

# Patogenetikai tényezők vizsgálata gyulladáso- s ízületi betegségekben

Doktori értekezés

**Joóné Baricza Eszter**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Nagy György, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Bácsi Attila, DSc, egyetemi docens  
Dr. Vásárhelyi Barna, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Fekete Béla, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Skaliczki Gábor, Ph. D, egyetemi adjunktus  
Dr. Bajtay Zsuzsanna, DSc, egyetemi tanár

Budapest, 2018.

**TARTALOMJEGYZÉK**

Rövidítések jegyzéke .....	4
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. A gyulladás immunológiai vonatkozásai.....</b>	<b>9</b>
1.1.1. A természetes és kóros autoimmunitás kialakulása .....	10
1.1.1.1. A perifériás és a centrális tolerancia mechanizmusai .....	12
1.1.1.2. Genetikai tényezők szerepe.....	13
1.1.1.3. Környezeti tényezők szerepe .....	14
1.1.1.4. A T- és B-sejtek .....	16
<b>1.2. A Th17-sejtek jelentősége az autoimmunitásban .....</b>	<b>21</b>
1.2.1. A T-sejtek érése és aktivációja.....	21
1.2.1.1. A T limfociták kialakulása.....	22
1.2.1.2. A T limfocita aktiváció folyamata .....	23
1.2.2. A humán Th17-sejtek differenciálódása és karakterizálása .....	25
1.2.3. A Th17-sejtek fiziológiás és pathológiás funkciója .....	32
1.2.4. Az aromás szénhidrogén receptor szerepe a Th17-sejtekben.....	33
<b>1.3. Az osteoclastok és az immunkomplexek szerepe a gyulladásban.....</b>	<b>39</b>
1.3.1. Az osteoclastok funkciója .....	39
1.3.2. Az immunkomplexek és autoantitestek jelentősége.....	41
<b>1.4. A rheumatoid arthritis és az arthritis psoriatica .....</b>	<b>43</b>
1.4.1. Rheumatoid arthritis .....	43
1.4.2. Arthritis psoriatica .....	45
1.4.3. Rheumatoid arthritis és arthritis psoriatica összehasonlítása .....	47
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>49</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Donorok .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. T-limfocita sejtek izolálása és tenyésztése .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3. In vitro Th17 differenciáltatás .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. In vitro osteoclast differenciáltatás .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5. Immunkomplexek előállítása .....</b>	<b>55</b>
<b>3.6. Dohányfüst elnyelése RPMI médiumban .....</b>	<b>55</b>
<b>3.7. Viabilitás mérés .....</b>	<b>56</b>

<b>3.8. mRNS génexpressziós vizsgálatok .....</b>	<b>57</b>
<b>3.9. Áramlási citometriás mérések .....</b>	<b>58</b>
<b>3.10. ELISA és ELISPOT mérések .....</b>	<b>60</b>
<b>3.11. Konfokális mikroszkópia .....</b>	<b>61</b>
<b>3.12. Statisztika .....</b>	<b>62</b>
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. A humán <i>in vitro</i> Th17-differenciálódás vizsgálata egészséges donorokban</b>	<b>63</b>
<b>4.2. AHR ligandok és immunkomplexek hatásának vizsgálata a Th17-sejtek és az osteoclastok differenciálódására .....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Aromás szénhidrogén receptor expresszió vizsgálata T sejtekben .....	70
4.2.2. AHR ligandok hatása a sejtek IL-17A termelésére .....	71
4.2.3. Az immunkomplexek hatása a Th17-differenciálódásra .....	73
4.2.4. Az immunkomplexek hatása az osteoclastok differenciálódására .....	74
<b>4.3. A Th17-differenciálódás vizsgálata egészségesekben, rheumatoid arthritises és arthritis psoriaticás betegekben .....</b>	<b>75</b>
4.3.1. Naiv sejtek vizsgálata és összehasonlítása .....	77
4.3.2. Differenciálódott sejtek vizsgálata és összehasonlítása .....	77
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>95</b>
<b>6. Következtetések .....</b>	<b>106</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>107</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>108</b>
<b>9. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>109</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>140</b>
10.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények .....	140
10.2. Az értekezéshez fel nem használt közlemények .....	140
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>142</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>rövidítés</b>	<b>kifejtés angolul</b>	<b>kifejtés magyarul</b>
3-MC	3-methylcholantrene	3-metilklorantén
ACPA	anti- cyclic citrullinated peptide antibody	ciklikus citrullinált fehérje elleni antitest
ACR	American College of Rheumatology	Amerikai Reumatológus Kollégium
AHR	aryl hydrocarbon receptor	aromás szénhidrogén receptor
AHRR	nuclear AHR repressor	sejtmagi AHR represszor fehérje
AICD	Activation-induced cell death	aktiváció indukált sejthalál
AIP	AhR Interacting Protein	AhR-interakciós fehérje
AIRE	autoimmune regulator	autoimmun regulátor
AOV	Analysis of Variance	variacionális analízis
AP	psoriatic arthritis	arthriti psoriatica
AP-1	activator protein 1	aktivátor fehérje 1
APC	antigen presenting cell	antigénprezentáló sejt
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	AhR nukleáris transzlokátor
B[a]P	Benzo[alpha]pyrene	benzo[a]pirén
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein	B-sejt limfóma 6 fehérje
BCR	B cell receptor	B-sejt receptor
DMARD	Disease-modifying antirheumatic drug	betegségmódosító antireumatikus szer
bDMARD	biological DMARD	biológiai DMARD
BNC2	basonuclin 2	-
CALCR	calcitonin receptor	kalcitonin receptor
CASPAR	Classification Criteria for Psoriatic Arthritis	arthriti psoriatica klasszifikációs kritériumrendszer
CATK	cathepsin K	katepszin K
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	CC kemokin ligand 20
CCR	C-C motif chemokine receptor	CC kemokin receptor
CD	cluster of differentiation	differenciációs klaszter
CD40L	CD40 ligand	CD40 ligand
CRP	C reactive protein	C-reaktív protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4	citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	C-X-C kemokin ligand 1
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor	C-X-C kemokin receptor
csDMARD	conventional DMARD	konvencionális DMARD
DAS	disease activity score	betegségaktivitási pontszám
DC	dendritic cells	dendritikus sejt
DC-STAMP	Dendritic Cells (DC)-Specific Transmembrane Protein	dendritikus sejt-asszociált transzmembrán fehérje
DIM	Diindolylmethane	diindol-metán

DMARD	disease modifying antirheumatic drugs	betegségmódosító antireumatikus szerek
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	enzim kapcsolt immunszorbens esszé
ELISPOT	Enzyme-linked immunoSpot	enzim kapcsolt immunszpot esszé
EOMES	eomesodermin	-
ESR	erythrocyte sedimentation rate	vérsejtsüllyedés
EULAR	European League Against Rheumatism	Európai Reuma Ellenés Liga
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	fluoreszcens-aktivált sejt szortolás
Fas	apoptosis antigen-1	apoptózis antigén 1
FasL	Fas ligand	Fas ligand
FBS	Fetal Bovine Serum	főtális borjúsavó
Fc	fragment crystallizable	-
FcR	Fc receptor	Fc receptor
FICZ	6-formylindolo(3,2-b)carbazole	-
FOXO4	Forkhead box protein O4	Forkhead box fehérje O4
FOXP3	Forkhead box P3	Forkhead box fehérje P3
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GATA3	GATA binding protein 3	GATA kötő fehérje 3
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor	granulocita kolónia stimuláló faktor
GM-CSF	granulocyte–monocyte colony-stimulating factor	granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor
HLA	human leukocyte antigen	humán leukocita antigén
HLH	helix-loop-helix	helix-loop-helix
HPRT-1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	hipoxantin foszforibozil transzferáz-1
HSP90	heat shock protein 90	hősokk fehérje 90
I3C	Indole-3-carbinol	indol-3-karbinol
I3S	indoxyl 3-sulfate	indoxil 3-szulfát
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	intracelluláris adhézións molekula 1
IFN $\gamma$	interferon gamma	interferon gamma
IFR4	Interferon regulatory factor 4	interferon reguláló faktor 4
Ig	immunoglobulin	immunglobulin
IKZF2	IKAROS Family Zinc Finger 2	-
IL	interleukin	interleukin
IL-23R	interleukin 23 receptor	interleukin 23 receptor
IL2R $\alpha$	IL-2 receptor alpha	IL-2 receptor alfa
IL2R $\alpha\beta\gamma$	IL-2 receptor alpha beta gamma	IL-2 receptor alfa béta gamma
ILC3	innate lymphoid cells 3	veleszületett limfoid sejtek 3-as típusa
IPEX	Immune dysregulation,	X-hez kötött öröklődésű

	polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked	immundiszreguláció, polyendocrinopátia, enteropathia szindróma
IRF-4	interferon-inducible factor-4	interferon indukált faktor 4
ITE	2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester	-
iTreg	induced Treg	indukált Treg-sejtek
KLRB1	killer cell lectin-like receptor B1	-
KYNA	kynurenic acid	kinurénsav
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3	leukocita aktivációs gén 3
LDA	linear discriminant analysis	lineáris diszkriminancia analízis
LDL	low density lipoprotein	alacsony denzitású lipoprotein
LFA-3	lymphocyte function-associated antigen 3	limfocita funkció-asszociált antigén
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting	Immunomágneses sejtszeparálás
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	monocita kemoattraktáns fehérje 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	makrofág kolónia stimuláló faktor
MG	myasthenia gravis	miaszténia grávisz
MHC	major histocompatibility complex	fő hisztokompatibilitási génkomplex
MMP	matrix metalloproteinases	mátrix metalloproteinázok
MS	multiple sclerosis	szklerózis multiplex
NFAT	activated T cell nucleic factor	aktivált T-sejt nukleáris transzkripció faktor
NFATc1	activated T cell nucleic factor 1 cytoplasmic 1	aktivált T-sejt citoplazmatikus nukleáris transzkripció faktor 1
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	aktivált B-sejt κ könnyűlánc nukleáris faktor enhancer
NK	natural killer	természetes ölő
NKT	natural killer T	természetes ölő T-sejtek
NSAID	NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug	nemszteroid gyulladásgátlók
nTreg	natural Treg	természetes Treg-sejtek
OPG	Osteoprotegerin	oszteoprotegerin
p23	prostaglandin E synthase 3	prostaglandin E szintáz 3
PAD	protein arginine deiminase	fehérje arginin dezimináz
PAMP	pathogen associated pattern	patogén asszociált molekuláris mintázat
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	perifériás mononukleáris sejtek
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polimerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PFA	paraformaldehyde	paraformaldehid
pMHC	peptide-MHC	peptid-MHC

PRR	Pattern recognition receptor	mintázatfelismerő receptorok
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	protein tirozin foszfatáz non-receptor 22
PU-1	purine-rich DNA sequence binding transcription factor 1	purin gazdag szekvenciát kötő transzkripció faktor 1
RA	rheumatoid arthritis	rheumatoid arthritis
RANK-L	receptor activator of nuclear factor kappa-B	nukleáris faktor $\kappa$ B receptor aktivátorának ligandja
RES	resveratrol	rezveratrol
RF	rheumatoid factor	rheumatoid faktor
<i>Rorc/</i> <i>RORC</i>	retinoic acid-related orphan nuclear receptor C variant 2	retinoinsav kapcsolt árvareceptor C 2 gén
ROR $\gamma$	RAR related orphan nuclear receptor gamma	-
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	-
rSPA	recombinant Staphylococcus Protein A	rekombináns Staphylococcus A fehérje
RT qPCR	real time quantitative PCR	valós idejű kvantitatív PCR
SE	shared epitope	közös epitóp
SFC	spot forming colony	kolónia formáló egység
SIC	soluble immune complex	szolubilis immunkomplex
SLE	systemic lupus erythematosus	szisztémás lupus erythematosus
SMAD	small mothers against decapentaplegic homolog	-
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	citokin szignalizáció gátló transzkripció faktor 3
STAT	signal transducer and activator of transcription	transzkripció szignál transzducer és aktivátor
Tbet/ TBET	T-box expressed in T cells	T-sejt eredetű T-box transzkripció faktor fehérje
<i>Tbx21/</i> <i>TBX21</i>	T-box transcription factor TBX21	T-box transzkripció faktor TBX21
Tc	cytotoxic T cell	citotoxikus T-sejt
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	-
TCR	T cell receptor	T-sejt receptor
Tem	T effector memory	effektor memória T-sejt
TGF $\beta$	transforming grow factor beta	tumor növekedési faktor béta
Th17	T-helper 17	T segítő 17 sejt
Tm	memory T cell	memória T-sejtek
TNFRSF4	TNF receptor superfamily 4	TNF receptor szupercsalád 4-es tagja
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrozis faktor alfa
Tr1	type 1 regulatory T	1-es típusú regulatórikus T-sejt
TRAF	TNF associated factor	TNF asszociált faktor
TRAP	tartrate resistant acidotic phosphatase	tartarát rezisztens savas foszfatáz

Treg	regulatory T cell	regulatórikus T-sejt
Trm	rezidual memory T cell	reziduális memória T-sejtek
tsDMARD	targeted synthetic DMARD	célzott szintetikus DMARD
TUKEB	-	Tudományos és Kutatás-Értékelési Bizottság
Tukey HSD	Tukey's honest significant difference test	-
XAP2	hepatitis B virus X-associated protein	hepatitis vírus X-asszociált fehérje
$\alpha$ -MEM	minimal essential medium alpha	mimumim esszenciális médium alfa



## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A gyulladás immunológiai vonatkozásai

Az immunrendszer egyik alapvető funkciója, hogy a „nem saját” illetve veszélyes molekulákat el tudja különíteni a „saját” és veszélytelen struktúráktól. Szöveti károsodás, trauma hatására vagy veszélyesként felismert molekulák és kórokozók megjelenése esetén az immunrendszer más szervrendszerekkel együttműködésben egy összetett eseménysorozatot indít el, amelyet gyulladásnak nevezünk. A gyulladás olyan fiziológiai folyamat, amelynek célja, hogy olyan sejteket, enzimeket, molekuláris hírvivőket és más faktorokat mozgósítson, amelyek ezen eseménysorozat eredményeképpen a szöveti ártalom elszigetelésében, a fertőző ágens elpusztításában vesznek részt és helyreállítják a szöveti integritást [1, 2].

A gyulladás folyamatában számos immunsejt részt vesz, amelyek egy része a helyszínen tartózkodik (pl. makrofágok, hízósejtek, dendritikus sejtek), másik részük szignálmolekulák segítségével (pl. citokinek, kemokinek), szabályozott módon jut a helyszínre (pl. granulociták, limfociták). Az ép kapillárisok falán való átjutás folyamata az ún. extravazáció, amelynek során a keringésből kilépnek a sejtek és az extracelluláris térben vándorolva érik el a gyulladás helyszínét. Az ide jutó sejtek effektor funkciójuknak megfelelően különböző mediátor molekulákat termelnek, kölcsönhatásba lépnek egymással, fagocitálnak, amely funkciók által a gyulladás hatása kiterjedhet más szervekre, szövetekre is. A gyulladás tüneteit már az i.e I. században megfigyelték (Celsus és Galenus), amely tünet együttes a szöveti hőmérséklet emelkedése, az e területen kialakuló értágulat, kapillárisátjárhatóság növekedése és folyadékkiáramlás következménye (pír - *rubor*, duzzadás - *tumor*, meleg - *calor*, fájdalom – *dolor*, funkciókárosodás - *functio laesa*). A gyulladás kiterjedését tekintve a csak egy szervet vagy körülhatárolható szövetet érintő (lokális gyulladás) és a teljes szervezetre kiterjedő (szisztémás gyulladás) esetekről beszélhetünk. A folyamat kialakulását követően néhány órával elindul a reakció megszüntetését elősegítő aktív helyreállító folyamat (gyógyulás), amely általában rövid idő elteltével, sikeresen és nyomtalanul lecseng (akut vagy heveny gyulladás). Ennek eredményeképpen a granulociták és limfociták apoptotizálnak, majd a makrofágok eltávolítják e sejtörmeléket amely anti-inflammatórikus citokinek (pl. tumor növekedési faktor béta /TGFβ/) termelésére serkenti őket, végül maguk is a nyirokereken keresztül távoznak a helyszínről [1, 2]. A

gyulladás elhúzódhat (idült vagy krónikus gyulladás) és pathológiás következményekkel járhat, ha a szervezet nem képes megszüntetni az azt kiváltó tényezőket. Krónikus gyulladást válthatnak ki sejtalkomponenseik révén bizonyos mikroorganizmusok (pl.: *Streptococcus* és *Staphylococcus* fajok) és az autoimmun betegségekben az autoantigének folyamatos jelenléte. A krónikus gyulladásban főképpen a limfociták játszanak szerepet és bizonyos gyulladásos citokinek (pl. tumor nekrosis faktor alfa /TNF $\alpha$ /, interferon gamma /IFN $\gamma$ /) termelődése fokozódik, amely jelentős szövetkárosodással jár és a kötőszövet degeneratív elváltozásához vezethet (fibrózis). Az ilyen jellegű gyulladás másik következménye a granulóma, amelyben az aktivált limfociták és makrofágok többmagvú óriássejteké olvadnak össze. Ez bármilyen szervben előfordulhat, de leggyakrabban a tüdőben alakul ki. Ebben, a szövetekben található csomószerű képletben a sejtek apoptotizálhatnak és kórokozók (pl. *Mycobacterium tuberculosis*) is felhalmozódhatnak. A granulóma belsejében a baktériumok „alvó” vagy „dormans” formában akár évekig is életben maradhatnak, amelyek kiszabadulása súlyos következményekkel járhat. Hosszú távon a krónikus gyulladás daganatos elváltozások kialakulásához is vezethet [1, 2].

### **1.1.1. A természetes és kóros autoimmunitás kialakulása**

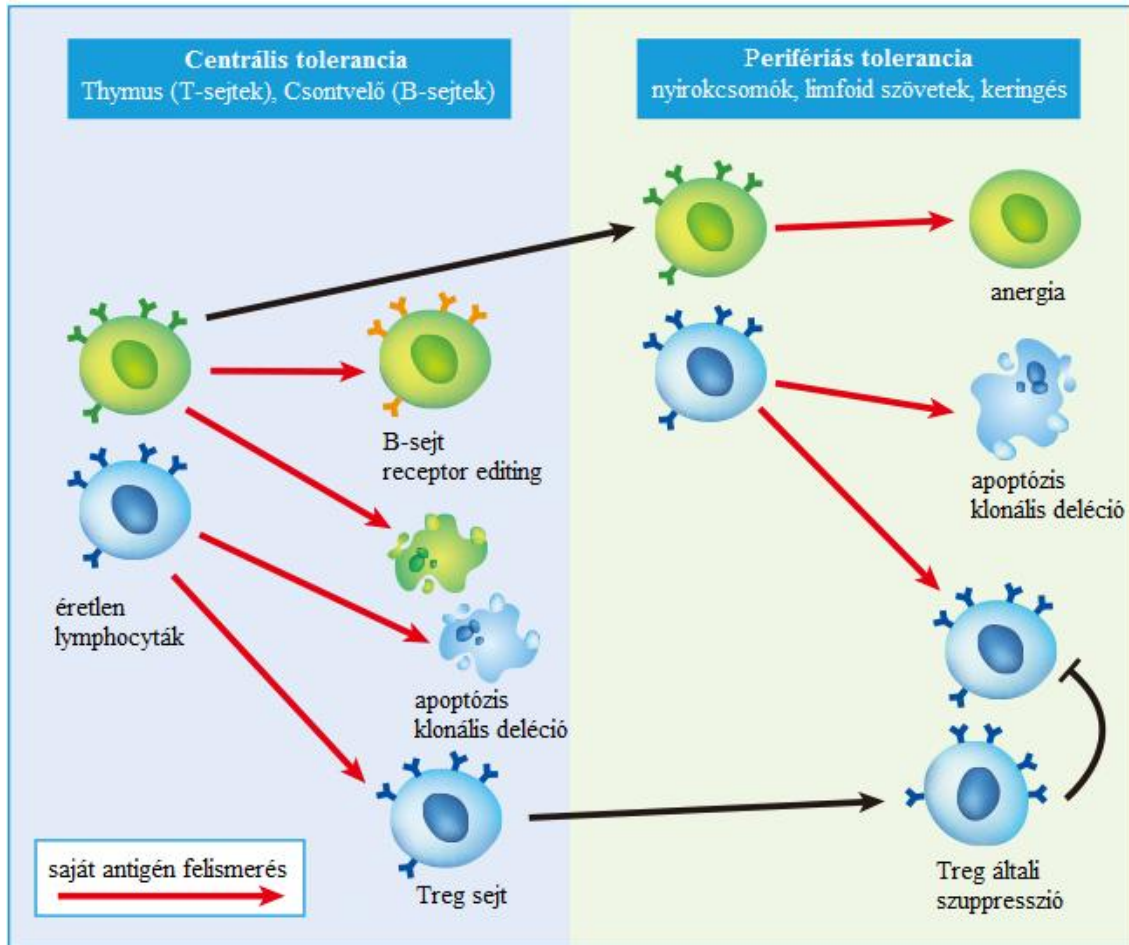
Az autoimmunitás az immunrendszer fellépése a szervezet saját antigénjeivel szemben. A következő fejezetben az autoimmunitás kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok és sejtek általános jellemzésére töreksem, a kóros autoimmunitás esetében az annak hátterében álló folyamatokat az ezt követő alfejezetekben fejtem ki részletesebben (lásd 1.1.1.1 - 1.1.1.3 fejezetekben). Az autoimmunitásban szerepet játszó autoreaktív T- és B-sejtek és a B-sejtek által termelt antitestek kis mennyiségben ugyan, de fiziológias körülmények között is megtalálhatóak a szervezetben, e sejtek hozzájárulnak a természetes autoimmunitáshoz. Annak ellenére, hogy a saját antigénekre specifikusak, a több szintű, precíz szabályzási mechanizmusoknak köszönhetően jelenlétük nem vezet betegség kialakulásához. E sejtek közös jellemzője, hogy antigénspecificitásuk és reakciókészségük eltér a pathológiás folyamatokban szerepet játszó autoreaktív sejtektől. Többféle, a szervezetben található molekulát tudnak felismerni (lásd részletesen az 1.2.2. fejezetben és 2. táblázatban), de kisebb affinitással, ily módon képesek ezen antigének „elrejtésére” a pathológiás, nagy affinitással felismerni képes

receptorral rendelkező sejtek elől. Emellett ezek a természetes autoantigének nagymértékű homológiát mutatnak az evolúciósan konzerválódott patogén eredetű antigénekkal, amelynek köszönhetően készenlétben tartható az adaptív immunválasz az ilyen típusú antigénekkal szemben. A természetes autoimmunitás, mint az egészségesen működő immunrendszer nélkülözhetetlen eleme, fontos szerepet játszik a szervezet működéséhez szükséges alapvető molekulák védelmében. Az ide sorolható polireaktív, B-sejtek által termelt antitestek, immunológiai homunkulusként” egy olyan hálózatot alkotnak, amely szabályozott módon együttműködve szolgálja az esszenciális molekulák védelmét [1, 2].

Kóros vagy pathológiás autoimmunitás több tényező (genetikai faktorok, környezeti tényezők) együttes hatása vagy kölcsönhatása eredményeképpen alakulhat ki. A kóros autoimmunitás kialakulásának elkerülésében lényeges szerepet játszanak az immutolerancia mechanizmusok, amelyeket az 1.1.1.1. fejezetben részletesen kifejttek. Az antigénprezentáció folyamatának megváltozása az autoimmunitás kialakulásának első lépése. E folyamatokban bekövetkezett hiba létrejöhet az immunsejtek kialakulása során, a centrális vagy perifériás tolerancia sérülésekor, vagy akár azt követően is, egyéb regulációs útvonalak működését érintő genetikai vagy környezeti hatások következtében. Az autoimmun betegségekben e folyamatok végeredményeképpen a szervezetben egy vagy több autoantigén „jelenik meg” és az erre specifikus receptorral rendelkező autoreaktív sejtek aktiválódnak. Az autoantigének és autoantitestek kapcsolódásából létrejövő immunkomplexek eltávolítása lényeges folyamat a gyulladás elkerülésében, amely hozzájárul az autoimmun folyamatokhoz (lásd részletesen az 1.3.2. fejezetben). Ezekben a komplementrendszer mellett a vörösvérsejtek és a makrofágok is fontos szerepet játszanak. Az elpusztult sejtek elégtelen eltávolítása esetén az ezekből felszabaduló antigének megnövelik T-sejt mediált autoimmun folyamatok esélyét, így az apoptózis működésével összefüggő gének hibája is autoimmunitást indukálhat. Minden olyan tényező, amely a toleranciát kialakító mechanizmusok egyensúlyát megbontja (szuppresszor és reguláló sejtek számának vagy aktivitásának csökkenése), így az autoantigének hozzáférhetőségének vagy dózisének (pl. fertőzés, gyulladás vagy trauma esetén), illetve a prezentáló sejtek funkciójának (pl. kostimulátor molekulák fokozott expressziója) változása autoimmun betegség kialakulásához vezethet [1, 2].

#### **1.1.1.1. A perifériás és a centrális tolerancia mechanizmusai**

A tolerancia az antigén inger hatására bekövetkező, az adott antigénre nézve fajlagos válaszképtelenséget jelent. Kialakulásának helye alapján megkülönböztetünk központi vagy centrális toleranciát, amely a központi nyirokszervekben (csontvelő és tímusz) a T- és B-sejtek érése során érvényesül, illetve a perifériás toleranciát, amely az érett sejtek esetében a nem patogén antigénekkal szemben fejeződik ki a perifériás nyirokszervekben (nyirokcsomók és lép). A centrális tolerancia mechanizmusai (klonális deléció, receptor editing) az elsődleges immunszervekben, a csontvelőben (B-sejtek) és a tímuszban (T-sejtek) zajlanak. Emellett ismerünk olyan szabályozó folyamatokat (anergia, klonális ignorancia, immunszuppresszió), amelyek segítségével a főleg nem patogén (pl. táplálék eredetű) antigénekkal szembeni perifériás tolerancia kialakítása történik (**1. ábra**) [1, 2].



**1. ábra:** A centrális és perifériás tolerancia mechanizmusa.

A T- é B-sejt receptor (BCR és TCR) specificitása a sejtek ontogenezis során a központi nyirokszervekben és azt követően, az érett sejtek esetében a perifériás nyirokszervekben többszörös ellenőrzésen esik át. A centrális tolerancia mechanizmusa során a saját antigénnel nagy affinitással reagáló sejtek apoptózissal elpusztulnak. A sejthalált receptoruk specificitásának, illetve affinitásának megváltoztatásával kerülheti el, amelyet „receptor editing”-nek nevezünk. A perifériás tolerancia során a saját antigénnel reagáló sejtek antigén inger hiányában szintén apoptózissal elpusztulhatnak, az antigén nagy dózissal jelenlétében vagy kostimulációs inger hiányában anergiával, illetve nagyon kis antigéndózis esetén ignoranciával reagálhatnak. A T-limfociták esetében a sajátfelismerés regulátor T-sejtek kialakulásához is vezethet. A nagy antigéndózis és a kostimuláció hiánya nem csak anergiás sejtek, hanem a szuppressziót végző sejtek képződéséhez is vezetnek mind központi, mind pedig a perifériás nyirokszervekben egyaránt (pl. Treg-sejtek). Ezek a sejtfelszínükön expresszált és általuk termelt faktorok révén gátolják a többi sejt funkcióit. Rövidítések: TCR: T-sejt receptor, BCR: B-sejt receptor  
 Forrás: <https://www.genscript.com/self-tolerance.html>. alapján

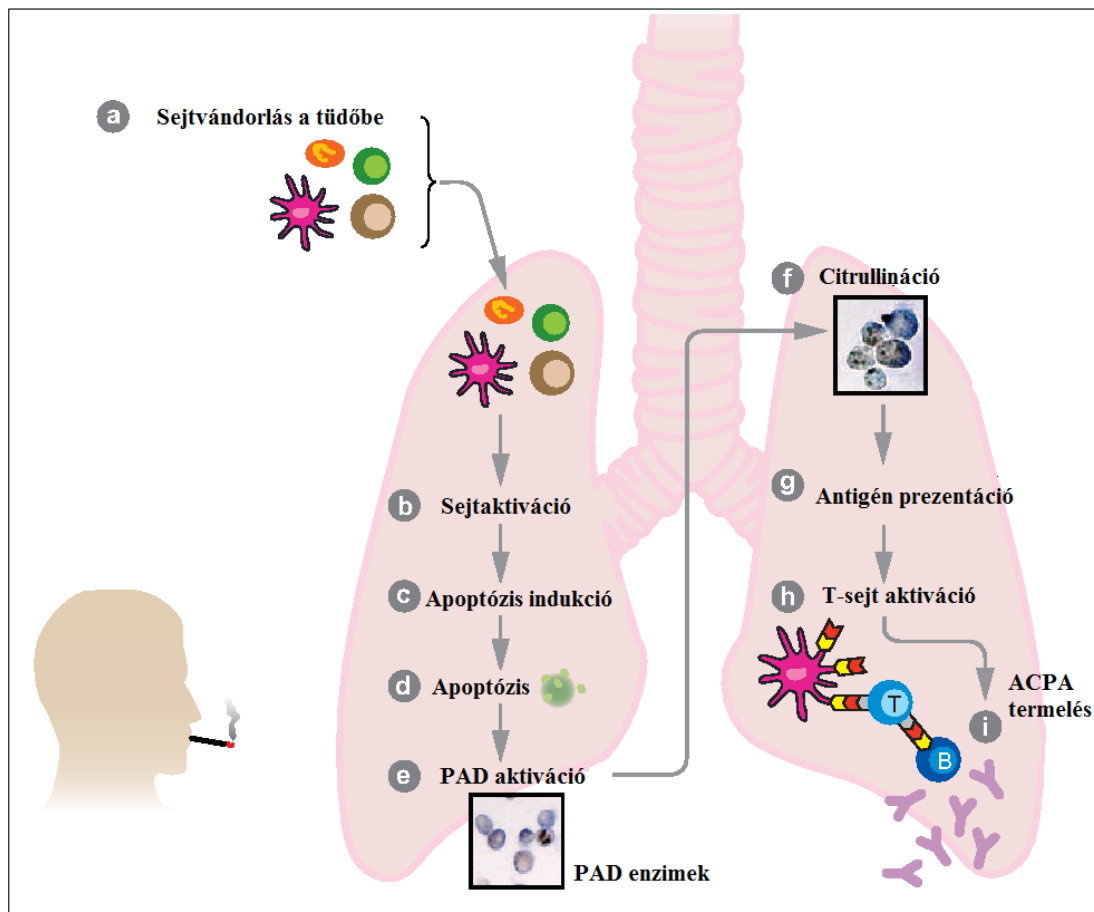
### 1.1.1.2. Genetikai tényezők szerepe

Az autoimmun betegségekről általában elmondható, hogy kialakulásukban több tényező játszik szerepet (multifaktoriális betegségek). Néhány kivételtől eltekintve az olyan autoimmun kórképekben mint például a rheumatoid arthritis (RA), a szisztémás lupus erythematosus (SLE), a sclerosis multiplex (MS), vagy a myasthenia gravis (MG), több

gén is érintett a betegség patomechanizmusában [1-3]. Genetikai tényezők közül a legfontosabbak az antigénprezentációban szerepet játszó molekulák, a fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC) gének, amelyeket emberben humán leukocita antigéneknek (HLA) nevezünk, és főképpen az immuntolerancia és az immunfolyamatok szabályozásában játszanak szerepet. Valamennyi autoimmun betegség esetében jellemző valamilyen mértékű HLA asszociáció, hiszen e molekulák szabják meg, hogy milyen antigének ellen indulhat a T-sejtek által közvetített immunválasz [4-6]. A HLA gének mellett több, az autoantigének feldolgozásában részt vevő vagy a folyamatot szabályzó molekula génje játszhat szerepet.. Ilyenek lehetnek az autoimmun regulátor (AIRE) [7, 8], az apoptózis szignál 1 (Fas) és ligandja (FasL) [9-11], a TIM1 és a TIM3 [12-15], a protein tirozin foszfatáz non-receptor 22 (PTPN22) [16] vagy a citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4 (CTLA4) [17-19] molekulák génei. A T- és B-limfocitáknak, mint jelfeldolgozó és effektor sejteknek ebben a folyamatban lényeges funkciójuk van.

#### **1.1.1.3. Környezeti tényezők szerepe**

Az olyan külső környezeti faktorok, mint például a dohányzás ismert hajlamosító tényező autoimmun egyes betegségekben (pl.: RA és SLE), amelyet már kb. az 1980-as évek vége óta ismernek [20-22]. Emellett leírták azt a molekuláris hatásmechanizmust, amely a genetikai és immunológiai tényezők kapcsolatát jellemzi e jól ismert környezeti tényezővel (**2. ábra**) [23, 24]. A dohányzás az RA kialakulásának egyik legfőbb rizikótényezője és HLA DRB1 shared vagy ún. „közös” epitóp (SE) hordozása esetén annak mértéke és kumulatív mennyisége korrelál a ciklikus citrullinált peptid elleni antitest (ACPA) titerrel és a betegség prognózisának súlyosságával [20, 23-29].



**2. ábra:** Az ACPA pozitív RA kialakulása dohányzás hatására.

A dohányzás hatására az immunsejtek a tüdőbe vándorolnak (a), ahol dohányfüst különböző toxikus komponensei aktiválják őket (b) és apoptózist indukálnak bennük (c-d). Az apoptózis hatására a PAD enzimek aktiválódnak (e) és deziminálják a tüdőben található fehérjéket (f), amelyek prezentálódnak (g) az autoreaktív T-sejteknek, így azok aktiválódnak (h). A T-sejtek a B-sejtekkel kapcsolatba kerülve autoantitestek (ACPA) termelődését segítik elő (i). Rövidítések: PAD: protein arginin dezimináz, ACPA: ciklikus citrullinált fehérje elleni antitest

Forrás: Klareskog, L., et al., Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 651-75. alapján [25].

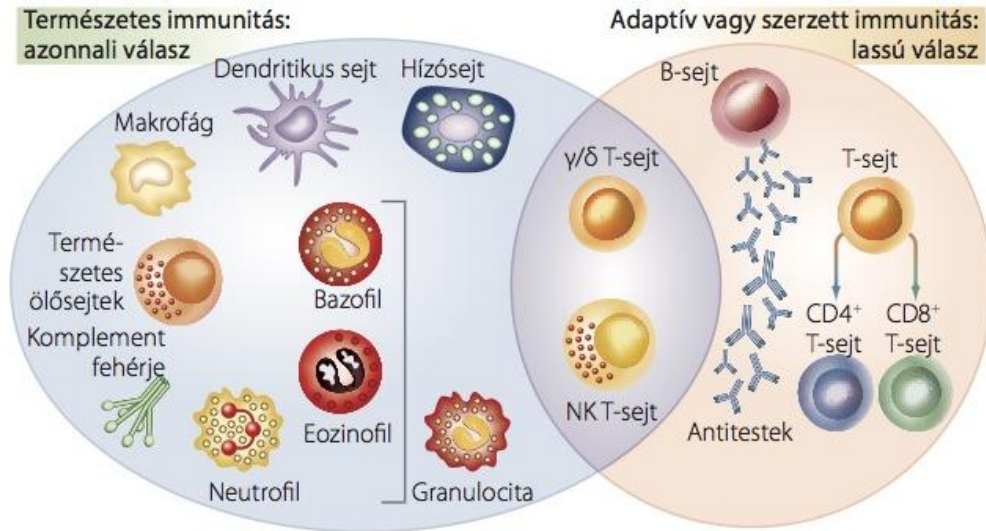
Környezeti tényezőként meg kell említeni a különböző fertőzéseket, amelyek az immunválasz kiváltása mellett annak toleranciát érintő mechanizmusait is befolyásolhatják. Az autoimmun betegségeken a fokozódó szövetkárosodás következtében barrieret átörve szabadulhatnak ki a szövetekből autoantigének. A helyszínen lévő számos antigénprezentáló sejt ezeket az újonnan felszabadult antigéneket, de akár a már korábban hozzáférhető molekulák további epitópjait prezentálhatja T-sejteknek, amelyek szintén további B-sejtek aktiválódását eredményezhetik. A jelenséget „epitóp spreadingnek” vagy „epitóp terjedésnek” nevezzük és hozzájárul az autoimmun betegségek progresszív jellegéhez. A molekuláris

mimikri során a kórokozók által kiváltott immunválasz olyan immunsejtek aktivációjához vezet, amelyek a kórokozó epitópjához hasonló szerkezetű saját antigént is fel tudnak ismerni. Ezek a keresztreakciót kiváltó epitópok a fertőzést követően autoimmun folyamatot indukálhatnak (*Streptococcus* fertőzés által kiváltott szívizomgyulladás és poliartitissel kísért reumás láz) [30-32].

#### **1.1.1.4. T és B limfociták szerepe az autoimmunitásban**

Az immunhomeosztázis fenntartásában alapvetően két, egymással szoros összhangban működő rendszer, a veleszületett vagy természetes és a szerzett vagy adaptív immunitás játszik szerepet (**3. ábra**). A limfocitáknak, mint az adaptív immunrendszer elemeinek, kulcsfontosságú szerepe van az immunválasz irányításában, amelynek első védelmi vonalát a természetes immunválasz sejtjeinek képezik. Az adaptív immunrendszer részét képezik a celluláris vagy sejtközvetített immunválaszban szerepet játszó T-sejtek és a humorális vagy ellenanyag közvetített immunválaszban közreműködő B-limfociták. E sejtek jellegzetessége, hogy a természetes immunválasz sejtjeitől eltérően a sejtklónok specifikus receptorral rendelkeznek, amelyek egyedi molekuláris részeket ún. antigén epitópokat ismernek fel. Az adaptív immunválaszra jellemző, hogy specifikus és fajlagos (az effektor funkciók az immunválaszt kiváltó antigén ellen jönnek létre), adaptív (az immunológiailag kompetens sejtek és antitestek recipiensbe történő átvitele védettséget biztosít), memóriával rendelkezik (az antigén másodszori bejutását követően kialakuló szekunder immunválasz gyorsabb és effektívebb, mint az első expozíciót követő primer immunválasz és szenzitív (az antigén bekerülésekor érzékennyé teszi a szervezetet, amely évek múltán is kimutatható). Az adaptív immunválasz kialakulásához a T- és B-sejtek aktiválódását követő klonális expanszió szükséges, amely néhány hétig tart [1, 2].





**3. ábra:** A természetes és az adaptív immunválasz sejtjei.

A natív vagy természetes immunitás sejtjei (makrofágok, dendritikus sejtek, hízósejtek, természetes ölüsejtek (NK), komplement rendszer, granulociták) evolúciósan konzervált patogén mintázatok (patogén asszociált molekuláris mintázat, PAMP) felismerésében játszanak szerepet, amelyeket a sejteken ugyanazok a receptorok ismernek fel (mintázathelismereő receptorok, PRR). A szerzett vagy adaptív immunitás sejtjei a limfociták (T és B-sejtek), amelyeken egyedi receptorok segítik a különböző fehérje epitópok felismerését és az arra specifikus immunválasz elindítását. Antigenfelismerési és funkcionális sajátosságai révén köztes csoportot képviselnek a természetes ölü T-sejtek (NKT) és a gamma-delta T-sejtek. A két rendszer tagjai szorosan együttműködnek és biztosítják az immunhomeosztázist.

Forrás: Dranoff, G., Nat Rev Cancer, 2004. 4(1): p. 11-22. alapján [33]

A T- és B- limfociták különféle alcsoportokra oszthatók, az egyes sejt szubpopulációknak pedig más-más immunológiai funkciója van. Ebben a fejezetben a B sejtek röviden, a T sejtek részletesebben kerülnek beutatásra. Sejtfelszíni markereik alapján a B-sejteket differenciálódási klaszter (CD)  $5^+$  és  $5^-$  populációkra, míg a CD3 molekulát kifejező T-sejteket  $CD4^+CD8^- \gamma\delta$ ,  $CD4^+CD8^- \alpha\beta$  és  $CD4^-CD8^+ \alpha\beta$  populációkra oszthatjuk (**1. táblázat**) [1, 2, 34, 35].

A B-sejtek 5-10%-a, amelynek felszínén kifejeződik a CD5 molekula, jellemzően autoreaktív. Ezek főleg immunglobullin (Ig)M izotípusú, alacsony affinitású, saját antigénekre specifikus ellenanyagokat (természetes autoantitestek) termelnek.. Az autoreaktív sejtek keletkezése az 1.1.1.2-1.1.1.3. fejezetekben tárgyalt okokra vezethető vissza, amelyhez a B-sejtek különböző – főképpen antitestfüggő – effektorfunkciókkal járulnak hozzá. A legfontosabbak az autoantitest termelés (lásd részletesen az 1.3.2.. fejezetben), az autoantigének prezentálása, különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek (pl. interleukin /IL/-4, IL-6, IL-10, IL-21, interferon gamma /IFN $\gamma$ /, tumor

növekedési faktor béta /TGF $\beta$ /) termelése, a gyulladós szövet (ektópiás germinális centrum) és immunkomplexek létrehozása [36-38].

A T- és B-limfociták alcsoportjai között található autoimmunitást elősegítő vagy fenntartó, illetve e folyamatokat gátló alpopulációkat egyaránt. A naiv T-sejtekből antigén inger hatására memória T-sejtek (T<sub>m</sub>) keletkezhetnek, amelyek számos effektor funkcióval rendelkezhetnek. Autoimmun betegségek esetében az antigéninger folyamatossága elősegíti, hogy az ismételt expozíciót követően a T<sub>m</sub> sejtek a célszövetbe migráljanak és effektor funkciójuk legyen [39, 40]. Autoimmun folyamatok általában az autoreaktív T helper (Th) sejtek közreműködésével alakulhatnak ki. Az antigénnel való kölcsönhatás eredményeképpen a Th sejtek számos limfokint termelnek. Ezek olyan kisméretű glikoproteinek, amelyek számos sejt differenciálódását és funkcióját befolyásolhatják (pl. B-sejtek, makrofágok). Kemoattraktánsok lehetnek, amelyek a gyulladás során a granulocitákat, a makrofágokat és a limfocitákat a gyulladás helyszínére vonzzák. Serkentik a B-T-sejt interakciót és befolyásolhatják a B-sejt autoantitest termelését.

A Th1 sejtek főképpen makrofágokat aktiváló citokineket (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , makrofág gyulladós fehérje /MIP $\gamma$ -1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and tímusz eredetű kemotaktikus szer /TCA/-3) termelnek, amellyel hozzájárulnak a központi idegrendszerben zajló gyulladós folyamatokhoz (pl.: sclerosis multiplexben) [41, 42]. A Th1 sejtek gyulladást indukáló szerepét már kollagén indukált arthritis egérmodellben [43] és gyulladós bélbetegségben egyaránt [44] igazolták, melyben a differenciálódásukhoz szükséges faktoroknak, a T-sejt eredetű T-box transzkripciós faktor fehérjének (Tbet), és az IL-12-nek fontos szerepe van.

Míg a Th1 sejtek fiziológiai körülmények között főleg az intracelluláris kórokozók elleni védelemben játszanak szerepet, addig a Th2 sejtek a humorális immunválasz közvetítőiként az extracelluláris kórokozók, férgek és paraziták elleni immunvédekezés elősegítői. Olyan citokineket termelnek (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) amelyek a B-sejtek aktiválását és antitesttermelését befolyásolják [1]. Ennek ismeretében talán nem meglepő, hogy szerepét olyan autoimmun betegségben igazolták, ahol a B-sejtek és az általuk termelt autoantitestek szerepe számottevő. Leírták, hogy SLE-ben az IL-4-nek kettős hatása van a betegség patomechanizmusában, hiszen serkenti a B-sejtek izotípusváltását, autoantitest termelését és hozzájárul a gyulladáshoz, ugyanakkor

gátolhatja is az autoimmun folyamatokat (valószínűleg a Th1 sejtek gátlásán keresztül) [41, 45].

A Th9 sejtek olyan T-sejt populáció, amely TGF $\beta$  és IL-4 hatására differenciálódik és főképpen IL-9-et termel. A Th2 és Treg-sejtekhez hasonlóan kisebb mértékben, de IL-4-et is termel, valamint a forkhead box P3 (FoxP3)-at expresszál. [46, 47]. A Th2 sejtekhez hasonlóan a Th9 sejteknek és az általuk termelt IL-9-nek is kettős funkciója van. Egyfelől az IL-9 támogatja a Treg-sejtek gyulladásgátló funkcióit, ugyanakkor SLE-s és RA-s betegek szérumában a citokin mennyisége nagyobb. [48, 49]. SLE betegekben a Th9 sejtek mennyisége pozitívan korrelál a betegségaktivitással. Emellett a Th9 sejtek és/vagy az IL-9 szerepe más autoimmun betegségben is feltételezhető (pl. RA, a sclerosis multiplex vagy gyulladásgátló bélbetegség) [49-51].

Az autoimmunitás kialakulásában meghatározó szerepük van a T helper 17 (Th17) sejteknek (lásd részletesen az 1.2. fejezetben) [52]. A Th17-sejtek és a Treg-sejtek reciprok kapcsolatát gyakran egy kétkarú mérleggel szokták ábrázolni. A mérleg egyik karja a gyulladást szimbolizálja, amelyben a Th17-sejtek szerepe számottevő. A másik karon az immunológiai tolerancia ábrázolható, amelynek mechanizmusában a szabályzó Treg-sejtek játszanak fontos szerepet, egyensúlyt tartva a gyulladásgátló folyamatokkal. Kapcsolatuk a differenciálódásukat tekintve is összefügg, hiszen mindkét sejt közös prekursorból származik és differenciálódásához TGF $\beta$  szükséges [53]. A regulatórikus T (Treg) sejtek szerepe igen sokrétű az immunológiai tolerancia fenntartásában. A Treg-sejtek lehetnek tímusz eredetű természetes Treg-sejtek (nTreg) vagy a periférián TGF $\beta$  hatására differenciálódó indukált Treg (iTreg) sejtek. Számos természetes és adaptív immunsejt funkcióját szabályozzák többféle módon, mint például gátló citokinek (pl. IL-10, IL-35, TGF $\beta$ ) termelésével, közvetlen perforinfüggő sejtpusztítás révén (pl. granzimek termelése), anyagcsere útvonalak gátlása (pl. CD25 receptorának IL-2 megkötése és adenzin vagy ciklikus adenzin monofoszfát termelése), vagy a dendritikus sejtek funkciójának modulálása révén (pl. citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4 /CTLA-4/ – gátolja a dendritikus sejt (DC) kostimulátor expresszióját, leukocita aktivációs gén 3 /LAG-3/ – gátolja a DC antigénprezentációját) [1, 2]. A FoxP3 gén mutációi X-hez kötött öröklődésű immundiszreguláció, polyendocrinopátia, enteropathia szindróma (IPEX) kialakulásához vezetnek. A Treg-sejtek funkciójának hiánya emellett már autoimmun betegségekben is kimutatható, mint például SLE-ben

[54] vagy autoimmun encephalomyelitisben (sclerosis multiplex állatmodellben igazolt) [55]. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a Treg-sejtek differenciálódása bizonyos mértékig reverzibilis, amelynek következtében nemcsak elveszthetik immunszuppresszív funkciójukat, de gyulladást indukáló fenotípusú sejté is alakulhatnak [56, 57].

Egy másik ugyancsak a  $CD4^+$  sejtek közé tartozó szuppresszív funkciójú sejtípus, az ún. 1-es típusú regulatórikus T-sejt (Tr1) [58]. E sejtek  $TGF\beta$ , IL-27 és IL-21 hatására differenciálódnak és a Treg-sejtekkel ellentétben FoxP3-at nem expresszálnak [41, 59]. T-sejt receptor (TCR) aktiválódást követően a sejtek IL-10-t,  $TGF\beta$ -t,  $IFN\gamma$ -t termelnek és kis koncentrációban IL-2-t és IL-4-et [60]. Az IL-10 gátolja a gyulladáshoz vezető citokinek termelődését, az antigénprezentációt valamint a sejtproliferációt. A  $CD4^+$  IL-10<sup>+</sup> T-sejtek ezen antigénspecifikus szuppresszív szerepét igazolták arthritis, gyulladáshoz vezető bélbetegség és sclerosis multiplex egérmodellekben [58].

A T-sejtek főbb alcsoportjain megtalálható sejt felszíni molekulákat és az egyes alcsoportokat definiáló mester regulátor géneket (transzkripciós faktorokat) az 1. táblázatban foglaltuk össze.

## 1. táblázat: A főbb T-sejt alcsoportok sejtfelszíni markerei és expresszált transzkripciós faktoraik.

A táblázatban a teljesség igénye nélkül foglaltuk össze a T-sejtek különböző alcsoportjainak sejtfelszíni markereit és transzkripciós faktoraikat. Rövidítések: Th: helper T-sejt, Tc: citotixikus T-sejt, TCR: T-sejt receptor, CD: differenciációs klaszter, CCR: C-C kemokin receptor, CXCR: C-X-C kemokin receptor, *TBX21*: T-boksz fehérje 21, STAT: signal transducers and activators of transcription, *GATA3*: GATA kötő fehérje 3, *IFR4*: interferon reguláló faktor 4, *PU-1*: purin gazdag szekvenciát kötő transzkripciós faktor 1, *RORC*: RAR Related Orphan Receptor C variant 2, *BNC2*: basonuclin 2, *FOXO4*: Forkhead box fehérje O4, *AHR*: aromás szénhidrogén receptor, *BCL6*: B-sejt limfóma 6 fehérje, *FOXP3*: forkhead box fehérje P3, *IKZF2*: IKAROS Family Zinc Finger 2, *EOMES*: eomesodermin.

