

# **Patogenetikai tényezők vizsgálata gyulladáso- s ízületi betegségekben**

Doktori tézisek

**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.

## 1. Irodalmi háttér

A Th17-sejtek és osteoclastok fontos szerepet játszanak a rheumatoid arthritis (RA) és az arthritis psoriatica (AP) patogenezisében. A Th17-sejtek főképpen IL-17A termelő sejtpopuláció, amelyre humán sejtekben a *RORC* transzkripciós faktor expresszió jellemző. A Th17-sejtek az extracelluláris patogének elleni immunvédekezésben, és egyes autoimmun betegségek kialakulásában játszanak szerepet. Krónikus autoimmun gyulladás során a Th17-sejtek differenciálódása fokozódik és funkciójuk megváltozhat, amely számos egyéb sejtre lehet hatással az ízületekben (pl. synoviocyták és osteoclastok) és a bőrben (keratinocyták). Az osteoclastok mieloid eredetű, monocytákból differenciálódó csontbontásra specializálódott sejtek, amelyek az gyulladás indukálta ízületi csontdestrukcióért felelősek.

A dohányzás bizonyítottan erős környezeti hajlamosító tényező RA-ban, amely az aromás szénhidrogén receptoron keresztül szabályozhatja a T-sejtek differenciálódását és funkcióját.

Az RA patomechanizmusában emellett fontos szerepet játszanak az immunkomplexek, amelyek szintén befolyásolhatják mind a csontfalósejtek, mind pedig a T-sejtek érést. A Th17-sejtek és osteoclastok megváltozott illetve fokozott funkciója hozzájárul az RA és az AP patomechanizmusához.

## 2. Célkitűzések

- 2.1. A humán *in vitro* Th17-differenciálódás vizsgálata egészséges donorok mintáiban.
- 2.2. A dohányfüst komponenseinek és az immunkomplexek hatásának vizsgálata az *in vitro* Th17-sejt és az osteoclast differenciálódására.
- 2.3. Az *in vitro* Th17-differenciálódás vizsgálata egészségesekben, RA-s és AP-s betegekben.

## 3. Módszerek

**Donorok:** Kísérleteink során egészséges donor (n=12) véradókat, RA-s (n=12) és AP-s betegeket (n=12) vizsgáltunk. Az RA-s betegeket a 2010-es ACR/EULAR kritériumrendszer alapján, az AP-s betegeket a CASPAR

klasszifikáció alapján diagnosztizálták a Budai Irgalmasrendi Kórházban.

### **In vitro sejtenyésztés:**

*Th17 differenciáltatás:* a vérmintákból mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk ficoll (Sigma, Darmstadt, Németország) grádiens centrifugálással. A naiv CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> limfocitákat kétlépes mágneses szeparációval (MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) különítettük el. A sejteket 10% borjúsavóval (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok), 1% L-glutaminnal és 1% Penicillin-Streptomycinnel kiegészített RPMI (mindhárom Sigma) tápfolyadékban 10<sup>6</sup>/ml koncentrációban tenyésztettük. A naiv T-sejteket anti-CD3 (1µg/ml; Bio-Techne Ltd., R&D systems, Abingdon, Egyesült Királyság), anti-CD28 (1µg/ml; BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA) és egy ezeket keresztköti kecske anti-humán IgG F(ab)2 fragmens antitest (1µg/ml; Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, US) felhasználásával aktiváltuk. A differenciálódást rekombináns TGFβ (2,5ng/ml) IL-6 (25ng/ml), IL-1β (10ng/ml) és IL-23 (10ng/ml) citokin

(mind ImmunoTools GmbH, Friesoythe; Németország) és anti-IL-4 neutralizáló antitest (10 $\mu$ g/ml, BioLegend) kezelésekkel indukáltuk. A sejteket 10 napig differenciáltattuk; a sejtszuspenziókból a 0., az 5. és 10. napon vettünk mintát.

