

A Toll-like receptor homológ CD180 molekula által közvetített B-sejt funkciók vizsgálata szisztémás sclerosisban

Doktori (PhD) – értekezés

Erdő-Bonyár Szabina

Témavezető:

Dr. Simon Diána, egyetemi adjunktus

Programvezető:

Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ,

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Pécs, 2022.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	5
2	Bevezetés	8
2.1	Szisztémás sclerosis	8
2.1.1	A limitált kután szisztémás sclerosis (lcSSc)	8
2.1.2	A diffúz kután szisztémás sclerosis (dcSSc)	9
2.1.3	Tünetek.....	9
2.1.3.1	Bőrjelenségek.....	9
2.1.3.2	Csont és ízületi eltérések	10
2.1.3.3	Raynaud jelenség és érrendszeri károsodás.....	10
2.1.3.4	Belső szervi manifesztációk	10
2.1.3.4.1	Gasztrointesztinális rendszer	10
2.1.3.4.2	Tüdőérintettség.....	11
2.1.3.4.3	Szívérintettség.....	11
2.1.3.4.4	Veseérintettség.....	11
2.1.4	Diagnosztika.....	12
2.2	B-sejtek szerepe az SSc patogenezisében	13
2.2.1	A B-sejtek autoantitest termelése.....	14
2.2.2	A B-sejtek citokintermelése	15
2.2.3	A B-sejtek, mint antigénprezentáló sejtek.....	16
2.3	Természetes autoantitestek	16
2.3.1	Citrát-szintáz elleni autoantitestek	17
2.3.2	Topoizomeráz I (F4) elleni autoantitestek.....	17
2.4	Toll-like receptorokon keresztüli szignalizáció	18
2.4.1	A Toll-like receptorok	18
2.4.2	Toll-like receptorok szerepe a szisztémás autoimmun kórképekben.....	19
2.4.3	A TLR homológ CD180 molekula.....	19
2.5	PI3k/Akt/mTOR szignalizáció	20
2.6	BAFF szignalizáció	21
3	Célkitűzések	23
4	Anyag és módszer	24
4.1	Minták	24
4.1.1	Perifériás vérminták.....	24
4.1.2	Mandula minták	25
4.2	Mononukleáris sejtek izolálása és a B-sejtek szeparálása	25

4.3	Sejtek stimulálása	26
4.3.1	Perifériás vér B-sejtek stimulálása.....	26
4.3.2	Mandula B-sejtek stimulálása	26
4.4	RNS izolálás, cDNS szintézis és qPCR.....	26
4.4.1	CD180 mRNS expresszió meghatározása.....	27
4.4.2	BAFF-R mRNS expresszió meghatározása	27
4.5	Áramlási citometriás vizsgálatok	27
4.5.1	A B-sejt alcsoportok azonosítása.....	27
4.5.2	A CD180 fehérje expresszió meghatározása dcSSc-s és HC B-sejteken	28
4.5.3	A BAFF-R és TACI expresszió meghatározása dcSSc-s és HC B-sejteken.....	29
4.5.4	Mandula B-sejtek áramlási citometriás vizsgálata.....	29
4.5.5	Jelátviteli molekulák foszforilációjának vizsgálata dcSSc-s és HC B-sejteken ...	29
4.6	ELISA mérések.....	30
4.6.1	Mandula B-sejtek citokin termelésének mérése	30
4.6.2	Mandula B-sejtek természetes autoantitest termelésének mérése	30
4.6.2.1	Az anti-citrát szintáz IgM autoantitest mérése	31
4.6.2.2	Az anti-topoizomeráz I (F4) IgM autoantitest mérése	31
4.7	Luminex MAGPIX mérés.....	32
4.8	Statisztikai analízis	32
5	Eredmények	33
5.1	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatásának vizsgálata dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein.....	33
5.1.1	A CD180 molekula expressziójának vizsgálata dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein.....	33
5.1.2	A CD180 ligáció hatásának vizsgálata a PI3K/Akt/mTOR szignálizációra dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben.....	34
5.1.2.1	A CD180-on keresztüli stimuláció kisebb mértékben növeli az Akt foszforilációját a B-sejteken dcSSc-ben, mint az egészséges egyéneken	34
5.1.2.2	Az S6 foszforilációjában nincs különbség dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok B-sejtjeiben	35
5.1.2.3	A B-sejtek NF- κ B foszforilációját kevésbé növelte az anti-CD180 antitest kezelés dcSSc-ben, mint az egészséges egyéneken	35
5.1.3	Anti-BAFF autoantitestek mérése dcSSc-ben szenvedő betegek szérummintáiban	36
5.1.4	A CD180-on keresztüli B-sejt stimuláció BAFF receptorok expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata	37
5.1.4.1	Anti-CD180 antitesttel történő kezelés a dcSSc-ben szenvedő betegekben megfigyelt szintre csökkenti a BAFF-R expresszióját egészséges egyének B-sejtjein	37