Forrás:

<https://resources.rndsystems.com/images/site/rnd-systems-tcell-subsets-pm-1728.png>

[https://www.miltenyibiotec.com/\\_Resources/Persistent/321261780bc5f2b6e4257bd90cfa8c54a9500c10/T%20Cell%20Quick%20Guide.pdf](https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/321261780bc5f2b6e4257bd90cfa8c54a9500c10/T%20Cell%20Quick%20Guide.pdf) [34, 35]

Sejttípus	Csoport	Alcsoport	Sejtfelszíni molekula	Transzkripciós faktor
minden $\alpha\beta$ T-sejt			TCR $\alpha\beta$ , CD2, CD3, CD45, CD28	-
	Th sejtek		CD4	-
		Th1 sejtek	CD94, CXCR3, CCR5	<i>TBX21</i> , <i>STAT1</i> , <i>STAT4</i>
		Th2 sejtek	CCR3, CCR4, CXCR4	<i>GATA3</i> , <i>STAT6</i>
		Th9	CCR6	<i>IRF4</i> , <i>GATA3</i> , <i>STAT6</i> , <i>PU-1</i>
		Th17	CD161, CCR4, CCR6	<i>RORC</i> , <i>STAT3</i>
		Th22	CCR4, CCR6, CCR10	<i>BNC2</i> , <i>FOXO4</i> , <i>STAT3</i> , <i>AHR</i>
		Tfh	CD69, CXCR5, CCR7	<i>STAT3</i> , <i>BCL6</i>
		Treg	CD25 (IL-2R $\alpha$ ), CD152 (CTLA-4), CD127, GITR,	<i>FOXP3</i> , <i>IKZF2</i> , <i>STAT5</i>
	Tc sejtek		CD8, CD107a, CD178, CXCR3	<i>TBX21</i> , <i>EOMES</i>
$\gamma\delta$ T-sejtek			TCR $\gamma\delta$ , CD4 $^{+/-}$ , CD8 $^{+/-}$ , CXCR4, CD161	<i>EOMES</i> , <i>GATA3</i> , <i>PLZF</i> , <i>RORC</i> , <i>TBX21</i>

## 1.2. Th17-sejtek jelentősége az autoimmunitásban

### 1.2.1. A T-sejtek érése és aktivációja

### 1.2.1.1. A T limfociták kialakulása

A T-sejtek a magzati máj, később csontvelői eredetű limfocita progenitorból származó immunsejtek, amelyek a tímuszba vándorolva különböző érési folyamatokon mennek keresztül (limfopoézis) [61]. A fejlődő T-sejtek (timociták) a tímusz külső kéreg alatti állományából indulva, a kéreg (cortex) majd kéreg-velő határ felé haladva végül a velőben (medulla) fejezik be érési folyamatukat, ahonnan a perifériára kerülnek. Kezdetben sem T-sejt receptort, sem a T-sejtekre jellemző egyéb sejtfelszíni szignalizációs vagy koreceptorokat (CD3, CD4, CD8) nem hordozzák (dupla negatív sejtek). Elsőként a gamma-delta és alfa-béta T-sejt receptor láncok fejeződnek ki, majd az alfa-béta láncokat expresszáló – a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> koreceptorokat is hordozó (dupla pozitív) – T-sejtek (a progenitorok kb. 90%-a) közül az MHCII-t felismerők CD4<sup>+</sup> (T helper sejtek, Th), míg az MHCI-t felismerők CD8<sup>+</sup> sejtekké (T citototoxikus sejtek, Tc) érnek. A timociták érése sejt-sejt interakciók révén valósul meg amelyet tímuszban található epitelsejtek, makrofágok és dendritikus sejtek biztosítanak. A kéregben zajló pozitív szelekció során a corticalis epitelsejteken bemutatott MCH+peptid komplexet felismerő timociták túlélnek, ugyanakkor az MHC molekulát nem ismerik fel apoptózissal elpusztulnak. A negatív szelekció során a medulláris epitelsejtek és kérgi dendritikus sejtek által bemutatott MHC asszociált saját epitóp felismerésének erőssége (affinitás) alapján történik a szelekció. Itt a koreceptor (CD4 vagy CD8) MHC-hez való kapcsolódása is szükséges, ha ez megtörténik (MHCI-CD8 vagy MHCII-CD4) a sejt túléli a szelekciót, ha a koreceptorok nem ismerik fel az MHC-t vagy ha nagy affinitással kötődik a T-sejt receptor, a timocita apoptózissal elpusztul. A medulláris epitelsejtekre jellemző egyedi génexpressziós képesség birtokában valamennyi, a szervezetre jellemző saját antigén prezentálódik az érő timocitáknak. A szelekciós mechanizmusoknak köszönhetően, amelyek a centrális tolerancia részét képezik, olyan T-sejtek kerülnek ki a perifériára, amelyet az MHC molekulán prezentált idegen eredetű antigént képesek nagy affinitással felismerni [61].

A naiv T-sejtekből az antigén expozíciót követően rövid életű effektor sejtek és hosszú életű memória sejtek keletkeznek. A memória sejtek közé tartoznak a szövetekben letelepedő effektor memória (Tem) és a centrális memória (Tcm) sejtek. A Tcm sejtek nagyfokú proliferációs kapacitással rendelkeznek és főleg a másodlagos immunszervekben találhatóak meg. Ezzel szemben a rövidebb életű és kisebb proliferációs kapacitással

rendelkező Tem sejtek a célszövetekben találhatóak, és számos effektor funkciójuk lehet [39, 62]. Valamennyi említett T-sejt típus keringésben a szervezetben a keringés és a nyirokrendszer között. Létezik azonban egy kevésbé ismert csoport, a reziduális memória T-sejtek (Trm), amelyek nem találhatóak meg a keringésben, mozgásuk kizárólag a nem limfoid szövetekre korlátozódik [39, 40].

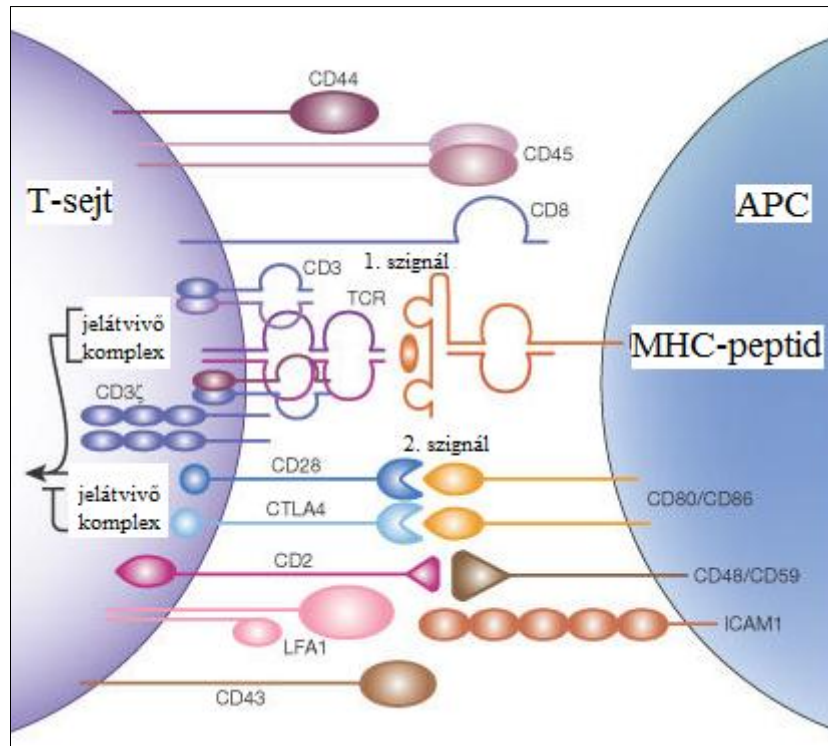
### 1.2.1.2. A T limfocita aktiváció folyamata

Az immunológiai szinapszisok olyan molekuláris kontaktusok, amelyek antigénprezentáló sejtek és limfociták között jönnek létre és rendkívül fontos szerepet játszanak a T-sejt funkciók irányításában. Ennek kialakításában számos receptor-ligand komplex, intra- és extracelluláris jelátvivő molekula játszik szerepet. A T-sejtek ún. kettős felismerést végeznek, csak az antigénprezentáló sejtek által „molekulárisan feldolgozott” antigének felismerésére képesek [61, 63].

A T-limfociták folyamatosan aktívan monitorozzák környezetüket, és rövid ideig tartó kontaktusok révén „letapogatják” az ott található molekuláris felszínt. Amennyiben egymással kölcsönható molekulák találkoznak, egy ilyen kontaktus révén kialakulhat az immunológiai szinapszis. A T-sejt aktivációjához két szignál szükséges (**5/A ábra**). Az első szignál az MHC-epitóp együttes kapcsolódása a T sejt receptorhoz, amelynek hatására a T-sejten fokozódik az adhéziós molekulák száma, így szorosabb kölcsönhatást tesz lehetővé. A szinapszisban a TCR-MHC+peptid komplex helyezkedik el középen, míg az adhéziós molekulák annak szélén stabilizálják a kapcsolatot. A TCR ligand kötését követően gyors szignalizációs kaszkádot indít be a sejtben, melynek következménye a citoplazmatikus kalcium szint emelkedése, egyes fehérjék és lipidek aktiválódása és különböző gének expressziója. A második szignál a kostimuláció, amelyben a nyugvó T-sejteken is kifejeződő CD28 vesz részt, amelynek ligandjai az APC felszínén a B7.1 (CD80) és a B7.2 (CD86) molekulák. Kostimulációs inger hiányában a sejtek anergiásak lehetnek vagy apoptózissal elpusztulhatnak. A CD28 kis affinitással képes kötni az aktivált antigénprezentáló sejt (APC) felszínén átmenetileg (az aktivációt követő néhány óra vagy nap elteltével) megjelenő B7.1-et és a kisebb mértékben (ugyanakkor az aktivációt követően azonnal indukálható módon) konstitutívan expresszáló B7.2-t. Az aktivált sejtek életképességének fokozásához, az effektor és memóriasejtek kialakulásához hozzájárulnak a TNF receptor molekulacsalád

egyed tagjai (pl.: CD40, CD137, TNF receptor szupercsalád 4-es tagja /TNFRSF4/, CD27) is. Ezen kölcsönhatások az APC-k és a T-sejtek között (**5/B ábra**) nemcsak a T-sejt, hanem az APC számára is lényeges előnyös funkcionális következményekkel járnak (pl. B-sejt esetében az antitesttermelés és az izotípus váltás). A hivatásos APC-ken konstitutívan expresszáldó CD40 molekula az aktivált T-sejteken megjelenő CD40 liganddal (CD40L) kapcsolódva fokozza az APC felszínén a B7 expresszióját. A CD28 által közvetített jelátviteli mechanizmus a nagy affinitású IL-2 receptor alfa (IL2R $\alpha$ ) és IL-2 citokin gének expresszióját indukálja a T-sejtben. Az IL-2 citokin termelésével a T-sejt autokrin módon szabályozza a sejtfelszíni nagy affinitású IL-2 receptor alfa béta gamma (IL2R $\alpha\beta\gamma$ ) kifejeződését, amelynek köszönhetően az aktivált T-sejtek intenzív sejtosztódásba kezdenek (klonális expanzió). A T-sejt aktiváció leállításáért az aktivált T-sejtek felszínén megjelenő CTLA-4 koinhibitor felelős. Nyugalmi állapotban a CTLA-4 egy adapter fehérjéhez kapcsoltna a sejt belsejében található, majd a TCR általi aktivációt követő szignalizációnak köszönhetően expressziója fokozódik, megjelenik a sejtfelszínen majd a citoszkeleton segítségével a szinapszis területére vándorol. A CTLA-4 nagyobb affinitással képes a B7 kötésére, mint a CD28, amely kapcsolódás az IL-2 termelés gátlásához és a sejtciklus leállításához vezet. Az aktiváció megszűnését követően az APC-ről leváló T-sejtek a későbbiek során még képesek osztódásra, illetve effektor és memória sejtté érésre is. Ugyanakkor a sejtek az ismételt saját antigénnel való aktiváció, a magas antigén koncentráció vagy a túl erős TCR stimulus következtében az aktiváció indukált sejthalál (AICD) folyamatában el is pusztulhatnak, amely hozzájárul a perifériás tolerancia folyamatához [1, 64, 65].





**4. ábra:** A T-sejt aktivációt szabályozó szignálok és molekulák.

A T-sejtek aktivációjához két szignál szükséges. Az első a peptid-MHC komplex (pMHC) és a T-sejt receptor (TCR) kötődése, a második pedig a kostimulációs receptor ligand komplexek (CD28-B7) kapcsolódása. Az ezek által kiváltott molekuláris szignalizációs útvonalak eredményeképpen felszabaduló citokinek segítik a T-sejtek effektor sejté érését. Az immunológiai szinapszisban az MHC-peptid-TCR kapcsolódás annak közepén helyezkedik el, amelyet a koreceptorok (CD4/CD8, CD28) és az adhéziós molekulák stabilizálnak (LFA-3-ICAM-1, CD2-CD48). APC: antigén prezentáló sejt, Th sejt: T helper sejt, CD: differenciációs klaszter, MHC: fő hisztokompatibilitási génkomplex, LFA-3: limfocita funkció-asszociált antigén, ICAM-1: intracelluláris adhéziós molekula 1,

Forrás: Boes, M. and H.L. Ploegh, Nature, 2004. 430 (6996): p. 264-71. alapján [64].

### 1.2.2. A humán Th17-sejtek differenciálódása és karakterizálása

A T limfocita alcsoportok elkülönítésének kezdete az 1970-es évek végére tehető, amelynek sikeréhez nagyban hozzájárult a citokin kutatások fellendülése, lehetővé téve a T-sejtek által termelt citokinek elkülönítését és hatásának vizsgálatát [66]. Egérben a Th17-differenciálódása alapjaiban ugyan hasonlóan zajlik, mint emberben, azonban lényeges különbségek vannak a két folyamat között (**2. táblázat**) [67]. Munkánk során a humán Th17-sejtek differenciálódását vizsgáltuk, így a következőkben, az e folyamatban szerepet játszó legfontosabb citokineket és azok szerepét foglaljuk össze.

A humán IL-17 termelő sejtek a killer cell lectin-like receptor B1 (KLRB1) vagy CD161<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> progenitor sejtkeiből keletkeznek, amelyek konstitutívan expresszálják a

RAR related orphan nuclear receptor gamma ( $ROR\gamma$ ), az interleukin 23 receptor (IL-23R) és a (CC kemokin receptor) CCR6 fehérjét. Az IL-17 termelő sejtfeleségek e progenitorból IL-1 $\beta$  és IL-23 hatására differenciálódnak [68-70]. A TGF $\beta$  szerepe a humán Th17-differenciálódásban több irodalmi forrás alapján korábban kérdéses volt, ugyanis azt megerősítő és cáfoló adatok is fellelhetők voltak az irodalomban [71-75]. E. V. Acosta-Rodriguez és munkacsoportjának eredményei alapján a humán Th17-differenciálódás elindulásához IL-1 $\beta$  szükséges, míg a folyamat fenntartása IL-6 és TGF $\beta$  jelenlétét igényli, az IL-12 pedig gátolja azt. Az IL-1 $\beta$  jelenléte indukálja mind a  $ROR\gamma$  és az IL-17, mind pedig az IFN $\gamma$  termelődését, míg az IL-6 az IFN $\gamma$  termelődésének gátlása mellett fokozza a sejtek IL-17 termelődését. A munkacsoport eredményei alapján a TGF $\beta$  jelenléte gátolja a humán Th17-differenciálódást, a csak IL-17 termelő sejtek sokkal érzékenyebbek e citokin jelenlétére, mint azok amelyek IFN $\gamma$ -t is termelnek [71]. N. J. Wilson és munkacsoportja megerősítette ezt a megfigyelést, miszerint TGF $\beta$  és IL-6 fiziológiás koncentrációban nem elégségesek IL-23 hiányában a humán Th17-differenciálódás indukációjához. E két citokin kizárólag IL-23 jelenlétében indukálja az IL-17A, -F és IL-22 citokinek termelődését, amelynek jelenléte szükséges az IL-23R kifejeződéshez, amely az IL-17 termelő memória sejteken megtalálható molekula [72]. Ellenben L. Yang és munkacsoportja azt találta, hogy a TGF $\beta$  és az IL-21 jelenléte a humán naiv T sejtekből történő Th17-differenciálódás elindulásához, míg az IL-1 $\beta$  és az IL-6 a centrális memória sejtek IL-17 termelődéséhez szükséges. Az IL-21 ugyan indukálja a sejtek IFN $\gamma$  termelését is, ám azt a jelenlévő TGF $\beta$  gátolja, tehát olyan sejtek alakulnak ki, amelyek IL-17-t igen, de IFN $\gamma$ -t nem termelnek [75]. Később más irodalmi források is megerősítették, hogy a TGF $\beta$  szükséges a humán Th17-differenciálódáshoz [73-76]. A timusz, illetve köldökzsínór vér eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejt prekursor sejtek IL1 $\beta$  és IL23 hatására TGF $\beta$  hiányában is termelhetnek IL-17-et, hiszen e sejtek között számos memória fenotípusú is található. Ezen prekursorok további Th17 irányú differenciálódásához szükséges a TGF $\beta$ , a korábban említett IL-1 $\beta$  és IL-23 inkább a sejtek aktivációjához és expanziójához, sem mint a *de novo* differenciálódáshoz szükségesek [76]. A megfigyelések alapján a TGF $\beta$  indirekt módon indukálja a Th17-differenciálódást, mégpedig a TBET expresszió, azaz a Th1 fenotípus kialakulásának gátlásán keresztül, amelyhez az IL-1 $\beta$  és az IL-23 citokinek jelenléte is hozzájárul [77].

Az IL-23-nak lényeges szerepe van a humán Th17-sejtek expanziójában és fenotípusuk stabilizációjában, amely megfigyelést szintén több irodalmi adat is megerősít. Az IL-23 kezelés hatására a ROR $\gamma$  expresszió fokozódik, amely serkenti a sejtek IL-17 és IL-22 termelését, valamint saját receptorának (IL-23R) expresszióját. [72, 78, 79]. Egerekben az IL-6 elősegíti a signal transducers and activators of transcription 3 (*Stat3*) aktivációját, amely szintén fokozza a Ror $\gamma$  expresszióját, így ugyancsak fontos szerepet játszik a Th17-differenciálódásban [53, 80, 81]. A fertőzés, sérülés és gyulladás serkenti az IL-6 termelődését, amely egérben gátolja a TGF $\beta$  indukált Treg differenciálódást, támogatva ezzel a ROR $\gamma$  expresszió gátlásának gátlásán keresztül a Th17-sejtek kialakulását [53, 82, 83]. Az IL-6 Th17-differenciálódást indukáló hatását ugyanakkor humán sejtek vizsgálata esetén is leírták [72-74]. Az IL-6 mellett az egérben az IL-21 is stimulálja a *Stat3* expressziót, amely TGF $\beta$  jelenlétében az IL-6-től függetlenül serkenti a Ror $\gamma$  expressziót és hozzájárul a Th17-differenciálódáshoz [83-86], amely hatást szintén igazoltak humán sejtekben is [73, 75, 87].

**2. táblázat:** A Th17-differenciálódásban szerepet játszó citokinek indukáló szerepe egérben és emberben.

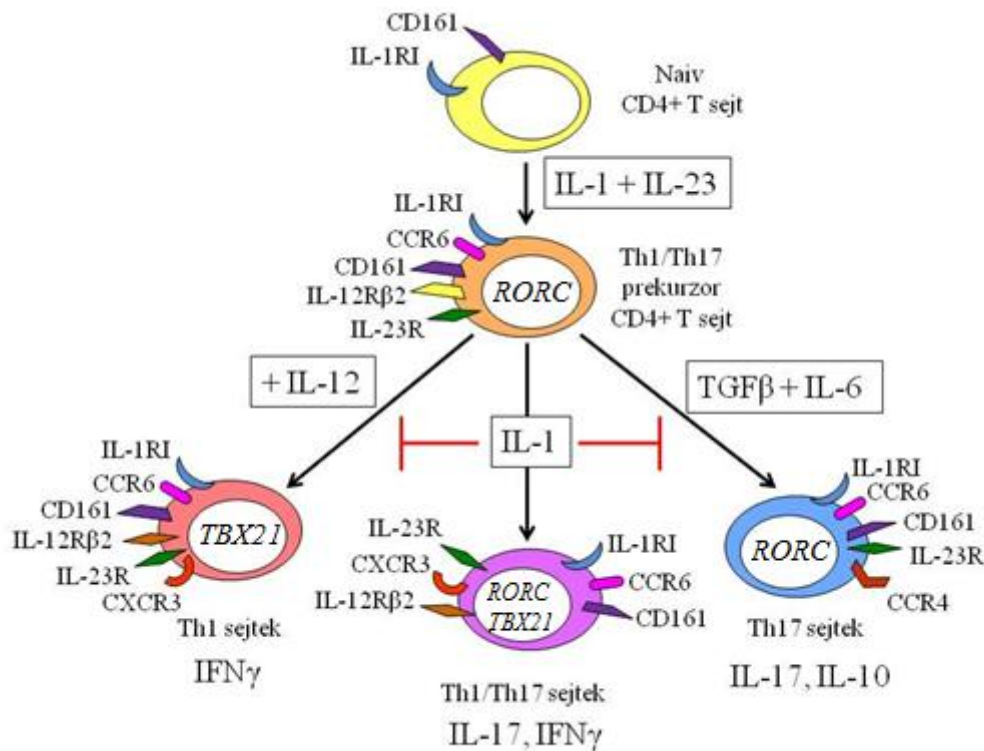
Rövidítések: TGF $\beta$ : tumor növekedési faktor béta, IL: interleukin, IFN $\gamma$ : interferon gamma. A Th17 differenciálódást serkenti ( $\uparrow$ ) vagy gátolja ( $\downarrow$ ).

Forrás: Tesmer, L.A., et al., Immunological Reviews, 2008. **223**: p. 87-113. [67]

Citokinek	TGF $\beta$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-23	IL-4	IFN $\gamma$	IL-12
Egér	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Ember	$\uparrow/\downarrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$

K. Ghoreschi és munkatársai két funkcionálisan eltérő Th17-sejtpopulációt azonosítottak egerekben. Az ún. konvencionális Th17-sejtek TGF $\beta$  és IL-6 hatására differenciálódnak, CC kemokin ligand 20 (CCL20) valamint C-X-C kemokin receptor 6 (CXCR6) pozitívak, valamint IL-9, IL-10 mellett IL-17A és -F citokineket termelnek. A másik az IL-6, IL23 és IL-1 $\beta$  hatására differenciálódó csoportot IL-23-indukált Th17-sejteknek neveznek. Ezek a sejtek több IL-22-t termelnek, hasonló mértékű IL-17F mellett, mint a konvencionális Th17-sejtek, és CCL9-t és CXCR3-at hordoznak [88]. A legfontosabb különbség azonban a két csoport között az az, hogy az IL-23-indukált

Th17-sejtek nemcsak ROR $\gamma$ , hanem TBET expresszióra is képesek. A humán IL-17 termelő sejtek CCR6 és CCR4 kemokin receptorokat hordoznak a felszínükön, míg az IL17/IFN $\gamma$  termelő sejtek csupán CCR6-ot, CCR4 nélkül [89]. Egérben a TGF $\beta$  gátolja a Tbet indukálta IFN $\gamma$  termelést, az IL-23R expresszióját, valamint az IL-23 által indukált IL-22 termelést a konvencionális Th17-sejtekben [88]. E megfigyelés lényeges információt hordoz a Th17-differenciálódás plaszticitásának és szabályozásának megértéséhez, főképpen annak ismeretében, hogy a Th17-sejtek megismerése előtt az autoimmun betegségek kialakulásában sok esetben a Th1-sejtek szerepét feltételezték. Az ilyen kettős fenotípusú sejtek megjelenése sokkal inkább hozzájárulhat a krónikus gyulladás kialakulásához. C. E. Zielinski munkacsoportja és más kutatók e kétféle Th17-sejtpopulációt emberben is megfigyelték, és leírták, hogy azok antigénspecificitása is eltérő (**5. ábra**). Mindkét populáció ROR $\gamma$ -t expresszált és CCR6 molekulát hordozott, valamint IL-17 és IL-22 citokinet termelt, azonban a *Candida albicans* antigénnel kezelt sejtek TBET és IFN $\gamma$  pozitívak is voltak, míg a *Staphylococcus aureus* antigénnel kezelt nem. E sejtek kialakulásában az IL-1 $\beta$ -nak kiemelkedő szerepe van, hiszen ellensúlyozza az IL-12 citokin gátlását, így elősegíti az IFN $\gamma$  és gátolja az IL-10 termelését az IL-17<sup>+</sup> sejteknek [88, 90-92].



**5. ábra:** A Th17-differenciálódás citokinek általi szabályozása és plaszticitása.

Az IL-17 termelő sejtek egy naiv CD4+CD161+IL-1RI+ sejtől differenciálódnak IL-1 és IL-23 hatására egy Th1/Th17 közös prekurzor sejté, amelyekből citokínkörnyezettől függően folytatják valamely sejtvonal irányába a differenciálódást. TGFβ és IL-6 jelenlétében IL-17 és IL-10 termelő Th17-sejteké érnek, amelyek a *RORC* transzkripciós faktort expresszálják, és CCR6, CCR4, IL-23R markereket hordoznak. IL-1β jelenlétében kettős fenotípusú Th1/Th17-sejtek alakulnak ki, amelyek *RORC* és *TBX21* expresszióra is képesek, IL-17 és IFN $\gamma$  termelők és CCR6, CXCR3, IL-23R valamint IL-12R $\beta$ 2-t hordoznak. IL-12 hatására Th1-sejteké alakulnak, amelyek csak IFN $\gamma$ -t termelnek és Tbet-et expresszálják és a Th1/Th17-sejtekhez hasonló markereket hordoznak. Rövidítések: CD: differenciációs klaszter, CCR: C-C motívum kemokin receptor, CXCR: C-X-C motívum kemokin receptor, Tbet: T-sejt eredetű T-box transzkripciós faktor fehérje, *RORC*: RAR-asszociált orphan receptor C, TGFβ: tumor grow factor beta, IFN $\gamma$ : interferon gamma

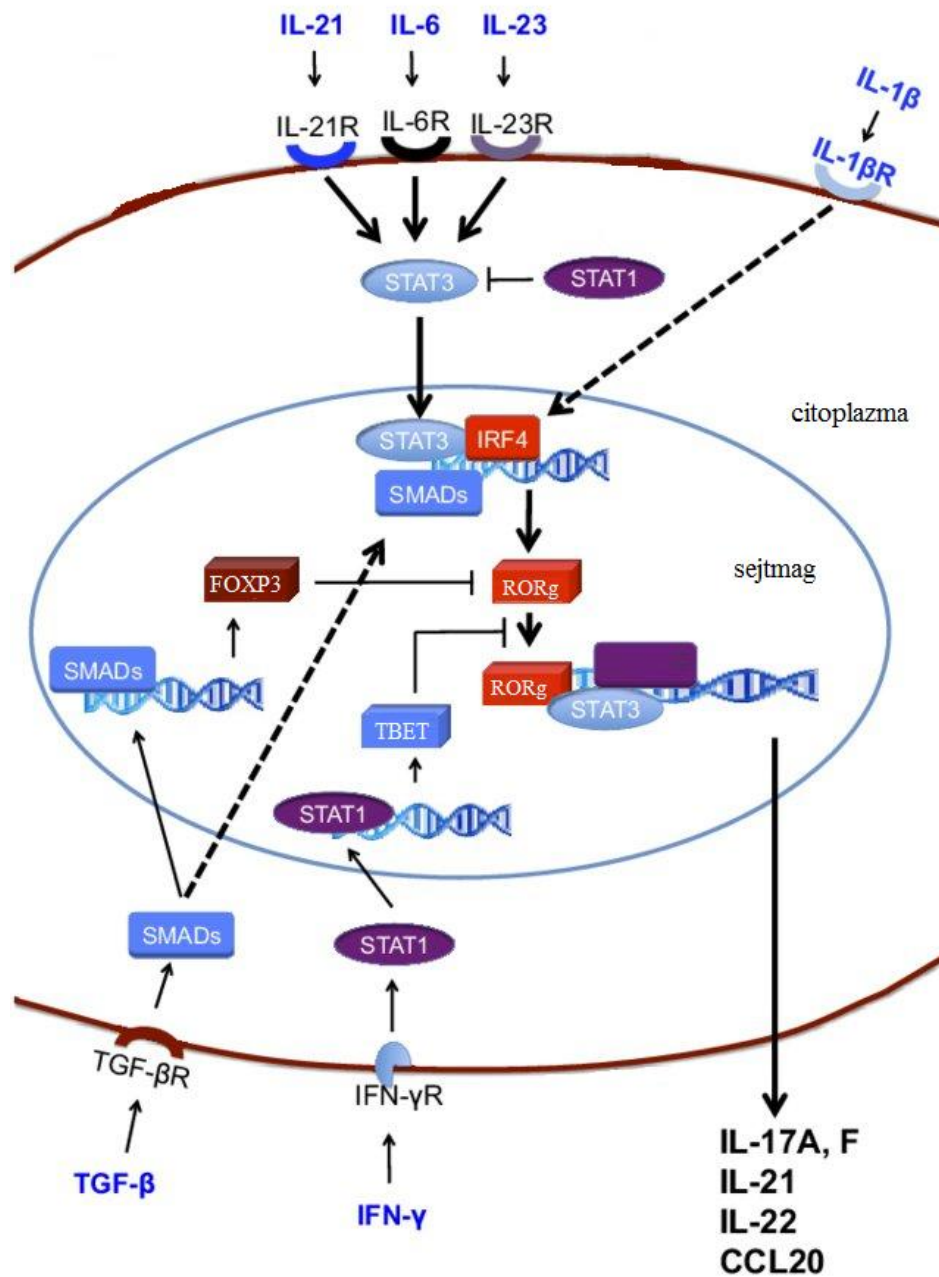
Forrás: Baricza, E., et al., Cell Mol Life Sci, 2016. 73(1): p. 95-117. alapján [93].

A következőkben összefoglaljuk a Th17-sejtek differenciálódásának transzkripcionális szabályozásában szerepet játszó tényezőket (**6. ábra**). A legfontosabb Th17-differenciálódást reguláló faktorok a ROR $\gamma$ , az aromás szénhidrogén receptor (AHR) és a STAT3. A ROR $\gamma$ -t emberben a retinoic acid-related orphan nuclear receptor C variant 2 (*RORC*) gén kódolja és ez a transzkripciós faktor az ún. mester regulátora a Th17-sejteknek [72, 73, 92, 94]. Emellett egérben leírták, hogy a Ror $\gamma$  fontos szerepet játszik a limfoid organogenezisben és a tímusz fejlődésében [95].

A Th17-differenciálódás transzkripcionális szabályozásának lépései és az azokat szabályzó faktorok pontos szerepe döntően egér sejtek vizsgálata alapján ismert. A

Th17-differenciálódás első lépésében a sejteket körülvevő citokin milió (IL-6, IL-21 és IL-23) és a TGF $\beta$  koncentrációjától függően a ROR $\gamma$  felszabadul a FOXP3 gátlása alól. Az alacsony TGF $\beta$  koncentráció, IL-6 jelenlétében egérben fokozza a Th17-differenciálódást, az IL-21 termelődést és az IL-23R expressziót [82]. Ezzel ellentétben a magas TGF $\beta$  koncentráció az IL-6 és IL-21 által indukált suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) gátlásán keresztül – amely egérben megfigyelt regulátor – gátolja a STAT3 expresszióját [96]. Az alacsony TGF $\beta$  koncentráció és IL-6 hatására indukált ROR $\gamma$  expresszió egérben fokozza a sejtek IL-17A és -F, valamint ROR $\alpha$  termelődését [87]. Emellett az IL-6, IL-21 és IL-23 által kiváltott STAT3 aktiváció ugyancsak szükséges a *RORC* expressziójához. A STAT3 mind egérben mind emberben számos Th17 releváns gén funkcióját szabályozza, mint például az IL17A, IL17F, IL21, IL21R és az IL23R [88, 97-100]. A STAT3 számos egyéb transzkripciós faktorhoz kötődve szabályozza a Th17-differenciálódást, így emberben mind egérben fontos szerepe van a Th17-sejtek proliferációjában és túlélésében [100, 101]. A ROR $\gamma$  az IL-17 promoteréhez kötődik és a STAT3 közreműködésével mind egérben, mind emberben irányítja a sejtek IL-17 termelését [87, 100, 101].

A Th1/Th17 köztes fenotípusú sejtek, amelyeket emberben is megfigyeltek, rendelkeznek mind a Th1, mind a Th17-sejttípusra jellemző tulajdonságokkal [77]. A CD161<sup>+</sup> sejtek mind a Th1, mind pedig a Th17-sejtek közös prekurzorai. Mindkét differenciálódási útvonal indukálódik IL-1 $\beta$ +IL23 hatására, azonban vannak olyan citokinek amelyek csak a Th1 (pl. IL-12) vagy csak a Th17 irányú differenciálódást (pl. TGF $\beta$ ) támogatják [71, 77, 102]. Az IL-12 az IL-17 termelődés gátlásán és az IFN $\gamma$  termelés serkentésén keresztül támogatja a Th1 differenciálódást, azonban a mindkét citokint termelő humán sejtek számát nem befolyásolja (**5. ábra**). E „dupla pozitív” populáción belül ugyanakkor emberben csökkenti az IL-22 és/vagy IL-17F termelő sejtek számát [102]. A TGF $\beta$  ezzel szemben a TBET expressziót gátolja, így indirekt módon serkenti a Th17-differenciálódást A STAT3 pedig úgy szabályozza az IL-12/IL-23 egyensúlyt, hogy gátolja az IL-12 hatását, amellyel így szintén a Th17 serkentő faktorok közé sorolható egér és humán kísérletek alapján [77, 103].



**6. ábra:** A Th17-differenciálódás transzkripcionális szabályozása.

A TGF $\beta$  serkenti mind a FOXP3 mind pedig a ROR gamma expressziót, így egyéb gyulladáscsökkentő citokinek hiányában az általa indukált FOXP3 gátolja a ROR gammát. Proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-21, és IL-23) jelenlétében a STAT3 foszforilálódik, a ROR gamma felszabadul a FOXP3 gátlása alól és indukálja a Th17-differenciálódást. Az IRF4 segíti a STAT3 általi ROR gamma aktiválást, így e két transzkripciós faktor az *IL17*, *IL21*, *IL22* és *CCL20* gének promóter régiójához kötődve indukálja a citokinek szekrécióját. Az IFN $\gamma$  serkenti a STAT1 expresszióját, amely gátolja a STAT3 funkcióját, így közvetve a ROR gamma expressziót is, az általa regulált TBET expresszió fokozása révén. STAT: signal transducer and activator of transcription; IRF-4: interferon-inducible factor-4; SMAD: mothers against decapentaplegic homolog, ROR $\gamma$ : RAR-asszociált orphan receptor gamma, IL: interleukin, TGF $\beta$ : tumor grow factor beta, IL23R: interleukin 23 receptor, FOXP3: forkhead box P3 fehérje, TBET: T-sejt eredetű T-box transzkripciós faktor fehérje

Forrás: Maddur, M.S., et al., Am J Pathol, 2012. 181(1): p. 8-18. alapján [104]

### 1.2.3. A Th17-sejtek fiziológiás és pathológiás funkciója

A Th17-sejtek a T-limfociták közé tartozó, karakterisztikus pro-inflammatorikus citokintermeléssel jellemezhető sejtcsoport [52]. A sejteket a 2000-es évek elején azonosították, a korábban leírt Th1, illetve Th2 szubpopulációktól eltérően differenciálódó, főképpen IL-17 citokint termelő sejtekként definiálták [105-108]. Az IL-23 felfedezését követően megfigyelték, hogy létezik egy T-sejt alpopuláció, amely IL-23 hatására keletkezik és fontos szerepet tölt be a gyulladásban [67, 106, 109, 110]. A Th17-sejtek legfontosabb fiziológiás funkciója az extracelluláris patogének elleni immunvédelem (pl.: *Streptococcus pyogenes* vagy *Campylobacter jejuni*), azonban lényeges a gyulladás kialakulásában és az autoimmun betegségek patomechanizmusában betöltött szerepük is. Annak megértéséhez, hogy a Th17-sejtek e szerepüket pontosan hogyan töltik be, az általuk termelt citokinek jellemzésén keresztül juthatunk el. Ennek megfelelően az alábbiakban a Th17-sejtek által termelt legfontosabb citokineket jellemezzük, amelyek az IL-17, IL-21 és IL-22 [52, 109].

Az IL-17 citokin család evolúciósan konzervált, az emlősök mellett, más gerinces osztályokban is megtalálhatók. A citokincsalád tagjai az IL-17 A, B, C, D, E és F citokinek, amelyek közül az IL-17A és -F típusúakat termelik a Th17-sejtek [111]. Az IL-17 citokin fontos szerepet játszik egyéb proinflammatorikus citokinek, (pl.: IL-6, TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$ ), kemokinek (IL-8, C-X-C kemokin ligand 1 /CXCL1/ és CXCL10) termelődését. Szintén fokozhatja egyéb faktorok, mint például a mátrix metalloproteinázok (MMP) és kolónia stimuláló faktorok (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor /GM-CSF/), granulocyte colony-stimulating factor /G-CSF/) kifejeződését. Az IL-17 fokozza a neutrofil granulociták aktivációját és kemotaxisát, valamint a nitrogén monoxid (NO) termelődést. A proinflammatorikus citokinek (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-17) fokozott termelődése RA-ban korrelál az ízületekben zajló destruktív folyamatokkal. [112-114].

Az IL-22 szerepet játszik a bőr gyulladásos folyamataiban, a pathológiás keratinocita differenciálódásban és proliferációban, a leukocyták aktivációjában és az infiltrációban, amely folyamatok például pikkelysömörben is megfigyelhetők [115]. RA-s betegek szinoviális folyadékában megtalálható mononukleáris sejtekben az IL-22 expressziója fokozott, amely hozzájárul az itt található szinoviális fibroblasztok proliferációjához, fokozza az osteoclastogenezist, amely végső soron csont destrukcióhoz vezet [116]. Az

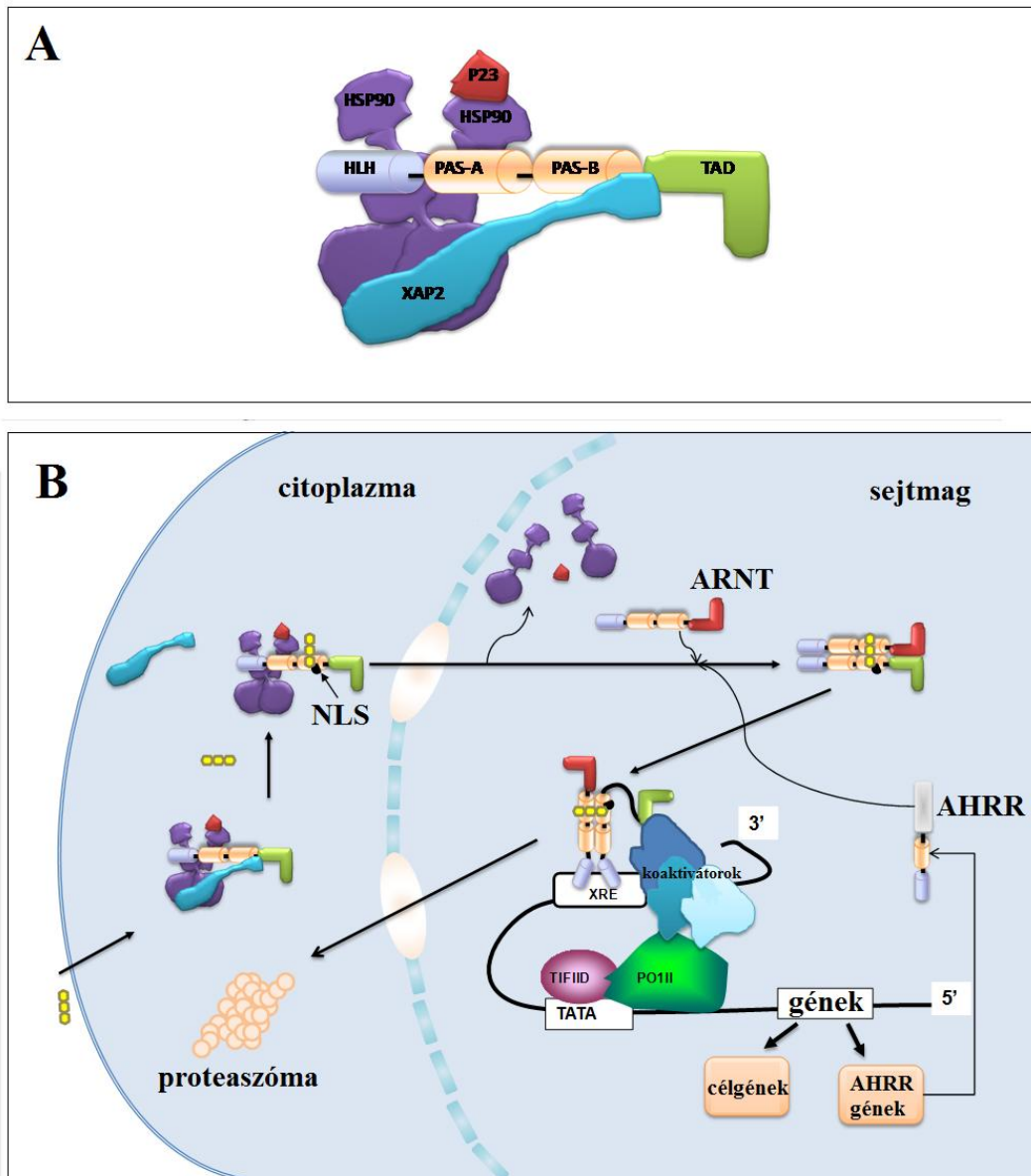


1.2.2. fejezetben utaltunk rá, hogy az AHR a Th17-differenciálódást reguláló transzkripciós faktorok közé tartozik. E receptornak fontos szerepe van a Th17-sejtek IL-22 termelésének szabályozásában, amelyet a következő fejeztben részletesen is kifejtünk.

#### **1.2.4. Az aromás szénhidrogén receptor szerepe a Th17-sejtekben**

Az aromás szénhidrogén vagy dioxin receptor egy citoplazmában elhelyezkedő, speciális doménnal rendelkező helix-loop-helix típusú transzkripciós faktor (7. ábra) [117, 118]. Az AHR-hez hasonló szerkezetű transzkripciós faktorok az élővilágban általánosan előforduló molekulák, amelyek mint molekuláris „tépőzárak” fontos szerepet játszanak a cirkadián óra fehéjék (pl. emlősökben a Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Bmal, és Clk) megkötésében [119, 120]

Az AHR ligandjai lehetnek szintetikus vagy természetes eredetűek, mint például a policiklusos aromás szénhidrogének közé tartozó benzo[alpha]pirén (B[a]p), vagy a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), amelyek a dohányfüstben is megtalálhatóak. Endogén ligandjai közé tartoznak a különböző triptofán származékok (pl. indigokarmin és az indirubin) [121], tetrapirrolok (pl. bilirubin) [122], arachidonsav metabolitok (pl. lipoxin A4 és prostaglandin G) [123], az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) egyes módosított formái [124] és néhány karotinoid [125]. A detoxifikáció mellett fontos szerepet játszik a sejtek proliferációjában, a cirkadian ritmusban és a neurogenesisben is [126]. Az AHR számos humán szervben és szövetben expresszálódik (pl. tüdő, szív, vese, máj, nyelőcső, hasnyálmirigy, placenta, here, csecsemőmirigy és retina) [127, 128]. A Th17-sejtekben fokozott a receptor expressziója, Treg-sejtekben kevésbé, míg Th1, illetve Th2 sejtekben nem expresszálódik [129]. Számos irodalmi adat utal arra, hogy az AHR szerepe az immunrendszer fiziológiás és pathológiás működésében is központi szerepet játszik a Th17-sejtek szabályzásán keresztül, amelyet a következőkben részletesebben is kifejtünk [129-132].



**7. ábra:** Az AHR felépítése (A) és szignalizációja (B) a sejtekben.

A ligandot nem kötő AhR a citoplazmában inaktív fehérjekomplex formájában van jelen, egy hőszokk fehérje 90 (Hsp90) dimerrel, a prostaglandin E szintáz 3 (Ptges3, p23), az immunophilin szerű hepatitis B vírus X-asszociált protein 2 (XAP2), az AhR-interakciós fehérjével (AIP) molekulákkal. A molekula középső részén a PAS-A régióval kapcsolódik a Hsp90, míg a PAS-B régióval a XAP2-höz. A Hsp90 dimer és a p23 védi a receptort a proteolízistól, megakadályozza a ligandkötő konformáció kialakulását és az ezt követő molekuláris kölcsönhatás létrejöttét. A XAP2 a Hsp90 komplex C-terminális végéhez kapcsolódik, és elfedi az AhR nukleáris lokalizációs szignál (NLS)-t képező molekularészletét, megakadályozva annak indokolatlan transzportját a sejtmagba. A megfelelő ligand kötődésekor a XAP2 felszabadulásával szabaddá válik a NLS hely, amely a sejtmagba való transzportját segíti. Ekkor a Hsp90 disszociál a komplexről, szabaddá válik a receptor két PAS doménje, ami lehetővé teszi az Ahr nuclear translocator (ARNT) kötődését. Az aktivált Ahr/ARNT heterodimer ezt követően képes közvetlenül vagy közvetetten kapcsolódni a DNS-en található dioxin/xenobiotikum érzékeny DNS szakaszokhoz (DRE-Dioxin/Xenobiotic responsive element). A leggyakoribb felismerőhelye az Ahr/ARNT komplexnek az előbbi gének promotor régiójában található 5'-T/GNGCGTGA/CG/CA-3' konszenzus szekvencia. Az általa regulált gének által szabályozott mechanizmusok, például a sejtmagi AHR represszor fehérje (AHRR) segítségével az AHR az aktivációt követően proteaszómálisan lebomlik a sejtmagban.

Rövidítések: TAD: transzaktivációs domén, PAS: Per (period circadian protein)-Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein)-Sim (single-minded protein), HLH: helix-loop-helix  
 Forrás: E.Baricza et. al. Cell. Mol. Life Sci. 2016. [93]

M. Veldhoven és munkacsoportja leírta, hogy az AHR természetes agonista ligandjai szükségesek az optimális Th17-differenciálódáshoz, hiányukban az nem megfelelően zajlik [133]. AHR agonisták szerepét igazolták humán CD4<sup>+</sup> T sejtek IL-22 termelésének szabályzásában [133, 134]. Míg az IL-17 termelést döntően az ROR $\gamma$  és a ROR $\alpha$  expresszió szabályozza, az IL-22 termelést kevésbé e transzkripciós faktorok, sokkal inkább az AHR ligand függő aktivációja befolyásolja. [133, 135]. Az AHR szabályozza a STAT molekulák kifejeződését is, amelyek fontos szerepe van a Th17-differenciálódásban [136, 137]. A. Kimura és munkatársai megfigyelték, hogy az IFN $\gamma$  és IL-27 által regulált STAT1 szignalizációt az AHR szelektíven szabályozza, amely Th17 indukáló körülmények között (TGF $\beta$ +IL-6 vagy TGF $\beta$ +IL-21) gátolja a Th17-differenciálódást. Az AHR képes a STAT1-hez és a STAT5-höz is kötődni, de a STAT3-hoz és a STAT6-hoz nem, így negatívan szabályozza a Th17-differenciálódást [137]. Az AHR hatása az azt expresszáló sejttől és a receptorhoz kapcsolódó ligand fajtájától is függ. Mind a Th17, mind pedig a Treg-sejtek kifejezik a receptort, amely sejtekre a receptornak ligand-specifikus hatása van. A 6-formylindolo(3,2-b)carbazole (FICZ) endogén ligand serkenti a Th17-differenciálódást, míg a Treg-sejtekre egy exogén eredetű ligand, a TCDD van inkább hatással [138]. Az AHR-nek ezen funkciója szerepet játszhat a káros anyagok elkerülésének és metabolizációjának szabályzásában. A receptor endogén ligandjai, amelyek keletkezéséhez a mikrobiális tevékenység is gyakran hozzájárul, a Th17-sejtekre pozitívan hatnak, indukálva a gyulladást és a patogének eltávolítását, míg a környezetből származó exogén ligandok a Treg-sejtekre hatva gátolják a kóros Th17-sejtek által indukált autoimmunitást. RA-s betegek synoviális szöveteiben is magas AHR expressziót mutattak ki, amelyet a TNF $\alpha$  szintje szabályoz. TCDD hatására a synoviális sejtekben fokozódik a proinflammatorikus IL-1 $\beta$  és IL-6 citokinek expressziója [71, 75, 139]. A TCDD AHR-en keresztül regulálja az IL-22 expressziót, gátolja az IL-17 termelést illetve a RORC és IL-23R expressziót [140, 141]. A receptornak több olyan ligandja is ismert tehát, amely valamilyen módon befolyásolja (indukálja vagy gátolja) a Th17-sejtek differenciálódását vagy az általuk mediált folyamatokat, így szerepük lehet autoimmun betegségek kialakulásában (**3. táblázat**) [93].