*Oszteoklaszt differenciáltatás:* PBMC sejtszuspenzióból mágneses szeparálással (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) pozitívan szelektáltuk a CD14<sup>+</sup> monocytákat. A sejteket 10% FBS (Gibco) valamint 1-1% L-glutaminnal és Penicillin-Streptomycinnel kiegészített minimal essential medium alpha ( $\alpha$ -MEM; mindhárom Sigma) tápban vettük fel. A sejteket humán rekombináns makrofág kolóniastimuláló faktorról (M-CSF), majd 50ng/ml humán rekombináns aktivált B-sejt  $\kappa$  könnyűlánc nukleáris faktor enhancerrel (RANKL; mindkettő PeproTech, London, Egyesült Királyság) kezeltük.

A Th17 és az osteoclast differenciálódás során a sejteket humán IgG (Jackson Immunoresearch) és rekombináns Staphylococcus Protein A-ből (rSPA; Repligen, Waltham, MA, Egyesült Államok) előállított immunkomplexekkel kezeltük.

**Dohányfüsttel kezelt RPMI médium előállítása:** Steril, FBS és antibiotikum/antimikotikum mentes RPMI médiumot cigaretta füsttel kezeltünk. Ezt követően az oldatot 25x-ére hígítottuk, majd 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) és 1-1% antibiotikum/antimikotikummal (Sigma, Darmstadt, Németország) egészítettük ki a sejtek kezeléséhez.

**Viabilitás mérés:** Az élő sejszámot tripánkék exklúziós módszerrel és impedancia mérésen alapuló sejszámláló automatával (CASY-TT, Roche Innovatis, Penzberg, Németország) határoztuk meg.

### **Génexpressziós vizsgálatok:**

*Th17 differenciáltatás:* a sejtekből totál RNS-st izoláltunk a NucleoSpin RNA/Protein kittel (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, Germany), majd vizsgálandó génenként 25ng RNS-st írtunk át cDNS-sé reverz transzkripció PCR módszerrel a SensiFAST cDNS Synthesis Kit (BioLine Reagents Ltd, London, Egyesült Királyság) felhasználásával. A valós idejű kvantitatív PCR reakciót SensiFast Hi-Rox PCR

master mix (BioLine) és primerek (*HPRT-1*, *RORC*, *TBX21* és *AHR*, mindegyik Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) felhasználásával végeztük el ABI Prism 7900ht típusú PCR készülékkel. A kapott eredményeket a komparatív ( $\Delta\Delta C_t$ ) módszerrel értékeltük ki, a *HPRT-1* háztartási gén expressziójára vonatkoztatva.

*Osteoclast differenciáltatás:* a sejtekből RNeasy Micro Kit (Quiagen, Venlo, Hollandia) segítségével totál RNS-t izoláltunk. A SensiFAST cDNS Synthesis Kit (BioLine) felhasználásával 200 ng RNS-st írtunk át cDNS-sé. Az RT qPCR reakciót Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied BioSystems, Thermo Scientific) és specifikus primerek (*CALCR*, *C-FOS*, *CTSK*, *C-FMS*, *DC-STAMP*, *NFATc1*, *OSCAR*, *RANK*, *TRAP*, *SLAP-1*, *SLAP-2*; IDT, San Jose, Kalifornia, Egyesült Államok) alkalmazásával végeztük el. Az eredményeket komparatív ( $\Delta\Delta C_t$ ) módszerrel értékeltük ki a *GAPDH* háztartási gén expressziójára vonatkoztatva.

**Áramlási citometriás mérések:** A sejteket anti-humán CD196 (CCR6) FITC, anti-humán CD194 (CCR4) PE,

anti-humán CD183 (CXCR3) PerCP Cy5.5, anti-humán CD3 APC Cy7, anti-humán CD4 PerCP Cy5.5, anti-humán CD45RA FITC, anti-humán CD45RO PE Cy7, anti-humán CD197 APC antitestekkel vagy izotípus kontrollokkal (mindegyik BioLegend, Inc., San Diego, CA, Egyesült Államok) jelöltük, majd BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok) áramlási citométerrel mértük le. Az transzkripció faktorok intracelluláris jelöléshez a sejtfelszíni festést követően Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmingen™, BD Biosciences) kittel permeabilizáltuk a sejteket, majd anti-humán Tbet PE CF594 és anti-humán ROR $\gamma$  PE antitestekkel vagy izotípus kontrollokkal jelöltük. Ezt követően a sejteket BD FACS Aria III. (BD Biosciences) áramlási citométerrel mértük le. Az eredményeket FlowJo 10.3 szoftverrel (Tree Star, Ashland, OR, Egyesült Államok) értékeltük ki.