5.1.4.2	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció a dcSSc-ben szenvedő betegekben megfigyelt szintre növeli a TACI expresszióját egészséges egyének B-sejtjein.....	38
5.1.4.3	Az egészséges kontrollok naiv B-sejtjen megfigyelt magasabb BAFF-R expressziót az anti-CD180 antitest kezelés lecsökkentette a dcSSc-ben szenvedő betegek naiv B-sejtjein megfigyelt szintre.....	39
5.1.4.4	Az egészséges kontrollok naiv B-sejtjein megfigyelt magasabb TACI expressziót az anti-CD180 antitest kezelés a dcSSc-ben szenvedő betegek naiv B-sejtjein megfigyelt szintre növelte.....	41
5.2	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatásának vizsgálata a B-sejtfunkciókra mandula B-sejteken.....	42
5.2.1	Az anti-CD180 antitest kezelés csökkenti a B-sejtek CD180 expresszióját.....	42
5.2.2	A CD180 pozitív sejtek aránya a non-switched memória B-sejt alcsoportban a legmagasabb.....	44
5.2.3	A CD180-on keresztüli stimuláció aktiválja mind a 4 vizsgált B-sejt alcsoportot.....	46
5.2.4	A B-sejtek IL-6 termelését fokozza az anti-CD180 antitesttel történő kezelés.....	47
5.2.5	A CD180 stimuláció képes indukálni a természetes autoantitest termelést.....	48
5.2.5.1	Az anti-CD180 antitest kezelés csak a CpG-vel együtt növeli az anti-CS IgM antitest termelést.....	49
5.2.5.2	CD180 ligáció fokozza az anti-topo I IgM antitest termelését.....	49
6	Összefoglalás és következtetések.....	51
6.1	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjeire kifejtett hatásának vizsgálata.....	51
6.2	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció mandula B-sejtekre kifejtett hatásainak vizsgálata.....	53
7	Új eredmények összefoglalása.....	55
7.1	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjeire kifejtett hatásának vizsgálata során:.....	55
7.2	A CD180 molekulán keresztüli stimuláció B-sejt funkciókra kifejtett hatásának mandula B-sejteken történő vizsgálata során:.....	55
8	Irodalomjegyzék.....	57
9	Köszönetnyilvánítás.....	69
10	Publikációs lista.....	70
10.1	A dolgozat alapjául szolgáló közlemények.....	70
10.2	Egyéb publikációk.....	70
10.3	Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek.....	73

1 Rövidítések jegyzéke

ACA = anti-centromer antitest

ACR= Amerikai Reumatológiai Kollégium (American College of Rheumatology)

ANA = anti-nukleáris antitestek

anti-CD180 antitest = anti-humán CD180 antitest

anti-RNS pol III = anti-RNS polimeráz III antitest

anti-topo I antitest, anti-Scl 70 antitest = DNS topozomeráz I elleni természetes autoantitest

APC = antigénprezentáló sejt

B-CLL = B-sejtes krónikus limfocitás leukémia

BAFF = B-sejt aktiváló faktor

BAFF-R = B-sejt aktiváló faktor receptor

BCR = B-sejt receptor

BSA = bovine serum albumin

cDNS = komplementer dezoxiribonukleinsav

CpG = citozin - foszfát - guanin oligodeoxinukleotid

CS = citrát-szintáz

CD = cluster of differentiation

DAMP = károsodás asszociált molekuláris mintázat

DLCO = szénmonoxid-diffúziós kapacitás

DN = kettős negatív B-sejt

DNS = dezoxiribonukleinsav

dcSSc = diffúz kután szisztémás sclerosis

dsDNS = kettősszálú dezoxiribonukleinsav

ELISA = enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat

EULAR = Európai Reumatológiai Társaságok Szövetsége (European Alliance of Associations for Rheumatology)