**3. táblázat:** A Th17-sejtekre ható AHR ligandok és hatásuk összefoglalása autoimmun illetve gyulladásos betegségekben.

Rövidítések: RA: rheumatoid arthritis, TCDD: IL: interleukin, B[a]p: Benzo[alpha]pyrene, 3-MC: 3-Methylcholanthrene, CD: differenciációs klaszter, Th17: T helper 17 sejtek, Treg: regulatórikus T-sejtek, FoxP3: Forkhead box P3, ITE: FICZ: 6-Formylindolo(3,2-b) carbazole, KYNA: kinurénsav RES: rezveratrol, I3C: indol-3-karbinol, DIM: diindol-metán, I3S: indoxil-3-szulfát

Forrás: E.Baricza et. al. Cell. Mol. Life Sci. 2016. alján [93]

AHR ligand	típus	forrás	sejttípus vagy állatmodell	megfigyelt hatás	releváns betegség	hatása a betegségre és a Th17-sejtekre
TCDD	agonista	füstölt élelmiszerek, erdőtűz, cigaretta füst	RA betegek fibroblaszt eredetű synoviocytái, MH7A sejtvonal	serkenti az IL-1 mRNS expresszióját	RA	súlyosbítja
			humán synoviocyták	IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 expresszióját serkenti	RA és oszteoarthritis	súlyosbítja
			Colitis egérmodell	csökkenti az IL-6 szintet és serkenti a FoxP3+ Treg-eket	gyulladásos bélbetegség	gátolja
			C57BL/6 egér	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Treg-ek expanzióját serkenti	kísérletes autoimmun encephalomyelitis	gátolja
B[a]P	agonista	erdőtűz, füstölt élelmiszerek, kipufogógáz (diesel), cigaretta füst	RA betegek fibroblaszt eredetű synoviocytái, MH7A sejtvonal	serkenti az IL-1 mRNS expresszióját	RA	súlyosbítja
			humán monocita eredetű dendritikus sejt	csökkenti az IL-6 termelést	RA	hozzájárul a pathogenezishez
3-MC	agonista	égéstermék	RA betegek fibroblaszt eredetű synoviocytái, MH7A sejtvonal	serkenti az IL-1 mRNS expresszióját	RA	súlyosbítja
leflunomid	agonista	Arava (RA-ban alkalmazott terápiás szer) hatóanyaga	egér PBMC és vese sejtek	serkenti a Treg és IL-10 termelődést, csökkenti az IL-17 és IL-23 termelő sejtek számát	akut vese sérülés	gátolja
ITE	agonista	sertés tüdőből izolálják	egér tímusz és mesenterialis nyirokcsomó eredetű T sejtek	serkenti FoxP3+ Treg-eket	kollagén indukált arthritis	gátolja

			allergiás rhinitises betegek	gátolja az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 és serkenti az IL-10 termelést	allergiás rhinitis	gátolja
			monocita eredetű dendritikus sejtek betegekből	gátolja a Th17-sejteket	Behcet kór	gátolja
FICZ	agonista	triptofán származék	B6 egér és human CD4+ sejtek	serkenti az <i>Il17a</i> , <i>Il17f</i> és <i>Il22</i> gének expresszióját	kísérletes autoimmune encephalomyelitis	súlyosbítja
			bél eredetű mononukleáris sejtek betegekből és colitis egérmodell	serkenti az IL-22 termelést	gyulladásos bélbetegség	gátolja
KYNA	agonista	a kyneurine útvonalon keresztül keletkező triptofán származék	BALB/c egér CD4+ T sejtjei	serkenti a IL-17 termelést	autoimmun gastritis	súlyosbítja
curcumin	antagonista /agonist	Curcuma longa (kurkuma) gyökere	humán PBMC és alveoláris makrofágok	csökkenti a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, és IFN $\gamma$ termelődést	akut tüdő sérülés	gátolja
			humán fej-nyaki daganat sejtek	dózis függő módon gátolja a STAT3 foszforilációját és transzlokációját	fej-nyaki daganatok	gátolja
RES	antagonista /agonista	piros szőlő és vörösbor, kakaó, mogoró, bogyós gyümölcsök, fenyő	DBA1 eredetű limfociták	gátolja az IL-6 és az IL-17 termelését, valamint a Th17-sejt differenciálódást	kollagén-indukált arthritis	gátolja
			SJL/J egér lép és agy eredetű mononukleáris sejtek	serkenti az IL-17/IL-10+ T sejteket és gátolja a makrofágok IL6 termelését	kísérletes autoimmun encephalomyelitis	gátolja
			humán akut mieloblasztikus leukémia (Kasumi-1), akut T-sejtes leukémia (Jurkat) és akut limfoblasztikus B-sejt leukémia (SUP-B15) sejtvonalak	a STAT aktivitását befolyásolja	leukémia	gátolja

			SJL/J eredetű T sejtek és makrofágok	serkenti az IL-17/IL-10+ T sejteket és gátolja a makrofágok IL6 termelését	kísérletes autoimmun encephalomyelitis	gátolja
			C57BL/6 egér és and EL4 egér T limfóma sejt vonal	serkenti a FoxP3 expressziót	kísérletes autoimmun encephalomyelitis	gátolja
I3C	agonisták	keresztesvirágú zöldségek (brokkoli, káposzta, karfiol, kelbimbó, kelkáposzta)	C57BL/6 egér eredetű T sejtek	serkenti a Treg-eket és gátolja a Th17-sejteket	kísérletes autoimmun encephalomyelitis	gátolja
DIM						
baicalin	agonista	flavon típusú flavanoisid pl. a Csukóka növényfajokban	C57BL/6 (B6) és lupus MRL/lpr egérmodellekből származó T-sejtek and human köldökzsínór vér sejtek	gátolja az <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> Th17-differenciálódást, az IL-6R, az IL-17 termelést és a ROR $\gamma$ mRNS expressziót, serkenti a Foxp3 expressziót	kollagén indukált arthritis egérmodell	gátolja
I3S	agonista	bélbaktériumok közreműködésével keletkező triptofán metabolit (indol)	BALB/C egér T-sejtjei	indukálja a STAT3 és ROR $\gamma$ expressziót és foszforilációt, elősegíti az <i>in vitro</i> Th17-differenciálódást	kollagén indukált arthritis egérmodell	súlyosbítja

### **1.3. Az osteoclastok és az immunkomplexek szerepe a gyulladásban és kapcsolatuk a T sejtekkel**

A gyulladásban szerepet játszó T-sejtek mellett egyéb faktorok szerepe is fontos az gyulladásos ízületi betegségek patomechanizmusában. A továbbiakban két olyan tényezőt fogunk jellemezni, amelyek funkciója meghatározó az általunk vizsgált betegségek (RA és AP) kialakulásában és lefolyásában.

#### **1.3.1. Az osteoclastok szerepe**

A csontszövetet extracelluláris mátrix és csont-, illetve egyéb sejtek (adipocyták, kötőszöveti sztrómasejtek, illetve a vérképzés és véredényrendszer sejtjei) építik fel. A csontsejtek közé tartoznak a csont építéséért felelős osteoblastok, a csontbontást végző osteoclastok és a csontmátrixba épülő osteocyták. E sejtek az egyedfejlődés során a csontszövet kialakulásában (modelling), és azt követően annak megújulásakor (remodelling) aktívak. Az osteoclastok, vagy csontfaló sejtek olyan többmagvú, csont- és elmeszesedett porcszövet lebontására specializálódott makrofágok, amelyek fontos szerepet játszanak az immunmediált gyulladásos ízületi betegségekben. A csontszövet remodellingje során az osteoclastok feladata, hogy a lebontani kívánt csont mentén felsorakozva, annak szövetét lebontsák, amelynek helyén az osteoblastok közreműködésével új csontszövet képződik [142-145].

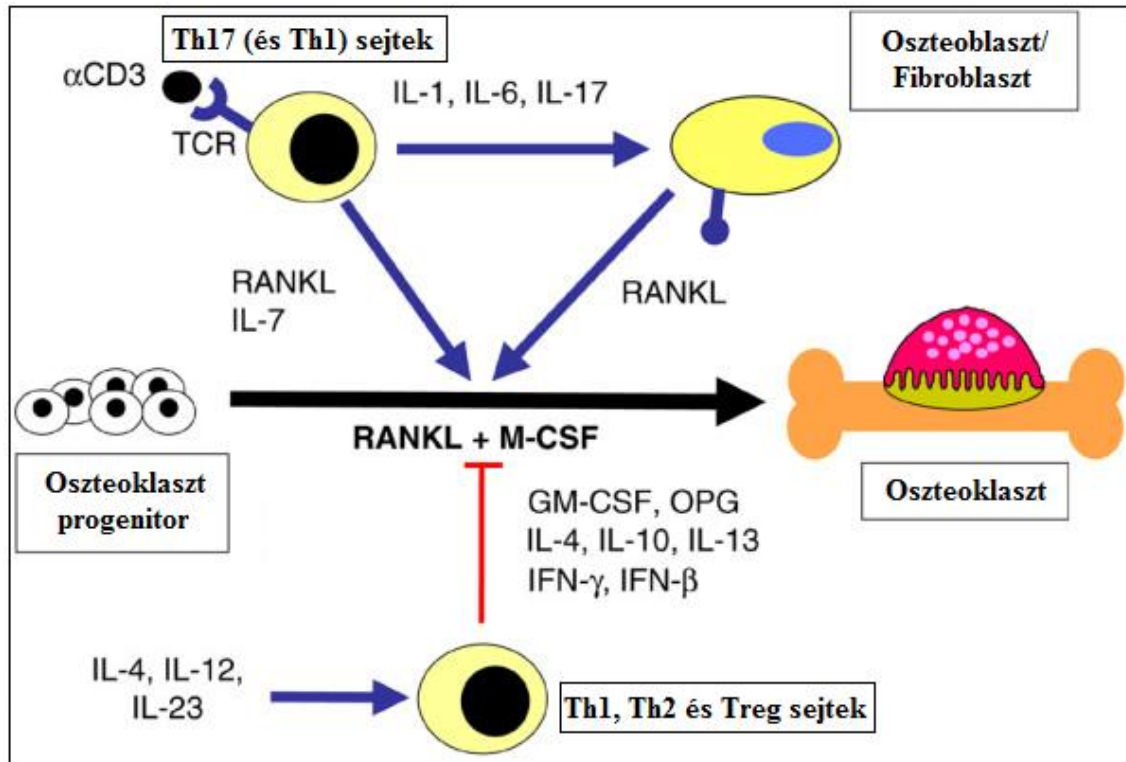
Az osteoclastok hemopoetikus mieloid őssejtekből alakulnak ki, amelyhez letapadási felszín és szolubilis faktorok például a makrofág konónia stimuláló faktor (M-CSF) és a nukleáris faktor  $\kappa$ B receptor aktivátorának ligandja (RANK-L) szükségesek. A hemopoetikus őssejtekből M-CSF hatására makrofág irányba kezdenek differenciálódni, amely folyamatot a RANK-L hatása irányítja osteoclast specifikus differenciálódási irányba. A RANK-L membránkötött formában is létezik, amely metalloproteináz enzimek segítségével válik le a plazmamembránból [146]. A RANK-L osteoblastokon, ízületekben lévő fibroblaszton és kötőszöveti immunsejteken (pl. T- és B-sejtek) is megtalálható. A RANK-L receptora a RANK, amely az osteoclast prekurzorokon található. Ennek intracelluláris részéhez TNF asszociált faktor (TRAF) adaptor fehérjék kapcsolódnak, amelyek különböző transzkripciós faktorokat aktiválva – mint például az aktivátor protein 1 (AP-1), a nukleáris faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), vagy az aktivált T-sejt nukleáris faktor 1 (NFATc1) – segítik elő az osteoclast sejtekre jellemző fehérjék

expresszióját. Ilyenek például a katepszin K (CTSK), a tartarát rezisztens savas foszfatáz (TRAP) vagy a kalcitonin receptor (CALCR) [147-150]. Ezen szignalizációs útvonalak aktiválódásának hatására preosteoclastok jönnek létre, ezek kemotaktikus hatású kemokinek segítségével (CCL-2,-3,-9, CXCL12) kerülnek közel egymáshoz, amelyek az előalakokban osteoclast specifikus gének expresszióját indukálják [151-155]. Ezt követően a dendritikus sejt-asszociált transzmembrán fehérje (DC-STAMP) és  $\alpha\beta 3$  integrinek hatására fuzionálnak és aktiválódva érett csontfaló sejtekké válnak [148, 149, 156]. Az osteoblastok a RANK-L mellett egy szolubilis receptort is termelnek, az oszteoprotegerint (OPG), amely megköti a RANK-L-ot gátolva ezzel az osteoclastok differenciálódását [157].

A csontfaló sejtek mind fejlődésük, mind funkciójuk során szoros kapcsolatban vannak az immunsejtekkel. A RANK-L molekula kifejeződését először T-sejtekben írták le és legnagyobb mennyiségben a B-sejtek expresszálják [157, 158]. A B-sejtek ugyanakkor OPG-t is termelnek, amely negatív regulátora az osteoclastogenezisnek [158, 159]. A T-sejteknek lényeges szerepük van a különböző citokinek termelésében, amelyekkel számos módon modulálják az osteoclastok aktivitását (**8. ábra**), emellett RANK-L expresszió révén közvetlenül befolyásolhatják az osteoclastogenezist [160]. A gyulladás során termelődő citokinek ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, -2, -6, -17A, -23, közvetetten az  $\text{IFN}\gamma$ ) és az IL-7 fokozzák az osteoclastok aktiválódását [149, 160-165]. Ezzel hozzájárulnak a gyulladás során fellépő csont- és porc- destrukcióhoz, amely RA-ban megfigyelhető [149, 160, 162]. A Th17-sejtek IL-17, IL-23 indukált osteoclastogenezist serkentő szerepe mellett a Th1- és Th2-sejtek által termelt citokinek (IL-4, IL-12,  $\text{IFN}\gamma$ ), és a Treg-sejtek által termelt IL-10 gátolja az osteoclastogenezist [160, 163, 164, 166-170].

A T-sejtek által termelt citokinek hatása az osteoclastokra szerteágazó, ugyanakkor az osteoclastok is hatással vannak a T-sejtekre. Az MHC I és MHC II-n felül számos, a kostimulációban szerepet játszó molekulát expresszálnak (CD80, CD86, CD40), amely hatékony antigénprezentáló sejtté teszi őket. Allogén antigéneket expresszálnak és mutatnak be T sejteknek, emellett IL-10,  $\text{TGF}\beta$  és  $\text{TNF}\alpha$  citokineket is szekretálnak, így szintén komplex módon hatnak a T-sejtekre [171].





**8. ábra:** A T-sejtek által termelt citokinek hatása az osteoclastogenezisre.

A T-sejtek által termelt citokineknek többféle hatása van az osteoclastogenezisre. Egyes citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1, -6, -7, -17A, -23, IFN $\gamma$ ) közvetlenül a T-sejtek, osteoblastok és fibroblasztok RANKL expresszióját fokozva vagy közvetetten más citokinek termelésén vagy transzkripciós faktorok serkentésén/gátlásán keresztül fokozzák az osteoclastogenezist (pl. Th17- és bizonyos mértékben Th1 sejtek). Emellett más (pl.: Th1, Th2 vagy Treg-sejtek) T-sejtek által termelt citokinek (IL-4, IL-12, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ , IFN $\beta$ , GM-CSF) szintén a RANK-L illetve OPG expresszióján keresztül vagy transzkripciós faktorokra (NFATc1, c-Jun és c-Fos) hatva gátolják az osteoclastok érését. Rövidítések: TNF: tumor nekrosis faktor, IL: interleukin, IFN: interferon, RANK-L: nukleáris faktor  $\kappa$ B receptor aktivátorának ligandja, GM-CSF: granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor, OPG: oszteoprotegerin, CD: differenciációs klaszter  
Forrás: Gillespie, M.T., Arthritis Research & Therapy, 2007. 9(2): p. 103-103. alapján [160].

### 1.3.2. Az immunkomplexek és autoantitestek szerepe

Az immunkomplexek antigének és antitestek összekapcsolódásával létrejövő struktúrák, képződésük egy egyesülési folyamat, amelyet a két alkotóelem koncentrációján felül, több fizikai és kémiai paraméter befolyásol. Az immunkomplexek képződése természetes folyamat a szervezetben. A kis mennyiségben jelenlévő antigénekből keletkező szolubilis komplexeket optimális esetben az immunsejtek egy része (makrofágok, granulociták, vörösvértestek) eltávolítja. Ez a folyamat az ún. immunkomplex clearance. Amennyiben az antigének mennyisége megnő a szervezetben (pl. fertőzés vagy autoimmun folyamat) olyan kisebb, mozgékonyabb, stabiliabb szerkezetű immunkomplexek keletkezhetnek, amelyek így hosszabb időt töltenek el a keringésben és lerakódnak az egyes szervekben és szövetekben, ahol gyulladást

indukálnak [1, 2]. A legismertebb immunkomplex képződéssel járó autoimmun betegség az SLE, amelyben főképpen a vesét és az idegrendszert károsíthatják a lerakódott komplexek, illetve jól látható gyulladást okoznak a hámrétegben, ez az ún. pillangó erythema [172]. Az immunkomplexek szerepe a B-sejt fejlődés során is lényeges. A folliculusokban található folliculáris dendritikus sejtek nyúlványain C3 komplementtel fedett immunkomplexek találhatók, amelyek a bennük tárolt antigének révén elősegítik a B-sejtek szomatikus rekombinációját és izotípus váltását. A komplementet aktiváló és azt tartalmazó komplexek kisebb dózisban is kiváltják a B-sejt aktivációt és elősegítik a B-sejtek antigénprezentációját [36].

Az autoantitestek különböző receptorokhoz vagy receptor ligandokhoz kapcsolódva fokozzák vagy gátolják az adott szignálút vonalat (pl. szerv-specifikus autoimmun betegségekben) vagy fokozhatják az APC-k antigénprezentációját. Az Fc receptor (FcR)-ral rendelkező APC-kbe (monocita, dendritikus sejtek) pinocitózissal kerülhetnek be a komplexek, amelyek felvétele így módon mintegy 10-100-szor effektívebb, mint annak hiányában, így a T-sejt aktiválásához kisebb mennyiségű antigén jelenléte is elegendő [1, 2]. Rheumatoid arthritisben jellemző az autoantitestek kialakulása, amelyek autoantigénekkal immunkomplexeket képezhetnek és a fent kifejtett módon gyulladást indukálnak (**4. táblázat**).

#### 4. táblázat: RA-ban azonosított autoantigének.

Forrás: Song, Y.W. and E.H. Kang, QJM: An International Journal of Medicine, 2010. 103(3): p. 139-146. [173]

Molekula típusa	Példa
ízületi porc komponens	II. típusú kollagén (natív és denaturált)
stresszfehérje	mikrobiális Hsp65, immunglobulinkötő fehérje (Bip)
enzimek	alpha-enoláz, glükóz-6-foszfát izomeráz, calpastatin
sejtmagi fehérje	RA33/hnRNP A2
citrullinált fehérje	filaggrin, fibrin, fibrinogén, vimentin, I-es és II-es típusú kollagén, alfa-enoláz, szintetikus ciklikus citrullinált fehérjék

A következőkben ezeket az autoantitesteket jellemezzük. Az RA-ban jellemző két leismertebb prognosztikus és diagnosztikus értékű autoantites a rheumatoid faktor (RF) és az anti-CCP vagy ACPA, de egyéb autoantitestek jelenlétét is kimutatták a betegségben, melyek számos autoantigénre lehetnek specifikusak [173, 174]. Az RF olyan autoantitest, amely IgG immunglobulinok fragment crystallizable (Fc) részével

képez komplexet. Leggyakrabban IgM izotípusúak, de megfigyeltek már IgG, IgA, IgE és IgD ellenanyagokat is [175-178]. Ez volt az első autoantitest, amit 1940-ben E. Waaler leírt RA-ban [179]. Az RA-s betegek nagyrésztében (kb. 60-80%) megtalálható ez az autoantitest, míg kisebb hányaduk szeronegatív, így ezen autoantitest nem specifikus de jellemző markere a betegségnek. Az RF-nél specifikusabb (a betegség-specifitás 90-95%), és jobb prognosztikus értékű markerek az ACPA-k. Annak ellenére, hogy a betegek 70-90%-ában megtalálhatók, hasonlóan az RF-hez, az ACPA-k is előfordulnak egészségesekben vagy más betegségekben is, amely esetben súlyosabb betegséglefolyást prognosztizálnak [26, 180]. A citrullináció, a fehérjék olyan enzim katalizált poszttranszlációs módosulása, amely fiziológiai körülmények között is előfordul, azonban egyes környezeti hatások (pl.: dohányzás) fokozzák a folyamatot (lásd részletesebben az 1.1.1.2. fejezetben) [20, 25, 27, 181].

Az autoantitestek az ízületekben többféleképpen indukálhatnak destruktív gyulladást [182]. Az ACPA-ból és citrullinált fehérjéből (pl. fibrinogén) álló immunkomplexek indukálhatják a makrofágok TNF $\alpha$  termelődését, amelyek Fc $\gamma$  receptorokkal köthetik meg e struktúrákat [183]. Az ACPA a klasszikus és az alternatív útvonalon keresztül is aktiválni tudja a komplement kaskádját, így a gyulladás helyszínén fokozódik a komplement komponensek felhasználása [184]. Emellett az ACPA-k fokozzák a szinovialis fibroblasztok gyulladási mediátor (IL-6, IL-8) és adhéziós molekula termelését [185, 186]. Az ACPA-k az osteoclastok felszínéhez kötődhetnek és feltételezhetően protein arginin dezimináz (PAD) enzim-függő módon az IL-8 termelésén keresztül serkentik az osteoclastogenezist [187-190].

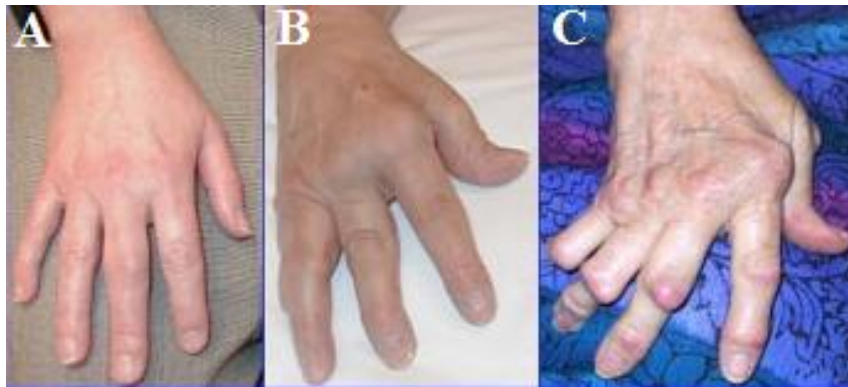
#### **1.4. A rheumatoid arthritis és arthritis psoriatica**

Munkánk során rheumatoid arthritises és arthritis psoriaticás betegekben vizsgáltuk a különböző patogenetikai tényezőket, amelyek e betegségek kialakulásában szerepet játszanak. A következőkben jellemezzük mindkét betegséget, illetve áttekintjük a két kórkép közötti különbségeket.

##### **1.4.1. Rheumatoid arthritis**

Az RA szisztémás autoimmun betegség, amely főleg a kéz és láb kisízületeit érinti (**9. ábra**). A kórkép az ízületekben zajló gyulladás következtében a csont és porc destrukciójához és deformitásához vezethet, amely az életminőség jelentős romlását

okozza [191-193]. A betegség a népesség kb. <1%-át érinti, illetve kétszer gyakrabban fordul elő nőkben, mint férfiakban [192, 193]. Kialakulásának hátterében számos genetikai és környezeti tényezőt azonosítottak, amelyek egymással különféle kölcsönhatásban állva alakítják ki ezt a multifaktoriális betegséget. A genom asszociációs vizsgálatoknak köszönhetően már több, mint 100 olyan génlókuszt azonosítottak RA-ban, amely hajlamosít a betegségre, vagy összefüggést mutat annak prognózisával [194]. Kialakulásának pontos molekuláris háttere csak részben feltárt, azonban néhány hajlamosító faktor szerepe ismert (lásd részletesen az 1.1.1.2.-1.1.1.3. fejezetekben), mint például genetikai tényezők (pl.: az SE allélok, mint a HLA-DRB1\*01:01, DRB1\*04:01, \*04:04 és 04:05) és környezeti tényezők (dohányzás, fertőzések /pl.: perodontitis/) [195-197].



**9. ábra:** Az RA stádiumai.

Az ábrán egy korai (A), egy köztes (B) és egy késői (C) klinikai stádiumú RA-s kéz látható.  
 Forrás: <http://advancedhealth.ca/conditions/arthritis/rheumatoid-arthritis--ra-.html> alapján

A betegség általában kétoldalt szimmetrikusan, több ízületet érintve (polyarthritis), ritkábban asszimmetrikusan néhány ízületet érintve jelentkezik [198]. A gyulladás kialakulásában és fenntartásában a T-sejteknek (IL-1, IL-17, IL-21, IL-22, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), a B-limfocitáknak (RF és ACPA termelés), a makrofágoknak (IL-6, IL-8) és a csontfalósejteknek (csontbontás) fontos szerepe van [36, 39, 173, 188, 191, 199]. Az RA klasszifikációs kritériumait az 5. táblázat foglalja össze [200].

**5. táblázat: 2010-es ACR és EULAR klasszifikációs kritériumok.**

Rövidítések: RF: reumatoid faktor, ACPA: ciklikus citrullinált peptidok elleni antitest, CRP: C-reaktív protein, ACR: American College of Rheumatology, EULAR: European League Against Rheumatism  
 Forrás: Aletaha, D., et al., 2010 Annals of the Rheumatic Diseases, 2010. **69**(9): p. 1580. [200]

<b>2010-es ACR és EULAR klasszifikációs kritériumok</b>	
<b>A) Ízületi érintettség</b>	
1 nagyízület	0 pont
2-10 nagyízület	1 pont
1-3 kisízület - nagyízületi érintettséggel vagy anélkül	2 pont
4-10 kisízület - nagyízületi érintettséggel vagy anélkül	3 pont
>10 ízület - legalább 1 kisízület	5 pont
<b>B) Szerológia: autoantitestek jelenléte</b> (legalább 1 teszt kivitelezése szükséges)	
Negatív RF és negatív ACPA	0 pont
Alacsony pozitív RF vagy ACPA	2 pont
Magas pozitív ACPA	3 pont
<b>C) Akutfázis-reakció</b>	
Normális CRP és süllyedés	0 pont
emelkedett CRP vagy süllyedés	1 pont
<b>D) A tünetek fennállásának tartama</b>	
<6 hét	0 pont
>=6 hét	1 pont
	6- 10 pont = RA

Az RA terápiája során alkalmazott készítmények lehetnek kortikoszteroidok vagy betegségmódosító antireumatikus szerek (disease modifying antirheumatic drugs, /DMARD/). A DMARD-okon belül megkülönböztetünk szintetikus és biológiai DMARD-okat (bDMARD). A szintetikus DMARD-ok lehetnek konvencionális (csDMARD), mint pl.: a methotrexat, leflunomid, sulfasalazin vagy célzott szintetikus (tsDMARD) DMARD-ok, mint például a Tofacitinib. A bDMARD-ok gyulladáscsökkentő citokineket illetve receptorokat blokkolnak, ilyen például az Infliximab (anti-TNF $\alpha$ ), vagy a Tocilizumab (anti-IL6) [201-205].

**1.4.2. Arthritis psoriatica**

Az arthritis psoriatica pikkelysömörrel (psoriasis) társuló ízületi gyulladáscsökkentő betegség. A pikkelysömör a népesség kb. 0,3-1%-át érinti, a betegek 10-40%-ánál alakul ki ízületi gyulladás. Általában fiatal korban indul, ám többnyire felnőtteket érint (nőket és férfiakat egyaránt) igen változatos tünetekkel, amelyek lehetnek kétoldali szimmetrikus

vagy aszimmetrikus megjelenésűek. Gyakori tünetei a gerinc merevsége és deréktáji fájdalom, az ín és ízületi szalagok gyulladása (pl. Achilles ín) és az ún. kolbászujj (dactylitis), amely az ujjakat hajlító inak gyulladása. Az esetek nagyrésztében (kb.: 70%) a betegekben a bőrtünetek előbb jelentkeznek (hajlatokban, körmökön), mint az ízületi tünetek. A betegek szeronegatívak (RF és ACPA általában nincs jelen), a hajlamosító genetikai faktorok közül a HLA-C\*06:02 allélnak, a környezeti faktorok közül az egyes fertőzéseknek (pl. *Streptococcus*, *E. coli*, *Chlamydia*), illetve gyógyszereknek (pl. béta-blokkolók, chloroquin) fontos szerepe van a betegség kialakulásában [206-210]. Az bőr és az ízületi tünetek mellett jellemző a bélrendszer gyulladása és az uveitis [209, 211]. Az AP diagnosztikus kritériumait a 6. táblázat foglalja össze.

**6. táblázat:** Az arthritis psoriatica klasszifikációs kritériumai.

Rövidítések: CASPAR: arthritis pszoriatica klasszifikációs kritériumrendszer (Classification Criteria for Psoriatic Arthritis), RF: reumatoid faktor

Forrás: Gossec, L., et al., Ann Rheum Dis, 2016. 75(3): p. 499-510. és D'Angelo, S., et al., Open Access Rheumatol, 2017. 9: p. 21-28. [212, 213]

<b>Moll-Wright kritériumok</b> (diagnózis valószínű a 3 pont teljesülése mellett)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- gyulladós arthritis (perifériás arthritis, szakroileitisz és spondilitisz)</li> <li>- psoriasis</li> <li>- szeronegativitás (többnyire nincs RF)</li> </ul> <p><i>a kritériumrendszer specificitása: 1; szenzitivitása: 0,858</i></p>	
<b>CASPAR kritériumok</b> (az ízületi gyulladás mellett még legalább 3 pont jelenléte szükséges)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- psoriasis</li> <li>- psoriasis korábbi előfordulása</li> <li>- psoriasis a családi anamnézisben</li> <li>- dactylis</li> <li>- juxtaartikuláris újcsont képződés</li> <li>- körömatrófia</li> <li>- RF negativitás</li> </ul> <p><i>a kritériumrendszer specificitása: 0,992; szenzitivitása: 0,917</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 pont</li> <li>1 pont</li> <li>1 pont</li> <li>1 pont</li> <li>1 pont</li> <li>1 pont</li> <li>1 pont</li> </ul>

A betegség kialakulásában fontos szerepet játszanak a makrofágok, a granulociták illetve a Th (főként a Th1 és Th17 alcsoportok) és Tc sejtek, valamint a  $\gamma\delta$  T-sejtek. Az IL-17/IL-23 útvonalhoz tartozó citokinek (IL-12, IL-17, IL-22, IL-23) szerepe AP-ben igen jelentős [209]. Az IL-17-et a Th17-sejtek mellett a veleszületett limfoid sejtek 3-as

típusa (innate lymphoid cells 3 /ILC3/), a  $\gamma\delta$  T-sejtek és a Tc sejtek is termelik. Az IL-17 fokozza az osteoclastok differenciálódását (RANK expresszió indukálása), illetve a fibroblasztok (IL-6, IL-8, MMP3 termelésének fokozása) és keratinociták proliferációját (neutrofil granulociták toborzása, IL-6 és IFN $\gamma$  szekréció növelése), melynek következménye porc- és csonterózió, valamint a gyulladós psoriaticus plakk kialakulása, amely szintén az életminőség romlásához vezet (**10. ábra**) [135, 209, 214, 215].



**10. ábra:** Arthritis psoriaticás beteg kezei.

Az ábrán jól láthatóak az AP-ra jellemző gyulladás okozta bőr (psoriaticus plakkok), köröm tünetek és az ízületi deformitás.

Forrás: <http://www.gcigsh.org/wg-psoriasis/about-psoriasis/the-clinical-picture-of-psoriasis/Psoriatic-arthritis---Joint-involvement.html> alapján

Az AP kezelése az RA-hoz hasonlóan tüneti, a nemszteroid gyulladásgátlók (NSAID), szteroidok, DMARD-ok és a különböző biológiai terápiák alkalmazásán alapul [212, 213, 216].

### **1.4.3. Rheumatoid arthritis és arthritis psoriatica összehasonlítása**

Mind az RA, mind az AP ízületi gyulladással járó megbetegedés, melyek kialakulásában és lefolyásában vannak ugyan hasonlóságok, azonban patomechanizmusuk több szempontból különbözik. Ezeket a tüneti különbségeket a 7. táblázat, míg a betegségek biomarkereinek különbségeit a 8. táblázat foglalja össze.

**7. táblázat:** Az RA és az AP differenciál-diagnosztikája.

Rövidítések: HLA:humán leukocita antigén, RF: rheumatoid faktor, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica

Forrás: Mc Ardle, A., et al., Arthritis Research & Therapy, 2015. **17**(1): p. 141. [217]

Jellemző	RA	AP
prevalencia (kaukázusi populációban)	~ 1%	0,3-1%
nemek aránya (nő:ffi)	3:1	1:1
betegség leggyakoribb kezdete	40-60 évesen	30-40 évesen
hajlamosító HLA allélok	HLA-DR1*01:01, *04:01, *04:04, 04:05	HLA-C*06:02
pikkelysömör	-	+
ízületi érintettség	szimmetrikus	szimmetrikus vagy asszimmetrikus
rheumatoid csomó	+	-
RF	+, a betegek ~70%-a	-
ACPA	+	-

**8. táblázat:** Az ízületi károsodás citokin és kemokin biomarkerei RA-ban és AP-ben.

Rövidítések: IL: interleukin, CCL: kemokin C-C motívum ligand, CXCL: kemokin C-X-C motívum ligand, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica

Forrás: Mc Ardle, A., et al., Arthritis Research & Therapy, 2015. **17**(1): p. 141. [217]

Citokin/kemokin	Betegség	Szerep
IL-1	AP	indukálja a keratinociták, porcsejtek, osteoclastok aktivációját és fokozza a gyulladásos citokinek termelését
IL-6	RA	serkenti a neutrofil granulociták kemotaxisát és a gyulladásos citokinek termelődését
IL-13	RA	fokozza a B-sejtek autoantitest termelését
IL-15	AP	fokozza a T-sejt proliferációt és a B-sejtek differenciálódását, memória T-sejteket vonz a synoviumba és serkenti a TNF $\alpha$ termelésüket
IL-16	RA	CD4 <sup>+</sup> T-sejtek, monociták és eozinofil granulociták kemotaxisát serkenti, modulálja a T-sejt aktivációt
IL-22	RA	a fibroblasztok proliferációját és monocita kemoattraktáns fehérje 1 (MCP-1) termelését serkenti
IL-33	RA	serkenti a krónikus gyulladást
CCL3	AP	limfocita, monocita, bazofil és eozinofil granulocita kemoattraktáns
CCL11	AP	eozinofil granulocita kemoattraktáns
CXCL13	RA	B-sejt kemoattraktáns



## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

### **1. A humán *in vitro* Th17-differenciálódás vizsgálata egészséges donorok mintáiban.**

Célul tűztük ki az optimális differenciálódáshoz szükséges kiindulási sejtpopuláció és citokinek meghatározását.

### **2. A dohányfüst komponenseinek és az immunkomplexek hatásának vizsgálata az *in vitro* Th17-sejt és az osteoclast differenciálódására.**

**2/a)** Aromás szénhidrogén receptor expresszió vizsgálata T sejtekben.

**2/b)** AHR ligandok hatása a sejtek IL-17A termelésére.

**2/c)** Az immunkomplexek hatása a Th17-differenciálódásra.

**2/d)** Az immunkomplexek hatása az osteoclastok differenciálódására.

### **3. Az *in vitro* Th17-differenciálódás vizsgálata egészségesekben, rheumatoid arthritises és arthritis psoriaticás betegekben**

**3/a)** Naiv sejtek vizsgálata és összehasonlítása.

**3/b)** Differenciálódott sejtek vizsgálata és összehasonlítása.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. Donorok

Kísérleteink során egészséges (nincs ismert reumatológiai kórkép, minimum két hete nem zajlott semmilyen heveny infekciózus megbetegedés, a vérvétel idejében gyógyszert nem szedtek) donor (n=12) véradókat, rheumatoid arthritis (RA) (n=12) és arthritis psoriatica (AP) betegeket (n=12) vizsgáltunk. Az RA-s betegeket a 2010-es ACR/EULAR kritériumrendszer (**5. táblázat**) alapján, az AP-s betegeket a CASPAR klasszifikáció (**6. táblázat**) alapján diagnosztizálták a Budai Irgalmasrendi Kórházban [200, 208]. A betegek a disease activity score (DAS) értékek alapján átlagosan alacsony vagy közepes betegség aktivitással rendelkeztek, amelyet egyéb klinikai paraméterekkel és a terápiára vonatkozó adataikkal együtt az 9-10. táblázatban foglaltunk össze. Kísérleteinket a Helsinki Deklarációban (1975.) leírtaknak megfelelően végeztük, amelyhez a szükséges etikai engedély rendelkezésünkre állt (Tudományos és Kutatásetikai Bizottság /TUKEB/ engedély ügyiratszám: 23096/2012/EKU 399/PI/12.).

**9. táblázat:** A felhasznált betegminták donorainak nemre, korra és terápiára vonatkozó adatai.

Rövidítések: RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica

Kód	Nem	Születési idő	Terápia
RA1	nő	1976	Cimzia
RA2	nő	1968	Cimzia
RA3	férfi	1972	Cimzia
RA4	nő	1965	Roactemra
RA5	nő	1948	Roactemra
RA6	nő	1976	Roactemra
RA8	nő	1949	Arava
RA9	nő	1957	Arava
RA10	férfi	1979	Arava
RA13	nő	1950	Arava
RA14	nő	1947	frissen diagnosztizált (kezeletlen)
RA15	nő	1949	frissen diagnosztizált (kezeletlen)
AP9	nő	1967	metotrexat, Simponi
AP10	férfi	1973	Sandimmun
AP14	férfi	1958	Humira
AP15	férfi	1956	Humira
AP16	férfi	1958	metotrexat
AP17	férfi	1984	metotrexat, Salozopirin
AP19	nő	1963	metotrexat, Salozopirin, Medrol

**10. táblázat:** A donorok laborparamétereit.

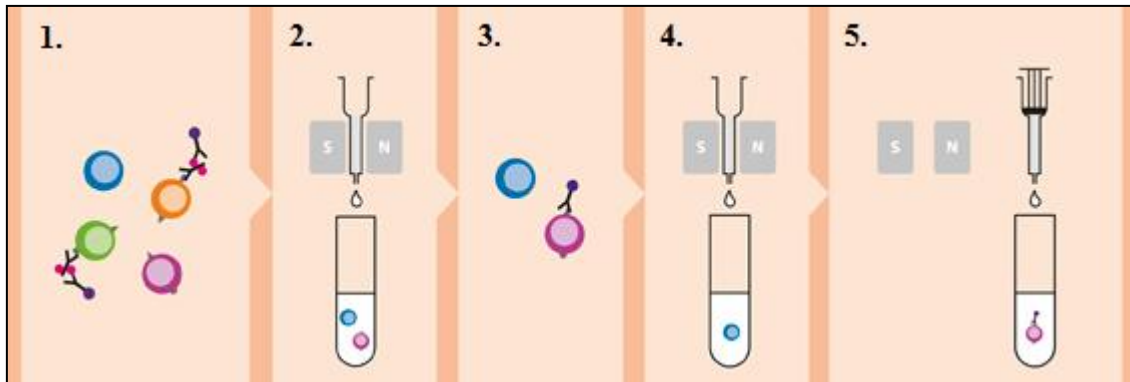
Rövidítések: ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, AP= arthritis pszoriatica, CRP= C reaktív protein, DAS= betegségaktivitási pontszám (disease activity score), ESR: vérséjsüllyedés, DMARD= betegségmódosító antireumatikus szerek (disease modifying antirheumatic drugs), RA= rheumatoid arthritis

Forrás: E.Baricza et. al. Cell. Mol. Life Sci. 2016. [93]

	<b>Egészséges kontrollok</b>	<b>RA betegek</b>	<b>AP betegek</b>
<b>Donorok száma</b>	12	12	7
<b>nők; férfiak</b>	10; 2	10; 2	2; 5
<b>Életkor (év)</b>	45,67 ± 13,53	53,83 ± 12,81	48,58 ± 11,17
<b>Betegségtartam (év)</b>	-	15 ± 14,20	11 ± 7,33
<b>Biológiai DMARD (%)</b>	-	50%	43%
<b>Konvencionális DMARD (%)</b>	-	80%	70%
<b>szteroid (%)</b>	-	50%	14%
<b>frissen diagnosztizált (kezeletlen)</b>	-	17%	-
<b>DAS28 átlag</b>	-	3,48 ± 1,33	3,06 ± 1,94
<b>ESR átlag (mm/h)</b>	-	22	15
<b>CRP átlag(mg/l)</b>	-	7,71	9
<b>RF átlag (IU/ml)</b>	-	172,44	-
<b>ACPA átlag (AU/ml)</b>	-	466,58	-
<b>ACPA negatív (%)</b>	-	8%	-

**3.2. T limfocita sejtek izolálása és tenyésztése**

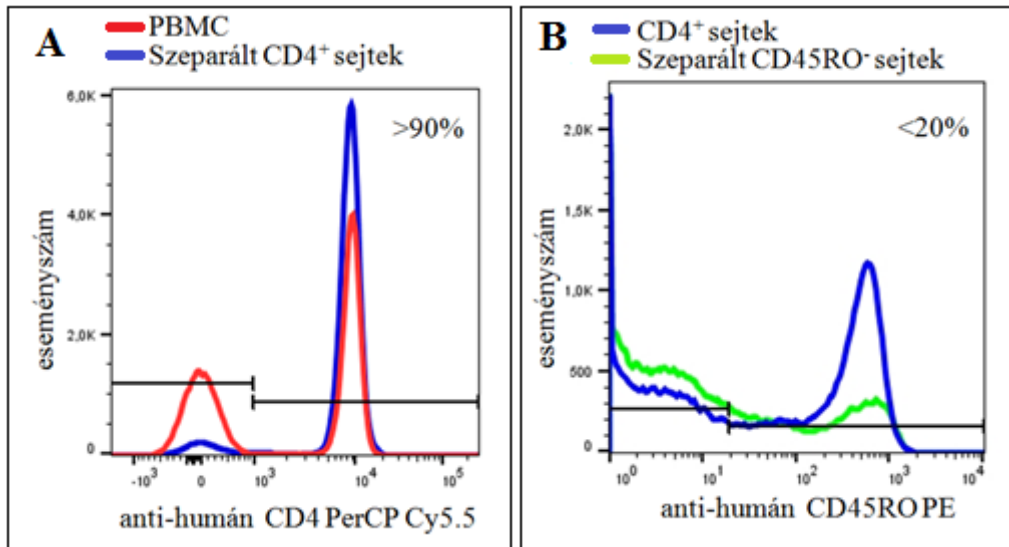
A vérmintákat (30-90 ml) a kísérlet 0. napján etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) tri-káliummal alvadágátolt vérvételi csőben gyűjtöttük (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria). A vérmintákból a perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) ficoll (Sigma, Darmstadt, Németország) gradiens centrifugálás segítségével izoláltuk. A naiv CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> helper T (Th) limfocitákat kétlépéses negatív mágneses szeparációval különítettük el a mononukleáris sejtektől immunomágneses sejtseparálás (MACS) módszerrel (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) a **11. ábrán** látható módon:



<p><b>1. Első jelölés:</b> Biotinilált CD8a, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD132, TcR<math>\gamma/\delta</math>, and CD235a (Glycophorin A) ellenes antitestekkel és anti-biotin/anti-CD61 antitestekkel konjugált mikrogöngyökkel.</p>
<p><b>2. Első szeparálás:</b> A nem jelölt (CD4<sup>+</sup>) T sejtek összegyűjtése (negatív frakció).</p>
<p><b>3. Második jelölés:</b> CD45RO ellenes antitestekkel konjugált mikrogöngyökkel.</p>
<p><b>4. Második szeparálás:</b> A nem jelölt CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> naiv Th sejtek (negatív frakció) összegyűjtése.</p>
<p><b>5. Eluálás:</b> A jelölt CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> memória Th sejtek (pozitív frakció) összegyűjtése.</p>

**11. ábra:** A naiv T sejtek mágneses izolálásának összefoglaló ábrája.

Az izolálás tisztaságát CD4, CD45RO valamint CD45RA jelölést követően áramlási citometriával ellenőrizzük (**12. ábra**). Az élő sejt számot tripánkék exklúziós módszerrel Bürker-kamrában mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A sejteket 10% főtális borjúsavóval (fetal bovine serum, /FBS/) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok), 1% L-glutaminnal és 1% Penicillin-Streptomycinnel (mindkettő Sigma, Darmstadt, Németország) kiegészített Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médium (Sigma, Darmstadt, Németország) tápfolyadékban 10<sup>6</sup>/ml koncentrációban vettük fel és 24 vagy 48 lyukú sejtenyésző lemezen tenyésztettük (Eppendorf Austria GmbH, Bécs, Ausztria)



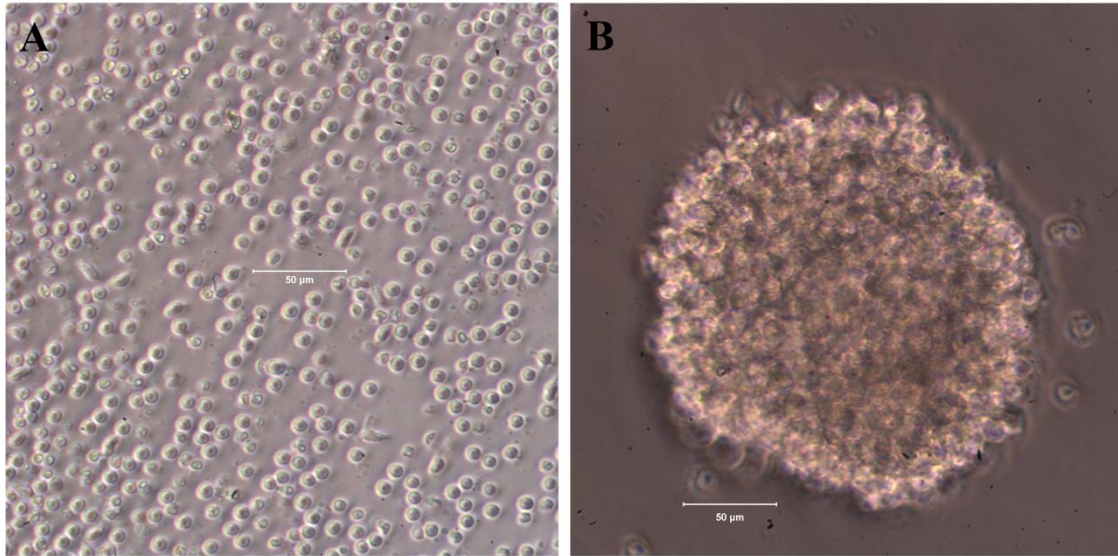
**12. ábra:** A mágneses szeparálás tisztaságának ellenőrzése áramlási citometriával.

Alvadásgátolt perifériás vérből gradiens centrifugálással mononukleáris sejteket szeparáltunk, majd ezek egy részéből két egymást követő negatív mágneses szeparálással  $CD4^+$  T- (A) és  $CD45RO^-$  naiv T-sejteket (B) izoláltunk. Mindhárom sejtszuszpenziót lecentrifugáltuk és 0,5% BSA 1xPBS-ben mostuk majd anti-humán CD4 PerCP Cy5.5 és anti-humán CD45RO PE Cy7 antitestekkel, és párhuzamosan azok izotípus kontrolljával 30 percig, 6-8°C-on, sötétben jelöltük a sejteket. A jelölést követően a sejteket 1xPBS-ben mostuk, majd 3-400 $\mu$ l 1xPBS oldatban vettük fel és BD FACS Calibur áramlási citométer segítségével mértük le. Az eredményeket FlowJo 10.3 szoftverrel értékeltük ki. Rövidítések: CD: differenciációs klaszter, PBMC: perifériás mononukleáris sejtek.