**ELISA és ELISPOT mérések:** A plazma és sejtfelülészó mintákból humán IL-17A /homodimer/ ELISA Ready-SET-Go!™ Kit és IL-22 ELISA Ready-SET-Go!™ Kit (eBioscience™, Fisher Scientific,



Loughborough, Egyesült Királyság) segítségével határoztuk meg a citokinek koncentrációját. Az IL-17A citokint termelő sejtek számát humán IL-17A ELISPOT Ready-SET-Go!<sup>TM</sup> (Fisher Scientific) kittel kvantifikáltuk.

**Konfokális mikroszkópia:** Az aromás szénhidrogén receptor kimutatásához a naiv és memória T sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk, majd blokkoltuk az Fc receptorokat. Az AHR jelöléséhez 5µg/ml koncentrációban monoklonális egér anti-AHR antitestet (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) használtunk. Ezt követően a másodlagos kecske anti-egér Alexa488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) antitestet 4µg/ml koncentrációban, illetve a DRAQ5 sejtmagfestéket 5nM koncentrációban adtunk a sejtekhez. A felvételeket FluoView 500 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Germany) készítettük.

**Statisztika:** Az adatok statisztikai elemzését GraphPad Prism V6 (San Diego, CA, US), R és SPSS programokkal végeztük.

## 4. Eredmények

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

A TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  citokin kombinációs kezelés hatására a sejtek *RORC* expressziója már az 5. napon nőtt. A keresztköti antitest fokozza az anti-CD3 és anti-CD28 indukálta sejtaktivációt és IL-2 termelést. Aktiváció hatására mind PBMC, mind CD4<sup>+</sup> sejtek esetében kb. 50-50% arányban kétféle méretű (7-9 $\mu$ M és 9-13 $\mu$ M méretű) populáció volt detektálható a szuszpenzióban. Az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  kezelés hatására a T sejtek *RORC* expressziója nagyobb volt (kb. négyszerese), mint PBMC sejtek esetében. Az IL-4 és IFN $\gamma$  neutralizáló antitestek fokozzák az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$  kezelés indukálta Th17-differenciálódást, amely során a *RORC* és IL-17A kifejeződés fokozódik, míg az IL-22 termelődés csökken. Az aktiváció mind a *RORC* expressziót, mind a sejtek citokintermelését fokozza. A *RORC* kifejeződését többféle citokin kezelés is serkenti, azonban ezek eltérően szabályozzák az IL-17A és IL-22 termelődését.

A Th17-differenciálódást indukáló citokinkezelés a Th1 specifikus *TBX21* expresszióját is fokozza.

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

Egészséges donorok kezeletlen, CD45RO<sup>-</sup> naiv és CD45RO<sup>+</sup> memória T sejtjeiben az AHR gén és fehérje jelenléte kimutatható és aktiváció hatására fokozódik. A naiv és memória sejtek *AHR* expressziójában nem detektáltunk különbséget.

Egészséges donorok PBMC sejtjeiben az aktiváció indukálta IL-17A termelést mindkét AHR agonista (benzo[a]pirén és TCDD) és a dohányfüsttel kezelt RPMI médium is gátolja. Az AHR agonista leflunomid terápiában részesülő RA-s betegek naiv T-sejtjei kevesebb IL-22 termeltek ( $p < 0,01$ ), amely aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ +anti-IL4 kezelés hatására jobban fokozódott ( $p < 0,01$ ), mint a biológiai terápiás betegek sejtjeiben.

Az immunkomplexek jelenléte más kezelésekhez hasonlóan fokozta sejtek *RORC* kifejeződését,

ugyanakkor a többi kezeléshez viszonyítva gátolta a *TBX21* expressziót. Az immunkomplexek a kezeletlen sejtekhez képest serkentették az IL-17A, de nem befolyásolták az IL-22 termelődését.