FITC = Fluoreszcein-izotiocianát

FVC = forszírozott vitálkapacitás

GAPDH = Gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

HC = egészséges kontroll (healthy control)

HRCT = nagy felbontású komputertomográfia

HRP = tormagyökér peroxidáz (horseradish peroxidase)

IFN- α = interferon- α

Ig = immunglobulin

IQR = interkvartilis terjedelem

IVIg = intravénás immunglobulin

IL= interleukin

lcSSc = limitált kután szisztémás sclerosis

LPS = lipopoliszacharid

LRR = leucin gazdag ismétlődés

MCP = metacarpophalangeális

MD = mieloid differenciációs faktor

MFI= átlagos fluoreszcencia intenzitás

MHC II = főhisztokompatibilitási komplex II

MRSS= módosított Rodnan bőrpontszám

mTOR = mammalian target of rapamycin

MZ = marginális zóna

NF- κ B = nukleáris faktor κ B

NK-sejt = természetes ölősejt

NS = non-switched memória B-sejt

PAH = pulmonális artériális hipertónia

PAMP = kórokozó asszociált molekuláris mintázat

PBMC = perifériás vér mononukleáris sejtek

PBS = foszfáttal puffertolt sóoldat

PDGF = vérlemezke eredetű növekedési faktor (Platelet-derived growth factor)

PE = fikoeritrin

PerCP = Peridinin klorofill protein

PI3K= foszfatidil-inozit-3-kináz

qPCR = kvantitatív polimeráz láncreakció

RNS = ribonukleinsav

RP105 = radioprotective 105 kDa fehérje

RQ = relatív kvantifikálás

S = switched memória B-sejt

SEM = az átlag standard hibája (standard error of the mean)

SLE = szisztémás lupus erythematosus

SSc = szisztémás sclerosis

TAC1 = transzmembrán aktivátor és kalciummodulátor és cyclophilin ligand interaktor

TGF- β = Transzformáló növekedési faktor β

Th2 T-sejtek = 2-es típusú helper T-sejtek

TIR = Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor

TLR = Toll-like receptor

TMB = 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

TNF = tumor nekrosis faktor

TSK = Tight Skin egér

2 Bevezetés

2.1 Szisztémás sclerosis

A szisztémás sclerosis (SSc) vagy más néven scleroderma egy komplex szisztémás autoimmun reumatológiai kórkép. A betegség érrendszeri károsodással, immunológiai eltérésekkel illetve a bőrt és a belső szerveket érintő fibrózissal jellemezhető, mely visszafordíthatatlan hegesedéshez és szervi elégtelenséghez vezet. A betegséget kiváltó okok még nem teljesen tisztázottak, de valószínűleg genetika, epigenetikai és környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak benne. A betegség nőkben jóval gyakrabban fordul elő és általában a 40-50-es éveikben kezdődik el [1]. Szinte mindegyik SSc-ben szenvedő betegben kimutathatóak különböző anti-nukleáris antitestek jelenléte és a különböző SSc fenotípusok erősen összefüggenek a különböző antitesttípusokkal [2]. A betegség felismerése a klinikai tünetek heterogenitása miatt nehézkes, azonban a betegség minél korábbi felismerése kulcsfontosságú az időben történő terápiás beavatkozáshoz, mely lehetővé teheti a visszafordíthatatlan szervi károsodás megelőzését és javíthatja a betegség prognózisát [1]. A bőr érintettsége alapján két formája különíthető el, a limitált és a diffúz kután SSc, melyek a klinikai tüneteikben és a prognózisukban is különböznek egymástól [3].