### 3.3. In vitro Th17 differenciáltatás

A naiv T-sejteket anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml; Bio-Techne Ltd., R&D systems, Abingdon, Egyesült Királyság), anti-CD28 (1 $\mu$ g/ml; BioLegend, Inc., San Diego, CA, Egyesült Államok) és egy ezeket keresztköti kecske anti-humán IgG F(ab)2 fragmens antitest (1 $\mu$ g/ml; Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, Egyesült Államok) segítségével aktiváltuk (**13. ábra**). Az *in vitro* Th17-differenciálódást rekombináns TGF $\beta$  (2,5ng/ml) IL-6 (25ng/ml), IL-1 $\beta$  (10ng/ml) és IL-23 (10ng/ml) citokin (mind ImmunoTools GmbH, Friesoythe; Németország) kezelésekkel indukáltuk. A következő kezelés kombinációkat alkalmaztuk: TGF $\beta$ +IL-6, TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ +SIC2x (az immunkomplexek előállítását lásd részletesen 3.5. fejezetben) IL-1 $\beta$ +IL-23, és IL1 $\beta$ +IL-23+IL-6. A Th2 irányú differenciálódás gátlásának érdekében anti-IL-4 (és csak a módszerbeállításnál anti-IFN $\gamma$ ) neutralizáló antitestet (10 $\mu$ g/ml, BioLegend, Inc., San Diego, CA, Egyesült Államok) használtunk valamennyi citokin kezeléssel együtt. A differenciálódás 5. napján a felülúszó 50%-át lecseréltük ekvivalens citokin tartalmú tápfolyadékra. Minden esetben kezeletlen és csak aktivált sejteket használtunk kontrollokként. A sejteket 10 napig differenciáltattuk; a sejtszuszpenziókból a 0., az 5.

és 10. napon vettünk mintát. A mintákból különválasztottuk a sejtfelülűszót, amelyekből a sejtek által termelt citokinek koncentrációját határoztuk meg, illetve magukat a differenciálódott sejteket, amelyekből RNS-t és fehérjét izoláltunk génexpressziós mérésekhez és fehérje analízishez és áramlási citometriás vizsgálatához.



**13. ábra:** 5 napig differenciáltatott kezeletlen (A) és aktivált (B) T sejtek.

Alvadásgátolt perifériás vérből gradiens centrifugálással mononukleáris sejteket szeparáltunk, negatív mágneses szeparálással CD4<sup>+</sup> T-sejteket izoláltunk. A sejtek egy részét nem kezeltük (A), másik részét 5 napig anti-CD3 (1µg/ml), anti-CD28 (1µg/ml) és keresztkötő antitest (1µg/ml) felhasználásával aktiváltuk. A sejteket 24 lyukú lemezen tartva Nikon inverz mikroszkóppal és kamerával 20x-os nagyítással fotóztuk. A sejtek az aktivációt követően láthatóan összecsapzódnak, amely nehezíti az élő sejtek számának meghatározását.

### 3.4. In vitro osteoclast differenciáltatás

Alvadásgátolt EDTA tartalmú vérvételi csövekbe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria) gyűjtött vénás vérből ficoll (Sigma, Darmstadt, Németország) gradiens centrifugálás segítségével mononukleáris sejteket szeparáltunk. Ezt követően a sejtszuspenzióból mágneses szeparálással pozitívan szelektáltuk a CD14<sup>+</sup> monocita sejteket a gyártó (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) utasítása szerint. Áramlási citometriával ellenőriztük a szuszpenzió tisztaságát, ami 90% felett volt, majd tripánkék festést követően megállapítottuk a sejtszámot. A sejteket 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) valamint 1-1% L-glutaminnal és Penicillin-Streptomycinnel (mindkettő Sigma, Darmstadt, Németország) kiegészített minimal essential medium alpha ( $\alpha$ -MEM; Sigma, Darmstadt, Németország) tápban vettük fel. 96 lyukú lemezre vittük fel a sejteket, lyukanként  $10^5$  sejt/100µl táp

denzitásban és térfogatban. Ezután a sejteket 50ng/ml humán rekombináns M-CSF-el (PeproTech, London, Egyesült Királyság) stimuláltuk 24 órán át, amely indukálja a RANK expresszióját. Ezt követően 50ng/ml humán rekombináns RANKL-ot (PeproTech, London, Egyesült Királyság) adtunk a szuszpenzióhoz. A sejteket előzetesen előállított immunkomplex (ezek előállítását lásd részletesen 3.5 fejezetben) kezeléssel vagy anélkül differenciáltattuk 7 napig. Minden donor esetén technikai triplikátumban végeztük el a kísérletet. A kontroll mintákat ekvivalens térfogatú steril 1x szűrt foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS) kezeltük, az immunkomplexekből pedig 1:100 és 1:200 hígításokat alkalmaztunk. 3 nap elteltével lecseréltük a sejtek tápfolyadékát és friss, citokineket és a immunkomplexeket tartalmazó tápoldatot mértünk rájuk. A 7. napon génextpressziós mérésekhez használtuk fel a sejteket.

### **3.5. Immunkomplexek előállítása**

A citokin kezelések mellett szolubilis immunkomplex (SIC) kezelés hatását is vizsgáltuk az in vitro Th17-differenciálódásra. Az immunkomplexeket humán IgG (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, PA, Egyesült Államok) és rekombináns Staphylococcus A fehérje (rSPA; Repligen, Waltham, MA, Egyesült Államok) felhasználásával állítottuk elő a kezelésekhöz, L.M. McLellan és munkatársai által leírtak alapján [218]. A humán IgG készítményből az aggregálódott immunglobulinokat 5 perc 13 000 RPM-en történő centrifugálás segítségével távolítottuk el. Az így megtisztított oldatból 150  $\mu$ M IgG-t összekevertünk 1xPBS-sel és 37,5  $\mu$ M rSPA-val. Ezt követően az oldatot 1 órán keresztül inkubáltuk 37°C-n. A SIC készítményeket 1:100 (SIC1x) és 1:200 hígításban (SIC 2x) frissen elkészítve adtuk a sejtek tápoldatához a Th17 és osteoclast differenciálódás során.

### **3.6. Dohányfüst elnyelése RPMI médiumban**

Steril, FBS és antibiotikum/antimikotikum mentes RPMI médiumot speciális lombikba mértünk, majd ezt egy 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. A lombik zárt csiszolatos tetővel és két kivezető nyílással rendelkezett, amelyek közül az egyik egy a médiumba merülő üvegcső. Ennek végére égő cigarettát helyeztünk, majd a másik kivezető nyílásra, amely nem a médiumba kerülő üvegcső volt, egy vákumpumpát erősítettünk. Egyenes erősséggel rövid időközönként ismételve szívóerőt fejtettünk ki az oldatra, amelynek köszönhetően a cigarettából a füstszűrőn át a médiumon buborék formájában vándorolt

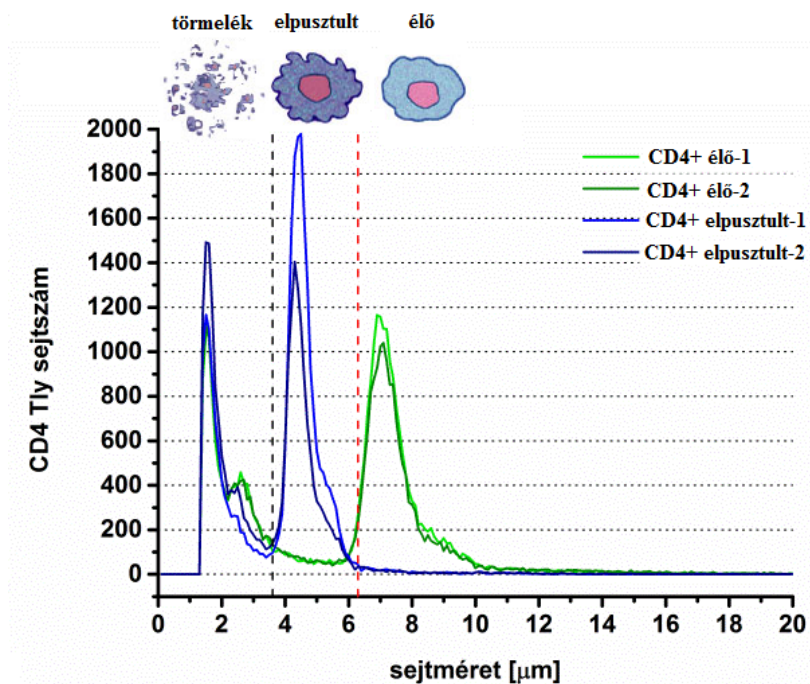
keresztül a dohányfüst. A füst optimális elnyelődését az oldat mágneses keverésével segítettük elő, amelyet ezidő alatt 37°C-on tartottuk. Az elnyeletést követően az elegyből a különböző policiklusos aromás szénhidrogének (TCDD és benzo[a]pirén) jelenlétét az ELTE Kémiai Intézetben Kárpáti Eszter vizsgálta gázkromatográf-tömegspektrometrométer segítségével [219]. Az oldatot 25x-re hígítottuk, majd 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és 1-1% antibiotikum/antimikotikum mixel (Sigma, Darmstadt, Németország) egészítettük ki a sejtek kezeléséhez.

### 3.7. Viabilitás mérés

A differenciálódás 0., 5. és 10. napján a mintavételek mellett a sejtek viabilitását is megmértük, 0. napon tripánkék (Sigma, Darmstadt, Németország) festés követően Bürker kamrával, az 5. és 10. napokon pedig impedancia mérésen alapuló sejtszámláló automata segítségével (CASY-TT, Roche Innovatis, Penzberg, Németország).

A CASY-TT egy impedimetria elvén működő készülék, amely a sejtszám és a sejtméret eloszlás pontos meghatározására is alkalmas (**14. ábra**). A méréseink során 50 µl sejtszuszpenziót 4,95 ml speciális elektrolit oldatban (CASY ton, Roche Innovatis, Penzberg, Németország) szuszpendáltunk, amelyből a készülék 3 x 200 µl mintát vesz és egy 60 µm pórusátmérőjű mérő kapilláris elektródjai között állandó sebességgel áramoltat keresztül. Az élő sejtek, amelyek membránja intakt, jól szigetelő struktúrák, így a kapillárisban elhelyezett elektródok között történő áthaladásuk során ellenállásként detektálhatók, amelynek mértéke a sejtek méretével arányos. Az élő sejteket lemérve, azokban egy etanol tartalmú speciális oldattal (Casy blue) apoptózis indukálható, majd a mérést ismét elvégezve megadhatjuk az apoptotizált sejtek jellemző mérettartományát. Az elpusztult sejtek membránja, így az elektromos erőterben azok barrier funkciója is sérült, ezért ezeket a sejteket jellemzően sejtmag méretűnek detektálja a készülék ("Pulse Area Analysis" módszer).





**14. ábra:** A CASY-TT készülékkel történő viabilitás és sejtméret eloszlás mérés kiértékelése.

Alvadásgátolt perifériás vérből gradiens centrifugálással mononukleáris sejteket, majd ebből negatív mágneses szeparálással CD4+ T-sejteket izoláltunk. 50  $\mu$ l sejtszuszpenziót 4,95 ml speciális elektrolit oldatban (CASY ton) szuszpendáltunk, amelyből a készülék 3 x 200  $\mu$ l mintát egy 60  $\mu$ m pórusátmérőjű mérő kapilláris elektródjai között állandó sebességgel áramoltat keresztül. A sejtekben Casy blue oldattal apoptózist indukáltunk, majd megismételtük a mérést. Rövidítések: CD: differenciációs klaszter, Tly: T-limfocita

### 3.8. mRNS génextpressziós vizsgálatok kvantitatív valós idejű PCR-el

A Th17 differenciáltatás esetén a különböző kezeléseket követően a sejteket lecentrifugáltuk, majd totál RNS-t és fehérjét izoláltunk belőlük NucleoSpin RNA/Protein kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az RNS mintákat 20  $\mu$ l RNáz mentes vízben vettük fel, koncentrációjukat NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, Egyesült Államok) készülékkel határoztuk meg figyelembe véve az 1,8 emissziós arány megtartását a minták tisztaságára vonatkozóan. Vizsgálandó génenként legalább 25 ng RNS-st (az általunk alkalmazott kontroll, konstitutívan expresszáldó háztartási gén expressziójához igazítva) írtunk át SensiFAST cDNS Synthesis Kit (BioLine Reagents Ltd, London, UK) segítségével cDNS-sé reverz transzkripció polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel 20  $\mu$ l végtérfogatban a gyártó utasítása szerint. A hőmérsékleti program a gyártó utasítása

szerint a következő volt: 10 perc 25°C (primerek bekötődése), 15 perc 42°C (reverz transzkripció), 5 perc 85°C (enzim inaktiváció), 4°C-on tartva a program végéig. A valós idejű kvantitatív PCR (RT qPCR) reakciót 96 vagy 384 lyukú lemezen, 8µl végtérfogatban a SensiFast Hi-Rox PCR master mix-el (Bioline Reagents Ltd, London, UK) és a következő primerek felhasználásával végeztük el: *HPRT-1* (Hs02800695\_m1), *RORC* (Hs01076122\_m1), *TBX21* (Hs00203436\_m1) és *AHR* (Hs00169233\_m1) (mindegyik Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A reakciókat standard valós idejű protokoll szerint ABIPrism 7900ht típusú PCR készülék segítségével viteleztük ki. A kapott eredményeket a komparatív ( $\Delta\Delta C_t$ ) módszerrel értékeltük ki, amely valamennyi esetben a hipoxantin foszforibozil transzferáz-1 (*HPRT-1*) háztartási gén mRNS expressziójára vonatkoztatva történt.

Az osteoclast differenciáltatás 7. napján a sejtekből RNeasy Micro Kit (Quiagen, Venlo, Hollandia) segítségével totál RNS-t izoláltunk. A minták RNS koncentrációját NanoDrop ND-1000 készülékkel (Thermo Scientific Software ND-1000 V3.8.1) ellenőriztük, majd a SensiFAST cDNS Synthesis Kit (BioLine, London, UK) felhasználásával mintánként legalább 200 ng RNS-st írtunk át cDNS-sé a gyártó leírása alapján. Az RT qPCR reakciót 384 lyukú PCR lemezen, 5 ng/minta cDNS-ből végeztük el Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Scientific) és specifikus primerek alkalmazásával. A méréshez a következő primereket alkalmaztuk: *CALCR* (GC07M093424), *C-FOS* (GC14P075278), *CTSK* (GC01M150768), *C-FMS* (GC05M150053), *DC-STAMP* (GC08P104339), *NFATc1* (GC18P079395), *OSCAR* (GC19M054094), *RANK* (GC18P062325), *TRAP* (GC00U923131), *SLAP-1* (GC08M133040), és *SLAP-2* (GC20M036613) (IDT, San Jose, Kalifornia, Egyesült Államok). Az eredményeket komparatív ( $\Delta\Delta C_t$ ) módszerrel értékeltük ki, amely valamennyi esetben a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*) (GC12P006533) háztartási gén mRNS expressziójára vonatkoztatva történt.

### 3.9. Áramlási citometriás mérések

A frissen izolált vagy a differenciáltatott sejteket lecentrifugáltuk és hideg 0,5% BSA 1x PBS-ben mostuk majd egyes esetekben (az alkalmazott antitestek gyártói ajánlásai szerint) az Fc receptorokat egér szérummal blokkoltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Az Fc receptor blokkolás az aspecifikus bekötődések csökkentése céljából szükséges,

amely általában az alkalmazott specifikusan kötődő antitesttel azonos organizmusban termelődő, de nem specifikusan kötődő antitestekkel történik. A kísérleteink során alkalmazott antitestek egér eredetűek, így alternatívaként a gyártó ajánlása alapján egér szérum alkalmazható blokkolásra ebben az esetben. A sejteket a sejtfelszíni jelölés során a 12. táblázatban felsorolt antitestekkel 30 percig, 6-8°C-on, sötétben jelöltük. A jelölést követően a sejteket 1xPBS-ben mostuk, majd 3-400µl 1xPBS oldatban vettük fel, és BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok) áramlási citométer segítségével mértük le. Az eredményeket FlowJo 10.3 szoftverrel (Tree Star, Ashland, OR, Egyesült Államok) értékeltük ki.

**11. táblázat:** A sejtfeszíni jelöléshez használt antitestek és izotípus kontrollak.

<b>Primer antitest/fluorokróm</b>	<b>Gyártó</b>
anti-humán CD196 (CCR6) FITC	BioLegend
anti-humán CD194 (CCR4) PE	BioLegend
anti-humán CD183 (CXCR3) PerCP Cy5.5	BioLegend
anti-humán CD3 APC Cy7	BioLegend
anti-humán CD4 PerCP Cy5.5	BioLegend
anti-humán CD45RA FITC	BioLegend
anti-humán CD45RO PE Cy7	BioLegend
anti-humán CD197 APC	BioLegend
egér IgG kappa PE izotípus kontroll	BioLegend
egér IgG2b kappa FITC izotípus kontroll	BioLegend
egér IgG1 PerCP Cy5.5 izotípus kontroll	BioLegend
egér IgG2b kappa FITC izotípus kontroll	BioLegend
egér IgG2a kappa PE Cy7 izotípus kontroll	BioLegend
egér IgG2a kappa APC izotípus kontroll	BioLegend

Az transzkripciós faktorok intracelluláris jelöléséhez a 12. táblázatban felsorolt antitesteket használtuk a gyártó előírásainak megfelelően. A donorokból ficoll gradiens centrifugálással izolált PBMC sejteket centrifugálással ülepítettük, majd a fent leírt metódust követve jelöltük meg a CD3, CD4, CD45RO, CD45RA és CD197 molekulákat. Ezt követően a transzkripciós faktorok jelöléséhez Transcription Factor

Buffer Set (BD Pharmingen™, BD Biosciences, San Jose, California, Egyesült Államok) kit-et alkalmaztunk, amely tartalmazta a megfelelő puffereket. A sejtfelszín jelölését követően a sejteket centrifugálással ülepítettük, majd 2 ml 1xFix/Perm pufferben vettük fel és a vortexelést követően 40-50 percig inkubáltuk 6-8°C-on. A sejtek permeabilizálása után azokat centrifugálással ismét ülepítettük majd két egymást követő lépésben mostuk 1-1 ml 1x Perm/Wash oldatban. A sejteket lecentrifugáltuk, majd 100 µl Perm/Wash oldatban vettük fel, amely tartalmazta az antitesteket vagy izotípus kontrollokat. A sejteket vortexel összekevertük és 40-50 percig, 6-8°C-on sötétben inkubáltuk. A jelölést követően a sejteket két egymást követő lépésben mostuk 1-1 ml 1x Perm/Wash oldatban, majd 3-400 µl 1xPBS oldatban vettük fel és BD FACS Aria III. (BD Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok) áramlási citométer segítségével mértük le. Az eredményeket FlowJo 10.3 szoftverrel (Tree Star, Ashland, OR, Egyesült Államok) értékeltük ki.

**12. táblázat:** Az intracelluláris jelöléshez használt antitestek és izotípus kontrollok.

Primer antitest/fluorokróm	Gyártó
anti-humán TBET PE CF594	BD Biosciences
anti-humán ROR $\gamma$ PE	BD Biosciences
egér IgG2b kappa PE izotípus kontroll	BD Biosciences
egér IgG1 kappa PE CF594 izotípus kontroll	BD Biosciences

### 3.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) és Enzyme-linked immunoSpot (ELISPOT) mérések

Az egyes donoroktól a PBMC szeparálást követően a plazma frakcióból és az in vitro differenciálódás 5. és 10. napján gyűjtött sejtfelülúszókból IL-17A és IL-22 ELISA mérésekhez vettünk mintát. A begyűjtött mintákat -65°C-on tároltuk azok feldolgozásáig. A citokinek koncentrációjának meghatározásához IL-17A (Human IL-17A /homodimer/ ELISA Ready-SET-Go!™ Kit, Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Egyesült Királyság) és IL-22 (eBioscience™ Human IL-22 ELISA Ready-SET-Go!™ Kit, Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Egyesült Királyság) ELISA kit-eket használtunk a gyártó előírásainak megfelelően. Az oldatok pontos IL-17A és IL-22 koncentrációját Multiskan Transmit MS microplate olvasón (Laboratory

Systems Group Pty Ltd, Kilsyth, Victoria, Ausztrália) 405 nm-en mérve, az ELISA kitek saját standard görbéje alapján, pg/ml-ben határoztuk meg.

Az IL17A citokint termelő sejtek számát ELISPOT módszerrel határoztuk meg (Invitrogen™ eBioscience™ Human IL-17A ELISPOT Ready-SET-Go!™, Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Egyesült Királyság) a gyártó előírásainak megfelelően. A differenciálódás 0. napján a frissen izolált PBMC vagy a naiv illetve a memória T sejteket technikai triplikátumban vittük fel ( $1-2 \times 10^5$  sejt/lyuk) vittük fel az antitesttel fedett ELISPOT lemezre (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), majd  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 antitesttel aktiváltuk 24 óráig. A lemezeket előhívtuk, majd ELISPOT olvasóval bescanneltük (CTL - Europe GmbH, Bonn, Németország) és CTL szoftver (CTL analysers LLC., Shaker Heights, OH, USA) segítségével kvantifikáltuk a citokint termelő sejtkolóniák számát, melyet kolóniaformáló egységben adtunk meg (spot forming colony, SFC).

### **3.11. Konfokális mikroszkópia**

A citoplazmában lokalizált aromás szénhidrogén receptor kimutatásához a frissen szeparált naiv és memória T sejteket kétszer mostuk 1xPBS-ben, majd 2%-os paraformaldehid (PFA) oldatban 20 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. 1xPBS-ben mostuk a sejteket, és permeabilizáló oldatban (0,1% szaponin, 1% BSA, PBS-ben) 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. E lépéstől kezdve a sejteket a jelölés alatt mindvégig a permeabilizáló oldatban tartottuk. Fc receptorok blokkolását egér szérum segítségével végeztük, amelyet az elsődleges antitest hozzáadása előtt adtunk a sejtszuspenzióhoz. Az AHR jelöléséhez  $5 \mu\text{g/ml}$  koncentrációban monoklonális egér anti-AHR antitestet (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Egyesült Államok) használtunk. A sejteket a primer antitest oldatban egy éjszakán át  $4^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk, majd kétszer mostuk a permeabilizáló oldatban. A másodlagos kecske anti-egér Alexa488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) antitestet  $4 \mu\text{g/ml}$  koncentrációban adtuk a sejtekhez a permeabilizáló oldatban. A másodlagos antitest mellett  $5 \text{ nM}$  koncentrációban DRAQ5 sejtmagfestéket is adtunk a sejtekhez, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a szuszpenziót. 1xPBS-ben mostuk a sejteket és jégen tartottuk a mérés kezdetéig. A mérés előtt 8 kamrás ibidi lemezre vittük fel a sejtszuspenziókat (ibidi GmbH, Planegg, Németország) A felvételeket négy optikai

csatornával felszerelt FluoView 500 konfokális lézerpásztázó mikroszkópon (Olympus, Hamburg, Germany) 60×-os olaj-immersiós objektíven és NA:1,45 magas numerikus apertúra beállítással készítettük.

### **3.12. Statisztika**

Az adatok statisztikai elemzését GraphPad Prism V6 (San Diego, CA, US), R [220] és SPSS 15.0 (IBM, Armonk, New York, Egyesült Államok) programokkal végeztük. Az egy változós analízis során két függő minta összehasonlításához Wilcoxon-signed rank tesztet, független minták összehasonlításához Mann-Whitney-tesztet használtunk. Három vagy annál több csoport összehasonlításához Friedman-tesztet illetve Dunn-post hoc-tesztet használtunk. Amennyiben a csoportok közötti különbség indokolta, több csoport összehasonlítása esetén páronkénti összehasonlításokat is végeztük a két fenti tesztet alkalmazva. Korreláció analízis során az adatsorok között lineáris Pearson-korrelációt vizsgáltunk. Több változós analízis esetében a különböző szempontok szerint (kezelések, beteg és egészséges csoportok) alkotott csoportokat varianciaanalízis (ANOVA) és Tukey's honest significant difference (Tukey HSD) tesztek segítségével elemeztük. A vizsgált csoportok esetében minden mért adatot felhasználva végeztük el a lineáris diszkriminancia analízist (LDA). Ennek lényege, hogy a mért paraméterek számértékei definiálják a térben az egyes donorokat. Az említett tér az adattípusoknak megfelelő számú síkot tartalmaz, amelyet két dimenzióban ábrázoltunk. E módszer alkalmas arra, hogy megbecsüljük a csoportosításunk (beteg és egészséges) helyességét és meghatározzuk azon tényezőket, amelyek megkülönböztetik a csoportokat, valamint definiáljuk, hogy az adott csoporthoz való tartozás hány %-ban becsülhető az adott változóval. Ez alapján szemléltethető, hogy mennyire választható el egymástól az egészségesek és a betegek csoportja, kizárólag a mért adatok alapján.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A humán *in vitro* Th17-differenciálódás vizsgálata egészséges donorok mintáiban

Kísérleteinket azoknak az optimális körülményeknek és faktoroknak a beállításával kezdtük, amelyek ismeretében jól vizsgálhatóvá válik *in vitro* a humán Th17-differenciálódás folyamata. Ekkor még nem álltak rendelkezésre olyan összetett sejtzitoláló rendszerek, amelyek lehetővé tették volna a kis mennyiségben jelenlévő, több marker alapján elkülönített primer sejtpopuláció vizsgálatát. A különböző Th17-differenciálódást befolyásoló tényezők (pl. mikroorganizmusok vagy szennyezőanyagok) hatása a sejtek fenotípusára még ma sem ismert minden részletében. Igyekeztünk olyan citokineket alkalmazni a kísérleteink során, amelyek esetében több irodalmi adat utal azok releváns szerepére a Th17-differenciálódásban. Célunk az volt, hogy meghatározzuk ezen citokinek optimális kombinációját és koncentrációját, a kiindulási sejtpopuláció típusát, és hogy vizsgáljuk a sejtek aktivációját valamint a Th1/Th2 irányú differenciálódást elősegítő anti-IFN $\gamma$ /anti-IL4 neutralizálásának a hatását a differenciálódásra egészségesekben.

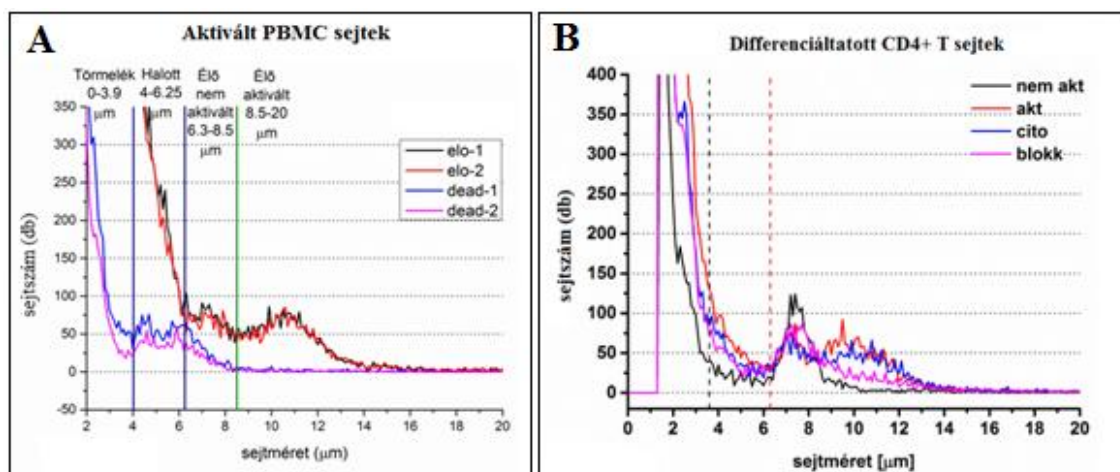
Az irodalmi adatok alapján kiválasztott IL-1 $\beta$ , IL-6 és TGF $\beta$  citokineket különböző kombinációban kapták a szeparált mononukleáris sejtek az aktiváció (anti-CD3 és anti-CD28) mellett. Az alkalmazott három kialakított citokin kombináció: a TGF $\beta$ +IL-6, IL-6+IL-1 $\beta$  és a TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  volt, amelyekben mindegyik citokin esetén alkalmaztunk egy alacsonyabb és egy magasabb koncentrációt (összesen 12 féle kezelés), valamint kontroll kezeléseket (kezeletlen és csak aktivált). A sejtek *RORC* expresszióját a 0., 5., 7. és 9. napokon vizsgáltuk.

A TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  citokin kombinációs kezelés hatására a sejtek *RORC* expressziója már az 5. napon nőtt és ez a 9. napig számottevően nem változott. Ez az expressziós változás abban az esetben volt tapasztalható, amikor a TGF $\beta$ -nak egy alacsonyabb (2,5 ng/ml), míg az IL-6 és IL-1 $\beta$  citokineknek a magasabb (30 ng/ml és 10 ng/ml) koncentrációját alkalmaztuk. Az IL-6 esetében 25 ng/ml-es koncentrációt preferáltunk a későbbiekben, amelyet az irodalmi adatok is megerősítettek.

Vizsgáltuk a T-sejt specifikus anti-CD3 és anti-CD28 antitestek és egy harmadik, ezeket keresztköti antitest (kecske anti-egér Fab fragmentum) által indukált sejtaktiváció

citokin termelésre kifejtett hatását. Azt tapasztaltuk, hogy a keresztköti antitest alkalmazása nagyobb mértékben aktiválja a sejteket, mint ha csupán az anti-CD és anti-CD28 antitesteket alkalmaznánk. A hatást a sejtek IL-2 termelésének mérésén keresztül igazoltuk. Az *in vitro* Th17-differenciálódás során valamennyi ezt követő kísérletben a sejteket mindig anti-CD3+anti-CD28+keresztköti antitestek (mindháromat 1 µg/ml koncentrációban használva) kombinációjával aktiváltuk. Mind PBMC, mind CD4<sup>+</sup> sejtek esetében megfigyeltük, hogy az aktiváció hatására a sejtek egy részének mérete megnövekszik, amely mikroszkópban és az impedancia mérés alapú viabilitás vizsgálatok alkalmával is detektálható volt (**15. ábra**). A PBMC sejtek esetében a fekete és piros vonalakkal ábrázoltuk az élő sejteket, ezen látható, hogy a 48 órás aktivációt követően az élő sejtek méretében a görbe kétsúcsú, azaz körülbelül 50-50% arányban kétféle (7-9µM és 9-13µM méretű) méretű élő sejt volt megfigyelhető a mintában. A CD4<sup>+</sup> sejtek esetében az ábra az *in vitro* Th17-differenciálódás 5. napján mutatja a sejtek viabilitását. A fekete vonallal jelölt aktiválatlan sejtek esetében azonos méretűek a sejtek, azonban a piros, és kék vonallal ábrázolt, csak aktivált és citokinkezelt sejtek esetén, a görbe szintén kétsúcsú, azaz különböző arányban találunk eltérő méretű sejteket. A aktiváció és citokinkezelés mellett a neutralizáló antitestek együttes alkalmazása esetén főként a kisebb méretű sejtek figyelhetők meg a mintában (**15. ábra**).

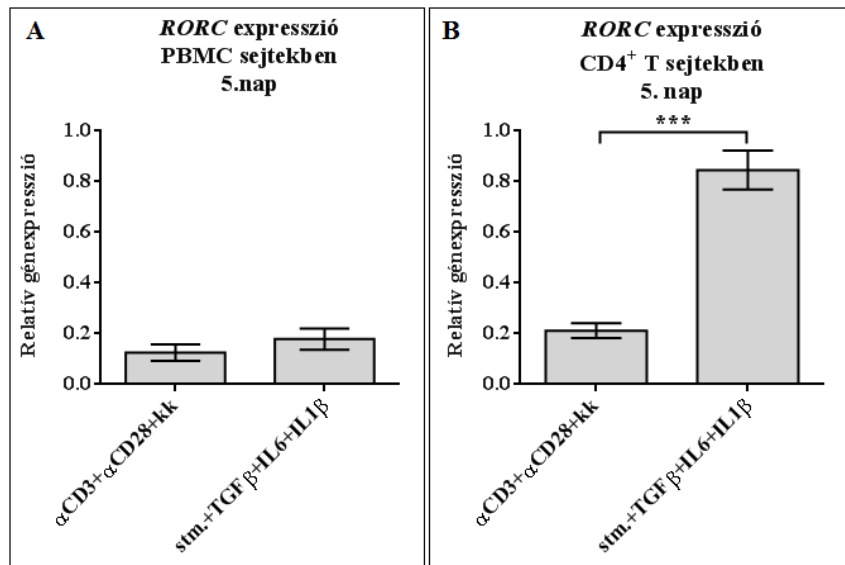




**15. ábra:** Az aktiváció hatása a PBMC (A) és CD4<sup>+</sup> T sejtek (B) méretére.

A: Egészségesek alvadásgátolt perifériás véréből gradiens centrifugálással mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk, majd 24 órán át anti-CD3-al (1 µg/ml), anti-CD28-al (1 µg/ml) és keresztköti antitesttel (1 µg/ml) aktiváltuk azokat. 50 µl sejtuszpenziót 4,95 ml speciális elektrolit oldatban (CASY ton) szuszpendáltunk, amelyből a készülék 3 x 200 µl mintát egy 60 µm pórusátmérőjű mérő kapilláris elektródjai között állandó sebességgel áramoltat keresztül. A sejtekben Casy blue oldattal apoptózist indukáltunk, majd megismételtük a mérést. B: A korábban leírt módon előállított PBMC sejtekből mágneses szeparálással CD4<sup>+</sup> T-sejteket izoláltunk. A sejtek egy részét nem kezeltük (nem akt), más részét különböző kezeléseknak vetettük alá: csak aktivált sejtek (anti-CD3+anti-CD28+keresztköti antitest), cito: anti-CD3+anti-CD28+keresztköti antitest+TGFβ+IL-6+IL-1β kezelés, blokk.: anti-CD3+anti-CD28+keresztköti antitest+TGFβ+IL-6+IL-1β+anti-IL4+anti-IFNγ. Az alkalmazott antitest és citokinkoncentrációk a következők voltak: anti-CD3, anti-CD28, keresztköti antitest: 1 µg/ml, TGFβ: 2,5 µg/ml, IL-1β, anti-IL-4, anti-IFNγ: 10 µg/ml, IL-6: 25 µg/ml. Rövidítések: elo-1, -2: élő sejtek, dead-1, -2: halott sejtek.

Kísérleteink beállításához szükségesnek tartottuk meghatározni azt a kiindulási sejtpopulációt, amelyből a Th17 irányú differenciálódás elindítható (irodalmi adatok szerint mind PBMC, mind pedig CD4<sup>+</sup> T sejtekből elindítható). Egészséges donorok PBMC és CD4<sup>+</sup> T sejtjeit 5 napig, aktiváció+TGFβ+IL-6+IL-1β kezeléssel stimuláltuk, majd mindkét frakcióban vizsgáltuk a Th17 specifikus *RORC* gén expresszióját. Eredményeink szerint CD4<sup>+</sup> T sejtek kezelését követően nagyobb mértékű transzkripciós faktor génexpresszió növekedés érhető el, mint PBMC sejtek kezelését követően. Míg előbbi esetben aktiváció+TGFβ+IL-6+IL-1β kezelés hatására csak másfélszeres *RORC* expresszió emelkedést tapasztaltunk a csak aktivált sejtekhez viszonyítva, addig ez a változás CD4<sup>+</sup> sejtek kezelésekor körülbelül négyszeres volt (**16. ábra**).

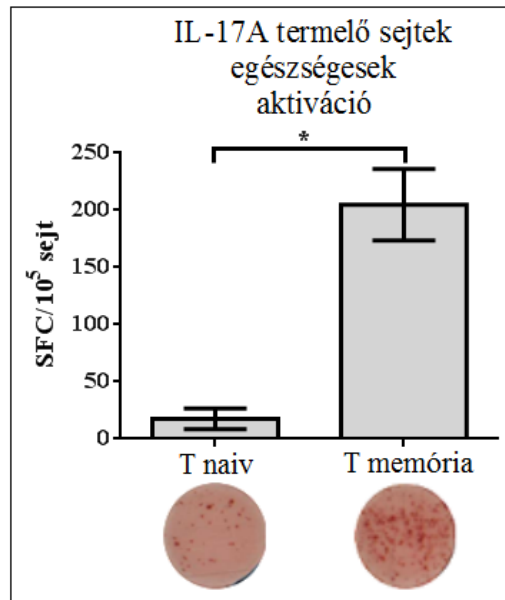


**16. ábra:** A *RORC* expresszió változása PBMC (A) és CD4<sup>+</sup> T sejtekben (B) citokin kezelés hatására.

Egészségesek alvadásgátolt perifériás véréből gradiens centrifugálással mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk (n=6) (A) majd azokból mágneses szeparálással CD4<sup>+</sup> T-sejteket különítettünk el (n=6) (B). A PBMC és CD4<sup>+</sup> T-sejteket 5 napig anti-CD3-al, anti-CD28-al és keresztköti antitestekkel ( $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28+kk) stimuláltuk vagy az aktiváció mellett citokinekkal (stm.+TGF $\beta$ +IL6+IL1 $\beta$ ) kezeltük azokat. Ezt követően a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t írtunk a mintákból és RT qPCR elvégzését követően elemeztük a *HPRT-1* háztartási gén expressziójára normalizált *RORC* expressziót. Az oszlopdiagramon átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltunk, \*\*\*p<0,001. Rövidítések: CD: differenciációs klaszter, TGF $\beta$ : tumor grow factor beta, IL: interleukin, stm.: aktiváció, *RORC*: RAR Related Orphan Receptor C, kk: keresztköti antitest

Irodalmi források alapján a Th1 és Th2 irányú differenciálódás blokkolásakor optimálisabb lehet az *in vitro* Th17-differenciálódás [221]. Ez alapján vizsgáltuk az anti-IL-4, mint Th2 sejtek által termelt IL-4, és az anti-IFN $\gamma$ , mint a Th1 sejtek által termelt IFN $\gamma$  citokineket neutralizáló antitestek hatását. Kísérletünkben a felsorolt neutralizáló antitestekkel kezeltük a CD4<sup>+</sup> T sejteket a fent kifejtett aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  kezelést kiegészítendő. Kontrollként, ahogy korábban is, kezeletlen, csak aktivált és csak citokinekkal kezelt sejteket használtuk. A differenciálódás 5. és 10. napján mértük a sejtek transzkripciós faktor expresszióját és citokin termelését. A neutralizáló antitestek hatására a *RORC* transzkripciós faktor kifejeződése és a sejtek IL-17A termelése fokozódott, ugyanakkor az IL-22 termelésük csökkent. Eredményeink alapján a sejtaktiváció nemcsak a *RORC* expresszióját, hanem az IL-17A és IL-22 citokinek termelődését is fokozta a CD4<sup>+</sup> T sejtekben. Felmerült a kérdés, hogy a T-sejtek között lévő memóriasejtek okozhatják-e a megfigyelt értékeket, így a továbbiakban a CD4<sup>+</sup> T sejtek izolálását követően egy második mágneses

szeparálással elkülönítettük a naiv ( $CD45RO^-$ ) sejtektől a memória sejteket ( $CD45RO^+$ ) és kizárólag a naiv sejtekből indítottuk a differenciálódást. Megvizsgálva a naiv és a memória sejtek IL-17A termelését is egyértelműen látható volt, hogy a memóriasejtek jelenléte jelentősen befolyásolja az *in vitro* differenciálódást (**17. ábra**).

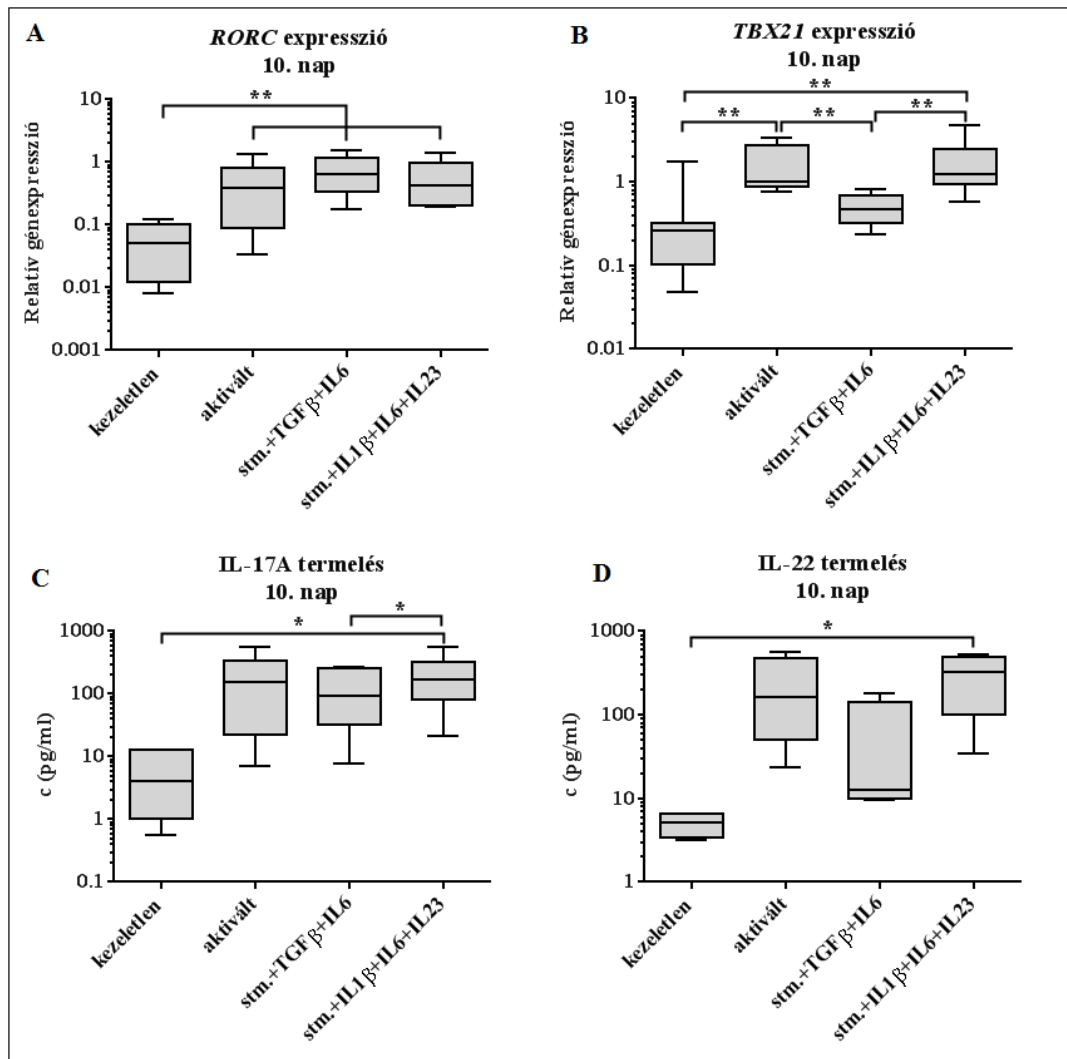


**17. ábra:** IL-17A termelő sejtek száma a naiv és a memória T sejtek aktiváció hatására.

Egészséges donorokból ( $n=6$ ) a 16. ábránál ismertetett módon naiv és memória sejteket izoláltunk. A sejteket anti-CD3 antitest segítségével 24 órán át aktiváltuk, majd ELISPOT módszerrel megállapítottuk az IL-17A termelő sejtek számát, amelyet kolóniaformáló egység (SFC)/ $10^5$  sejtre vonatkoztatva adtuk meg. Az oszlopdiagrammon átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltunk,  $*p<0,5$ . Rövidítések: IL: interleukin

Irodalmi adatok utalnak arra, hogy az egérben leírtakhoz hasonlóan emberben is jellemző a Th17-sejtek differenciálódására egy bizonyos mértékű "rugalmasság" más T-sejt szubpopulációk kialakulásának irányába. Leírtak olyan Th1 és a Th17-sejtek közötti, átmeneti fenotípusú sejteket, amelyek mindkét sejtípusra jellemző mester regulátor transzkripciós faktor géneket (Th1: humán: *TBX21*, egér: *Tbx21*; Th17: humán: *RORC*, egér: *Rorc*) kifejezik és mindkét sejtre jellemző citokineket termelnek (Th1:  $IFN\gamma$ ; Th17: IL-17) [90]. Ez a fenotípus feltehetően fontosabb szerepet tölt be az autoimmun betegségek kialakulásában, mint azok a Th17-sejtek, amelyek főként IL-17-et termelnek. A fent kifejtett átmeneti fenotípus kialakulásának hátterében az egyik lényeges tényező a sejteket körülvevő citokinkörnyezet. Ennek vizsgálatához különböző, a Th17-differenciálódásban szerepet játszó, de különböző hatású citokinekkal kezeltük naiv T sejteket ( $TGF\beta+IL-6$  valamint  $IL-1\beta+IL-6+IL-23$ ).

Irodalmi adatok alapján a korábbiakban vizsgált TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  hatása az optimális fiziológias fenotípusú Th17-sejtek kialakulását segíti elő, míg IL-23 hatására pathológias funkciójú sejtek keletkezhetnek [88, 90]. Eredményeink alapján a Th17-specifikus *RORC* transzkripciós faktor expresszióra többféle citokin is indukáló hatással van, azonban a sejtek citokintermelése eltérően regulálódik. A Th17-differenciálódást indukáló citokinkörnyezet érdekes módon a Th1 specifikus *TBX21* transzkripciós faktor expresszióra is hatással volt (**18. ábra**). Annak eldöntéséhez, hogy pathológias körülmények között megtalálhatóak-e mindkét transzkripciós faktort expresszáló sejtek, további kísérleteket végeztünk el (lásd részletesen a 4.3.1. fejezetben).



**18. ábra:** *RORC* (A), *TBX21* (B), IL-17A (C) és IL-22 termelés (D) vizsgálata egészségesek CD4<sup>+</sup> T sejteiben különböző kezelések hatására.

A naiv sejteket a 16. ábránál ismertetett módon izoláltuk, majd 10 napig különböző kezeléseknél vetettük alá. Ennek során anti-CD3-al (1 µg/ml), anti-CD28-al (1 µg/ml) és keresztköti (1 µg/ml) antitestekkel (aktivált), illetve az aktiváció mellett TGFβ (2,5 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml) (stm.+TGFβ+IL6), vagy IL-1β (10 ng/ml), IL-6 és IL-23 (10 ng/ml) citokin (stm.+IL1β+IL6+IL23) kezeléseket alkalmaztunk. Ezt követően a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t írtunk a mintákból és RT qPCR elvégzését követően elemeztük a *HPRT-1* háztartási gén szintjére normalizált *RORC* (n=8) és *TBX21* (n=8) expressziót. A sejtek IL-17A (n=6) és IL-22 (n=4) termelését ELISA módszerrel vizsgáltuk. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják, \*p<0,05, \*\*p<0,01. Rövidítések: stm. = aktiválás

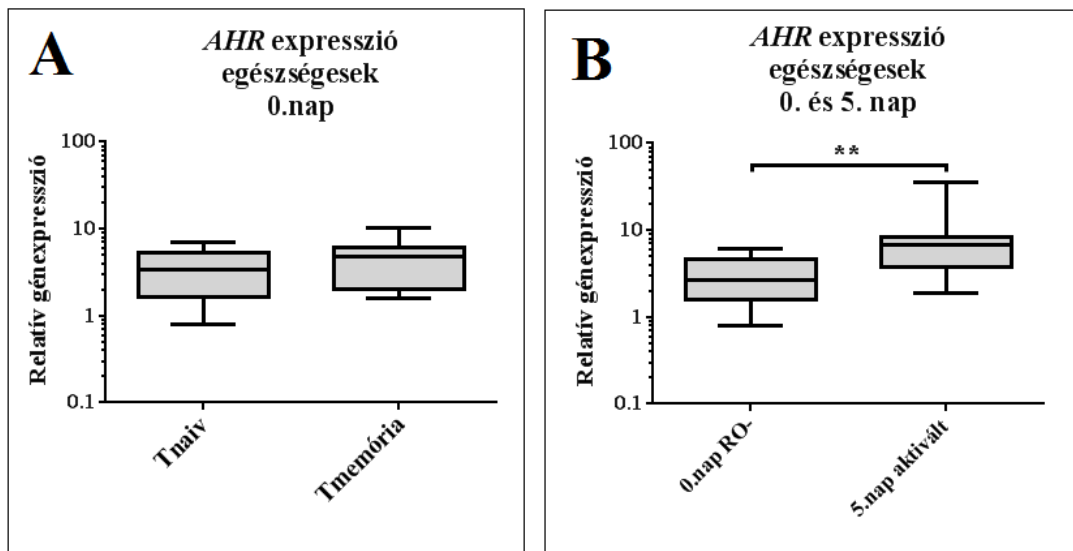
#### 4.2. AHR ligandok és immunkomplexek hatásának vizsgálata a Th17-sejtek és az osteoclastok differenciálódására

Kísérleteink során a dohányzás, mint külső környezeti tényező és az immunkomplexek T sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. Az AHR-nek számos ligandja létezik, amelyek közül néhány a dohányfüstben illetve egyes gyógyszerekben is megtalálható, így

szerepe lehet a dohányfüst hatásának közvetítésében különböző gének expressziójának szabályozásán keresztül.