Az egészségesekben az immunkomplexek mindkét alkalmazott koncentrációja csökkentette az osteoclastok *CTSK* és *RANK* kifejeződését, amely sem RA-s, sem AP-s betegekben nem volt megfigyelhető.

#### **4.3. A Th17-differenciálódás vizsgálata egészségesekben, RA-s és AP-s betegekben**

Megállapítottuk, hogy egészségesekben a  $CD4^+CD45RO^+$  memória T sejtek magasabb *RORC* és *TBX21* expresszióval jellemezhetőek, azonban az RA-s és AP-s betegek naiv és memória sejtjei nem különböznek egymástól. Megfigyeltük, hogy a naiv és memória sejtek *TBX21* kifejeződése mindhárom csoportban erős lineáris korrelációt mutatott ( $r = 0,9$ ,  $p < 0,0001$ ), ugyanakkor a *RORC* értékek ( $r = 0,18$ ,  $p = 0,17$ ) esetén ez nem detektálható. Az egészségesekhez képest az RA-s és AP-s betegek naiv T-sejtjeiben fokozódott a *RORC* gén és  $ROR\gamma$  fehérje kifejeződés

detektálható, míg a *TBX21* génben és TBET fehérjében nincs különbség sem a naiv sem a memória sejtek között. Az RA-s és AP-s betegek naiv T-sejtjeiben megfigyelhető egy nagyobb ROR $\gamma$  tartalmú sejtpopulációt. A memória sejtek nagyobb része centrális, kisebb részük effektor sejt mindhárom csoportban. Az effektor memóriasejtek között nagyobb arányban voltak jelen TBET $^+$ , ROR $\gamma^+$  vagy TBET $^+$ ROR $\gamma^+$  sejtek, mint a centrális memória sejtekben. Egészségesek memória sejtjei között több az CCR6 $^+$ CCR4 $^+$  és a CCR6 $^+$ CXCR3 $^+$  sejt, mint a naiv sejtek közt, azonban a betegcsoportokban ezek között nincs különbséget. A csak CXCR3 $^+$  naiv és memória sejtek száma egyik csoportban sem tért el egymástól. A vérszéklet (ESR) és a C-reaktív protein (CRP) paraméterek korrelációt ( $r=0,7213$ ;  $p=0,0093$  és  $r=0,7743$ ;  $p=0,0043$ ) mutattak a betegek CCR4 $^+$  memória T-sejtjeinek arányával. A transzkripciós faktorok expressziója alapján az egészségesek és a betegcsoportok 61%-os pontossággal választhatók el egymástól, míg kemokin receptor expresszió tekintetében már 81,3%-ban elkülöníthetők, azonban minden paramétert figyelembe véve ez 100%-os, azaz minél több

paraméter alapján definiáltunk egy-egy személyt, annál pontosabban elválasztható a betegek és az egészségesek csoportja. A naiv sejtek *RORC* kifejeződése és a  $CCR4^+CXCR3^+$  memória sejtek száma befolyásolta leginkább a fenti csoportosítást.

Az aktiváció+TGF $\beta$ +IL-6+IL-1 $\beta$ +anti-IL4 kezelés minden csoportban növelte a *RORC*, míg a *TBX21* expressziót egyik csoportban sem. Az IL-23 és IL-1 $\beta$  kezelések fokozták a *TBX21* expressziót, amely legkifejezettebb az egészségesekben, kevésbé az RA-s és egyáltalán nem volt megfigyelhető az AP-s betegekben. Az aktiváció egészségesekben mindkét transzkripciós faktor kifejeződését serkentette, ellenben ez az RA-s csoportban egyiket sem, míg AP-s betegekben kizárólag a *RORC* expresszióját indukálta. A *TBX21* expressziót AP-s betegekben egyik kezelés sem befolyásolta. RA-s betegekben az aktiváció+TGF $\beta$ +IL1 $\beta$ +IL6+anti-IL4 és az aktiváció+ IL1 $\beta$ +IL23+anti-IL4 ( $p < 0,01$  mindkét esetben) kezelések, míg AP-s betegekben az aktiváció+TGF $\beta$  +IL6+anti-IL4 és az aktiváció+TGF $\beta$ +IL1 $\beta$ +IL6+anti-IL4 ( $p < 0,05$  mindkét esetben) kezelések fokozták a *RORC* kifejeződését. A TGF $\beta$ +IL-6+anti-IL-4