#### 4.2.1. Aromás szénhidrogén receptor expresszió vizsgálata T-sejtekben

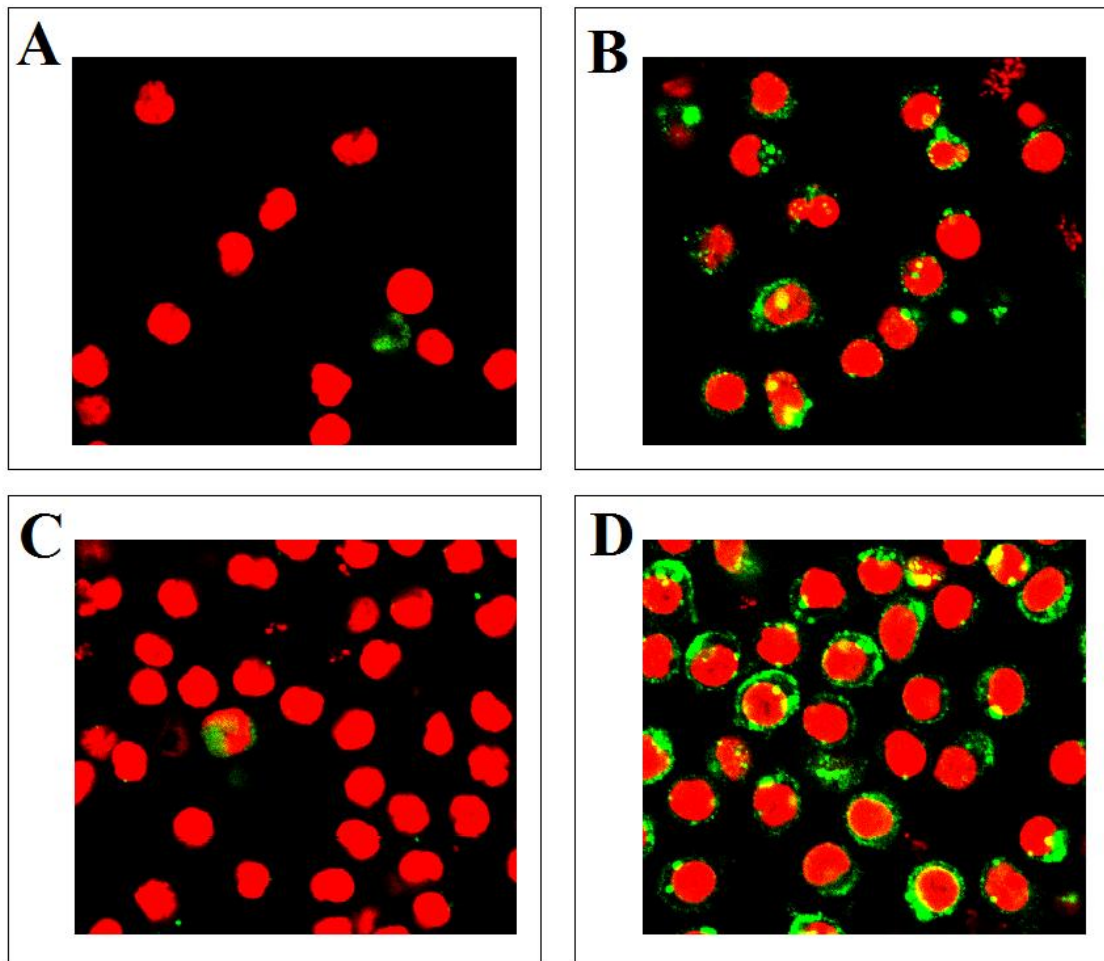
Jelen kísérletünk során kimutattuk az AHR-t egészséges donorok kezeletlen, frissen szeparált CD45RO<sup>-</sup> naiv és CD45RO<sup>+</sup> memória T sejtjeiben és vizsgáltuk annak kifejeződését aktiváció (anti-CD3+anti-CD28+keresztükötő antitest) hatására. Perifériás vérből két egymást követő mágneses szeparálással naiv és memória sejteket izoláltunk, amelyekből mind gén (19. ábra), mind pedig fehérje szinten (20. ábra) meghatároztuk az AHR kifejeződését. A génexpressziós méréseket kvantitatív valós idejű PCR, míg az AHR fehérje jelenlétét konfokális lézer pásztázó elektronmikroszkópiával vizsgáltuk.



**19. ábra:** *AHR* génexpresszió összehasonlítása egészséges donorok naiv és memória sejtjeiben (A) és aktiváció által indukált expresszió változás vizsgálata naiv sejtekben (B).

A 16. ábránál ismertetett módon naiv és memória sejteket izoláltunk. A sejteket anti-CD3, anti-CD28 és keresztükötő antitest (aktivált) alkalmazásával 5 napig aktiváltuk. Ezt követően a 18. ábránál leírt módon, génexpressziós analízist végeztünk, mely során a *HPRT-1* háztartási gén szintjére normalizált *AHR* génexpressziót a 0. napon (n=12) a kezeletlen naiv és memória sejtekben (A) és az 5. napon (n=10) az aktivált naiv sejtekben (B). A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják, \*\*p<0,01. Rövidítések: *AHR*: aromás szénhidrogén receptor, RO<sup>-</sup>: naiv T-sejtek.

Egészséges donorok naiv és memória sejtjeiben az *AHR* expressziója hasonló mértékű és aktiváció hatására fokozódik (20-21. ábrák).



**20. ábra:** Az AHR expressziójának vizsgálata egészséges donorok kezeletlen naiv (A), aktivált naiv (B), kezeletlen memória (C) és aktivált memória (D) sejteiben.

Egészséges donorokból (n=3) a 16. ábránál leírt módon naiv és memória sejteket izoláltunk. A sejteket fixáltuk, majd blokkoltuk az Fc receptorokat. A permeabilizálást követően anti-AHR antitesttel és Alexa488-al konjugált szekunder antitesttel, valamint DRAQ5 sejtmagfestékkel jelöltük. A felvételeket FluoView 500 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal készítettük

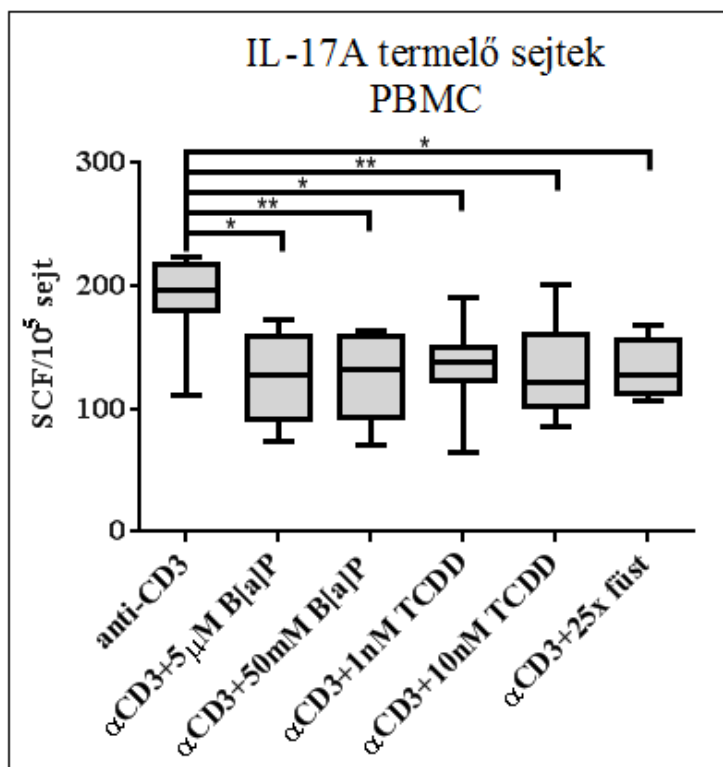
#### 4.2.2. AHR ligandok hatása a sejtek IL-17A termelésére.

A dohányfüstnek több mint 4000 összetevője közül néhány esetében, mint például a dioxin (TCDD) vagy a benzo[a]pirén leírták, hogy hatással van a T-sejtek differenciálódására és/vagy funkciójára. Kísérletünkben a dohányfüst komplex hatását vizsgáltuk PBMC sejtek IL-17A termelésére. Mind a benzo[a]pirén, mind a TCDD, az AHR agonista hatású ligandja, amelyek irodalmi adatok alapján gátolják (TCDD) vagy elősegítik (B[a]P) a Th17-sejtek kialakulását és/vagy funkcióját [93, 222]. Ezen anyagokkal kezeltük a sejteket, mindkét esetében egy kisebb és egy nagyobb koncentrációt alkalmazva. Összehasonlításképpen steril körülmények között próbálunk

előállítani olyan sejtmediumot, amelyben dohányfüstöt nyelettünk el annak komplex hatásának vizsgálatához. Az így előállított médiumból, tömegspektrometriás analízist követően Kárpáti Eszter és munkatársai sikeresen azonosították a benzo[a]pirént, mint policiklusos aromás szénhidrogén molekulát [219]. A sejtkezelés során a dohányfüstös médiumot 25x-ös hígításban alkalmaztuk. A mérés során a kezelt PBMC-t 24 óráig aktiváltuk anti-CD3 antitesttel (0,75µg/ml), majd ELISPOT módszerrel vizsgáltuk az IL-17A termelő sejt kolóniák számát. Kontrollként csak aktivált sejteket használtunk és valamennyi kezelés esetében áramlási citometriával és Bürker kamrával vizsgáltuk a sejtek viabilitását. Eredményeink szerint, egészséges donorok PBMC sejtjeiben az aktiváció által kiváltott IL-17A termelést gátolja mindkét AHR agonista és a dohányfüsttel kezelt médium is. Emellett a kezelések szignifikánsan nem befolyásolták a sejtek viabilitását (**21. ábra**)

Az AHR szintén agonista ligandja az RA terápiájában használt leflunomid [223]. A Th17-differenciálódás betegeknél történő vizsgálata során a betegek terápiája szerinti különbségeket is számba vettük a fentiek ismeretében. A leflunomid terápiában részesülő betegek sejtjeire kisebb mértékű IL-22 termelés volt jellemző a biológiai terápiás betegekhez viszonyítva ( $p < 0,01$ ), amely a Th17-differenciálódás indukálása mellett (stm.+TGFβ+IL-6+IL-1β+anti-IL4) fokozottabbá vált ( $p < 0,01$ ), mint a biológiai terápiás kezelésben részesülő RA-s betegek esetében. A különböző Th17 indukáló kezelések közül csupán a fent említett esetben figyeltük meg ezt a különbséget a 0.naphoz viszonyított IL-22 termelés mértékének változásában.



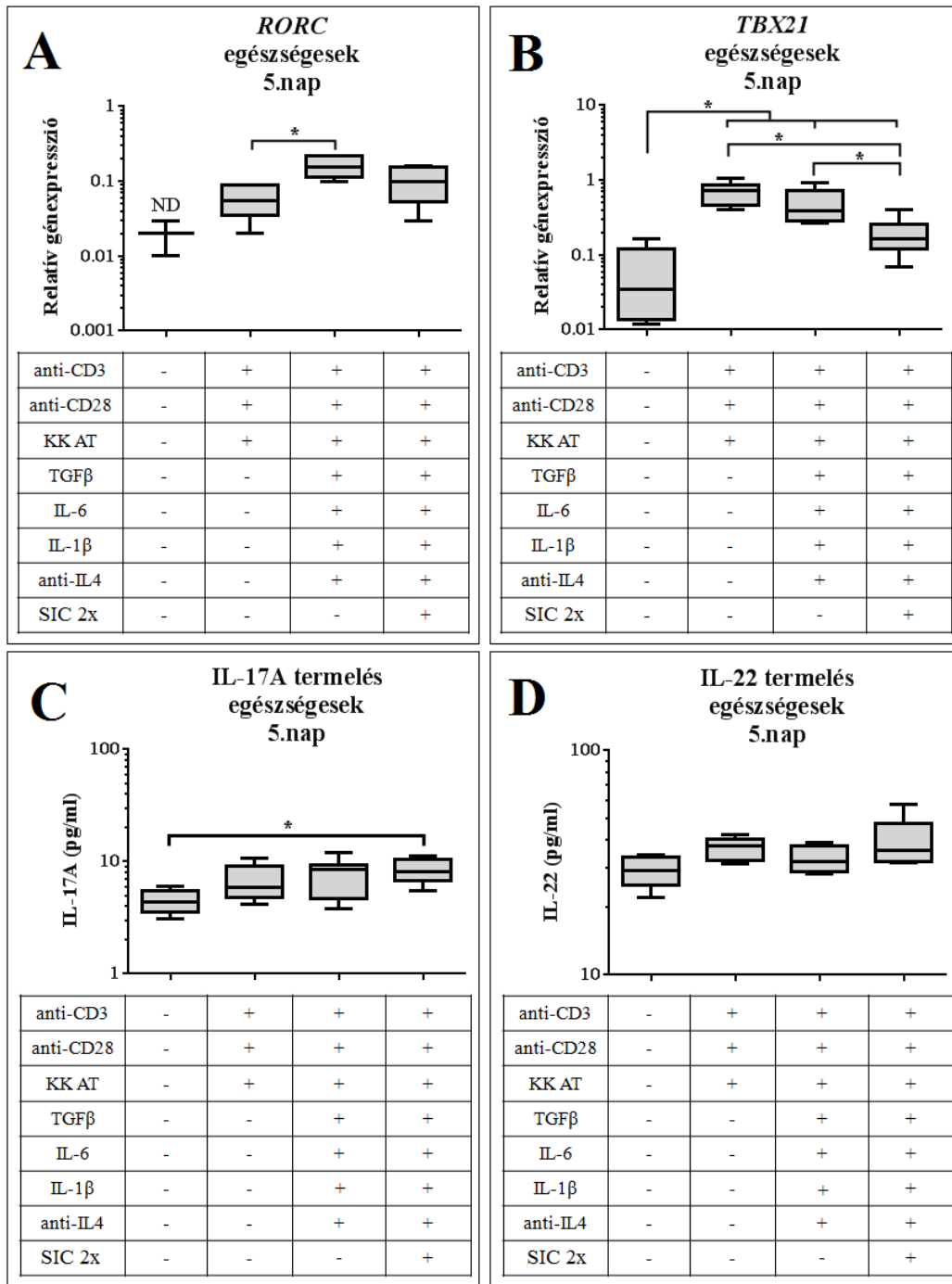


**21. ábra:** IL-17A termelő sejtek számának vizsgálata különböző AHR ligandok és dohányfüsttel kezelt sejtmedium hatására.

Egészséges donorokból (n=3) a 16. ábránál leírt módon mononukleáris sejteket izoláltunk, majd a 17. ábránál leírt módon ELISPOT módszerrel megállapítottuk az IL-17A termelő sejtek számát, amelyet kolóniaformáló egység (SFC)/10<sup>5</sup>sejtre vonatkoztatva adtuk meg. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják, \*p<0,5, \*\*p<0,01. Rövidítések: B[a]P: benzo[a]pirén, TCDD: 2,3,7,8-tetraklór-dibenzo-p-dioxin.

#### 4.2.3. Az immunkomplexek hatása a Th17-differenciálódásra

Az immunkomplexek számos autoimmun betegségben (pl.: RA, SLE) szerepet játszanak a gyulladás kialakulásában és fenntartásában. Munkánk során vizsgáltuk, hogy a rekombináns *Staphylococcus A* fehérjéből és humán IgG-ből álló immunkomplex (L.M. McLellan és munkatársainak cikke alapján 1:200 szoros hígításban alkalmazva [218]) jelenléte hogyan befolyásolja a Th17-differenciálódást egészségesekben és AP-s betegekben. A Th17-sejtek kialakulását indukáló citokinkezelés (stm.+TGFβ+IL-6+IL-1β+anti-IL4) hatására, szolubilis immunkomplex jelenlétében és hiányában vizsgáltuk a sejtek *RORC* és *TBX21* expresszióját, valamint IL-17A és IL-22 termelést.



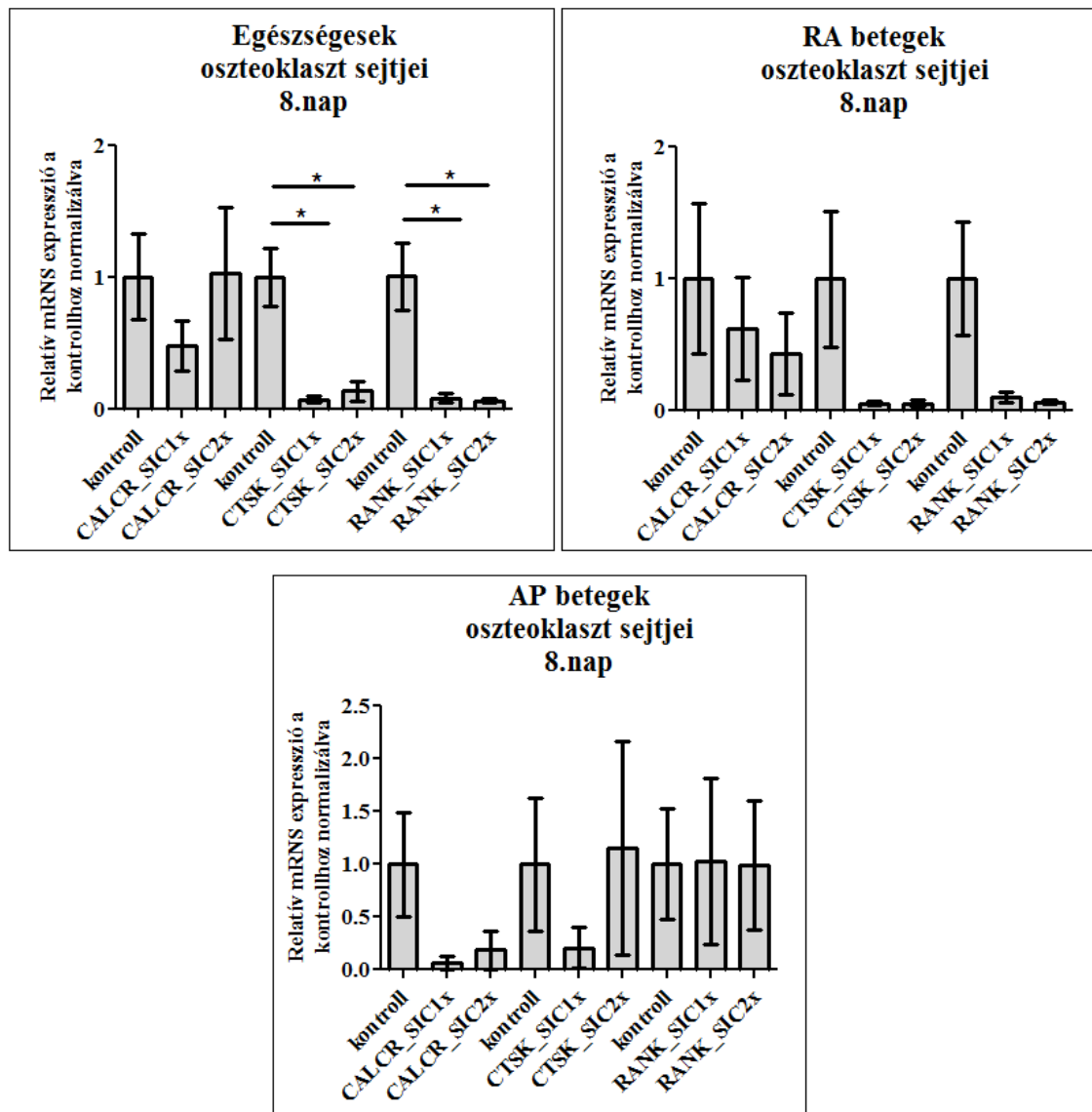
**22. ábra:** Immunkomplexek hatásának vizsgálata a humán in vitro Th17-differenciálódásra egészséges donorokban.

Egészségesekből a 16. ábránál leírt módon naiv T-sejteket izoláltunk. A sejteket 5 napig különböző kezeléseknek vetettük alá, mely során anti-CD3-al (1 µg/ml), anti-CD28-al (1 µg/ml) és keresztktő (1 µg/ml) antitestekkel aktiváltuk, illetve aktiváció mellett TGFβ (2,5 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml) citokinekkal és anti-IL4 (10 ng/ml) antitesttel kezeltük. A citokinkezelés mellett a sejtek egy részének 1:200 hígításban szolubilis immunkomplexet (SIC 2x) adtunk. Ezt követően a 18. ábránál leírt módon, géneexpressziós analízist végeztünk, amely során a *HPRT-1* gén szintjére normalizált *RORC* (n=6) és *TBX21* (n=6) expressziót elemeztük. A sejtek IL-17A (n=6) és IL-22 (n=5) termelését ELISA módszerrel határoztuk meg. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják, \*p<0,05. Rövidítések: ND: nem determinálható.

Az immunkomplexekkel kezelt egészséges donorokból származó sejtekben a *RORC* expresszió a többi kezeléshez hasonlóan nőtt, azonban nem különbözött a csak aktivált, illetve citokinkezelt sejtektől. Emellett a *TBX21* expressziót mind az aktivált, mind pedig a citokinkezelt sejtekhez viszonyítva csökkentette az immunkomplexek jelenléte. A sejtek IL-17A termelésére pozitív hatással volt az immunkomplex kezelés, míg az IL-22 termelést nem befolyásolta (**22. ábra**). AP-s betegekben a citokin+SIC kezelés az aktivációhoz és a citokinkezeléshez hasonló mértékben fokozta az IL-17A termelését, ezen kívül kezelések között egyéb különbséget nem tapasztaltunk egyik paraméter esetében sem.

#### **4.2.4. Az immunkomplexek hatása az osteoclastok differenciálódására**

Kísérletünkben, egészségesekben valamint RA-s és AP-s betegekben vizsgáltuk az immunkomplexek hatását az osteoclastok in vitro differenciálódására. L.M. McLellan és munkatársai leírták, hogy az rekombináns Staphylococcus A fehérjéből és humán IgG-ből álló immunkomplexek gátolják az osteoclastogenezist [218], amely megfigyelést saját kísérleteink során is megerősítettünk. Az általuk alkalmazott módon előállított immunkomplexekkel 1:100 (SIC1x) és 1:200 (SIC2x) hígításokban kezeltük az in vitro differenciáltatott osteoclastokat. A differenciálódás 8. napján vizsgáltuk az osteoclastérés molekuláris szabályozásában szerepet játszó molekulák (kalcitonin receptor - *CALCR*, retrovirális onkogén v-fos homológja - *C-FOS*, katepszin K - *CTSK*, makrofág kolóniastimuláló faktor receptora - *C-FMS*, dendritikus sejt asszociált transzmembrán fehérje - *DC-STAMP*, aktivált T-sejt nukleáris faktor 1 - *NFATc1*, osteoclast-asszociált immunglobulin-szerű receptor - *OSCAR*, nukleáris faktor  $\kappa$ B receptor aktivátora - *RANK*, tartarát rezisztens acidotikus foszfatáz – *TRAP*, Src-szerű adaptor fehérje - *SLAP-1* és *SLAP-2*) expresszióját. Az egészségesekben mindkét SIC koncentráció csökkentette az osteoclast sejtek *CTSK* és *RANK* expresszióját, amely a két betegpopulációban nem volt megfigyelhető. A *CTSK* és *RANK* kifejeződésén kívül, más génekben nem találtunk különbséget az egyes csoportokban a SIC és a kontroll kezelések között sem egészséges donorokban, sem RA-s vagy AP-s betegekben (**23. ábra**).



**23. ábra:** Immunkomplexek hatása az osteoclast differenciálódásra egészségesekben, RA-s és AP-s betegekben.

Egészséges donorok (n=6), RA-s (n=6) és AP-s (n=6) betegek alvadásgátolt perifériás véréből másneses szeparálással CD14<sup>+</sup> sejteket izoláltunk, majd M-CSF és RANKL felhasználásával osteoclastokat differenciáltattunk. A sejteket 1:100 (SIC 1x) és 1:200 (SIC 2x) koncentrációjú SIC-el kezeltük. A kontroll minták a differenciálódás alatt a kezelésekkkel ekvivalens térfogatú steril szűrt PBS-t kaptak. A differenciálódás 7. napján a sejteket lizáltuk, majd a 18. ábránál leírt módon génextpressziós analízist végeztünk, mely során elemeztük a *GAPDH* háztartási gén szintjére normalizált *CALCR*, *CTSK* és *RANK* expressziót. Az oszlopdiaagramon az átlag ± SEM értékeket ábrázoltuk, \*p<0,05. Rövidítések: *CALCR*: kalcitonin receptor, *CTSK*: katepszin K, *RANK*: nukleáris faktor κB receptor aktivátora, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica.

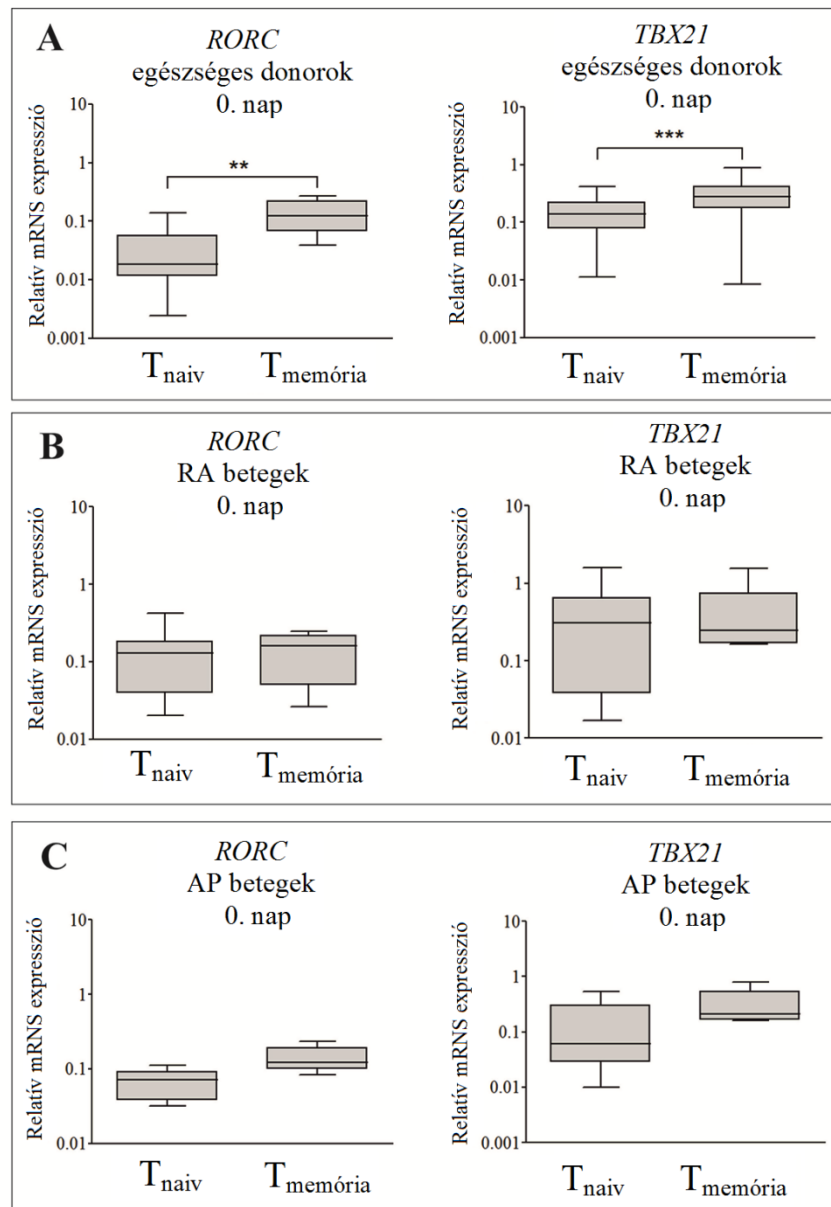
Forrás: Marton, N., et al., Cellular and Molecular Life Sciences, 2017. 74(19): p. 3599-3611.[224] alapján

### 4.3. A Th17-differenciálódás vizsgálata egészségesekben, rheumatoid arthritises és arthritis psoriaticás betegekben

A Th17-differenciálódást irányító citokinek szerepe többnyire jól jellemzett fiziológiás körülmények között, azonban ezek átfogó szerepére utaló irodalmi adat RA-s vagy AP-s betegekben nem áll rendelkezésre. Jelen vizsgálat során kísérleteink célja az volt, hogy összehasonlítsuk az egészséges donorok, illetve az RA-s és AP-s betegek naiv T sejtjeit, azok sejtfelszíni markereinek, a bennük található gén és fehérje expresszióinak, valamint az általuk termelt citokineknek a tekintetében. Emellett célul tűztük ki ugyanezen jellemzők vizsgálatát az *in vitro* Th17-differenciálódás során az említett csoportokban. Vizsgáltuk és összehasonlítottuk az egyes Th17-indukáló citokinek kombinációinak hatását a differenciálódásra, és az ennek hatására kialakuló effektor sejtek fenotípusát a két betegségben az egészséges donorokhoz viszonyítva.

#### 4.3.1. Naiv sejtek vizsgálata és összehasonlítása

Egészséges, RA-s és AP-s donorok perifériás véréből mágnesesen izolált  $CD4^+CD45RO^-$  naiv T-sejteket hasonlítottunk össze génexpresszió és sejtfelszíni markermolekulák tekintetében. A Th1 és Th17-sejtekre jellemző *TBX21* és *RORC* transzkripciós faktorok mellett, az ezeknek a sejtpopulációknak a definiálására szolgáló kemokin receptor markereket (*CCR6*, *CCR4*, *CXCR3*) vizsgáltunk. Megállapítottuk, hogy egészségesekben a  $CD4^+CD45RO^+$  memória T sejtek magasabb *RORC* és *TBX21* expresszióval jellemezhetők (**24/A ábra**), azonban az RA-s (**24/B ábra**) és AP-s (**24/C ábra**) betegek naiv és memória sejtjei ebben a tekintetben nem különböznek egymástól.

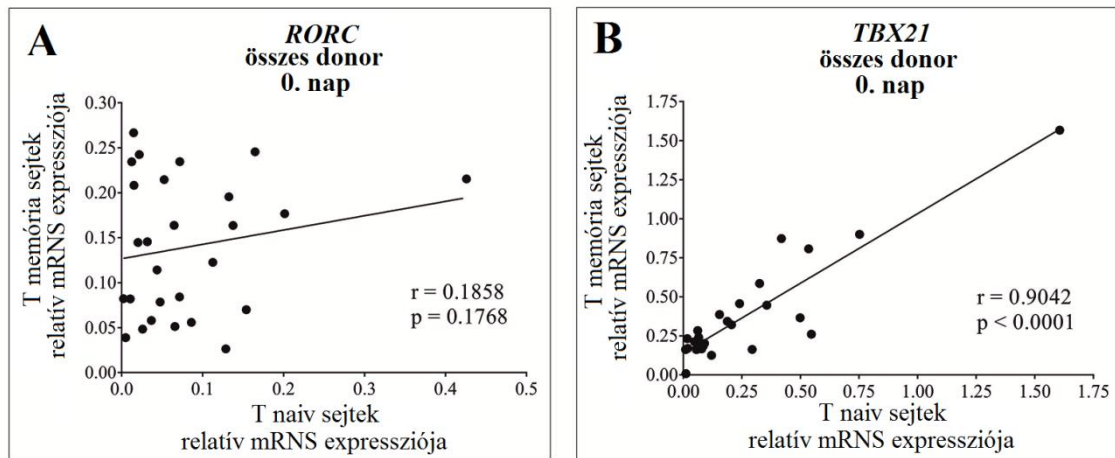


**24. ábra:** *RORC* és *TBX21* expresszió vizsgálata egészséges (A), RA-s (B) és AP-s (C) betegek naiv és memória T sejtjeiben.

Egészséges donorokból (n=12), valamint RA-s (n=12) és AP-s (n=7) betegekből a 17. ábránál leírt módon naiv és memória T-sejteket izoláltunk. Ezt követően a 18. ábránál leírt módon génexpressziós analízist végeztünk, amely során a *HPRT-1* háztartási gén szintjére normalizált *RORC* és *TBX21* expressziót vizsgáltuk. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázolják, \* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Rövidítések: *TBX21*: T-bosz transzkripciós faktor, *RORC*: RAR Related Orphan Receptor C, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica  
 Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018.[225].

A naiv és memória sejtek *RORC* és *TBX21* transzkripciós faktor expressziós értékei eltérő mértékű korrelációt mutattak. Megfigyeltük, hogy a naiv és memória sejtek *TBX21* expressziós értékei mindhárom vizsgált csoportban korreláltak egymással ( $r =$

0.9,  $p < 0,0001$ ), ugyanakkor a *RORC* értékek ( $r = 0,18$ ,  $p = 0,17$ ) esetén nem találtunk lineáris korrelációt (**25/A, B ábra**).

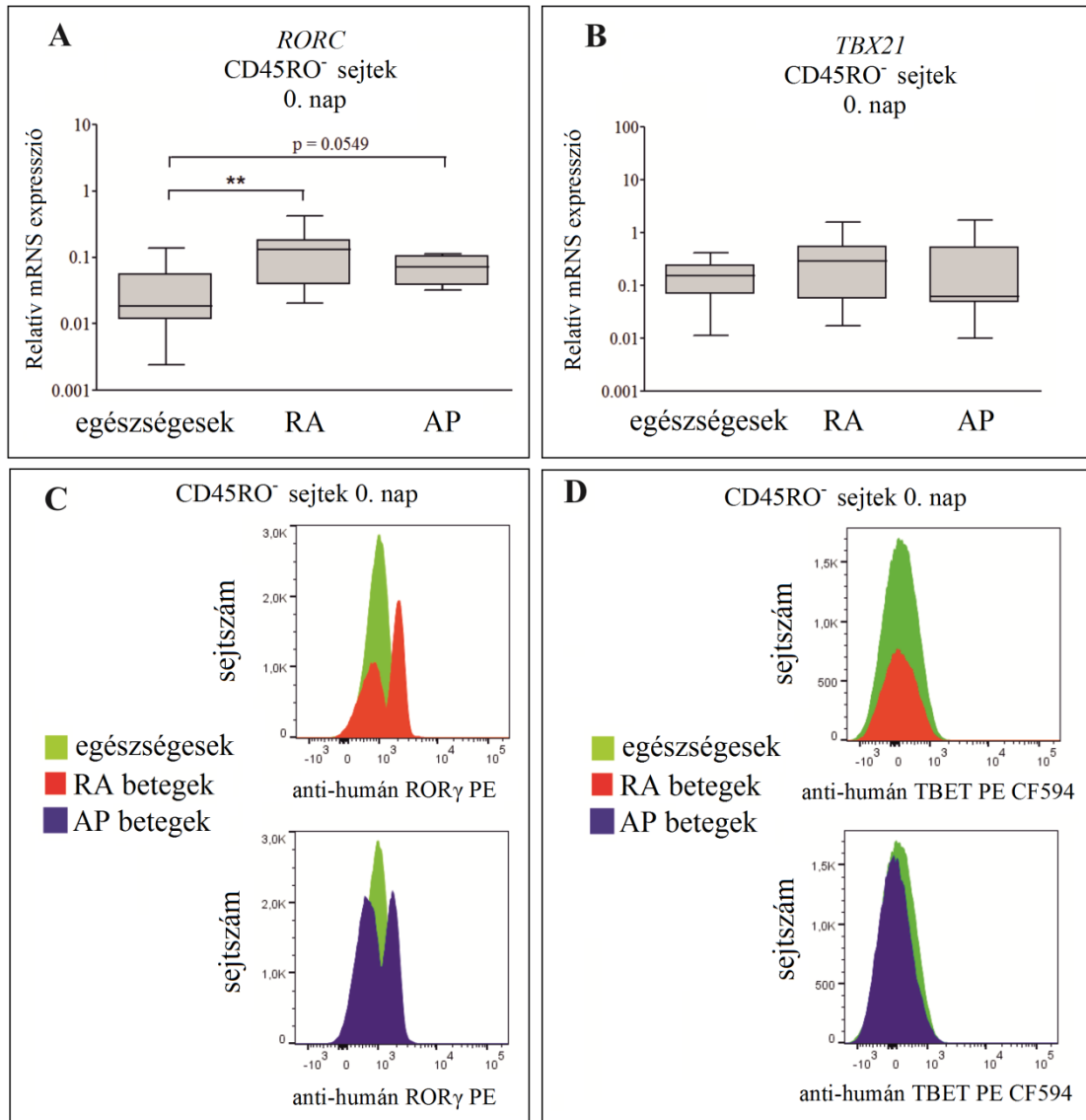


**25. ábra:** Lineáris korreláció vizsgálata naiv és memória T sejtek *RORC* (A) és *TBX21* (B) expressziós értékei között

A 24. ábránál kifejtett vizsgálatokat elvégeztük, majd a naiv és a memória sejtek *RORC* (A) és *TBX21* (B) expressziós értékei közötti Pearson korrelációt vizsgáltuk. Rövidítések: *TBX21*: T-borsz transzkripció faktor, *RORC*: RAR Related Orphan Receptor C.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018.[225].

Az egészségesekhez képest a betegekben magasabb *RORC* transzkripció faktor expressziós értékeket mértünk, míg a *TBX21* paraméterekben nem tapasztaltunk különbséget (**26. ábra/A, B** és **27. ábra/A, B panel**). Megvizsgáltuk, hogy a fent leírt különbségek fehérje szinten is detektálhatóak-e a betegekben és hasonlóképpen azt tapasztaltuk, hogy mind az RA-s, mind az AP-s betegekben a  $ROR\gamma$  fehérje mennyisége fokozódott, amely csak a naiv sejtekben volt detektálható. Áramlási citometriával vizsgáltuk a  $ROR\gamma$  és TBET fehérjék kifejeződését a naiv és memória T-sejtekben (**26. ábra/C, D** és **27. ábra/C, D panel**). A betegek naiv T-sejtjeiben a  $ROR\gamma$  fehérje esetén látható görbe az egészségesektől eltérően egy magasabb  $ROR\gamma$  kifejeződéssel jellemezhető sejtpopuláció jelenlétére utal. Az egészséges donorokból és a betegekől származó memória sejtekben a  $ROR\gamma$  görbék átfednek, amely a TBET eredmények esetén ehhez hasonlóan sejttípustól függetlenül megfigyelhető. Ez alapján az egészségesek memóriasejtjei egyik transzkripció faktor tekintetében sem, míg a naiv sejtjei csak a *TBX21* értékekben nem különböznek a betegektől.

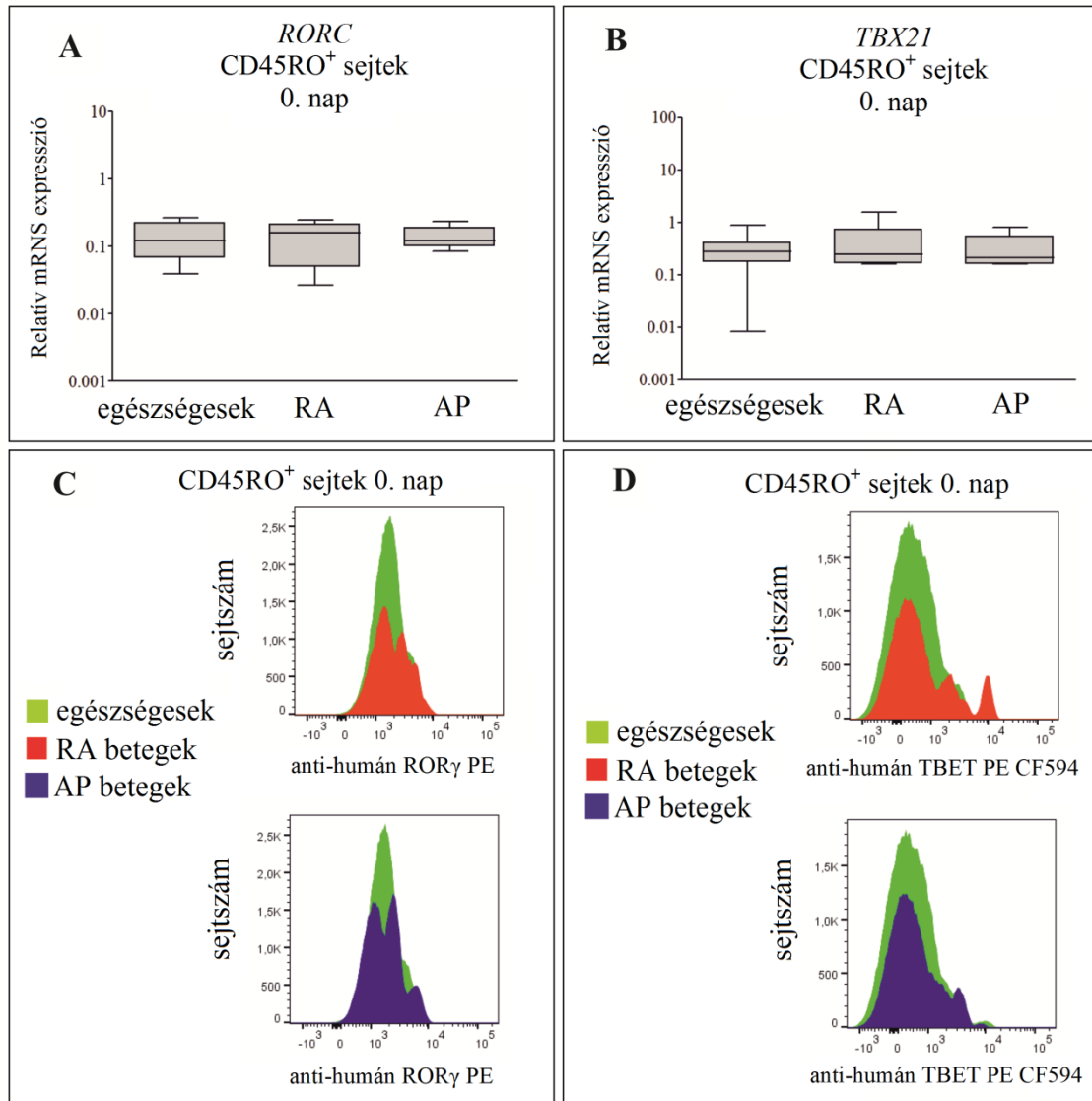


**26. ábra:** Naiv T-sejtek *RORC* gén és ROR $\gamma$  fehérje, valamint *TBX21* gén és TBET fehérje expressziójának összehasonlítása egészséges, RA-s és AP-s betegcsoportokban.

Egészséges donorokból (n=12), valamint RA-s (n=12) és AP-s (n=7) betegekből a 16. ábránál leírt módon naiv (CD45RO<sup>-</sup>) és memória (CD45RO<sup>+</sup>) T-sejteket izoláltunk. Ezt követően a 18. ábránál kifejtett módon génexpresszióanalízist végeztünk, amely során a *HPRT-1* háztartási gén szintjére normalizált *RORC* és *TBX21* expressziót vizsgáltuk. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázolják, \*\*p<0,01. (A, B). A sejtek transzkripciós faktor fehérje expresszióját egészséges donorok (n=6), valamint RA-s (n=5) és AP-s (n=5) betegek PBMC sejtjeiben vizsgáltuk. A sejteken blokkoltuk az Fc receptorokat, majd ezt követően anti-humán CD3 APC Cy7, anti-humán CD4 PerCP Cy5.5, anti-humán CD45RA FITC, anti-humán CD45RO PE Cy7 és anti-humán CD197 APC antitestekkel jelöltük a szuszpenziókat. A jelölést követően a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk és anti-humán TBET PE CF594 és anti-humán ROR $\gamma$  PE antitestekkel jelöltük. A mérést BD FACS Aria III áramlási citométer segítségével végeztük el és az eredményeket FlowJo 10.3 szoftverrel értékeltük ki. A histogrammokon az egyes csoportokban lévő valamennyi donor egyesített histogrammjait ábrázolja (C, D). Rövidítések: *TBX21*: T-boksz transzkripciós faktor, TBET: T-sejt eredetű T-box transzkripciós faktor fehérje, *RORC*: RAR Related Orphan Receptor C, ROR $\gamma$ : RAR Related Orphan Receptor gamma, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. alapján [225].





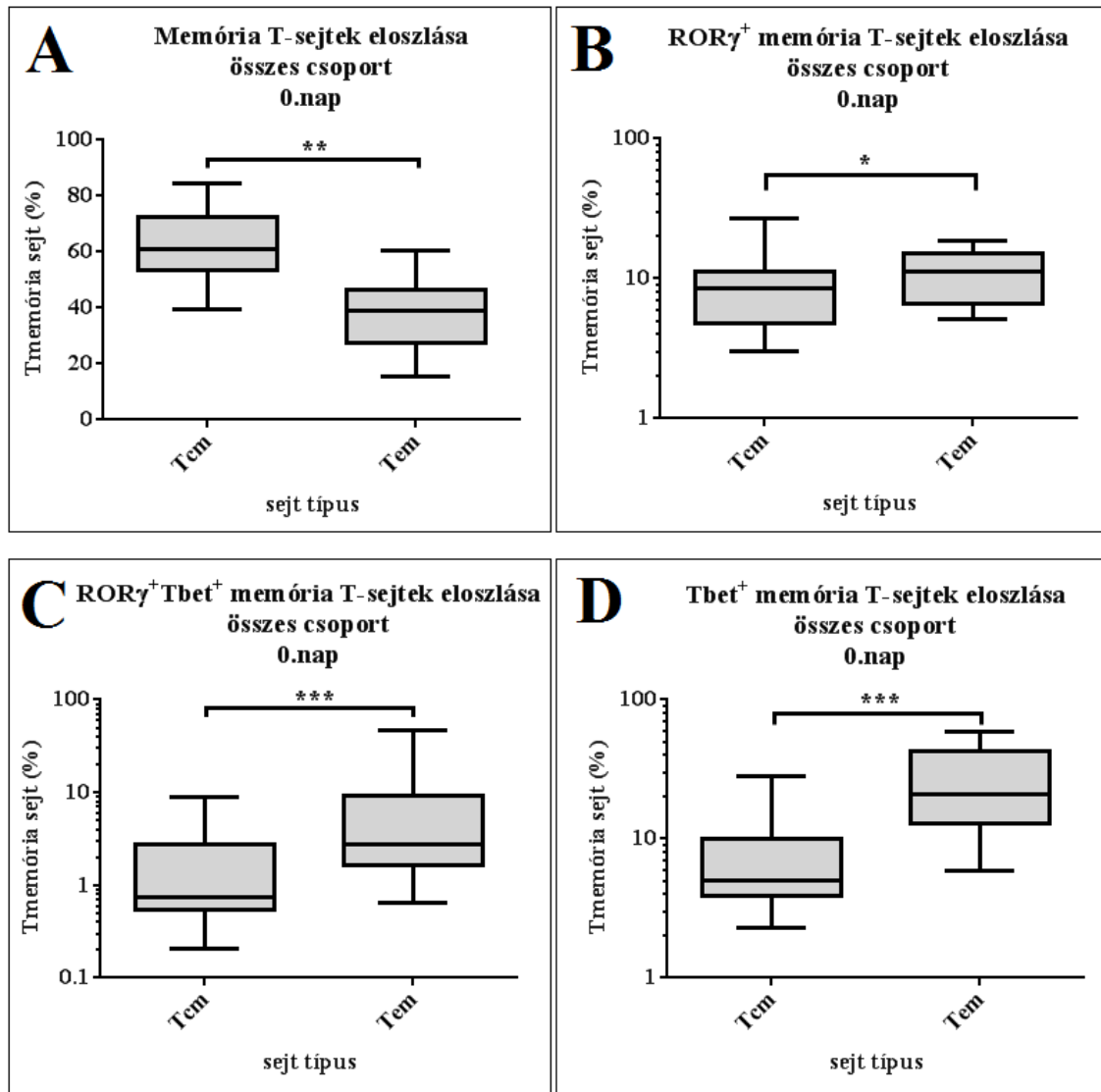
**27. ábra:** Memória T-sejtek *RORC* gén és ROR $\gamma$  fehérje, valamint *TBX21* gén és TBET fehérje expressziójának összehasonlítása egészséges, RA-s és AP-s betegcsoportokban.

A 26. ábránál kifejtett módon meghatároztuk a memória T-sejtek gén és fehérjeexpressziós paramétereit. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázolják. (A, B). A hisztogramokon az egyes csoportokban lévő valamennyi donor egyesített hisztogramjait ábrázolja (C, D).

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. alapján [225].

Intracelluláris áramlási citometriás méréseink során választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy mely sejtek között vannak olyanok, amelyek mind a TBET, mind pedig a ROR $\gamma$  transzkripciós faktorokat expresszálják, és van-e különbség ezen sejtek között a betegekben és egészségesekben. Mindhárom populációban különböző sejtfelszíni markerek alapján definiáltuk a naiv (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>) és a memória sejteket (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>). A CD197 vagy CCR7 molekulát a naiv és centrális memória sejtek is hordozzák, míg az effektor sejtek nem, így ez alapján

definiálni tudtuk a memória sejtek e két típusát is. Mind az egészségesekben, mind pedig a betegekben jellemzően a memória sejtek nagyobb része centrális, míg kisebb része effektor memóriasejt volt (**28/A ábra**). A transzkripciós faktor expressziót tekintve ugyanakkor az effektor memóriasejtek esetében tapasztaltunk magasabb értékeket mind a TBET+, a ROR $\gamma$ + és a TBET+ROR $\gamma$ + kifejeződés tekintetében (28. ábra/B, C és D panel). Egyéb tekintetben nem találtunk szignifikáns különbséget az egészségesek és a betegek között, meg kell azonban említenünk, hogy a betegek génexpressziós paraméterei nagy variációt mutattak.

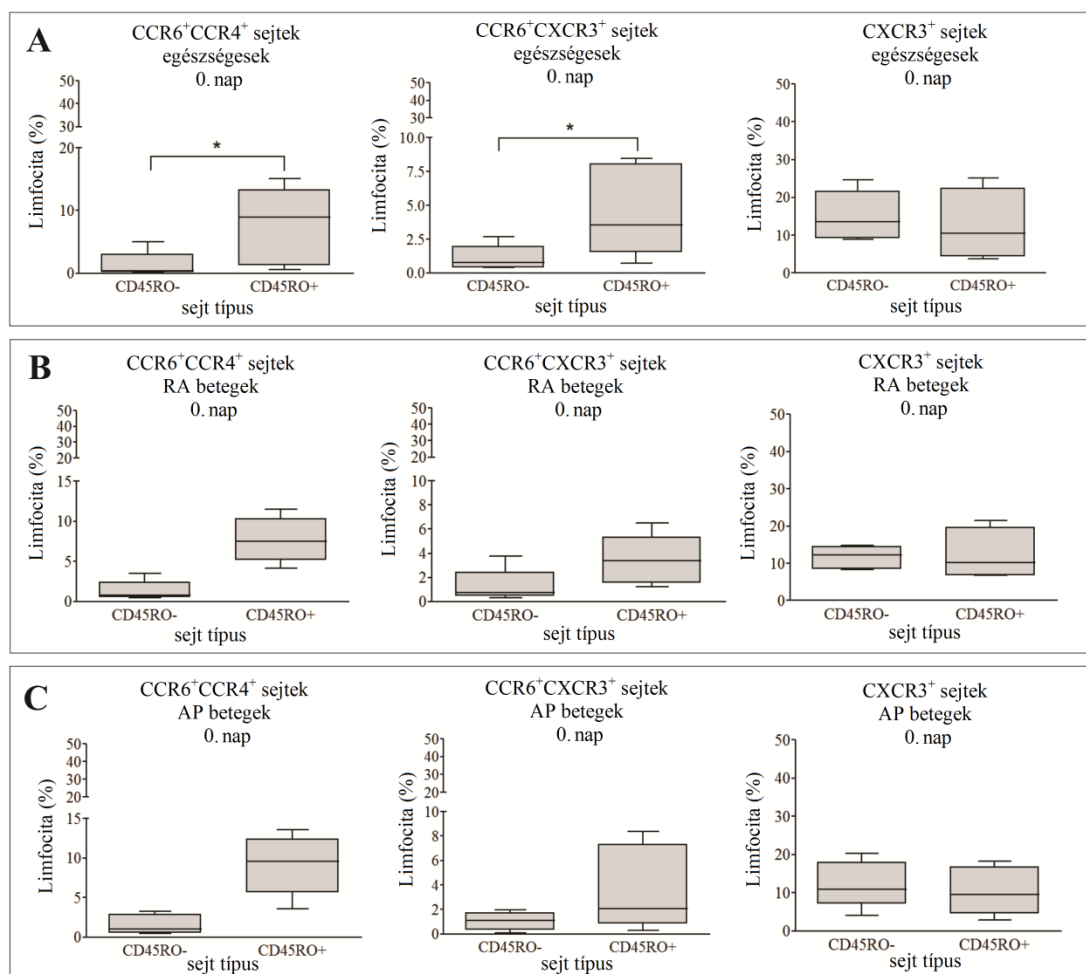


**28. ábra:** Memória T-sejt populációk ROR $\gamma$  és TBET fehérje expressziója.

Egészséges donorokból (n=6), valamint RA-s (n=5) és AP-s (n=5) betegekből a 26. ábránál leírtak alapján meghatároztuk a memória T-sejt alcsoportokban a ROR $\gamma$  és TBET transzkripciós faktor fehérjék kifejeződését. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázolják, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Rövidítések: Tem: effektor memória sejt, Tcm: centrális memória sejt, TBET: T-sejt eredetű T-box transzkripciós faktor fehérje, ROR $\gamma$ : RAR Related Orphan Receptor gamma fehérje.

Annak érdekében, hogy a sejtek fenotípusát még konkrétabban meghatározzuk, néhány Th1, illetve Th17 specifikus kemokin receptor molekulát vizsgáltunk meg a sejtek felszínén, amelyek különböző kombinációban jellemzőek az adott sejtpopulációkra. A klasszikus Th17-sejtek ismert markerei a CCR6 és CCR4, míg a Th1 sejteké a CXCR3. Ismert, hogy a nem klasszikus Th1 vagy Th1/Th17 átmeneti fenotípusú sejtek mind a

Th1 specifikus CXCR3-at, mind pedig a Th17-sejtekre jellemző CCR6 molekulát hordozzák [88, 89]. A CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> és a CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> sejtek számában csak az egészséges donoroknál volt különbség a naiv és a memória T sejtek között, míg RA-s és AP-s betegekben nem találtunk szignifikáns különbséget. Érdekes módon a csak CXCR3<sup>+</sup> naiv és memória sejtek száma sem az egészségesek, sem a betegek esetében nem tért el egymástól (**29. ábra**).



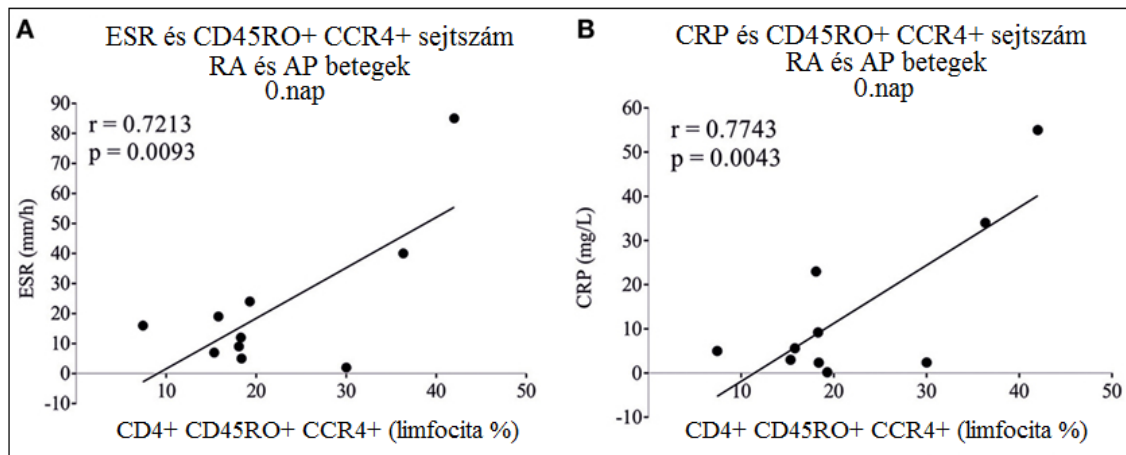
**29. ábra:** CCR6, CCR4 és CXCR3 kemokin receptor expresszió vizsgálata egészségesek (A), RA-s betegek (B) és AP-s betegek (C) naiv és memória T sejteiben.

Egészséges donorokban (n=6), valamint RA-s (n=5) és AP-s (n=5) betegekben a 16. ábránál leírt módon naiv és memóri T-sejteket izoláltunk. A sejtuszpenziókban blokkoltuk az Fc receptorokat, majd anti-humán CD3 APC Cy7, anti-humán CD196 (CCR6) FITC, anti-humán CD194 (CCR4) PE és anti-humán CD183 (CXCR3) PerCP Cy5.5 antitestekkel jelöltük a sejteket. A megjelölt sejteket BD FACS Calibur áramlási citométer segítségével mértük le. Az eredményeket FlowJo 10.3 szoftverrel értékeltük ki. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják, \*p<0,05. Rövidítések: CCR: C-C kemokin receptor, CXCR: C-X-C kemokin receptor, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. alapján [225].

Ebben az esetben is összehasonlítottuk az egyes csoportokban a naiv és memória sejtek kemokin receptor (CCR6, CCR4, CXCR3) expresszióját, de azok között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik esetben sem.

A betegekben megvizsgáltuk a klinikai adatok és az egyes 0. napon mért paraméterek (*RORC* és *TBX21* expresszió, valamint CCR6, CCR4 és CXCR3 kifejeződés) közötti korreláció mértékét is. A vérsejtsüllyedés (ESR) és a C-reaktív protein (CRP) paraméterek közepesen erős korrelációt ( $r=0,7213$ ;  $p=0,0093$  és  $r=0,7743$ ;  $p=0,0043$ ) mutattak a CCR4+ memória T-sejtek arányával (**30. ábra**).

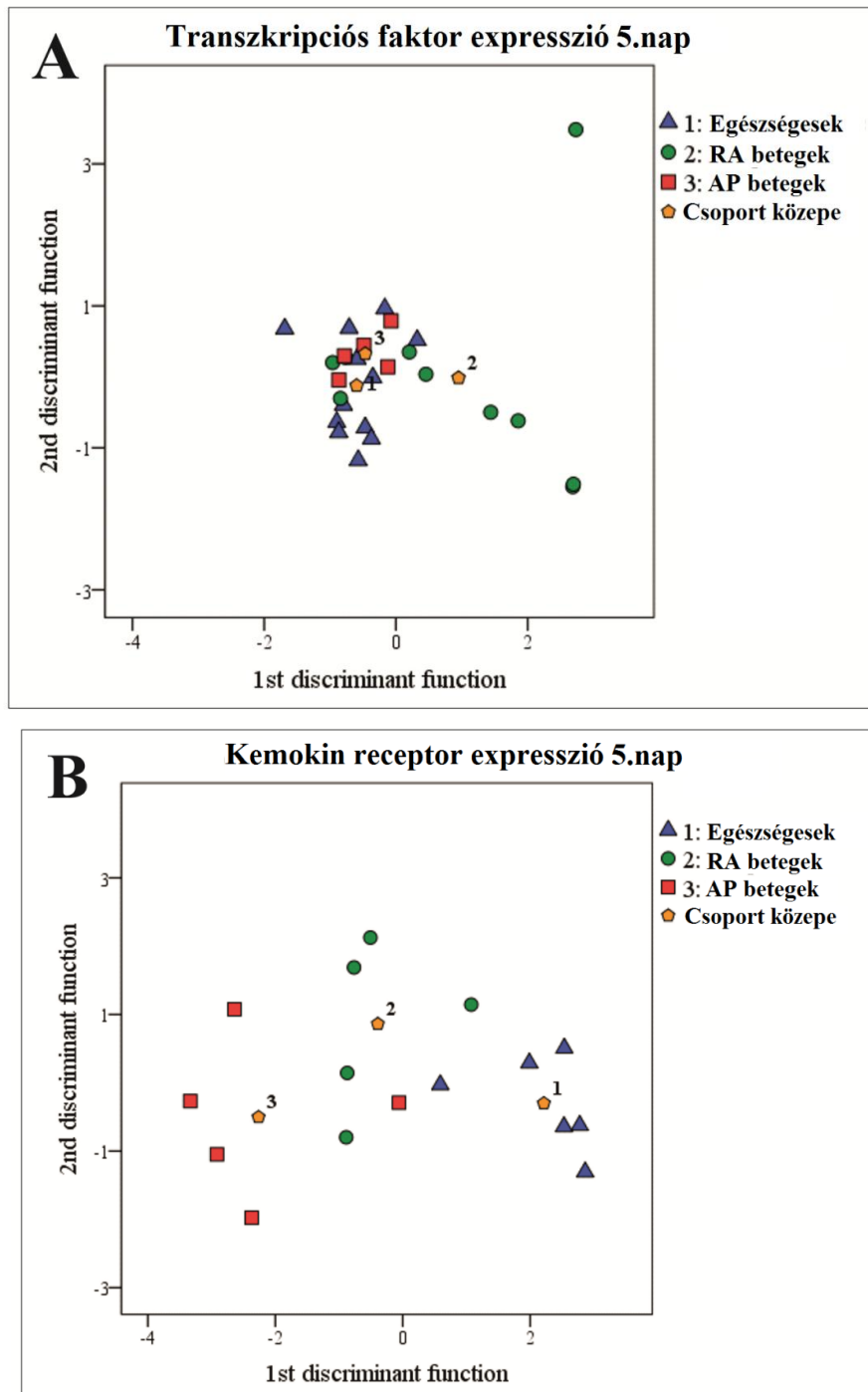


**30. ábra:** A betegek laborparamétereinek és a CCR4+ memória sejtek arányának korrelációja.

A korreláció analízishez a betegek (RA-s / $n=5$ / és AP-s / $n=5$ /) klinikai adatait és a kísérletek során mért kemokin receptor expresszós (CCR4) paramétereket használtuk. Az ábrán Pearson féle korreláció analízis eredménye látható, az  $r$  annak mértékét, a  $p$  a korreláció szignifikanciáját mutatja. Rövidítések: CCR: C-C kemokin receptor, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica, ESR: vérsejtsüllyedés, CRP: C-reaktív protein.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. alapján [225].

A vizsgálatokat kiegészítendő, mindhárom csoport összes mért adatát felhasználva lineáris diszkriminancia analízist végeztünk, amelynek alkalmazásával a betegcsoportok és az egészséges donorok csoportja jellemezhető és összehasonlítható. Ha csak a transzkripciós faktorok értékeit felhasználva végezzük el az analízist, az egészségesek és a betegcsoportok csekély, matematikailag mindössze 61%-os pontossággal választhatók el egymástól (**31/A ábra**), azonban a kemokin receptor expresszió tekintetében vizsgálva ez csoportosítás már 81,3%-ban bizonyul helyesnek (**31/B ábra**).



**31. ábra:** A differenciálódás 0.napján mért transzkripciós faktor és kemokin receptor expresszió elemzése lineáris diszkrimináció analízissel.

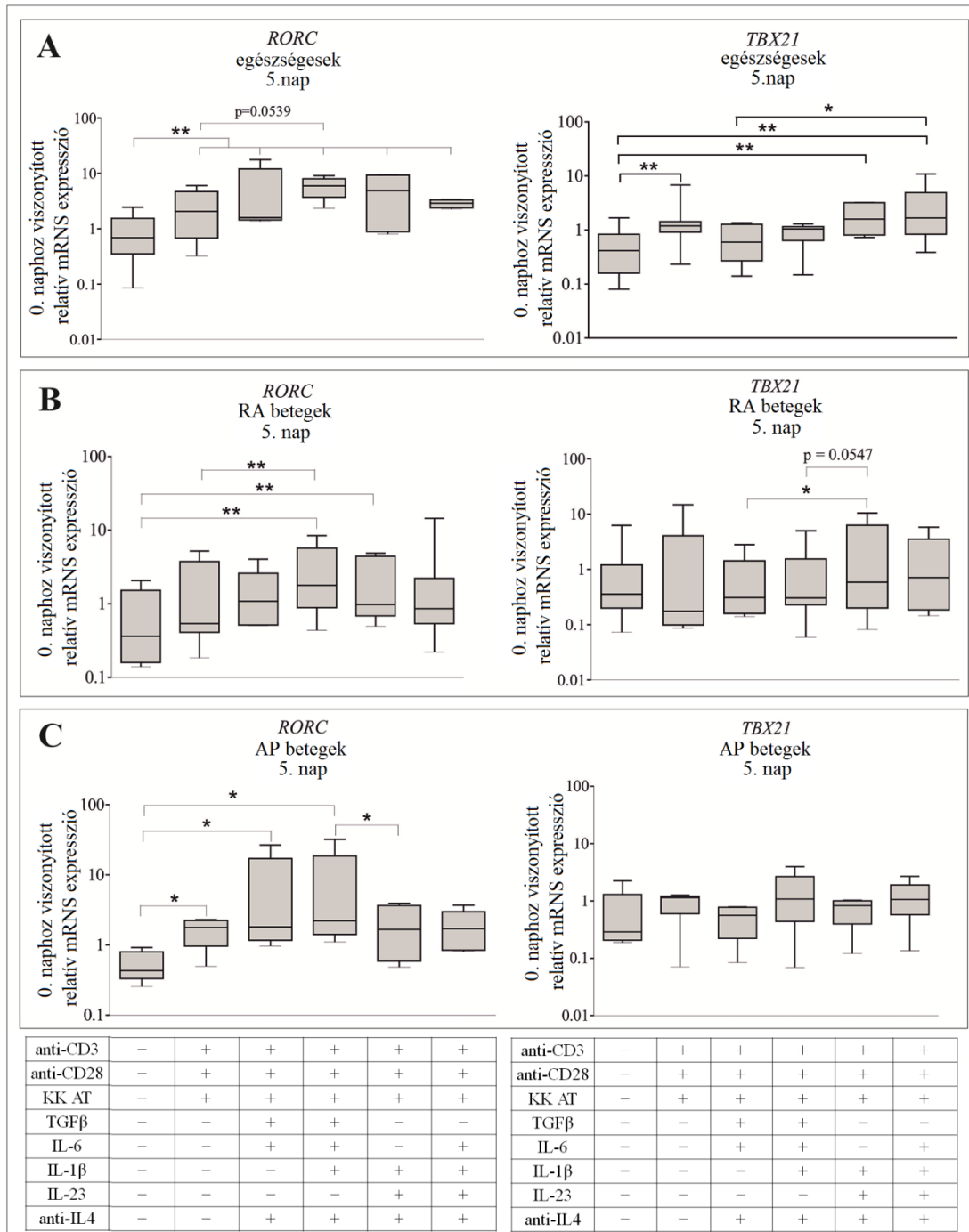
Az analízishez a korábban egészségesekben (n=12), RA-s (n=8) és AP-s (n=5) betegekben elemzett *RORC* és *TBX21* transzkripciós faktor értékeit (A), továbbá az egészségesekben (n=6), RA-s (n=5) és AP-s (n=5) betegekben jellemzett CCR6, CCR4 és CXCR3 kemokin receptor expressziós paramétereket (B) használtuk fel. Rövidítések: RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018.[225].

Abban az esetben, ha mindkét mérésből származó eredményeket vesszük alapul, a csoportosítás matematikailag 100%-ban pontos, azaz minél több paraméter alapján definiáltunk egy-egy személyt az adott csoportban, annál pontosabban elválasztható a betegek és az egészségesek csoportja egymástól. Az analízis során meghatároztuk azokat a paramétereket, amelyek a leginkább befolyásolták az adott csoportosítást, azaz azt hogy az egészségesek vagy a betegek csoportjába tartozik-e az adott személy. Ez a paraméter a transzkripciós faktorok esetén a naiv sejtek *RORC* expressziója, míg a kemokin receptor kifejeződés esetén a  $CCR4^+CXCR3^+$  memória sejtek száma volt, amelyeket az ún. Wilks lambda érték definiált a statisztikai analízis során az egyéneken.

#### **4.3.2. Differenciálódott sejtek vizsgálata és összehasonlítása**

A naiv sejtek vizsgálatát követően azokból indulva különböző kezelések hatására vizsgáltuk az *in vitro* Th17-sejt differenciálódást egészségesekben, illetve RA-s és AP-s betegekben. Korábbi eredményeink és irodalmi adatok alapján a vizsgált kezelések a következők voltak: kezeletlen, csak aktivált (anti-CD3-al, anti-CD28-al és keresztköti antitesttel), aktiváció.+TGF $\beta$ +IL-6, aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ , aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23 és aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+IL-6. Korábbi vizsgálatainknak megfelelően neutralizáló antitestet is alkalmaztunk a citokin kezelések során, azonban csak a Th2 irányú differenciálódás gátlásának érdekében, mert a Th1/Th17 kettős fenotípus kialakulását is tanulmányozni kívántuk, így minden citokinkezelést anti-IL4 antitesttel egészítettünk ki. A differenciálódás 5. és 10. napján vizsgáltuk a sejtek viabilitását, valamint sejt és felülúzó mintákat vettünk. A mintákból meghatároztuk a sejtek *RORC*, *TBX21* transzkripciós faktorok kifejeződését, a CCR6, CCR4 és CXCR3 sejtfelszíni molekulák expresszióját, valamint IL-17A és IL-22 citokin termelését. A mért adatokat egy- és többváltozós statisztikai analízis segítségével hasonlítottuk össze a vizsgált csoportokban. A sejtek *RORC* és *TBX21* expresszióját RT qPCR segítségével vizsgáltuk (32. ábra).

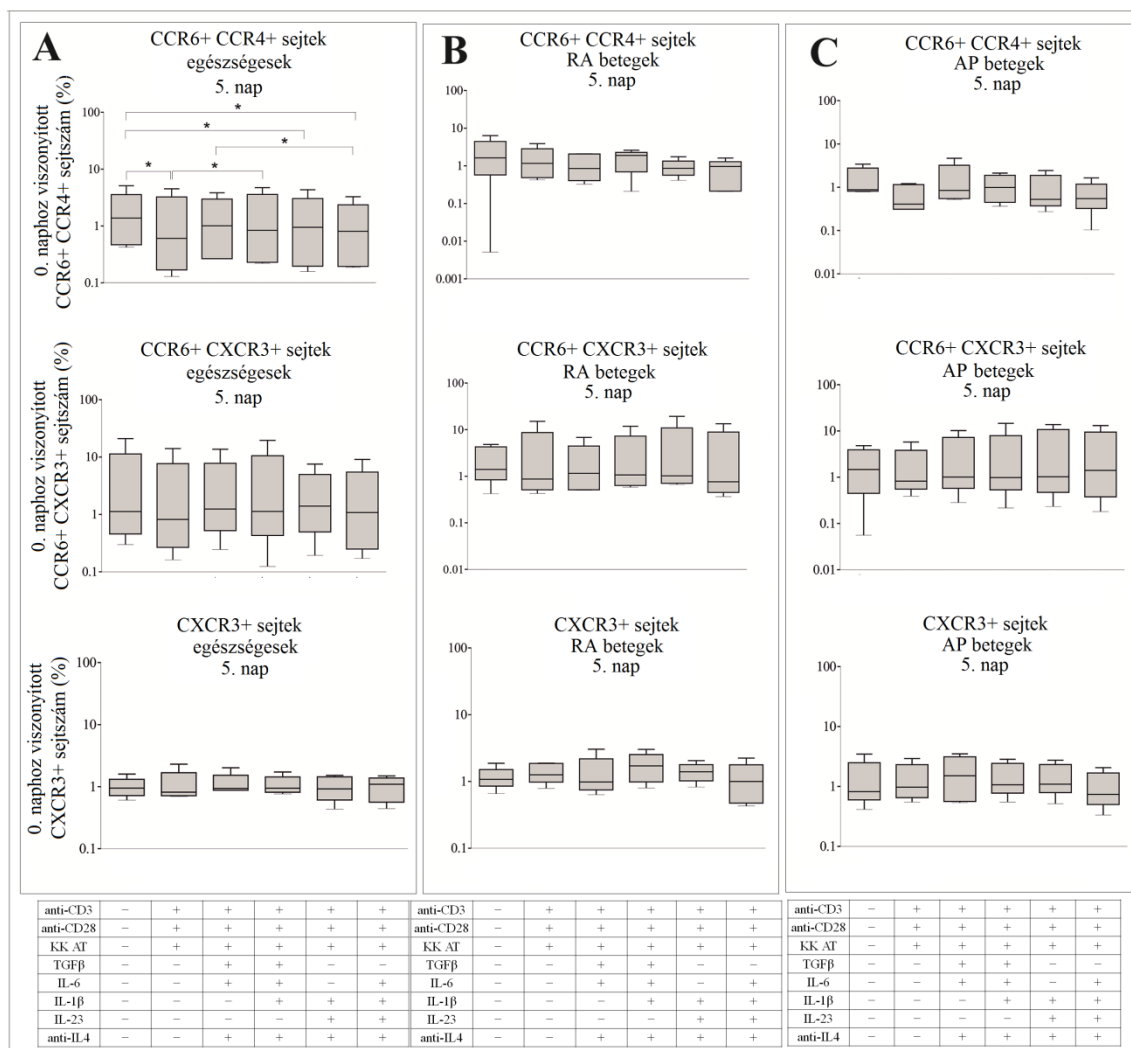


**32. ábra:** Transzkripciós faktorok expressziója egészségesekben, RA és AP betegekben az *in vitro* Th17-differenciálódás 5. napján.

Egészséges donorokból (n=10), valamint RA-s (n=10) és AP-s (n=6) betegekből a 16. ábránál leírt módon naiv (CD45RO<sup>-</sup>) T-sejteket izoláltunk. A sejteket 5 napig a 23. ábránál kifejtett antitesttel kezeltük, majd a 18. ábránál leírt módon génexpressziós analízist végeztünk, amely során a HPRT háztartási gén szintjére normalizált *RORC* és *TBX21* expressziót vizsgáltuk. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják a 0.napos génexpresszióhoz viszonyítva, \*p<0,05, \*\*p<0,01. Rövidítések: *TBX21*: T-boksz transzkripciós faktor, *RORC*: RAR Related Orphan Receptor C, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica, kk AT: keresztműző antitest  
 Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. [225].



Mindhárom csoportban megfigyeltük, hogy a korábbi kísérleteink eredményeihez hasonlóan a aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ +anti-IL4 kezelés növelte a sejtek *RORC* expresszióját, míg a *TBX21* expressziót egyik vizsgált csoportban sem. Az IL-23 és IL-1 $\beta$  tartalmú kezelések ugyanakkor fokozták a sejtek *TBX21* expresszióját, de ez legkifejezettebben az egészségesekben (**33/A ábra**), kevésbé az RA-sokban (**33/B ábra**) és egyáltalán nem volt megfigyelhető az AP-s betegekben (**33/C ábra**). Az egészségesek csak aktivált sejtjeiben mindkét transzkripciós faktor szintje emelkedett, ellenben ez az RA-s csoportban egyáltalán nem volt jellemző, míg AP-s betegekben az aktiváció kizárólag a *RORC* expresszióját indukálta. Az AP-s betegekben a sejtek *TBX21* expressziója egyik kezelés hatására sem változott meg szignifikánsan. RA-s betegekben az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-1 $\beta$ +IL-6+anti-IL4 és az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+anti-IL4 ( $p < 0,01$  mindkét esetben) kezelések, míg AP-s betegekben az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+anti-IL4 és az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-1 $\beta$ +IL-6+anti-IL4 ( $p < 0,05$  mindkét esetben) kezelések hatására nőtt a T sejtek *RORC* kifejeződése (**33. ábra**). A sejtek CCR6, CCR4 és CXCR3 kemokin receptor expresszióját áramlási citometriával határoztuk meg a Th17-differenciálódás 5. (**33. ábra**) és 10. napján.



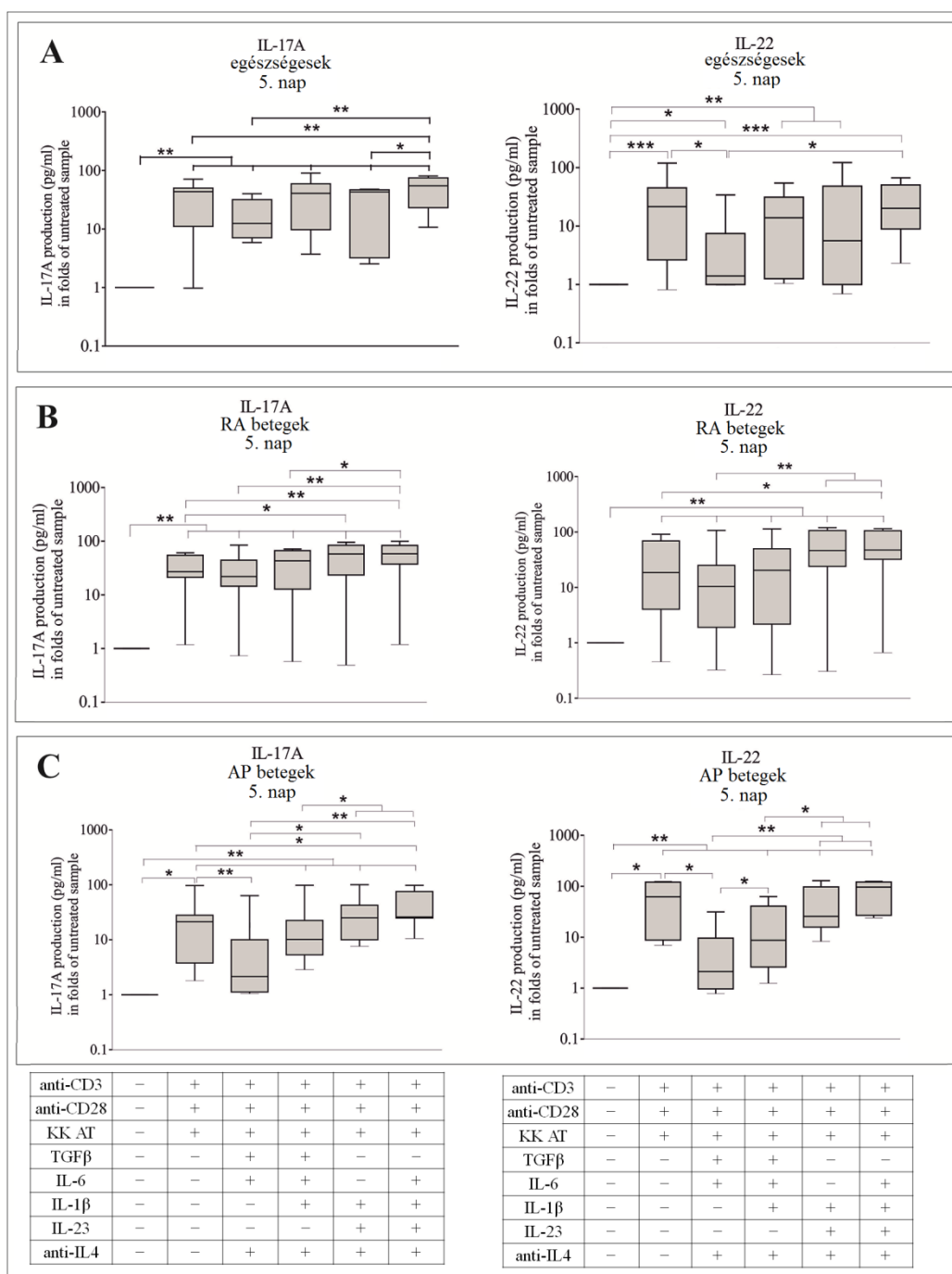
**33. ábra:** CCR6, CCR4 és CXCR3 kemokin receptor expresszió vizsgálata az in vitro Th17-differenciálódás 5. napján.

Egészséges donorokból (n=6), valamint RA-s (n=5) és AP-s (n=5) betegekből a 17. ábránál kifejtett módon naiv (CD45RO<sup>+</sup>) T-sejteket izoláltunk. A sejteket 5 napig a 23. ábránál leírt protokoll alapján citokinekkel és neutralizáló antitesttel kezeltük, majd a 30.-as ábránál található leírás szerint vizsgáltuk az egészséges donor eredetű (A), illetve az RA-s (B) és AP betegekből (C) származó sejtek CCR6, CCR4 és CXCR3 expresszióját. A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják a 0. napon mért értékekhez viszonyítva, \*p<0,05. Rövidítések: CCR: C-C kemokin receptor, CXCR: C-X-C kemokin receptor, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica, kk AT: keresztköti antitest, IL: interleukin.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. [225].

Az aktiváció+TGFβ+IL-6+anti-IL-4 citokin kezelés kivételével valamennyi kezelés befolyásolta a CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> sejtek számát, azonban kizárólag az egészséges donorok esetében. A betegcsoportokban ugyanakkor a kemokin receptor expressziót illetően nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelések között (**33. ábra**).

A sejtek IL-17A és IL-22 citokin termelését ELISA módszerrel vizsgáltuk a differenciálódás 5. és 10. napján a sejtek felülúszójából (**34. ábra**).

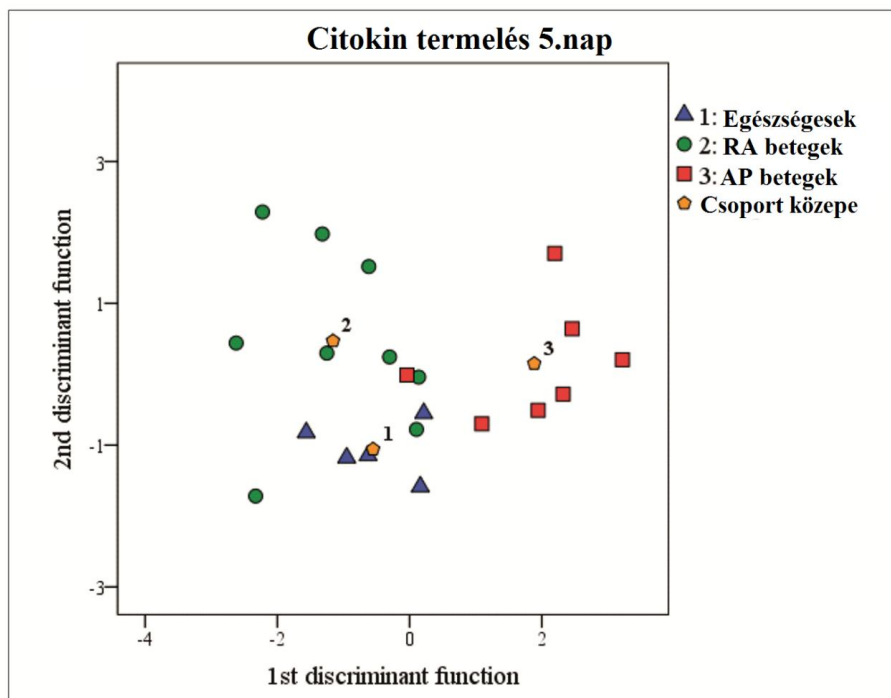


**34. ábra:** IL-17A és IL-22 termelés vizsgálata egészségesekben, RA és AP betegekben az in vitro Th17-differenciálódás során.

Egészséges donorokból (n=12), valamint RA-s (n=9) és AP-s (n=7) betegekben a 17. ábránál leírt módon naiv (CD45RO<sup>-</sup>) T-sejteket izoláltunk, majd a 23. ábránál kifejtett citokin s neutralizáló antitest kezeléseket alkalmaztuk 5. napig. A sejtek felülcsúszójából humán IL-17A és IL-22 ELISA kit felhasználásával meghatároztuk a sejtek által termelt IL-17A és IL-22 citokinek koncentrációját (pg/ml-ben). A dobozdiagramok a 10-es és 90-es kvartiliseket és az átlag ± SEM értékeket ábrázolják a kezeltlen minta értékeihez viszonyítva, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Rövidítések: RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica, kk AT: keresztköti antitest.

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018.[225].

A kezeletlen sejtekhez viszonyítva valamennyi kezelés indukálta az IL-17A és IL-22 termelést mindhárom csoportban (**34. ábra**). Az 32. ábra alapján megállapítható, hogy habár az aktiváció a betegekben nem indukálta a transzkripciós faktorok expresszióját, azonban mind az IL-17A, mind pedig az IL-22 termelésüket fokozta nem csak a betegekben, de az egészséges donorokban is. Az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+anti-IL-4 kezelés egészségesekben és AP betegekben csökkentette a sejtek IL-22 és az IL-17 termelését ( $p < 0,5$  és  $0,01$ ), azonban RA betegekben nem (**34. ábra**). Annak érdekében, hogy a sejtek citokintermelését a három vizsgált csoportban össze tudjuk hasonlítani, lineáris diszkriminancia analízist végeztünk valamennyi mért adat bevonásával (**35. ábra**).



**35. ábra:** A differenciálódás 5. napján a sejtek citokin termelésének elemzése lineáris diszkriminancia analízissel.

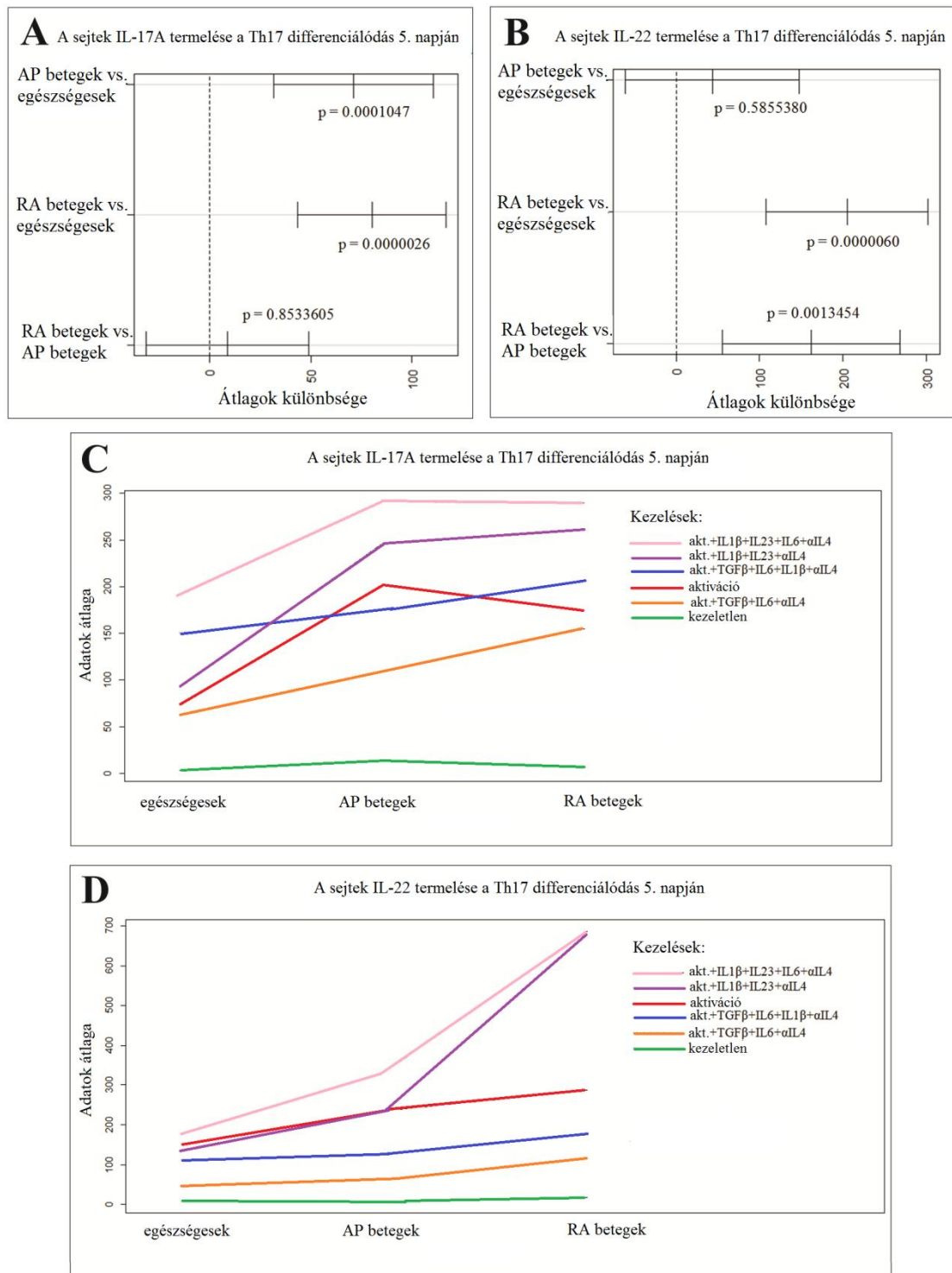
Az LDA analízishez a korábban egészségesekben ( $n=5$ ), RA-s ( $n=9$ ) és AP-s ( $n=7$ ) betegekben elemzett IL17-A és IL-22 termelés értékeit használtuk fel. Rövidítések: RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. [225].

A sejtek citokintermelése alapján 81%-os matematikai pontossággal választhatók el az egészséges donorok és a betegcsoportok egymástól (**35. ábra**). E csoportosítást az analízis eredménye alapján a leginkább az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+IL-6+anti-IL4 kezelés által indukált IL-22 termelés határozza meg. A sejtek transzkripciós faktor

expressziója számottevően nem változott az 5. napot követően. Az IL-17A és IL-22 termelés az 5. napot követően csökkent, emellett a 10. napon a CCR6+CCR4+ sejtek aránya az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+IL-6+anti-IL4 kezelés hatására nőtt, de kizárólag a betegcsoportokban.

Komplex statisztikai analízissel összehasonlítottuk a csoportokban lévő egyének citokintermelését. Eredményeink szerint a Th17-differenciálódás során a sejtek IL-17A termelése egészségesekben mind az RA-s ( $p = 0.0000026$ ), mind AP-s betegektől ( $p = 0.0001$ ) eltérő (**36/A ábra**). Az IL-22 termelés az AP-s betegekben és egészségesekben hasonló ( $p = 0.58$ ), míg egészségesek és RA-sok csoportját összehasonlítva szintén különböző ( $p = 0.000006$ ) volt (**36/B ábra**). A kezelések hatására, meglepő módon a betegcsoportokban az IL-17A termelése hasonló ( $p = 0,85$ ), míg IL-22 termelésük különböző ( $p = 0.001$ ) volt (**36. ábra/A, B panel**). Az egyes citokin kezelési kombinációk különbözőképpen hatottak az egészséges donor- az RA-s beteg-, és az AP-s betegekből származó sejtekre, amely a 37-es ábra C és D részén kezelésekre bontva látható. A betegekből származó sejtek IL-17A termelése az anti-CD3+anti-CD28+keresztműködő antitest indukálta stimuláció és az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+anti-IL4 valamint az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+IL-6+anti-IL4 kezelések hatására markánsabban növekedett mint az egészségesekből származó sejteké (**36/C ábra**). Emellett a aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+anti-IL4 és az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-23+IL-6+anti-IL4 kezeléseket tekintve hasonló mértékű különbség figyelhető meg a különböző eredetű sejtek között az IL-22 termelésben (**36/D ábra**).



**36. ábra:** Az IL-17 és IL-22 termelés összehasonlítása az egészséges, RA-s és AP-s betegcsoportokban.

Az analízishez a korábban egészségesekben (n=12), RA-s (n=9) és AP-s (n=7) betegekben elemzett IL17-A (A és C) és IL-22 (B és D) termelés értékeit használtuk fel. Rövidítések: akt. = aktiváció: anti-CD3+anti-CD28+keresztkötő antitest, RA: rheumatoid arthritis, AP: arthritis psoriatica

Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. [225].

## 5. MEGBESZÉLÉS

Ph.D. munkám során különböző patogenetikai tényezők szerepét vizsgáltam a Th17-sejtek és osteoclastok differenciálódására, amelyek szerepet játszanak a gyulladásos reumatológiai kórképek kialakulásában. A dolgozatban kifejtett eredmények három témakörnek felelnek meg. A disszertáció első felében a Th17-sejtek differenciálódását és az arra ható környezeti tényezők szerepét fejtem ki, amely témát a *Cellular and Molecular Life Sciences* című folyóiratban egy összefoglaló közlemény formájában publikáltuk [93]. Az oszteokasztok differenciálódásával kapcsolatos részeredmények, melyek a dolgozat második részében kerülnek kifejtésre, szintén a *Cellular and Molecular Life Sciences* című folyóiratban jelentek meg eredeti közleményként, hallgatótársammal közös munka eredményeképpen [224]. A dolgozat harmadik felében kifejtett eredményeket, amelyek a Th17-sejtek differenciálódásának egészségesekben és RA-s valamint AP-s betegekben történő összehasonlításáról szól a *Frontiers in Immunology* című folyóiratban eredeti közleményként publikáltuk [225].

Vizsgálataink során főképpen a Th17-sejtek differenciálódását és részben az osteoclastok érését hasolítottuk össze egészséges donorokban és két, gyulladásos reumatológiai betegségben. A Th17-sejtekről az elmúlt kb. 15 év irodalma alapján bebizonyosodott, hogy kulcsszerepet játszanak az autoimmun betegségek és gyulladásos reumatológiai kórképek patomechanizmusában [41, 52, 68, 72, 88, 92, 102, 105, 107-110, 141, 164]. A sejtek differenciálódásának tanulmányozása során több releváns citokin szerepét is vizsgáltuk, amelyeknek eltérő szerepe van az egér és a humán szervezetben (lásd **2. táblázat, 27. oldal**). Irodalmi adatokat alapul véve, elsőként a humán Th17-differenciálódás folyamatát vizsgáltuk egészségesekben. Komplex sejtizoláló rendszerek hiányában, néhány olyan fontos kérdésre kerestünk választ, mely alapján a későbbiekben felépíthető egy jól reprodukálható rendszer, amelyben vizsgálni tudjuk a differenciálódást. A TGF $\beta$ , IL-6 és IL-1 $\beta$  citokinek szerepét tanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy a legoptimálisabb Th17 indukáló körülmény az alkalmazott citokinek koncentrációját illetően az alacsony (2,5 ng/ml) TGF $\beta$  és magasabb IL-6 (25 ng/ml) illetve IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) koncentráció. Az irodalmi adatok egy része megerősíti, hogy további proinflammatorikus citokinek (IL-6 és IL-1 $\beta$ ) jelenlétében a TGF $\beta$  indukálja a Th17-differenciálódást [73, 74, 81, 226], ugyanakkor más adatok szerint gátló hatású [71, 72, 89]. A TGF $\beta$  Th17-differenciálódást indukáló

funkciója emberi sejtek esetében továbbra is ellentmondásos [227, 228]. Saját kísérleteink során a differenciálódást a Th17-sejtekre jellemző *RORC* transzkripció faktor expressziójának mérésével ellenőriztük, amelynek a leginkább a TGF $\beta$ , IL-6 és IL-1 $\beta$  citokin kombinációval való kezelést követően fokozódott az expressziója és a differenciálódás 5. napját követően sem változott számottevően.

A kiindulási sejtpopuláció kérdésének vizsgálatakor összehasonlítottuk a perifériás CD4<sup>+</sup> sejteket és az e populáción belüli naiv (CD45RO<sup>-</sup>) sejteket, amelyekben szintén a differenciálódást követően mért *RORC* expresszió tekintetében lényeges különbség mutatkozott. Az *in vitro* differenciálódás folyamata a naiv sejtekből kiindulva jobban tanulmányozható, hiszen a CD4<sup>+</sup> memória sejtek jelenléte és aktivációja lényegesen befolyásolja az eredmények értékelését, amelyek jelenlétét a *RORC* és *TBX21* expressziója (**24. ábra, 78. oldal**) és IL-17A termelése (**17. ábra, 67. oldal**) valamint a kemokin receptor expresszió kimutatásával (**29. ábra, 84. oldal**) igazoltunk. A Th17-differenciálódás vizsgálata az irodalmi adatok alapján is naiv Th sejtekből szükségszerű [71, 74, 75, 89]. A sejtaktiváció vizsgálata során a legtöbb protokoll által javasolt [71, 74, 89] anti-CD3 és anti-CD28 általi stimulációt választottuk, amely a sejtek IL-2 termelése alapján fokozottabb, ha egy mindkét antitestet kötő harmadik antitest alkalmazunk. Ez a rendszer az *in vivo* körülmények között lezajló antigénprezentáló sejtek általi T-sejt aktiváció folyamatát modellezi, amelynek alternatívája a kereskedelmi forgalomban kapható és széles körben használt CD3/CD28 konjugált gyöngy (Dynabead) [229]. A sejtek aktivációja során azok mérete megnövekedett, amelyet mikroszkópban és sejtszámláló automatában is megfigyeltünk. PBMC sejteken alkalmazva a T-sejt specifikus aktivációt (anti-CD3+anti-CD28+keresztköti antitest) látható, hogy csupán a sejtek egy részének mérete megnövekszik meg (**15/A ábra, 65. oldal**). A különböző kezelések, beleértve az aktivációt is, nemcsak a sejtfunciót, hanem a sejtek méretét (**15/B ábra, 65. oldal**) és a sejtdenzitást is befolyásolták. A T-sejt aktivációhoz a CD3 mellett a CD28 által közvetített szignál is szükséges a sejtproliferációhoz és a citokintermeléshez [230, 231], ugyanakkor CD4<sup>+</sup> T-sejtek CD3+CD28 általi aktivációja más irodalmi adatok alapján a sejtek csökkent IL-17 termeléséhez vezet [229]. A T-sejt aktiváció intenzitása a Th17-differenciálódás lényeges mozzanata, habár ennek elemzésénél is kardinális kérdés, hogy azt csak naiv vagy naiv és memóriasejteket is tartalmazó sejtpopuláció esetében vizsgáljuk. Több



tanulmány felvetette, hogy a megfelelő citokinkörnyezet (IL-1 $\beta$ , IL-23, TGF $\beta$ ) mellett a CD28 stimuláció nem szükséges, sőt esetleg gátló hatású a Th17-differenciálódásra [229, 232-234], ellenben a CD28 stimuláció hatására a naiv CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg-sejtekből is differenciálódhatnak Th17-sejtek [235].

RA-ban ismert, hogy a CD4<sup>+</sup> T-sejtek TCR/CD3-on keresztüli aktiválhatósága csökken, amelyet a CD3  $\xi$  láncának expressziója szabályoz [236-238]. Vizsgálatunk során egészséges donorokból származó differenciálódott T-sejtekben az anti-CD3, anti-CD28 és keresztköti antitest indukált aktiváció a transzkripciós faktorok (*RORC* és *TBX21*) expresszióját és a sejtek citokin termelését (IL-17A, IL-22) is serkentette. RA-ban és AP-ben csak a citokintermelés fokozódott (**34. ábra, 91. oldal**) a transzkripciós faktorok expressziója nem (RA), vagy csak részben növekedett (AP) (**32. ábra, 88. oldal**). Ez a megfigyelés alátámaszthatja a betegek T-sejtjeiben jellemző magasabb transzkripciós faktor expresszió és a Th17-sejt irányú elköteleződés meglétét, amelynek köszönhetően Th17 indukáló körülmények hiányában, csupán aktiváció hatására is képesek a Th17-sejtekre jellemző citokinek (IL-17A, IL-22) szekréciójára.