kivételével egészségesekben valamennyi kezelés befolyásolta a CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> sejtek számát. Valamennyi kezelés indukálta a sejtek citokintermelését mindhárom csoportban. Az aktiváció a betegekben a transzkripciós faktorok expresszióját nem, azonban mindkét citokin termelést fokozta. Az aktiváció+TGFβ+IL-6+anti-IL-4 kezelés egészségesekben (p<0,05) és AP betegekben csökkentette (p<0,01 és p<0,5), azonban RA-s betegekben nem befolyásolta a sejtek citokintermelését. A sejtek transzkripciós faktor expressziója nem változott, azonban citokintermelésük csökkent 5 nap után. A 10. napon a betegcsoportokban az aktiváció+IL-1β+IL-23+IL6+anti-IL4 kezelés hatására nőtt a CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> sejtek aránya. A citokintermelés alapján 81%-ban különülnek el az egészségesek és a betegcsoportok, amely csoportosítást az IL1β+IL23+IL-6+anti-IL4 kezelés indukálta IL-22 termelés befolyásol. A differenciálódás során az IL-17A termelődés mintázata az egészségesekben mind az RA-s (p = 0,0000026), mind AP-s betegektől (p = 0,0001) eltérő, ugyanakkor a betegcsoportokban hasonló (p = 0,85) volt. Az IL-22 termelődése azonban az AP-s betegekben és az

egészségesekben hasonló ( $p = 0,58$ ), míg az RA-s csoport mind az egészségesektől ( $p = 0,000006$ ), mind az AP-s betegektől ( $p = 0,001$ ) eltérő volt.

#### **4. Következtetések**

**4.1.** A humán Th17 *in vitro* differenciálódás a  $CD4^+CD45RO^-$  naiv T-sejtekből indítva a legoptimálisabb. Az anti-CD3, anti-CD28 és keresztükötő antitest fokozza a sejtaktivációt. Az IL-4 és  $IFN\gamma$  neutralizáló antitestek hozzájárulnak a Th17-differenciálódáshoz.

**4.2.** Az AHR fontos szerepet játszhat a környezeti faktorok (pl. dohányfüstben található TCDD és benzo[a]pirén) vagy gyógyszermolekulák (pl. leflunomid) által közvetített hatások molekuláris szignalizációjában. Az AHR kimutatható a kezeletlen humán naiv és memória T-sejtekben, kifejeződése aktiváció hatására fokozódik. A TCDD, benzo[a]pirén és leflunomid AHR agonista ligandok befolyásolják a limfociták IL-17A és IL-22 termelését. Az immunkomplexek egészségesekben a Th17-



differentiálódás során gátolják a sejtek *TBX21* expresszióját, ugyanakkor serkentik az IL-17A termelést. Az immunkomplexek egészségesekben gátolják, RA-s és AP-s betegek osteoclastjaiban nem befolyásolja a *RANKL* és *CTSK* kifejeződését.

**4.3.** RA-s és AP-s betegek naiv T-sejtjeiben Th17 irányú elköteleződés figyelhető meg. Az *in vitro* Th17-differentiálódás folyamata és a sejtek citokintermelési mintázata egészségesekben és RA-s illetve AP-s betegekben eltérően szabályozott.

## 5. Saját publikációk jegyzéke

### 5.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények listája

- **Baricza E**, Marton N, Királyhidi P, Kovács O.T, Kovácsné Székely I, Lajkó E, Kóhidai 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*. Cell Mol Life Sci 73:(1) pp. 95-117. (2016)

**IF: 5,788** (összesített IF nem tartalmazza)

- 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**

## 5.2. 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.

**IF: 3,418** (összesített IF nem tartalmazza)

- Csöngei V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyarai 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*. Int. J. Colorectal Dis. 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*. Experi Clinical Endo Diabetes, 118: (3) pp. 209-212.

**IF: 1,826**

Összesített impakt faktor: **16,443**