A Th17 differenciálódás során az anti-IL4 és anti-IFN $\gamma$  antitestek alkalmazása – az irodalmi adatokkal megegyező módon – egészségesekben fokozták a *RORC*<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> sejtek kialakulását, azonban e szuszpenzióban detektáltuk a legkisebb sejtdenzitást [53, 105, 107]. A neutralizáló antitestek alkalmazásával valóban kiküszöbölhetővé válhat az egyéb Th sejtvonalak irányába történő differenciálódás, amelyet a különböző aktivált sejtklonok által termelt citokinek (pl. nagy mennyiségű IL-2 Treg vagy Th1 indukáló hatása) kiváltanak. A sejtek IL-2 termelését saját kísérleteink alkalmával is ellenőriztük néhány esetben, és azt tapasztaltuk, hogy neutralizáló antitestek hiányában, a sejtaktiváció által kiváltott IL-2 termelés fokozottabb volt, mint azok alkalmazása esetén, Th17-indukáló körülmények hatására. Feltételezhető, hogy jelenlétük mellett csak a Th17 irányba differenciálódó sejtek szaporodnak, amely magyarázatot nyújthat az alacsony sejtdenzitás mellett mért magasabb *RORC* expresszióra ezeknél a kezeléseknél.

A Th17-sejt differenciálódás folyamatáról ismert, hogy a prekurzor-sejtek a citokinkörnyezettől függően nem klasszikus Th1 vagy Th1/Th17 köztes fenotípusú sejtekké is differenciálódhatnak, amelyben epigenetikai folyamatok (*IFN $\gamma$*  gén csökkent metilációja) is szerepet játszanak [239-241]. A Th17-differenciálódás folyamatának

általános tanulmányozása mellett, a folyamat Th1 irányú rugalmasságában szerepet játszó citokinek szerepét is vizsgálni kívántuk, így különböző, a Th17-sejtdifferenciálódásban szerepet játszó citokinek kombinációjával kezeltük a naiv T-sejteket. Neutralizáló antitestek alkalmazása nélkül vizsgálva az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6 és az aktiváció+IL-1 $\beta$ +IL-6+IL-23 kezelések hatását, látható volt, hogy a naiv T-sejtek *RORC*, *TBX21* expressziója eltérően változik (**22. ábra, 74. oldal**), ami felvetette annak lehetőségét, hogy valóban megfigyelhető bizonyos mértékű kontinuitás a kétféle fenotípus között. A kezelések a sejtek citokintermelésére is eltérő hatással voltak, míg az IL-17A termelésre valamennyi kezelés hasonlóan serkentőleg hatott, az IL-22 produkciót főképpen az aktiváció+IL-1 $\beta$ + IL-23+IL-6 citokinkombináció fokozta és a TGF $\beta$  gátolta (**22. ábra, 74. oldal**). Ez a megfigyelés az irodalmi adatokkal együtt alátámasztja, hogy a Th17 releváns citokinek optimális kombinációja fontos tényező, amely nemcsak a Th17 specifikus, hanem más, például a Th1 irányú differenciálódást is serkentheti, létrehozva ezzel a korábban említett kettős fenotípusú Th1/Th17-sejteket. A Th17-sejtek által termelt citokinek közül az IL-17A és IL-22 szerepe számottevő azok patogenitása szempontjából [52, 67, 72, 112, 135, 239]. Megfigyelésünk alapján a két citokin termelése eltérően regulálódik a differenciálódás során (**19. és 33/A ábra, 70. és 90. oldalak**), amely megfigyelésnek lényeges szerepe lehet a patogén funkciójú Th17 fenotípus kialakulásának megismerésében.

Számos olyan genetikai vagy külső környezeti hatás ismert, amely autoimmun betegségek kialakulását segíti elő, ezen tényezők pontos kapcsolata részleteiben mindmáig nem ismert. Az általunk vizsgált két, sok tekintetben különböző gyulladósos reumatológiai betegségben a Th17-sejtek mellett az osteoclastok szerepe is számottevő [191, 206, 209]. A dohányzás, mint környezeti tényező autoimmun betegségekre hajlamosító szerepe jól ismert [20, 25]. A dohányzás hatása nehezen vizsgálható, hiszen a dohányfüstben található különböző anyagok együttesen hatásán keresztül érvényesül. Ezen anyagok jelenléte ugyanakor detektálható azok fizikai, kémiai tulajdonságai alapján [219]. Vizsgálatainkban két ilyen, a dohányfüstben azonosított anyag mellett, annak komplex hatását is tanulmányozva megfigyeltük, hogy azok hatással vannak PBMC sejtek IL-17A termelésére. Mind a TCDD, mind a benzo[a]pirén, amelyek az AHR agonista ligandjai, mind pedig a dohányfüstöt elnyelt sejtmedium csökkentette a sejtek CD3 indukálta IL-17A termelését, amely az irodalmi adatokkal összefüggő

megfigyelés (**3. táblázat, 36-38. oldal**) [242, 243]. Az irodalmi adatok szerint ezek az anyagok a sejtek IL-22 termelését fokozzák, így a Th22 fenotípus kialakulását segítik elő, amely sejtekre nem jellemző az IL-17 termelő képesség [141, 244]. Egérben ugyanakkor kimutatták, hogy az *Ahr* a *ROR $\gamma$* -val kapcsolatba lépve annak sejtmagba történő lokalizációját indukálja és így közvetve serkenti az *Il17a* promóteréhez való kötődését és átírását [245]. Az AHR expressziója számos humán szövetben, köztük az immunsejtek egy részében is megfigyelhető és az utóbbi évek irodalmi adatai szerint lényeges szerepe van annak kialakulásában is. Az immunológiai barrierék (bőr, nyálkahártyák) a külső környezetből származó anyagokkal (dohányzás, táplálkozás, gyógyszerek) viszonylag gyakran kerülnek kapcsolatba és az AHR-nek, mint xenoszenzornak ezen anyagok megkötésében és feldolgozásában fontos funkciója van [127-129, 246]. Kimutattuk, hogy humán naiv ( $CD4^+CD45RO^-$ ) és memória ( $CD4^+CD45^+$ ) T-sejtek AHR expressziója hasonló mértékű és az anti-CD3, anti-CD28 és keresztükötő antitest általi sejtaktivációra fokozódik (**19-20. ábra, 70-71. oldalak**). Az AHR ligandoknak bizonyított szerepe van a Th17-Th22-Treg-sejtek érésében (lásd részletesen az 1.2.4. fejezetben), differenciálódásában és funkciójában. Az irodalmi adatok alapján lehetséges, hogy e sejtek arányára és immunológiai egyensúlyára olyan anyagok gyakorolnak döntő hatást az AHR általi szignalizáció révén, amelyekkel a mindennapi életünk során érintkezünk. Ezek a megfigyelések közelebb vihetnek az immunológiai betegségek kialakulásának megértéséhez, amely új immunológiai terápiás célpontok megtalálását teszi lehetővé.

Az általunk vizsgált betegségek közül RA-ban a tünetek kialakulásához hozzájárul az immunkomplexek fokozott jelenléte, amelyek gyulladási indukáló hatása jól ismert [173, 174]. A betegség patomechanizmusában szerepet játszó Th17-sejtek és osteoclastok in vitro differenciálódására e komplexek hatással lehetnek, amelyet a sejtek differenciálódásában szerepet játszó gének és citokinek expresszióján keresztül követtünk nyomon egészségesekben és a betegcsoportokban. A SIC kezelés egészségesekben az osteoclastok érésében szerepet játszó gének (*CTSK* és *RANKL*) expresszióját gátolta, azonban a Th17 eredetű *RORC* transzkripciós faktor expressziót nem befolyásolta és az IL-17A termelést fokozta (**22-23. ábra, 74. és 76. oldalak**). RA-s és AP-s betegekben, az immunkomplexek jelenléte sem az osteoclastok, sem a Th17-sejtek differenciálódását nem befolyásolta. E molekulák megkötésében a többek között

antigénprezentáló sejteken (pl. DC) és az osteoclastokon is expresszáldó Fc $\gamma$  receptorok játszanak szerepet. Bakteriális antigénekből kialakuló immunkomplexek megkötése fokozza DC-k érését és antigénprezentálását, amelynek következtében olyan gyulladáscitokinek (IL-1 $\beta$ , IL-23) szabadulhatnak fel, amelyek a Th17-sejtek érését indukálják [247]. Az FcR-ok mellett a *Staphylococcus aureus* antigéneket tartalmazó immunkomplexek – amelyekkel kísérleteink során mi is dolgoztunk – Toll like receptorokon keresztül is stimulálhatják az APC-eket, amelyek attól függően hogy monocita eredetű makrofágok-e, gátolják (IL-10 termelés révén), vagy dendritikus sejtek-e fokozzák (IL-12 és IL-23 termelés által) a Th1/Th17 irányú differenciálódást [248]. L.M. McLellan és munkatársainak eredményeihez hasonlóan az *S. aureus* peptid tartalmú immunkomplexek az általunk végzett kísérletekben is gátolták az osteoclastogénikus gének expresszióját egészségesekben, azonban a betegekben ez a hatás nem volt megfigyelhető. Egyes RA-ban releváns immunkomplexek (pl.ACPA) ugyanakkor ismert módon fokozzák az osteoclastogenezist, amelyben szintén szerepet játszhatnak a sejteken expresszáldó FcR-ok [189, 190, 249]. A SIC molekulák, habár egészséges szervezetben az osteoblastok gátlásán keresztül indirekt módon serkentik az osteoclastogenezist [250], ugyanakkor RA-ban az autoantigén indukált gyulladás mérséklésére használt terápiás molekulák [251]. Megfigyeléseink alapján feltételezhető, hogy a betegekben mind a Th17, mind az osteoclast differenciálódás egészségesektől eltérően szabályozódik, így a SIC kezelésre adott válasz is eltérő lehet.

A Th17-differenciálódásban szerepet játszó főbb citokinek szerepe ma már jól ismert és jellemzett (**2. táblázat és 5-6. ábra, 27, 29. és 31. oldal**) [53, 71-86, 92], ugyanakkor az optimális differenciálódási körülmények (citokinek koncentrációja, kombinációja, kezelési idő) még kérdéseket vet fel. Annak ellenére, hogy számos adat található az irodalomban az IL-17A termelésre és a Th17-sejtek mennyiségére vonatkozóan, perifériás T-sejtek Th17 irányú differenciálódási folyamatának szabályozását tekintve kevés adat áll rendelkezésre a különböző betegségekben [226, 252-259]. Gyulladásos arthropathiák esetében csupán néhány tanulmány foglalkozik ennek vizsgálatával [255, 257-259], amelyekben az RA és AP esetében leírtakat saját kísérleteink is megerősítik. Perifériás CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> naiv és CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> memória sejtek vizsgálata során kimutattuk, hogy azok fenotípusa eltérő egészségesekben és gyulladásos arthropathiákban, amelyekben e naiv T-sejtek Th17 irányú elköteleződése figyelhető

meg. E következtetéseket a sejtek *RORC* (emelkedett a naiv sejtekben) és *TBX21* (nincs szignifikáns különbség) expressziójának mRNS, fehérje és kemokin receptorok (CCR6, CCR4, CXCR3) mérési eredményei erősítik meg (**24, 26 és 29. ábra, 78, 80. és 84. oldalak**). A vizsgált csoportokban a naiv és memória T-sejtek *TBX21* expressziója erős pozitív lineáris korrelációt mutatott, míg a *RORC* expresszió esetében semmilyen lineáris összefüggést nem volt kimutatható, amely a betegek sejtjeiben megfigyelt fokozott expresszió következménye (**25/A, B ábra, 79. oldal**). Mind az egészségesekben, mind a két betegcsoportban megfigyelhetők ugyanakkor a kettős fenotípusú ( $ROR\gamma^+/TBET^+$ ) memóriasejtek (**28. ábra, 83. oldal**), amelyek az irodalmi adatoknak megfelelően döntően az effektor memóriasejtek között jelentek meg [39, 62]. Kimutattuk, hogy a sejtek mért paramétereire alapján (transzkripciós faktor és kemokin receptor expresszió) a betegek az egészségesektől és egymástól elkülönülő csoportokat alkotnak (**31. ábra, 86. oldal**).

Eredményeink alapján az *in vitro* Th17-differenciálódás folyamata eltérően szabályozott mind egészségesekben, mind pedig RA-s és AP-s betegekben. Annak ellenére, hogy az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 és TGF $\beta$  Th17-differenciálódást indukáló szerepe feltételezhető RA-ban és AP-ben is [53, 258, 260], eredményeink közlését megelőzően nem volt olyan komplex összefoglaló kísérleti munka az irodalomban, amely a Th17 indukáló citokinek kombinációjának szerepét hasonlítja össze ezekben a kórképekben. A TGF $\beta$  pontos szerepe a Th17-differenciálódásban számos tényezőtől függ, mint például más citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23) jelenléte, a kiindulási sejtpopuláció és szöveti környezet (perifériás vér, köldökzsínór vér vagy például ízületi folyadék). A különböző irodalmi forrásokban szereplő adatokat, sokszor az eltérő kísérleti elrendezés miatt korlátozottan lehetséges összehasonlítani.

Eredményeink az irodalmi adatokat megerősítve igazolják, hogy a TGF $\beta$  szerepe a klasszikus Th17 fenotípus kialakításában számottevő [73-77], azonban az IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-23 citokin kombinációnak van a legmarkánsabb fokozó hatása a sejtek IL-17A és IL-22 termelésére (**32-34. ábrák, 88, és 90-91. oldalak**) [71, 83, 106, 233, 257, 260]. A sejtek citokin termelési mintázata eltérő egészségesekben és RA-s, illetve AP-s betegekben, amely különbség főképpen a sejtaktiváció és az IL-1 $\beta$  illetve IL-23  $\pm$  IL-6 kezelések hatására jelenik meg a sejtek fokozottabb IL-17A és IL-22 termelésében. Az IL-17A termelés profilja az egészségesekben mindkét betegcsoporttól szignifikánsan

eltérőnek mutatkozott, azonban az IL-22 tekintetében az egészségesek csak az RA-s csoporttól tértek el. (35. ábra, 92. oldal). Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a Th17-differenciálódás folyamata mindkét betegségben eltérően szabályzott.

A humán Th17-sejtekre jellemző kemokin receptor markerek a CCR6 és CCR4 [89, 92], amelyek expresszióját vizsgálataink során a naiv és a differenciálódott sejtekben mi is nyomonkövettük. E markerek expressziója a Th22 sejtekre is jellemző, amelyek ezen kívül a CCR10 expresszióval is jellemezhetőek [141, 244, 261]. A Th22 sejtek főképpen IL-22 termelnek, és a Th17sejtekhez hasonlóan fontos szerepet játszanak mind a bőrbetegségek (pl. psoriasis), mind pedig az RA, illetve más reumatológiai betegségek kialakulásában [135, 261-265]. A Th17-sejtektől eltérően a Th22 sejtek igen kis mértékben vagy egyáltalán nem expresszálnak *RORC* vagy *TBX21* transzkripciós faktorokat, ugyanakkor kialakulásukban az AHR kulcsszerepet játszik és TNF $\alpha$  illetve IL-6 hatására differenciálódnak [141, 261, 263, 266]. Habár az IL-22 fontos szerepet játszik az arthritis és a psoriasis patogenezisében, mind RA-ban mind AP-ben leírták, hogy a Th17-sejtek szerepe független a Th22 sejtektől, mennyiségük ugyan pozitívan korrelál, de a Th17-sejtek szerepe mindkét kórképben ismert [265, 267-269]. Az IL-17A és IL-22 citokinek termelődésének eltérő szabályozását saját kísérleteink során is megfigyeltük és a vizsgált citokin kombinációk az irodalmi adatok szerint nem indukálják a Th22 sejtek termelődését. A CCR10 termelődését ugyan nem vizsgáltuk, de a *RORC* és/vagy *TBX21* expressziójának mértéke alapján feltételezhető, hogy a termelt IL-22 a Th17-sejtekből származik. Az RA-s betegek egy része leflunomid terápiában részesült a mintavételkor, amelyről ismert, hogy az AHR agonista ligandja [223]. Ezekben a betegekben a differenciálódás 0.napján kisebb IL-22 szintet mértünk, ugyanakkor a Th17-differenciálódást indukáló aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ +anti-IL4 kezelés hatására fokozottabb IL-22 termelést figyeltünk meg, mint a biológiai terápiát kapó betegekben. E megfigyelésünket megerősíti az a közelmúltban publikált megfigyelés, amely szerint leflunomid és metotrexát terápiában részesülő RAs betegekben a plazma IL-22 szintje csökkent, amely pozitívan korrelált a betegségaktivitás csökkenésével is [270]. A leflunomid aktív metabolitja (A771626) az RA-s betegekben a hosszan tartó gyulladás során a synoviumban fokozottan termelődő mediátorok (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NO, and MMP-3) produkcióját is gátolja, amelyet humán synovium sejtvonalon végzett kísérletek igazolnak [271]. Ezen irodalmi adatok és saját

eredményeink is megerősítik, hogy az AHR és ligandjai által közvetített szignalizációs folyamatok IL-22 termelő sejtpopulációkban betöltött szerepüknek köszönhetően rendkívül fontosak a gyulladásos reumatológiai betegségek patomechanizmusában.

A betegekben mért klinikai adatokat a mérési adatainkkal összevetve megfigyeltük, hogy a  $CD4^+CD45RO^+CCR4^+$  memória T-sejtek száma a gyulladást jelző CRP és ESR paraméterekkel lineáris pozitív korrelációt mutat. Irodalmi adatok szerint lupus nephritisben a vesét infiltráló memória T-sejtek nagyrésze  $CCR4^+$ , amelyek aránya pozitív korrelációt mutat a komplement aktivitással [272]. Statisztikai analízisünk során kimutattuk, hogy a  $CCR4^+CXCR3^+$  sejtek aránya a legfontosabb olyan paraméter, amely alapján külön csoportokba sorolhatók a betegek és az egészséges donorok. E Th1-Th2 markereket egyaránt kifejező sejtek, amelyek feltételezhetően átmeneti fenotípusú memóriasejtek [273], meglepően nagy mennyiségben találhatóak meg az AP-s betegek synoviális folyadékában [274]. Ezek a megfigyelések rávilágítanak arra, hogy az egyes Th alpopulációk differenciálódása egy nem irreverzibilis, flexibilis és több ponton még manipulálható folyamat, amely számos már ismert vagy még nem ismert tényező befolyása révén patogén funkciójú sejtek kialakulásához vezethet.

A kísérletek során vizsgált két, gyulladásos reumatológiai betegség habár klinikailag hasonló megjelenésű lehet, azok patomechanizmusa sok tekintetben eltérő (**5-6. táblázat, 45-46. oldal**). Egyes citokinek ( $TNF\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-17A, IL-22, and IL-23) illetve a Th17-sejtek és osteoclastok szerepe mindkét kórképben nagy jelentőségű. Az általunk elvégzett kísérletek eredményei alapján látható, hogy RA-ban és AP-ben az egészséges donoroktól eltérően regulálódik a Th17-sejtek differenciálódása és a naiv sejtek már rendelkeznek bizonyos mértékű Th17 irányú elköteleződéssel, amely gyulladás fenntartásához hozzájárulhat (**24, 26 és 29. ábrák, 78, 80. és 84. oldalak**). A Th17-sejtek differenciálódásának folyamata során alkalmazott citokinkezelések különböző hatással voltak a beteg- és egészséges donor eredetű sejtek transzkripciós faktor (*RORC* és *TBX21*), citokin (IL-17A és IL-22) és kemokin receptor expressziójára (*CCR6*, *CCR4*, *CXCR3*), amely alapján feltételezhető, hogy a Th17-differenciálódás folyamata is eltérően regulálódik a betegségekben (**32-34 és 35-36. ábrák, 88, 90-92. és 94. oldalak**). Az egészségesekben és mindkét betegcsoportban más citokintermelődési profil figyelhető meg, amely a különböző patomechanizmusra hívja fel a figyelmet, és amelynek jellemzésére elsőként kutatócsoportunk alkalmazott komplex statisztikai

adataelemzési módszert (**36. ábra, 94. oldal**). Elsőként alkalmaztunk továbbá többváltozós adatelemzési módszereket annak igazolására, hogy a Th17 releváns és általunk mért paraméterek közül melyek azok, amelyeknek vizsgálata kulcsfontosságú az RA és az AP betegségek vizsgálata szempontjából.

A gyulladásban szintén szerepet játszó T-sejt populáció kialakulásának vizsgálata, mint például a Th1, a Th9 vagy a Th22 sejtek lehetőséget teremtene a betegekben kialakult komplex patofiziológias rendszer megismerésére [48, 267, 275-277]. Reményeink szerint eredményeink elősegítik a gyulladásos arthropathiák patomechanizmusának megértését és új és/vagy hatékonyabb terápiás célpontok felfedezését, amelyhez a jövőben a kutatás folytatásával és kiterjesztésével is hozzá szeretnénk járulni.



	naív T-sejt		memória T-sejt		Stimuláció: anti-CD3 + anti-CD28 + keresztükítő antitest		Stimuláció + IL-1 $\beta$ + IL-23 + anti-IL-4		Stimuláció + IL-1 $\beta$ + IL-23 + IL-6 + anti-IL-4	
AP betegek	CD45RO <sup>+</sup> sejtek	medián (ly%)	CD45RO <sup>+</sup> sejtek	medián (ly%)	Stimulált sejtek	medián (ly%)	Kezelt sejtek	medián (ly%)	Kezelt sejtek	medián (ly%)
	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.49	csak CCR4 <sup>+</sup>	23.30	csak CCR4 <sup>+</sup>	1.90	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.75	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.69
	csak CXCR3 <sup>+</sup>	12.35	csak CXCR3 <sup>+</sup>	10.53	csak CXCR3 <sup>+</sup>	11.62	csak CXCR3 <sup>+</sup>	11.82	csak CXCR3 <sup>+</sup>	8.00
	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	25.86	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	40.77	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.75	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.83	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.54
	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	28.33	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	14.25	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	0.92	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	1.01	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	0.96
RA betegek	CD45RO <sup>+</sup> sejtek	medián (ly%)	CD45RO <sup>+</sup> sejtek	medián (ly%)	Stimulált sejtek	medián (ly%)	Kezelt sejtek	medián (ly%)	Kezelt sejtek	medián (ly%)
	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.58	csak CCR4 <sup>+</sup>	26.50	csak CCR4 <sup>+</sup>	3.51	csak CCR4 <sup>+</sup>	3.01	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.96
	csak CXCR3 <sup>+</sup>	13.48	csak CXCR3 <sup>+</sup>	14.03	csak CXCR3 <sup>+</sup>	10.06	csak CXCR3 <sup>+</sup>	9.08	csak CXCR3 <sup>+</sup>	9.86
	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	24.05	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	36.07	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	1.96	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.88	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.61
	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	19.47	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	19.10	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	1.69	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	1.83	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	2.87
Egészséges donorok	CD45RO <sup>+</sup> sejtek	medián (ly%)	CD45RO <sup>+</sup> sejtek	medián (ly%)	Stimulált sejtek	medián (ly%)	Kezelt sejtek	medián (ly%)	Kezelt sejtek	medián (ly%)
	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.95	csak CCR4 <sup>+</sup>	36.98	csak CCR4 <sup>+</sup>	1.85	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.19	csak CCR4 <sup>+</sup>	2.59
	csak CXCR3 <sup>+</sup>	14.24	csak CXCR3 <sup>+</sup>	17.70	csak CXCR3 <sup>+</sup>	12.88	csak CXCR3 <sup>+</sup>	12.43	csak CXCR3 <sup>+</sup>	14.31
	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	19.12	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	36.49	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.41	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.43	CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0.34
	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	33.05	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	19.35	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	0.62	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	0.95	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	0.68
	0. nap				5. nap				t (nap)	

**37. ábra:** A Th17 differenciálódás folyamatának összehasonlítása egészséges donorokban, illetve RA és AP betegekben.

Az ábrán összefoglalva láthatóak a differenciálódás 0. napján a naív és memória T-sejtek közötti, valamint a különböző citokinkezelések hatására differenciálott sejtek közötti különbségek a sejtek ROR $\gamma$  expressziójában, CCR6, CCR4 és CXCR3 kemokin receptor expressziójában, valamint IL-17A és IL-22 citokintermelésében. Rövidítések: ROR $\gamma$ : RAR-asszociált orphan receptor gamma, RA: rheumatoid arthritis, AP:arthritis psoriatica  
Forrás: E. Baricza et. al. Front. Immunol. 2018. [225]

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A humán Th17 *in vitro* differenciálódás legoptimálisabban CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> naiv T-sejtekből indítható, az egyéb mononukleáris és memória T-sejtek jelenlétéből adódó, a differenciálódást befolyásoló hatások elkerülése érdekében. A sejtaktiváció során alkalmazott anti-CD3, anti-CD28 és keresztkötő antitest, valamint az anti-IL4 és anti-IFN $\gamma$  neutralizáló antitestek jelenléte hozzájárul a sejtek megfelelő differenciálódásához.
2. Az AHR fontos szerepet játszik a környezeti faktorok, mint például a dohányfüstben található policiklusos aromás szénhidrogének (TCDD és benzo[a]pirén) vagy gyógyszermolekulák (leflunomid) által közvetített hatások molekuláris szignalizációjában. Expressziója kimutatható a kezeletlen humán naiv és memória T-sejtekben, és expressziója fokozódik aktiváció hatására. A TCDD, benzo[a]pirén és leflunomid AHR agonista ligandok hatással vannak a T-sejtek IL-17A és IL-22 termelésére, így hozzájárulhatnak a rheumatoid arthritis és arthritis psoriatica patomechanizmusához. A rekombináns *Staphylococcus* Protein A és humán IgG-ből álló immunkomplexek egészségesekben gátolják a T-sejtek *TBX21* expresszióját, ugyanakkor Th17 indukáló körülmények mellett serkentik azok IL-17A termelését.

Az immunkomplexek gátolják az osteoclast sejtek RANKL és CTSK kifejeződését.

3. RA és AP betegek naiv T-sejtjeiben Th17 irányú elköteleződés figyelhető meg, amelyet a sejtek fokozott *RORC* gén és ROR $\gamma$  fehérje kifejeződése jellemez, valamint a naiv és memória sejtek közötti CCR6 és CCR4 kemokinreceptor expressziós különbség hiánya támaszt alá. Az aktiváció az RA és AP betegekből származó sejtekben fokozza az IL-17A és IL-22 citokintermelést, ugyanakkor a transzkripciós faktorokra nincs hatással. Az *in vitro* differenciálódás folyamata és a sejtek citokintermelése eltérően szabályozódik egészségesekben és RA-s, illetve AP-s betegeknél. Az egészséges donorokat és a betegcsoportokat megkülönböztető legfontosabb paraméterek a differenciálódást megelőzően a naiv T-sejtek *RORC* expressziója, és CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> memória sejtek aránya, a differenciálódást követően pedig az aktiváció+IL1 $\beta$ +IL23+IL-6+anti-IL4 kezelés által indukált IL-22 termelés mértéke.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A Th17-sejtek és osteoclastok fontos szerepet játszanak a rheumatoid arthritisben és az arthritis psoriaticában. A Th17-sejtek egy olyan, főképpen IL-17A termelő sejtpopuláció, amelyre humán sejtekben *RORC* transzkripciós faktor expresszió jellemző és az extracelluláris patogének elleni immunvédekezésben, illetve az autoimmun gyulladás kialakulásában játszik szerepet. Az osteoclastok mieloid eredetű, monocitákból differenciálódó csontbontásra specializálódott sejtek, amelyek a gyulladás indukálta ízületi csontdestrukcióért felelősek. Az olyan külső környezeti hatások, például a dohányzás, amely bizonyítottan erős környezeti hajlamosító tényező RA-ban, az aromás szénhidrogén receptoron keresztül regulálhatják a T-sejtek differenciálódását és funkcióját. Az rheumatoid arthritis patomechanizmusában szintén fontos szerepet játszanak az autoantitestekből és autoantigénekből kialakuló immunkomplexek, amelyek szintén befolyásolhatják mind a csontfalósejtek, mind pedig a T-sejtek érését.

Az AHR expresszió indukálható a humán T-sejtekben, amely lehetővé teszi a különböző környezeti hatások közvetítését a sejtek felé, ezáltal szerepet játszhat a rheumatoid arthritis és az arthritis psoriatica patomechanizmusában is.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a Th17-differenciálódás folyamata eltérően regulálódik egészségesekben és rheumatoid arthritises illetve arthritis psoriaticás betegekben, amely betegségek patomechanizmusában a Th17-sejteknek fontos szerepe van. A betegek naiv sejtjei Th17 irányú elköteleződést mutatnak, amely hozzájárulhat a betegekben a jellemző krónikus gyulladás és az abból adódó ízületi és bőrtünetek kialakulásához. A sejtek *in vitro* differenciálódása során jellemző IL-17A és IL-22 citokinprofil eltérő mind az egészséges, mind pedig a betegcsoportokban egymáshoz képest, amely rámutat e sejtek különböző szerepének jelentőségére a betegségek patomechanizmusában. Kutatócsoportunk elsőként hasonlította össze ezen sejtek differenciálódását komplex többváltozós statisztikai elemzés segítségével, amellyel reményeink szerint nagyban hozzájárulhatunk a rheumatoid arthritis és az arthritis psoriatica kialakulásának megértéséhez, és új vagy hatékonyabb terápiás célpontok azonosításához.

## 8. SUMMARY

The Th17 cells and osteoclasts have a prominent role in inflammatory arthropathies. The Th17 cells mainly produce IL-17A and characterized by *RORC* expression and they take part in the immunodefence against extracellular pathogens, furthermore in the development of autoimmune inflammation. Osteoclasts are myeloid derived cells, differentiated from monocytes and specialized to breakdown the bone tissue in addition to the role they have in the inflammation induced bone and joint destruction. The environmental effects, like the smoking which is a known strong predisposing factor for RA, may regulate the T cell differentiation and function via aryl hydrocarbon receptors. The immunocomplexes which consist of autoantigens and autoantibodies also mediate the differentiation of both T-cells and osteoclasts.

The inducible expression of AHR may transfer the environmental effects to the cells; this receptor may take part in the pathogenesis of RA and PsA.

According to our results, the Th17 cell differentiation is differently regulated in healthy donors and RA or PsA patients in which diseases the Th17 cells have a prominent role. The patient derived naive T cells are committed to Th17, this commitment may contribute the development of chronic inflammation and consequently to joint destruction and skin symptoms. The IL-17A and IL-22 production during differentiation were altered both in healthy donors and in patients, pointing to the different role of the Th17 cells in the pathomechanism of diseases. The complex comparison of the Th17 differentiation development carried out multivariate statistic analysis was first used by our research group for analyse these parameters. We hope that these results will contribute to the understanding of the development and pathogenesis of rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis and help to find new and/or more efficient therapeutic targets.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abul Abbas, Andrew H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition*. Vol. 44. 2012. 983.
2. Duan, L. and E. Mukherjee, 2016, *Janeway's Immunobiology, Ninth Edition*. The Yale Journal of Biology and Medicine. **89**(3): p. 424-425.
3. Su, M.A. and M.S. Anderson, 2009, *Monogenic Autoimmune Diseases: Insights into Self-Tolerance*. Pediatric research. **65**(5 Pt 2): p. 20R-25R.
4. Gough, S.C.L. and M.J. Simmonds, 2007, *The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action*. Current Genomics. **8**(7): p. 453-465.
5. Charles A Janeway, J., Paul Travers, Mark Walport, and M.J. Shlomchik., *The major histocompatibility complex and its functions*, in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 2001, Garland Science: New York.
6. Matzaraki, V., V. Kumar, C. Wijmenga, and A. Zernakova, 2017, *The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases*. Genome Biology. **18**: p. 76.
7. Anderson, M.S., E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis, 2002, *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science. **298**(5597): p. 1395-1401.
8. Gavanescu, I., B. Kessler, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis, 2007, *Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **104**(11): p. 4583-4587.
9. Watanabe-Fukunaga, R., C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and S. Nagata, 1992, *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature. **356**(6367): p. 314-317.
10. Takahashi, T., M. Tanaka, C.I. Brannan, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, T. Suda, and S. Nagata, 1994, *Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand*. Cell. **76**(6): p. 969-976.
11. Fisher, G.H., F.J. Rosenberg, S.E. Straus, J.K. Dale, L.A. Middleton, A.Y. Lin, W. Strober, M.J. Lenardo, and J.M. Puck, 1995, *Dominant interfering fas gene*

- mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome.* Cell. **81**(6): p. 935-946.
12. Chae, S.C., Y.R. Park, J.H. Song, S.C. Shim, K.S. Yoon, and H.T. Chung, 2005, *The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population.* Immunogenetics. **56**(10): p. 696-701.
  13. Chae, S.C., J.H. Song, S.C. Shim, K.S. Yoon, and H.T. Chung, 2004, *The exon 4 variations of Tim-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population.* Biochem Biophys Res Commun. **315**(4): p. 971-975.
  14. Khademi, M., Z. Illes, A.W. Gielen, M. Marta, N. Takazawa, C. Baecher-Allan, L. Brundin, J. Hannerz, C. Martin, R.A. Harris, D.A. Hafler, V.K. Kuchroo, T. Olsson, F. Piehl, and E. Wallstrom, 2004, *T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis.* J Immunol. **172**(11): p. 7169-7176.
  15. Rodriguez-Manzanet, R., R. DeKruyff, V.K. Kuchroo, and D.T. Umetsu, 2009, *The costimulatory role of TIM molecules.* Immunological reviews. **229**(1): p. 259-270.
  16. Cloutier, J.F. and A. Veillette, 1996, *Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells.* Embo j. **15**(18): p. 4909-4918.
  17. Brand, O., S. Gough, and J. Heward, 2005, *Proposed mechanism by which CTLA-4 might use LYP/Grb2 to inhibit T-cell activation.* Expert Reviews in Molecular Medicine. **7**(23).
  18. Carreno, B.M., F. Bennett, T.A. Chau, V. Ling, D. Luxenberg, J. Jussif, M.L. Baroja, and J. Madrenas, 2000, *CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression.* The Journal of Immunology. **165**(3): p. 1352.
  19. Marson, A., W.J. Housley, and D.A. Hafler, 2015, *Genetic basis of autoimmunity.* The Journal of Clinical Investigation. **125**(6): p. 2234-2241.
  20. Baka, Z., E. Buzas, and G. Nagy, 2009, *Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together.* Arthritis Res Ther. **11**(4): p. 238.

21. Vessey, M.P., L. Villard-Mackintosh, and D. Yeates, 1987, *Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis*. *Contraception*. **35**(5): p. 457-464.
22. Baricza, E., 2013, *Dohányzás és krónikus ízületi gyulladás. T-sejtek és sejtések*. *Élet és Tudomány*. **68**(9.): p. 262-264.
23. Padyukov, L., C. Silva, P. Stolt, L. Alfredsson, and L. Klareskog, 2004, *A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. **50**(10): p. 3085-3092.
24. Klareskog, L., P. Stolt, K. Lundberg, H. Kallberg, C. Bengtsson, J. Grunewald, J. Ronnelid, H.E. Harris, A.K. Ulfgren, S. Rantapaa-Dahlqvist, A. Eklund, L. Padyukov, and L. Alfredsson, 2006, *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. *Arthritis Rheum*. **54**(1): p. 38-46.
25. Klareskog, L., J. Ronnelid, K. Lundberg, L. Padyukov, and L. Alfredsson, 2008, *Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis*. *Annu Rev Immunol*. **26**: p. 651-675.
26. van der Helm-van Mil, A.H., K.N. Verpoort, F.C. Breedveld, R.E. Toes, and T.W. Huizinga, 2005, *Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*. **7**(5): p. R949-958.
27. Klareskog, L., M. Widhe, M. Hermansson, and J. Ronnelid, 2008, *Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise*. *Curr Opin Rheumatol*. **20**(3): p. 300-305.
28. Linn-Rasker, S.P., A.H. van der Helm-van Mil, F.A. van Gaalen, M. Kloppenburg, R.R. de Vries, S. le Cessie, F.C. Breedveld, R.E. Toes, and T.W. Huizinga, 2006, *Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles*. *Ann Rheum Dis*. **65**(3): p. 366-371.
29. Mahdi, H., B.A. Fisher, H. Kallberg, D. Plant, V. Malmstrom, J. Ronnelid, P. Charles, B. Ding, L. Alfredsson, L. Padyukov, D.P. Symmons, P.J. Venables, L.

- Klareskog, and K. Lundberg, 2009, *Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis*. *Nat Genet.* **41**(12): p. 1319-1324.
30. Calabrese, F. and G. Thiene, 2003, *Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects*. *Cardiovascular Research.* **60**(1): p. 11-25.
31. Delogu, L.G., S. Deidda, G. Delitala, and R. Manetti, 2011, *Infectious diseases and autoimmunity*. *J Infect Dev Ctries.* **5**(10): p. 679-687.
32. Kivity, S., N. Agmon-Levin, M. Blank, and Y. Shoenfeld, 2009, *Infections and autoimmunity--friends or foes?* *Trends Immunol.* **30**(8): p. 409-414.
33. Dranoff, G., 2004, *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. *Nat Rev Cancer.* **4**(1): p. 11-22.
34. Biotec, M. *The broadest portfolio for your T cell research*. 2018; Available from:  
[https://www.miltenyibiotec.com/\\_Resources/Persistent/321261780bc5f2b6e4257bd90cfa8c54a9500c10/T%20Cell%20Quick%20Guide.pdf](https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/321261780bc5f2b6e4257bd90cfa8c54a9500c10/T%20Cell%20Quick%20Guide.pdf).
35. Bio-techn. *T cell subsets*. 2018; Available from:  
<https://resources.rndsystems.com/images/site/rnd-systems-tcell-subsets-pm-1728.png>.
36. Hampe, C.S., 2012, *B Cells in Autoimmune Diseases*. *Scientifica.* **2012**: p. 18.
37. Aloisi, F. and R. Pujol-Borrell, 2006, *Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases*. *Nature Reviews Immunology.* **6**: p. 205.
38. Kalampokis, I., A. Yoshizaki, and T.F. Tedder, 2013, *IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease*. *Arthritis Research & Therapy.* **15**(1): p. S1.
39. Devarajan, P. and Z. Chen, 2013, *Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good*. *Immunologic research.* **57**(0): p. 12-22.
40. Schenkel, Jason M. and D. Masopust, 2014, *Tissue-Resident Memory T Cells*. *Immunity.* **41**(6): p. 886-897.
41. Jäger, A. and V.K. Kuchroo, 2010, *Effector and regulatory T cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation*. *Scandinavian journal of immunology.* **72**(3): p. 173-184.



42. Kuchroo, V.K., C.A. Martin, J.M. Greer, S.T. Ju, R.A. Sobel, and M.E. Dorf, 1993, *Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis*. *J Immunol.* **151**(8): p. 4371-4382.
43. Germann, T., H. Hess, J. Szeliga, and E. Rude, *Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis*, in *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996. p. 227-240.
44. Neurath, M.F., B. Weigmann, S. Finotto, J. Glickman, E. Nieuwenhuis, H. Iijima, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, J. Mudter, P.R. Galle, A. Bhan, F. Autschbach, B.M. Sullivan, S.J. Szabo, L.H. Glimcher, and R.S. Blumberg, 2002, *The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease*. *Journal of Experimental Medicine.* **195**(9): p. 1129-1143.
45. Singh, R.R., 2003, *IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity*. *Clinical Immunology.* **108**(2): p. 73-79.
46. Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger, 2008, *Transforming growth factor- $\beta$  'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. *Nature Immunology.* **9**(12): p. 1341-1346.
47. Goswami, R., R. Jabeen, R. Yagi, D. Pham, J. Zhu, S. Goenka, and M.H. Kaplan, 2012, *STAT6-dependent regulation of Th9 development*. *Journal of Immunology.* **188**(3): p. 968-975.
48. Dantas, A.T., C.D. Marques, L.F. da Rocha Junior, M.B. Cavalcanti, S.M. Goncalves, P.R. Cardoso, A. Mariz Hde, M.J. Rego, A.L. Duarte, R. Pitta Ida, and M.G. Pitta, 2015, *Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenic Role or Just an Epiphenomenon?* *Dis Markers.* **2015**: p. 519638.
49. Ouyang, H., Y.B. Shi, N. Su, and L.Y. Li, 2013, *Abnormality and significance of interleukin-9 and CD4+ interleukin-9+ T-cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus*. *National Medical Journal of China.* **93**(2): p. 99-103.

50. Fonseca-Camarillo, G. and J.K. Yamamoto-Furusho, 2015, *Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease*. *Inflammatory Bowel Diseases*. **21**(9): p. 2188-2193.
51. Deng, Y., Z. Wang, C. Chang, L. Lu, C.S. Lau, and Q. Lu, 2017, *Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials*. *Hum Immunol*. **78**(2): p. 120-128.
52. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, 2009, *IL-17 and Th17 Cells*. *Annual Review of Immunology*. **27**(1): p. 485-517.
53. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo, 2006, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*. **441**(7090): p. 235-238.
54. Alvarado-Sanchez, B., B. Hernandez-Castro, D. Portales-Perez, L. Baranda, E. Layseca-Espinosa, C. Abud-Mendoza, A.C. Cubillas-Tejeda, and R. Gonzalez-Amaro, 2006, *Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. *J Autoimmun*. **27**(2): p. 110-118.
55. Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T.R. Petersen, B.T. Backstrom, R.A. Sobel, K.W. Wucherpfennig, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, 2007, *Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation*. *Nat Med*. **13**(4): p. 423-431.
56. Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone, 2009, *Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo*. *Nat Immunol*. **10**(9): p. 1000-1007.
57. Voo, K.S., Y.H. Wang, F.R. Santori, C. Boggiano, Y.H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D.R. Littman, and Y.J. Liu, 2009, *Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**(12): p. 4793-4798.
58. White, A.M. and D.C. Wraith, 2016, *Tr1-Like T Cells – An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage*. *Frontiers in Immunology*. **7**: p. 355.

59. Levings, M.K. and M.G. Roncarolo, 2000, *T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties*. J Allergy Clin Immunol. **106**(1 Pt 2): p. S109-112.
60. Bacchetta, R., C. Sartirana, M.K. Levings, C. Bordignon, S. Narula, and M.G. Roncarolo, 2002, *Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines*. Eur J Immunol. **32**(8): p. 2237-2245.
61. Wood, E.J., 2004, *Cellular and molecular immunology (5th ed.): Abbas A. K., and Lichtman, A. H.* Biochemistry and Molecular Biology Education. **32**(1): p. 65-66.
62. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, 2004, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol. **22**: p. 745-763.
63. Zinkernagel, R.M., 1995, *Mhc-restricted t-cell recognition: The basis of immune surveillance*. JAMA. **274**(13): p. 1069-1071.
64. Boes, M. and H.L. Ploegh, 2004, *Translating cell biology in vitro to immunity in vivo*. Nature. **430**(6996): p. 264-271.
65. Dustin, M.L., 2014, *The immunological synapse*. Cancer immunology research. **2**(11): p. 1023-1033.
66. Dinarello, C.A., 2007, *Historical Review of Cytokines*. European journal of immunology. **37**(Suppl 1): p. S34-S45.
67. Tesmer, L.A., S.K. Lundy, S. Sarkar, and D.A. Fox, 2008, *Th17 cells in human disease*. Immunological Reviews. **223**: p. 87-113.
68. Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, 2008, *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor*. J Exp Med. **205**(8): p. 1903-1916.
69. Lanier, L.L., C. Chang, and J.H. Phillips, 1994, *Human NKR-PIA. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes*. J Immunol. **153**(6): p. 2417-2428.

70. Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, A. Peired, F. Frosali, S.Q. Crome, V. Querci, M. Fambrini, F. Liotta, M.K. Levings, E. Maggi, L. Cosmi, S. Romagnani, and F. Annunziato, 2010, *CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC*. *European Journal of Immunology*. **40**(8): p. 2174-2181.
71. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, 2007, *Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. *Nature Immunology*. **8**(9): p. 942-949.
72. Wilson, N.J., K. Boniface, J.R. Chan, B.S. McKenzie, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J.C. Lecron, R.A. Kastelein, D.J. Cua, T.K. McClanahan, E.P. Bowman, and R. de Waal Malefyt, 2007, *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. *Nat Immunol*. **8**(9): p. 950-957.
73. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, 2008, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. *Nat Immunol*. **9**(6): p. 641-649.
74. Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis, 2008, *A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses*. *Nat Immunol*. **9**(6): p. 650-657.
75. Yang, L., D.E. Anderson, C. Baecher-Allan, W.D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler, 2008, *IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH17 cells*. *Nature*. **454**: p. 350.
76. Zhang, S., 2018, *The role of transforming growth factor  $\beta$  in T helper 17 differentiation*. *Immunology*. **0**(0).
77. Santarlasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, 2009, *TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells*. *Eur J Immunol*. **39**(1): p. 207-215.

78. Li, Y., E.A. David, B.-A. Clare, D.H. William, B. Estelle, O. Mohamed, K.K. Vijay, and A.H. David, 2008, *IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH17 cells*. *Nature*. **454**(7202): p. 350-352.
79. Chen, Z., C.M. Tato, L. Muul, A. Laurence, and J.J. O'Shea, 2007, *Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes*. *Arthritis Rheum*. **56**(9): p. 2936-2946.
80. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, 2009, *IL-17 and Th17 Cells*. *Annu Rev Immunol*. **27**: p. 485-517.
81. Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger, 2006, *TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. *Immunity*. **24**(2): p. 179-189.
82. Zhou, L., J.E. Lopes, M.M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G.D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, and D.R. Littman, 2008, *TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function*. *Nature*. **453**(7192): p. 236-240.
83. Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman, 2007, *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. *Nat Immunol*. **8**(9): p. 967-974.
84. Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, 2007, *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. *Nature*. **448**(7152): p. 484-487.
85. Nurieva, R., X.O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A.D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong, 2007, *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. *Nature*. **448**(7152): p. 480-483.
86. Wei, L., A. Laurence, K.M. Elias, and J.J. O'Shea, 2007, *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. *J Biol Chem*. **282**(48): p. 34605-34610.
87. Yang, X.O., B.P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H.S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A.D. Panopoulos, K.S. Schluns, S.S. Watowich, Q. Tian, A.M. Jetten, and C. Dong, 2008, *T helper 17 lineage differentiation is programmed by*

- orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. *Immunity*. **28**(1): p. 29-39.
88. Ghoreschi, K., A. Laurence, X.P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O'Shea, 2010, *Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling*. *Nature*. **467**(7318): p. 967-971.
  89. Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani, 2007, *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. *Nat Immunol*. **8**(6): p. 639-646.
  90. Zielinski, C.E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, 2012, *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta*. *Nature*. **484**(7395): p. 514-518.
  91. Hirota, K., J.H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D.J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A.J. Potocnik, and B. Stockinger, 2011, *Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses*. *Nat Immunol*. **12**(3): p. 255-263.
  92. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani, 2007, *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. *The Journal of Experimental Medicine*. **204**(8): p. 1849.
  93. Baricza, E., V. Tamasi, N. Marton, E.I. Buzas, and G. Nagy, 2016, *The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells*. *Cell Mol Life Sci*. **73**(1): p. 95-117.
  94. Unutmaz, D., 2009, *RORC2: the master of human Th17 cell programming*. *Eur J Immunol*. **39**(6): p. 1452-1455.
  95. Kurebayashi, S., E. Ueda, M. Sakaue, D.D. Patel, A. Medvedev, F. Zhang, and A.M. Jetten, 2000, *Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during*

- thymopoiesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **97**(18): p. 10132-10137.
96. Qin, H., L. Wang, T. Feng, C.O. Elson, S.A. Niyongere, S.J. Lee, S.L. Reynolds, C.T. Weaver, K. Roarty, R. Serra, E.N. Benveniste, and Y. Cong, 2009, *TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3*. J Immunol. **183**(1): p. 97-105.
  97. Hirahara, K., K. Ghoreschi, A. Laurence, X.P. Yang, Y. Kanno, and J.J. O'Shea, 2010, *Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation*. Cytokine Growth Factor Rev. **21**(6): p. 425-434.
  98. de Beaucoudrey, L., A. Puel, O. Filipe-Santos, A. Cobat, P. Ghandil, M. Chrabieh, J. Feinberg, H. von Bernuth, A. Samarina, L. Janni re, C. Fieschi, J.-L. St phan, C. Boileau, S. Lyonnet, G. Jondeau, V. Cormier-Daire, M. Le Merrer, C. Hoarau, Y. Lebranchu, O. Lortholary, M.-O. Chandesris, F. Tron, E. Gambineri, L. Bianchi, C. Rodriguez-Gallego, S.E. Zitnik, J. Vasconcelos, M. Guedes, A.B. Vitor, L. Marodi, H. Chapel, B. Reid, C. Roifman, D. Nadal, J. Reichenbach, I. Caragol, B.-Z. Garty, F. Dogu, Y. Camcioglu, S. G lle, O. Sanal, A. Fischer, L. Abel, B. Stockinger, C. Picard, and J.-L. Casanova, 2008, *Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells*. The Journal of experimental medicine. **205**(7): p. 1543-1550.
  99. Yang, X.O., A.D. Panopoulos, R. Nurieva, S.H. Chang, D. Wang, S.S. Watowich, and C. Dong, 2007, *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem. **282**(13): p. 9358-9363.
  100. Durant, L., W.T. Watford, H.L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H.W. Sun, Y. Kanno, F. Powrie, and J.J. O'Shea, 2010, *Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis*. Immunity. **32**(5): p. 605-615.
  101. Tripathi, S.K., Z. Chen, A. Larjo, K. Kanduri, K. Nousiainen, T.  ijo, I. Rica o-Ponce, B. Hrdlickova, S. Tuomela, E. Laajala, V. Salo, V. Kumar, C. Wijmenga, H. L hdesm ki, and R. Lahesmaa, 2017, *Genome-wide Analysis of STAT3-Mediated Transcription during Early Human Th17 Cell Differentiation*. Cell Reports. **19**(9): p. 1888-1901.

102. Boniface, K., W.M. Blumenschein, K. Brovont-Porth, M.J. McGeachy, B. Basham, B. Desai, R. Pierce, T.K. McClanahan, S. Sadekova, and R. de Waal Malefyt, 2010, *Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage*. J Immunol. **185**(1): p. 679-687.
103. Kortylewski, M., H. Xin, M. Kujawski, H. Lee, Y. Liu, T. Harris, C. Drake, D. Pardoll, and H. Yu, 2009, *Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment*. Cancer Cell. **15**(2): p. 114-123.
104. Maddur, M.S., P. Miossec, S.V. Kaveri, and J. Bayry, 2012, *Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies*. Am J Pathol. **181**(1): p. 8-18.
105. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, 2005, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol. **6**(11): p. 1123-1132.
106. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua, 2005, *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. The Journal of Experimental Medicine. **201**(2): p. 233-240.
107. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, 2005, *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol. **6**(11): p. 1133-1141.
108. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney, 2003, *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem. **278**(3): p. 1910-1914.
109. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, 2007, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. Curr Opin Immunol. **19**(6): p. 652-657.
110. Kurts, C., 2008, *Th17 cells: a third subset of CD4 + T effector cells involved in organ-specific autoimmunity*. Nephrology Dialysis Transplantation. **23**(3): p. 816-819.



111. Gunimaladevi, I., R. Savan, and M. Sakai, 2006, *Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish*. *Fish & Shellfish Immunology*. **21**(4): p. 393-403.
112. Kolls, J.K. and A. Linden, 2004, *Interleukin-17 family members and inflammation*. *Immunity*. **21**(4): p. 467-476.
113. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua, 2006, *Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway*. *Trends Immunol*. **27**(1): p. 17-23.
114. Attur, M.G., R.N. Patel, S.B. Abramson, and A.R. Amin, 1997, *Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage*. *Arthritis & Rheumatism*. **40**(6): p. 1050-1053.
115. Sa, S.M., P.A. Valdez, J. Wu, K. Jung, F. Zhong, L. Hall, I. Kasman, J. Winer, Z. Modrusan, D.M. Danilenko, and W. Ouyang, 2007, *The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis*. *J Immunol*. **178**(4): p. 2229-2240.
116. Kim, K.-W., H.-R. Kim, J.-Y. Park, J.-S. Park, H.-J. Oh, Y.-J. Woo, M.-K. Park, M.-L. Cho, and S.-H. Lee, 2012, *Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts*. *Arthritis & Rheumatism*. **64**(4): p. 1015-1023.
117. contributors, W. *Aryl hydrocarbon receptor*. 2012 13 November 08:06 UTC 8 November 2012 14:39 UTC; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Aryl\\_hydrocarbon\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/Aryl_hydrocarbon_receptor).
118. SABiosciences, a.Q.c. *AHR Pathway*. 2000-2010; Available from: [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=AHR\\_Pathway](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=AHR_Pathway).
119. Möglich, A., R.A. Ayers, and K. Moffat, 2009, *Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains*. *Structure (London, England : 1993)*. **17**(10): p. 1282-1294.
120. McIntosh, B.E., J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield, 2010, *Mammalian Per-Arnt-Sim Proteins in Environmental Adaptation*. *Annual Review of Physiology*. **72**(1): p. 625-645.
121. Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C.A. Miller, 3rd, T. Kato, K. Saeki, and T. Matsuda, 2001, *Indirubin and indigo are*

- potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. J Biol Chem.* **276**(34): p. 31475-31478.
122. Sinal, C.J. and J.R. Bend, 1997, *Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells.* *Mol Pharmacol.* **52**(4): p. 590-599.
  123. Seidel, S.D., G.M. Winters, W.J. Rogers, M.H. Ziccardi, V. Li, B. Keser, and M.S. Denison, 2001, *Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins.* *J Biochem Mol Toxicol.* **15**(4): p. 187-196.
  124. McMillan, B.J. and C.A. Bradfield, 2007, *The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **104**(4): p. 1412-1417.
  125. Denison, M.S. and S.R. Nagy, 2003, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**: p. 309-334.
  126. Beischlag, T.V., J. Luis Morales, B.D. Hollingshead, and G.H. Perdew, 2008, *The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression.* *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **18**(3): p. 207-250.
  127. Dolwick, K.M., J.V. Schmidt, L.A. Carver, H.I. Swanson, and C.A. Bradfield, 1993, *Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA.* *Mol Pharmacol.* **44**(5): p. 911-917.
  128. Jiang, Y.Z., K. Wang, R. Fang, and J. Zheng, 2010, *Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues.* *J Histochem Cytochem.* **58**(8): p. 679-685.
  129. Stockinger, B., P. Di Meglio, M. Gialitakis, and J.H. Duarte, 2014, *The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system.* *Annu Rev Immunol.* **32**: p. 403-432.
  130. Cella, M. and M. Colonna, 2015, *Aryl Hydrocarbon Receptor: linking environment to immunity.* *Seminars in immunology.* **27**(5): p. 310-314.
  131. Gutierrez-Vazquez, C. and F.J. Quintana, 2018, *Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor.* *Immunity.* **48**(1): p. 19-33.
  132. Baricza, E., P. Királyhidi, N. Marton, and O.T. Kovács, 2016, *Régi ismerős új szerepben. Élet és Tudomány.* **71**(27.): p. 848-850.

133. Veldhoen, M., K. Hirota, A.M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J.C. Renault, and B. Stockinger, 2008, *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. *Nature*. **453**(7191): p. 106-109.
134. Alam, M.S., Y. Maekawa, A. Kitamura, K. Tanigaki, T. Yoshimoto, K. Kishihara, and K. Yasutomo, 2010, *Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(13): p. 5943-5948.
135. Zenewicz, L.A. and R.A. Flavell, 2011, *Recent advances in IL-22 biology*. *Int Immunol*. **23**(3): p. 159-163.
136. Hwang, E.S., 2010, *Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation*. *Yonsei Med J*. **51**(4): p. 484-491.
137. Kimura, A., T. Naka, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto, 2008, *Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(28): p. 9721-9726.
138. Quintana, F.J., A.S. Basso, A.H. Iglesias, T. Korn, M.F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H.L. Weiner, 2008, *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. *Nature*. **453**(7191): p. 65-71.
139. Kobayashi, S., H. Okamoto, T. Iwamoto, Y. Toyama, T. Tomatsu, H. Yamanaka, and S. Momohara, 2008, *A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology*. **47**(9): p. 1317-1322.
140. Ramirez, J.M., N.C. Brembilla, O. Sorg, R. Chicheportiche, T. Matthes, J.M. Dayer, J.H. Saurat, E. Roosnek, and C. Chizzolini, 2010, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells*. *Eur J Immunol*. **40**(9): p. 2450-2459.
141. Trifari, S., C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, and H. Spits, 2009, *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. *Nat Immunol*. **10**(8): p. 864-871.
142. O' Higgins, P., 2001, *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. *Journal of Anatomy*. **199**(Pt 6): p. 741-742.

143. Nakashima, T., M. Hayashi, and H. Takayanagi, 2011, [*Bone and calcium update; bone research update. Osteoclastogenesis and osteoimmunology*]. Clin Calcium. **21**(12): p. 93-102.
144. Greenblatt, M.B. and J.-H. Shim, 2013, *Osteoimmunology: A Brief Introduction*. Immune Network. **13**(4): p. 111-115.
145. Aguila, H.L. and D.W. Rowe, 2005, *Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis*. Immunol Rev. **208**: p. 7-18.
146. Lum, L., B.R. Wong, R. Josien, J.D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlondorff, P. Tempst, Y. Choi, and C.P. Blobel, 1999, *Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival*. J Biol Chem. **274**(19): p. 13613-13618.
147. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, 2003, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature. **423**(6937): p. 337-342.
148. Blair, H.C., L.J. Robinson, and M. Zaidi, 2005, *Osteoclast signalling pathways*. Biochem Biophys Res Commun. **328**(3): p. 728-738.
149. Nikolett, M., G. Pál, F. András, and N. György, 2012, *Az osteoclastok aktivitásának humorális és farmakológiai szabályozása*. Immunológiai Szemle. **4**(2): p. 11-18.
150. Takayanagi, H., S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E.F. Wagner, T.W. Mak, T. Kodama, and T. Taniguchi, 2002, *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts*. Dev Cell. **3**(6): p. 889-901.
151. Kyriakides, T.R., M.J. Foster, G.E. Keeney, A. Tsai, C.M. Giachelli, I. Clark-Lewis, B.J. Rollins, and P. Bornstein, 2004, *The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation*. Am J Pathol. **165**(6): p. 2157-2166.
152. Lean, J.M., C. Murphy, K. Fuller, and T.J. Chambers, 2002, *CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCRI are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts*. J Cell Biochem. **87**(4): p. 386-393.

153. Yang, M., G. Mailhot, C.A. MacKay, A. Mason-Savas, J. Aubin, and P.R. Odgren, 2006, *Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1–induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1 $\gamma$ ) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro*. *Blood*. **107**(6): p. 2262-2270.
154. Ishida, N., K. Hayashi, A. Hattori, K. Yogo, T. Kimura, and T. Takeya, 2006, *CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration*. *J Bone Miner Res*. **21**(1): p. 48-57.
155. Gronthos, S. and A.C. Zannettino, 2007, *The role of the chemokine CXCL12 in osteoclastogenesis*. *Trends Endocrinol Metab*. **18**(3): p. 108-113.
156. Miyamoto, T., F. Arai, O. Ohneda, K. Takagi, D.M. Anderson, and T. Suda, 2000, *An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*. *Blood*. **96**(13): p. 4335-4343.
157. Boyce, B.F. and L. Xing, 2007, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. *Arthritis Res Ther*. **9 Suppl 1**: p. S1.
158. Nakashima, T. and H. Takayanagi, 2009, *Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems*. *J Clin Immunol*. **29**(5): p. 555-567.
159. Simonet, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, and W.J. Boyle, 1997, *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. *Cell*. **89**(2): p. 309-319.
160. Gillespie, M.T., 2007, *Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function*. *Arthritis Research & Therapy*. **9**(2): p. 103-103.
161. Lee, S.K. and C.D. Surh, 2005, *Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis*. *Immunol Rev*. **208**: p. 169-180.

162. O'Gradaigh, D. and J.E. Compston, 2004, *T-cell involvement in osteoclast biology: implications for rheumatoid bone erosion*. *Rheumatology*. **43**(2): p. 122-130.
163. Lee, S.-H., T.-S. Kim, Y. Choi, and J. Lorenzo, 2008, *Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system*. *BMB reports*. **41**(7): p. 495-510.
164. Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D.J. Cua, and H. Takayanagi, 2006, *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction*. *J Exp Med*. **203**(12): p. 2673-2682.
165. Gao, Y., F. Grassi, M.R. Ryan, M. Terauchi, K. Page, X. Yang, M.N. Weitzmann, and R. Pacifici, 2007, *IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation*. *J Clin Invest*. **117**(1): p. 122-132.
166. Hong, M.H., H. Williams, C.H. Jin, and J.W. Pike, 2000, *The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine-phosphorylated proteins*. *J Bone Miner Res*. **15**(5): p. 911-918.
167. Horwood, N.J., J. Elliott, T.J. Martin, and M.T. Gillespie, 2001, *IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro*. *J Immunol*. **166**(8): p. 4915-4921.
168. Takayanagi, H., K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, T. Yokochi, H. Oda, K. Tanaka, K. Nakamura, and T. Taniguchi, 2000, *T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma*. *Nature*. **408**(6812): p. 600-605.
169. Amcheslavsky, A. and Z. Bar-Shavit, 2006, *Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides*. *J Cell Physiol*. **207**(1): p. 244-250.
170. Cheng, J., J. Liu, Z. Shi, D. Xu, S. Luo, G.P. Siegal, X. Feng, and S. Wei, 2011, *Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis*. *J Cell Biochem*. **112**(11): p. 3385-3392.

171. Li, H., S. Hong, J. Qian, Y. Zheng, J. Yang, and Q. Yi, 2010, *Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells*. *Blood*. **116**(2): p. 210-217.
172. Crampton, S.P., P.A. Morawski, and S. Bolland, 2014, *Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus*. *Disease Models & Mechanisms*. **7**(9): p. 1033.
173. Song, Y.W. and E.H. Kang, 2010, *Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies*. *QJM: An International Journal of Medicine*. **103**(3): p. 139-146.
174. Steiner, G. and J. Smolen, 2002, *Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance*. *Arthritis Research*. **4**(Suppl 2): p. S1-S5.
175. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, 2010, *Structure and function of immunoglobulins*. *J Allergy Clin Immunol*. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
176. Ingegnoli, F., R. Castelli, and R. Gualtierotti, 2013, *Rheumatoid Factors: Clinical Applications*. *Disease markers*. **35**(6): p. 727-734.
177. Nell, V.P., K.P. Machold, T.A. Stamm, G. Eberl, H. Heinzl, M. Uffmann, J.S. Smolen, and G. Steiner, 2005, *Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*. **64**(12): p. 1731-1736.
178. Pai, S., L. Pai, and R. Birkenfeldt, 1998, *Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis*. *Scand J Rheumatol*. **27**(4): p. 252-256.
179. Waaler, E., 2007, *On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939*. *Apmis*. **115**(5): p. 422-438; discussion 439.
180. Schellekens, G.A., H. Visser, B.A. de Jong, F.H. van den Hoogen, J.M. Hazes, F.C. Breedveld, and W.J. van Venrooij, 2000, *The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide*. *Arthritis Rheum*. **43**(1): p. 155-163.
181. Baka, Z., B. Gyorgy, P. Geher, E.I. Buzas, A. Falus, and G. Nagy, 2012, *Citrullination under physiological and pathological conditions*. *Joint Bone Spine*. **79**(5): p. 431-436.

182. Derksen, V.F.A.M., T.W.J. Huizinga, and D. van der Woude, 2017, *The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis*. *Seminars in Immunopathology*. **39**(4): p. 437-446.
183. Laurent, L., C. Clavel, O. Lemaire, F. Anquetil, M. Cornillet, L. Zabraniecki, L. Nogueira, B. Fournie, G. Serre, and M. Sebbag, 2011, *Fcγ receptor profile of monocytes and macrophages from rheumatoid arthritis patients and their response to immune complexes formed with autoantibodies to citrullinated proteins*. *Ann Rheum Dis*. **70**(6): p. 1052-1059.
184. Trouw, L.A., E.M. Haisma, E.W. Levarht, D. van der Woude, A. Ioan-Facsinay, M.R. Daha, T.W. Huizinga, and R.E. Toes, 2009, *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways*. *Arthritis Rheum*. **60**(7): p. 1923-1931.
185. Pratesi, F., I. Dioni, C. Tommasi, M.C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero, and P. Migliorini, 2014, *Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps*. *Ann Rheum Dis*. **73**(7): p. 1414-1422.
186. Khandpur, R., C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri, A. Gizinski, S. Yalavarthi, J.S. Knight, S. Friday, S. Li, R.M. Patel, V. Subramanian, P. Thompson, P. Chen, D.A. Fox, S. Pennathur, and M.J. Kaplan, 2013, *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis*. *Sci Transl Med*. **5**(178): p. 178ra140.
187. Harre, U., D. Georgess, H. Bang, A. Bozec, R. Axmann, E. Ossipova, P.J. Jakobsson, W. Baum, F. Nimmerjahn, E. Szarka, G. Sarmay, G. Krumbholz, E. Neumann, R. Toes, H.U. Scherer, A.I. Catrina, L. Klareskog, P. Jurdic, and G. Schett, 2012, *Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin*. *J Clin Invest*. **122**(5): p. 1791-1802.
188. Krishnamurthy, A., V. Joshua, A. Haj Hensvold, T. Jin, M. Sun, N. Vivar, A.J. Ytterberg, M. Engstrom, C. Fernandes-Cerqueira, K. Amara, M. Magnusson, G. Wigerblad, J. Kato, J.M. Jimenez-Andrade, K. Tyson, S. Rapecki, K. Lundberg, S.B. Catrina, P.J. Jakobsson, C. Svensson, V. Malmstrom, L. Klareskog, H.



- Wahamaa, and A.I. Catrina, 2016, *Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss*. *Ann Rheum Dis*. **75**(4): p. 721-729.
189. Catrina, A.I., C.I. Svensson, V. Malmström, G. Schett, and L. Klareskog, 2016, *Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis*. *Nature Reviews Rheumatology*. **13**: p. 79.
190. Schett, G., 2017, *The role of ACPAs in at-risk individuals: Early targeting of the bone and joints*. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. **31**(1): p. 53-58.
191. McInnes, I.B. and G. Schett, 2011, *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. *New England Journal of Medicine*. **365**(23): p. 2205-2219.
192. Firestein, G.S., 2003, *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. *Nature*. **423**(6937): p. 356-361.
193. Mc Ardle, A., B. Flatley, S.R. Pennington, and O. FitzGerald, 2015, *Early biomarkers of joint damage in rheumatoid and psoriatic arthritis*. *Arthritis Res Ther*. **17**: p. 141.
194. Okada, Y., D. Wu, G. Trynka, T. Raj, C. Terao, K. Ikari, Y. Kochi, K. Ohmura, A. Suzuki, S. Yoshida, R.R. Graham, A. Manoharan, W. Ortmann, T. Bhangale, J.C. Denny, R.J. Carroll, A.E. Eyler, J.D. Greenberg, J.M. Kremer, D.A. Pappas, L. Jiang, J. Yin, L. Ye, D.F. Su, J. Yang, G. Xie, E. Keystone, H.J. Westra, T. Esko, A. Metspalu, X. Zhou, N. Gupta, D. Mirel, E.A. Stahl, D. Diogo, J. Cui, K. Liao, M.H. Guo, K. Myouzen, T. Kawaguchi, M.J. Coenen, P.L. van Riel, M.A. van de Laar, H.J. Guchelaar, T.W. Huizinga, P. Dieude, X. Mariette, S.L. Bridges, Jr., A. Zernakova, R.E. Toes, P.P. Tak, C. Miceli-Richard, S.Y. Bang, H.S. Lee, J. Martin, M.A. Gonzalez-Gay, L. Rodriguez-Rodriguez, S. Rantapaa-Dahlqvist, L. Arlestig, H.K. Choi, Y. Kamatani, P. Galan, M. Lathrop, S. Eyre, J. Bowes, A. Barton, N. de Vries, L.W. Moreland, L.A. Criswell, E.W. Karlson, A. Taniguchi, R. Yamada, M. Kubo, J.S. Liu, S.C. Bae, J. Worthington, L. Padyukov, L. Klareskog, P.K. Gregersen, S. Raychaudhuri, B.E. Stranger, P.L. De Jager, L. Franke, P.M. Visscher, M.A. Brown, H. Yamanaka, T. Mimori, A. Takahashi, H. Xu, T.W. Behrens, K.A. Siminovitch, S. Momohara, F. Matsuda,

- K. Yamamoto, and R.M. Plenge, 2014, *Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery*. *Nature*. **506**(7488): p. 376-381.
195. Kurkó, J., T. Besenyei, J. Laki, T.T. Glant, K. Mikecz, and Z. Szekanecz, 2013, *Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review*. *Clinical reviews in allergy & immunology*. **45**(2): p. 170-179.
196. Szodoray, P., Z. Szabó, A. Kapitány, Á. Gyetvai, G. Lakos, S. Szántó, G. Szücs, and Z. Szekanecz, 2010, *Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis*. *Autoimmunity Reviews*. **9**(3): p. 140-143.
197. Kerlan-Candon, S., B. Combe, R. Vincent, J. Clot, V. Pinet, and J.F. Eliaou, 2001, *HLA-DRB1 gene transcripts in rheumatoid arthritis*. *Clinical and experimental immunology*. **124**(1): p. 142-149.
198. Majithia, V. and S.A. Geraci, 2007, *Rheumatoid arthritis: diagnosis and management*. *Am J Med*. **120**(11): p. 936-939.
199. McInnes, I.B. and G. Schett, 2007, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Immunol*. **7**(6): p. 429-442.
200. Aletaha, D., T. Neogi, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O. Bingham, N.S. Birnbaum, G.R. Burmester, V.P. Bykerk, M.D. Cohen, B. Combe, K.H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J.M.W. Hazes, K. Hobbs, T.W.J. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T.K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H.A. Ménard, L.W. Moreland, R.L. Naden, T. Pincus, J.S. Smolen, E. Stanislawski-Biernat, D. Symmons, P.P. Tak, K.S. Upchurch, J. Vencovský, F. Wolfe, and G. Hawker, 2010, *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **69**(9): p. 1580.
201. Peper, S.M., R. Lew, T. Mikuls, M. Brophy, D. Rybin, H. Wu, and J. O'Dell, 2017, *Rheumatoid Arthritis Treatment After Methotrexate: The Durability of Triple Therapy Versus Etanercept*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. **69**(10): p. 1467-1472.
202. Kavanaugh, A., E. Keystone, J.D. Greenberg, G.W. Reed, J.M. Griffith, A.W. Friedman, K.C. Saunders, and A. Ganguli, 2017, *Benefit of biologics initiation*

- in moderate versus severe rheumatoid arthritis: evidence from a United States registry.* Rheumatology (Oxford). **56**(7): p. 1095-1101.
203. Szekanecz, Z., B. Mesko, S. Poliska, A. Vancsa, S. Szamosi, E. Vegh, E. Simkovics, J. Laki, J. Kurko, T. Besenyei, K. Mikecz, T.T. Glant, and L. Nagy, 2013, *Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology.* Immunol Res. **56**(2-3): p. 325-333.
204. Smolen, J.S., D. van der Heijde, K.P. Machold, D. Aletaha, and R. Landewe, 2014, *Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs.* Ann Rheum Dis. **73**(1): p. 3-5.
205. Nandi, P., G.H. Kingsley, and D.L. Scott, 2008, *Disease-modifying antirheumatic drugs other than methotrexate in rheumatoid arthritis and seronegative arthritis.* Curr Opin Rheumatol. **20**(3): p. 251-256.
206. Gladman, D., C. Antoni, P. Mease, D. Clegg, and P. Nash, 2005, *Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome.* Annals of the Rheumatic Diseases. **64**(Suppl 2): p. ii14-ii17.
207. Zlatkovic-Svenda, M., D. Kerimovic-Morina, and R.M. Stojanovic, 2013, *Psoriatic arthritis classification criteria: Moll and Wright, ESSG and CASPAR - a comparative study.* Acta Reumatol Port. **38**(3): p. 172-178.
208. Taylor, W., D. Gladman, P. Helliwell, A. Marchesoni, P. Mease, and H. Mielants, 2006, *Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study.* Arthritis Rheum. **54**(8): p. 2665-2673.
209. Sakkas, L.I. and D.P. Bogdanos, 2017, *Are psoriasis and psoriatic arthritis the same disease? The IL-23/IL-17 axis data.* Autoimmunity Reviews. **16**(1): p. 10-15.
210. Feld, J., V. Chandran, N. Haroon, R. Inman, and D. Gladman, 2018, *Axial disease in psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis: a critical comparison.* Nature Reviews Rheumatology. **14**(6): p. 363-371.
211. Peluso, R., S. Iervolino, M. Vitiello, V. Bruner, G. Lupoli, and M.N.D. Di Minno, 2015, *Extra-articular manifestations in psoriatic arthritis patients.* Clinical Rheumatology. **34**(4): p. 745-753.

212. Gossec, L., J.S. Smolen, S. Ramiro, M. de Wit, M. Cutolo, M. Dougados, P. Emery, R. Landewe, S. Oliver, D. Aletaha, N. Betteridge, J. Braun, G. Burmester, J.D. Canete, N. Damjanov, O. FitzGerald, E. Haglund, P. Helliwell, T.K. Kvien, R. Lories, T. Luger, M. Maccarone, H. Marzo-Ortega, D. McGonagle, I.B. McInnes, I. Olivieri, K. Pavelka, G. Schett, J. Sieper, F. van den Bosch, D.J. Veale, J. Wollenhaupt, A. Zink, and D. van der Heijde, 2016, *European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update*. *Ann Rheum Dis*. **75**(3): p. 499-510.
213. D'Angelo, S., G. Tramontano, M. Gilio, P. Leccese, and I. Olivieri, 2017, *Review of the treatment of psoriatic arthritis with biological agents: choice of drug for initial therapy and switch therapy for non-responders*. *Open Access Rheumatol*. **9**: p. 21-28.
214. Melis, L., B. Vandooren, E. Kruithof, P. Jacques, M. De Vos, H. Mielants, G. Verbruggen, F. De Keyser, and D. Elewaut, 2010, *Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis*. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **69**(3): p. 618.
215. van Baarsen, L.G., M.C. Lebre, D. van der Coelen, S. Aarrass, M.W. Tang, T.H. Ramwadhoebe, D.M. Gerlag, and P.P. Tak, 2014, *Heterogeneous expression pattern of interleukin 17A (IL-17A), IL-17F and their receptors in synovium of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis: possible explanation for nonresponse to anti-IL-17 therapy?* *Arthritis Res Ther*. **16**(4): p. 426.
216. Kang, E.J. and A. Kavanaugh, 2015, *Psoriatic arthritis: latest treatments and their place in therapy*. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. **6**(4): p. 194-203.
217. Mc Ardle, A., B. Flatley, S.R. Pennington, and O. FitzGerald, 2015, *Early biomarkers of joint damage in rheumatoid and psoriatic arthritis*. *Arthritis Research & Therapy*. **17**(1): p. 141.
218. MacLellan, L.M., J. Montgomery, F. Sugiyama, S.M. Kitson, K. Thummler, G.J. Silverman, S.A. Beers, R.J. Nibbs, I.B. McInnes, and C.S. Goodyear, 2011, *Co-opting endogenous immunoglobulin for the regulation of inflammation and osteoclastogenesis in humans and mice*. *Arthritis Rheum*. **63**(12): p. 3897-3907.

219. Kárpáti, E., *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Tobacco Smoke Treated Medium with Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, in *Institute of Chemistry*. 2014, Eötvös Loránd University.
220. Team, R.C., *R: A language and environment for statistical computing [Internet]*. Vienna, Austria; 2014. 2017.
221. Niedbala, W., A.-G. Besnard, H.R. Jiang, J.C. Alves-Filho, S.Y. Fukada, D. Nascimento, A. Mitani, P. Pushparaj, M.H. Alqahtani, and F.Y. Liew, 2013, *Nitric Oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). **191**(1): p. 164-170.
222. Baricza, E., P. Királyhidi, N. Marton, and O.T. Kovács, 2016, *Régi ismerős új szerepben*. *Élet és Tudomány*. **27**: p. 858-850.
223. O'Donnell, E.F., K.S. Saili, D.C. Koch, P.R. Koppurapu, D. Farrer, W.H. Bisson, L.K. Mathew, S. Sengupta, N.I. Kerkvliet, R.L. Tanguay, and S.K. Kolluri, 2010, *The anti-inflammatory drug leflunomide is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor*. *PLoS One*. **5**(10).
224. Marton, N., O.T. Kovács, E. Baricza, Á. Kittel, D. Györi, A. Mócsai, F.M.P. Meier, C.S. Goodyear, I.B. McInnes, E.I. Buzás, and G. Nagy, 2017, *Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **74**(19): p. 3599-3611.
225. Baricza, E., N. Marton, P. Királyhidi, O.T. Kovács, I. Kovácsné Székely, E. Lajkó, L. Köhidai, B. Rojkovich, B. Érsek, E.I. Buzás, and G. Nagy, 2018, *Distinct In Vitro T-Helper 17 Differentiation Capacity of Peripheral Naive T Cells in Rheumatoid and Psoriatic Arthritis*. *Frontiers in Immunology*. **9**: p. 606.
226. Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud, and M. Ayyoub, 2010, *Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(45): p. 19402-19407.
227. Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, and F. Annunziato, 2009, *Properties and origin of human Th17 cells*. *Mol Immunol*. **47**(1): p. 3-7.

228. Sallusto, F., C.E. Zielinski, and A. Lanzavecchia, 2012, *Human Th17 subsets*. Eur J Immunol. **42**(9): p. 2215-2220.
229. Purvis, H.A., J.N. Stoop, J. Mann, S. Woods, A.E. Kozijn, S. Hambleton, J.H. Robinson, J.D. Isaacs, A.E. Anderson, and C.M. Hilkens, 2010, *Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses*. Blood. **116**(23): p. 4829-4837.
230. Klein Geltink, R.I., D. O'Sullivan, M. Corrado, A. Bremser, M.D. Buck, J.M. Buescher, E. Firat, X. Zhu, G. Niedermann, G. Caputa, B. Kelly, U. Warthorst, A. Rensing-Ehl, R.L. Kyle, L. Vandersarren, J.D. Curtis, A.E. Patterson, S. Lawless, K. Grzes, J. Qiu, D.E. Sanin, O. Kretz, T.B. Huber, S. Janssens, B.N. Lambrecht, A.S. Rambold, E.J. Pearce, and E.L. Pearce, 2017, *Mitochondrial Priming by CD28*. Cell. **171**(2): p. 385-397.e311.
231. Esensten, J.H., Y.A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, and J.A. Bluestone, 2016, *CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy*. Immunity. **44**(5): p. 973-988.
232. Bouguermouh, S., G. Fortin, N. Baba, M. Rubio, and M. Sarfati, 2009, *CD28 co-stimulation down regulates Th17 development*. PLoS One. **4**(3): p. e5087.
233. Revu, S., J. Wu, M. Henkel, N. Rittenhouse, A. Menk, G.M. Delgoffe, A.C. Poholek, and M.J. McGeachy, 2018, *IL-23 and IL-1 $\beta$  Drive Human Th17 Cell Differentiation and Metabolic Reprogramming in Absence of CD28 Costimulation*. Cell reports. **22**(10): p. 2642-2653.
234. Nelson, M., L. Huff, C. Rogers, S. Kundimi, and C. Paulos, 2012, *Defining the role of ICOS and CD28 costimulation in T<sub>H</sub>17 cell activation, differentiation and tumor immunity (46.29)*. The Journal of Immunology. **188**(1 Supplement): p. 46.29.
235. Ayyoub, M., C. Raffin, and D. Valmori, 2012, *Generation of Th17 from human naive CD4<sup>+</sup> T cells preferentially occurs from FOXP3<sup>+</sup> Tregs upon costimulation via CD28 or CD5*. Blood. **119**(20): p. 4810.
236. Érsek, B., V. Molnár, A. Balogh, J. Matkó, A.P. Cope, E.I. Buzás, A. Falus, and G. Nagy, 2012, *CD3 $\zeta$ -Chain Expression of Human T Lymphocytes Is Regulated by TNF via Src-like Adaptor Protein-Dependent Proteasomal Degradation*. The Journal of Immunology. **189**(4): p. 1602.

237. Berg, L., J. Ronnelid, L. Klareskog, and A. Bucht, 2000, *Down-regulation of the T cell receptor CD3 zeta chain in rheumatoid arthritis (RA) and its influence on T cell responsiveness*. Clin Exp Immunol. **120**(1): p. 174-182.
238. Zhang, Z., C.L. Gorman, A.C. Vermi, C. Monaco, A. Foey, S. Owen, P. Amjadi, A. Vallance, C. McClinton, F. Marelli-Berg, P. Isomaki, A. Russell, F. Dazzi, T.J. Vyse, F.M. Brennan, and A.P. Cope, 2007, *TCRzetadim lymphocytes define populations of circulating effector cells that migrate to inflamed tissues*. Blood. **109**(10): p. 4328-4335.
239. Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, and S. Romagnani, 2012, *Defining the human T helper 17 cell phenotype*. Trends Immunol. **33**(10): p. 505-512.
240. Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, M.C. Rossi, V. Querci, A. Mazzoni, R. Cimaz, R. De Palma, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, L. Cosmi, and F. Annunziato, 2012, *Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells*. Eur J Immunol. **42**(12): p. 3180-3188.
241. Mazzoni, A., V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, M.C. Rossi, V. Querci, R. De Palma, H.D. Chang, A. Thiel, R. Cimaz, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, A. Radbruch, S. Romagnani, J. Dong, and F. Annunziato, 2015, *Demethylation of the RORC2 and IL17A in human CD4+ T lymphocytes defines Th17 origin of nonclassic Th1 cells*. J Immunol. **194**(7): p. 3116-3126.
242. Brembilla, N.C., J.M. Ramirez, R. Chicheportiche, O. Sorg, J.H. Saurat, and C. Chizzolini, 2011, *In vivo dioxin favors interleukin-22 production by human CD4+ T cells in an aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent manner*. PLoS One. **6**(4): p. e18741.
243. Ple, C., Y. Fan, S. Ait Yahia, H. Vorng, L. Everaere, C. Chenivesse, J. Balsamelli, I. Azzaoui, P. de Nadai, B. Wallaert, G. Lazenec, and A. Tsicopoulos, 2015, *Polycyclic aromatic hydrocarbons reciprocally regulate IL-22 and IL-17 cytokines in peripheral blood mononuclear cells from both healthy and asthmatic subjects*. PLoS One. **10**(4): p. e0122372.
244. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, 2009, *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol. **10**(8): p. 857-863.

245. Chuang, H.-C., C.-Y. Tsai, C.-H. Hsueh, and T.-H. Tan, 2018, *GLK-IKK $\beta$  signaling induces dimerization and translocation of the AhR-ROR $\gamma$ t complex in IL-17A induction and autoimmune disease*. *Science Advances*. **4**(9).
246. Esser, C. and A. Rannug, 2015, *The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology*. *Pharmacological Reviews*. **67**(2): p. 259.
247. den Dunnen, J., L.T.C. Vogelpoel, T. Wypych, F.J.M. Muller, L. de Boer, T.W. Kuijpers, S.A.J. Zaat, M.L. Kapsenberg, and E.C. de Jong, 2012, *IgG opsonization of bacteria promotes Th17 responses via synergy between TLRs and Fc $\gamma$ RIIIa in human dendritic cells*. *Blood*. **120**(1): p. 112.
248. Frodermann, V., T.A. Chau, S. Sayedyahosseini, J.M. Toth, D.E. Heinrichs, and J. Madrenas, 2011, *A Modulatory Interleukin-10 Response to Staphylococcal Peptidoglycan Prevents Th1/Th17 Adaptive Immunity to Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*. **204**(2): p. 253-262.
249. Negishi-Koga, T., H.-J. Gober, E. Sumiya, N. Komatsu, K. Okamoto, S. Sawa, A. Suematsu, T. Suda, K. Sato, T. Takai, and H. Takayanagi, 2015, *Immune complexes regulate bone metabolism through Fc $\gamma$  signalling*. *Nature Communications*. **6**: p. 6637.
250. Josse, J., F. Velard, and S.C. Gangloff, 2015, *Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **5**(85).
251. Silverman, G.J., C.S. Goodyear, and D.L. Siegel, 2005, *On the mechanism of staphylococcal protein A immunomodulation*. *Transfusion*. **45**(2): p. 274-280.
252. Ye, Z.-J., Q. Zhou, Y.-Y. Gu, S.-M. Qin, W.-L. Ma, J.-B. Xin, X.-N. Tao, and H.-Z. Shi, 2010, *Generation and Differentiation of IL-17-Producing CD4<sup>+</sup> T Cells in Malignant Pleural Effusion*. *The Journal of Immunology*. **185**(10): p. 6348.
253. Ganjalikhani Hakemi, M., K. Ghaedi, A. Andalib, M. Hosseini, and A. Rezaei, 2011, *Optimization of human Th17 cell differentiation in vitro: evaluating different polarizing factors*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. **47**(8): p. 581-592.
254. Bai, A., A. Moss, E. Kokkotou, A. Usheva, X. Sun, A. Cheifetz, Y. Zheng, M.S. Longhi, W. Gao, Y. Wu, and S.C. Robson, 2014, *CD39 and CD161 Modulate*



- Th17 Responses in Crohn's Disease*. The Journal of Immunology. **193**(7): p. 3366.
255. Cosmi, L., R. Cimaz, L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, F. Borriello, F. Frosali, V. Querci, G. Simonini, G. Barra, M.P. Piccinni, F. Liotta, R. De Palma, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, 2011, *Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum. **63**(8): p. 2504-2515.
256. Miyahara, Y., K. Odunsi, W. Chen, G. Peng, J. Matsuzaki, and R.-F. Wang, 2008, *Generation and regulation of human CD4<sup>+</sup>IL-17-producing T cells in ovarian cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **105**(40): p. 15505.
257. Pourgholaminejad, A., N. Aghdami, H. Baharvand, and S.M. Moazzeni, 2016, *Is TGFβ as an anti-inflammatory cytokine required for differentiation of inflammatory TH17 cells?* Journal of Immunotoxicology. **13**(6): p. 775-783.
258. Leipe, J., M. Grunke, C. Dechant, C. Reindl, U. Kerzendorf, H. Schulze-Koops, and A. Skapenko, 2010, *Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis*. Arthritis Rheum. **62**(10): p. 2876-2885.
259. Muntyanu, A., F. Abji, K. Liang, R.A. Pollock, V. Chandran, and D.D. Gladman, 2016, *Differential gene and protein expression of chemokines and cytokines in synovial fluid of patients with arthritis*. Arthritis Res Ther. **18**(1): p. 296.
260. Yago, T., Y. Nanke, M. Kawamoto, T. Kobashigawa, H. Yamanaka, and S. Kotake, 2017, *IL-23 and Th17 Disease in Inflammatory Arthritis*. Journal of Clinical Medicine. **6**(9): p. 81.
261. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, 2009, *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nature Immunology. **10**: p. 857.
262. Fujita, H., 2013, *The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases*. Journal of Dermatological Science. **72**(1): p. 3-8.
263. Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S.R. Durham, C.B. Schmidt-Weber, and A. Cavani, 2009, *Th22 cells represent a distinct human T*

- cell subset involved in epidermal immunity and remodeling.* The Journal of Clinical Investigation. **119**(12): p. 3573-3585.
264. Paulissen, S.M.J., J.P. van Hamburg, W. Dankers, and E. Lubberts, 2015, *The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis.* Cytokine. **74**(1): p. 43-53.
265. Azizi, G., A. Simhag, N.M. El Rouby, and A. Mirshafiey, 2015, *Th22 Cells Contribution in Immunopathogenesis of Rheumatic Diseases.* Iran J Allergy Asthma Immunol. **14**(3): p. 246-254.
266. Eyerich, K. and S. Eyerich, 2015, *Th22 cells in allergic disease.* Allergo Journal International. **24**(1): p. 1-7.
267. Benham, H., P. Norris, J. Goodall, M.D. Wechalekar, O. FitzGerald, A. Szentpetery, M. Smith, R. Thomas, and H. Gaston, 2013, *Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis.* Arthritis Res Ther. **15**(5): p. R136.
268. Zhang, L., Y.-g. Li, Y.-h. Li, L. Qi, X.-g. Liu, C.-z. Yuan, N.-w. Hu, D.-x. Ma, Z.-f. Li, Q. Yang, W. Li, and J.-m. Li, 2012, *Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis.* PLoS ONE. **7**(4): p. e31000.
269. van Hamburg, J.P., O.B.J. Corneth, S.M.J. Paulissen, N. Davelaar, P.S. Asmawidjaja, and E. Lubberts, 2012, *Th17 but not Th22 cells display pathological behaviour in arthritis.* Annals of the Rheumatic Diseases. **71**(Suppl 1): p. A89.
270. Zhong, W., L. Zhao, T. Liu, and Z. Jiang, 2017, *IL-22-producing CD4+T cells in the treatment response of rheumatoid arthritis to combination therapy with methotrexate and leflunomide.* Scientific Reports. **7**: p. 41143.
271. Elkayam, O., I. Yaron, I. Shirazi, R. Judovitch, D. Caspi, and M. Yaron, 2003, *Active leflunomide metabolite inhibits interleukin 1 $\beta$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ , nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures.* Annals of the Rheumatic Diseases. **62**(5): p. 440.
272. Yamada, M., H. Yagita, H. Inoue, T. Takanashi, H. Matsuda, E. Munechika, Y. Kanamaru, I. Shirato, Y. Tomino, K. Matushima, K. Okumura, and H. Hashimoto, 2002, *Selective accumulation of CCR4+ T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis.* Arthritis Rheum. **46**(3): p. 735-740.

273. Song, K., R.L. Rabin, B.J. Hill, S.C. De Rosa, S.P. Perfetto, H.H. Zhang, J.F. Foley, J.S. Reiner, J. Liu, J.J. Mattapallil, D.C. Douek, M. Roederer, and J.M. Farber, 2005, *Characterization of subsets of CD4<sup>+</sup> memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **102**(22): p. 7916.
274. Kim, C.H., L. Rott, E.J. Kunkel, M.C. Genovese, D.P. Andrew, L. Wu, and E.C. Butcher, 2001, *Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo*. Journal of Clinical Investigation. **108**(9): p. 1331-1339.
275. James, E.A., M. Rieck, J. Pieper, J.A. Gebe, B.B. Yue, M. Tatum, M. Peda, C. Sandin, L. Klareskog, V. Malmstrom, and J.H. Buckner, 2014, *Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy*. Arthritis Rheumatol. **66**(7): p. 1712-1722.
276. Ciccia, F., G. Guggino, A. Ferrante, S. Raimondo, R. Bignone, V. Rodolico, S. Peralta, M. Van Tok, A. Cannizzaro, C. Schinocca, P. Ruscitti, P. Cipriani, R. Giacomelli, R. Alessandro, F. Dieli, A. Rizzo, D. Baeten, and G. Triolo, 2016, *Interleukin-9 Overexpression and Th9 Polarization Characterize the Inflamed Gut, the Synovial Tissue, and the Peripheral Blood of Patients With Psoriatic Arthritis*. Arthritis Rheumatol. **68**(8): p. 1922-1931.
277. Zhang, L., J.M. Li, X.G. Liu, D.X. Ma, N.W. Hu, Y.G. Li, W. Li, Y. Hu, S. Yu, X. Qu, M.X. Yang, A.L. Feng, and G.H. Wang, 2011, *Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis*. J Clin Immunol. **31**(4): p. 606-614.

## 10. SAJÁT PUBLILÁCIÓK JEGYZÉKE

### 10.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények listája

- **Baricza E**, Marton N, Királyhidi P, Kovács O.T, Kovácsné Székely I, Lajkó E, Kőhidai L, Rojkovich B, Érsek B, Buzás E, Nagy G, (2018) *Distinct in vitro Th17 differentiation capacity of peripheral naive T cells in rheumatoid and psoriatic arthritis*. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 9:(Apr) Paper 606. 13 p. (2018)

**IF: 5,511**

- **Baricza E**, Tamási V, Marton N, Buzás E.I, Nagy G (2016) *The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells*. CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 73:(1) pp. 95-117. (2016)

A folyóirat IF értéke a megjelenés évében **5,788**, amely a közlemény típusa miatt nem kerül feltüntetésre az összesített impakt faktor értékében

- Marton N, Kovács OT, **Baricza E**, Kittel Á, Györi D, Mócsai A, Meier FMP, Goodyear CS, McInnes IB, Buzás EI, Nagy G. (2017) *Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies*. Cell Mol Life Sci, 74:3599-3611.

**IF: 6,721**

Értekezéshez felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: **12,232**

Ebből elsőszerzős impakt faktor: **5,511**

### 10.2. Az értekezéshez fel nem használt közlemények listája

- Marton N, **Baricza E**, Érsek B, Buzás EI, Nagy G. (2015) *The Emerging and Diverse Roles of Src-Like Adaptor Proteins in Health and Disease*. Mediators Inflamm, 2015: 952536.

A folyóirat IF értéke a megjelenés évében **3,418**, amely a közlemény típusa miatt nem kerül feltüntetésre az összesített impakt faktor értékében

- Csöngői V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyar L, Polgár N, Bene J, Sarlós P, Lakner L, **Baricza E**, Szabó M, Rappai G, Melegh B (2011) *Interaction between CTLA4 gene and IBD5 locus in Hungarian Crohn's disease patients*.

INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE 26:(9) pp. 1119-1125.

**IF: 2,385**

- Mohás M, Kisfali P, **Baricza E**, Mérei A, Maász A, Cseh J, Mikolás E, Szijártó I A, Melegh B, Wittmann I, (2010) *A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA1c Levels and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus.* EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118: (3) pp. 209-212.

**IF: 1,826**

A megjelölt folyóiratok összesített impakt faktora: **16,443**

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni, témavezetőmnek, Dr. Nagy György professzor úrnak, hogy irányomban mindig bizalmat tanúsított és lehetővé tette, hogy egy izgalmas és újszerű témán dolgozhassak. Köszönöm, hogy a munkámhoz és fejlődésemhez szükséges lehetőségeket megteremtette, illetve tanácsaival és meglátásaival hozzájárult a disszertációm elkészüléséhez.

Szeretném megköszönni Dr. Buzás Edit professzor asszonynak és Dr. Falus András professzor úrnak, hogy a Genetikai- Sejt és Immunbiológiai Intézetben kutathattam, ahol a kezdetekkor és azóta is szeretettel támogatnak. Dr. Buzás Editnek külön köszönöm, hogy lehetővé tette, hogy az intézetben folytathassam a kutatásaimat.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Kísérletes Reumatológiai Munkacsoport korábbi és jelenlegi munkatársainak, különösen, Dr. Molnár-Érsek Barbarának az immunológiai módszerek elsajátításában nyújtott segítségét és Dr. Marton Nikolettnek a közös munka lehetőségét. Köszönöm Királyhidi Pannának, hogy tapasztalataimat átadhattam számára. Hálámat szeretném kifejezni a Genetikai- Sejt és Immunbiológiai Intézet valamennyi korábbi és jelenlegi munkatársának, különösen Dr. Baka Zsuzsannának, Dr. György Bencének és Orbán Andreának, hogy munkám kezdetén segítettek elsajátítani az immunológiai módszereket és a sejtenyésztést, Dr. Kőhidai Lászlónak és Dr. Lajkó Eszternek hogy méréseim egy részének elvégzéséhez segítséget és lehetőséget biztosítottak és Dr. Tóth Sárának, hogy a disszertációm tartalmi és formai ellenőrzését elvállalta.

Hálával tartozom a Budai Irgalmasrendi Kórház Rheumatológiai osztályain dolgozó orvosoknak, nővéreknek és aszisztenseknek, különösen Dr. Rojkovich Bernadette osztályvezető főorvosasszonynak, valamint Kosán Ágnes, Kósáné Csontos Erzsébet és Bán Zoltánné nővéreknek és aszisztenseknek a betegminták begyűjtésében nyújtott készséges segítségükért. Köszönöm továbbá Dr. Nagy Eszter és az Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet Központi Laboratórium dolgozóinak közreműködését az egészséges donorminták gyűjtésében.

Szeretném megköszönni a munkámban való segítségét az ELTE Immunológiai Tanszék korábbi és jelenlegi dolgozóinak, külön köszönetet szeretnék mondani a mikroszkópos felvételek elkészítésében való támogatásért Dr. Matkó János professzor úrnak, Dr.

Balogh Andreának és Dr. Osteikoetxea-Molnár Anikónak, az áramlási citometriás mérésekben nyújtott segítségéért pedig Szikora Bencének. Hálásan köszönöm Sármay Gabriella professzor asszony és munkatársainak támogatását a dohányfüstös kísérletek kivitelezésében.

Számomra rendkívül tanulságos volt, hogy lehetőségem nyílt megismerkedni a többváltozós statisztikai módszertannal, melyet ezúton is hálásan köszönök Dr. Kovács Józsefnek, Kovácsné Dr. Székely Ilonának és Kovács Soltnak.

Köszönöm az ELTE Elválasztástechnikai Kutató és Oktató laboratórium korábbi és jelenlegi munkatársainak, különösen Dr. Eke Zsuzsannának és Kárpáti Eszternek a közös munka lehetőségét és hogy ötleteikkel, meglátásikkal munkám kezdetén támogattak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a szeretetét és megértését, amellyel a mindennapokban támogattak és támogatnak a mai napig, különösen férjemnek, Joó Nobertnek, hogy mindig megértő volt a munkaidőm elhúzódásakor, húgomnak, Dr. Baricza Ágnesnek, hogy sorstáramként mindvégig bátorított. Külön köszönöm édesapámnak és édesanyának, hogy lehetővé tették, hogy tanulhassak és eljuthassak idáig. Disszertációm elkészítésével édesanyám emléke előtt szeretnék tisztelegni.