2.1.1 A limitált kután szisztémás sclerosis (lcSSc)

LcSSc-ben a bőrtünetek akrálisan, a kezeken, arcon, alszáron, alkaron jelennek meg és erre a formára jellemző tünetek a pulmonális artériális hipertónia (PAH), a szubkután kalcinózis valamint a gasztrointesztinális traktus fibrózisa és a következményes hipomotilitás, melyek késői megjelenését a Raynaud szindróma megjelenése akár évekkel vagy évtizedekkel is megelőzheti. Az lcSSc alcsoport jellegzetes autoantitestje az anti-centromer antitest (ACA). Az lcSSc a jobb prognózisú forma [1].

2.1.2 A diffúz kután szisztémás sclerosis (dcSSc)

DcSSc-ben a bőrelváltozások a Raynaud szindróma megjelenése után egy éven belül jelentkeznek, amik a térd illetve a könyök vonalától proximálisan is megjelennek és többnyire a törzs is érintett. A kórkép súlyos klinikai jellemzői közé tartoznak a tüdő intersticiális fibrózisa, illetve a vese, a szívizom és a gasztrointesztinális traktus diffúz fibrózisa, melyek korán, lényegében a bőrfolyamattal együtt kezdődnek. A dcSSc formára az anti-topoizomeráz I (anti-topo I = anti-Scl 70) és anti-RNS polimeráz III (anti-RNS pol III) autoantitestek jellemzőek. A dcSSc kedvezőtlen lefolyású kórkép [1].

2.1.3 Tünetek

2.1.3.1 Bőrjelenségek

A bőr érintettsége az SSc legkorábbi, leggyakoribb és legjellemzőbb megnyilvánulása. Az Amerikai Reumatológiai Kollégium (ACR) és az Európai Reumatológiai Társaságok Szövetsége (EULAR) által kidolgozott SSc klasszifikációs rendszerben a bőrérítettséghez rendelték a legmagasabb pontszámot és amennyiben a bőrérítettség a metacarpophalangeális (MCP) ízületől proximálisan is jelen van és mindkét kéz ujjain is észlelhető, ez önmagában elégséges kritérium az SSc diagnózis felállításához [4]. Az érintett területeken a bőr vastagodása és feszesebbé válása figyelhető meg, melynek hátterében a bőrben lévő fibroblasztok fokozott kollagén és intercelluláris mátrix termelése áll. A bőrvastagodás kiterjedtsége összefügg a súlyosabb belső szervi manifesztációk megjelenésével. A bőrelváltozások kiterjedtségének meghatározása a módosított Rodnan bőrpontszám (MRSS) pontrendszer segítségével történik, mely tapintás alapján a test 17 régiójában méri a bőr irha rétegének megvastagodását. Az egyéb bőrtünetek közé tartozik még a teleangiectázia, a csillag alakú heggel gyógyuló ujjbegyfekélyek, a bőr pigmentáció zavara és a szubkután kalcinózis [5,6].

2.1.3.2 Csont és ízületi eltérések

A betegségre jellemző vázrendszeri tünet a disztális ujjpercek felszívódása és az ujjvégek deformálódása. Emellett gyakori jelenség a polyarthralgia, de amennyiben polyarthrit is jelen van, már korán súlyos ízületi destrukciót okoz. A kialakuló súlyos ízületi kontraktúrák és kéz deformitások jelentősen rontják az érintett betegek életminőségét. Az ínhüvely-krepitáció („tendon friction rubs”) a korai dcSSc jellemző fontos tünete [7–9].

2.1.3.3 Raynaud jelenség és érrendszeri károsodás

A vaszkuláris abnormalitások kulcsfontosságú szereppel bírnak az SSc patogenezisében, melyek elsősorban a kapillárisokat és a kisartériákat érintik. A kapillárisok degenerációja és az újérvérvégződés zavara következtében avaszkuláris területek és óriáskapillárisok alakulhatnak ki, ami a környező szövetek károsodásához vezethet. A kisartériákban obliteratív arteriopátia alakul ki, mely szervkárosodásokhoz (Pl.: vese, tüdő) vezet [10,11].

A mikrovaszkuláris károsodások egyik legelső klinikai megjelenése a Raynaud jelenség, ami szinte minden SSc-ben szenvedő betegnél előfordul és mivel általában a betegeknél első tünetként jelenik meg, kulcsfontosságú szerepet játszik a nagyon korai SSc felismerésében [12]. A Raynaud jelenség hátterében epizodikusan jelentkező vazospasztikus rohamok következtében fellépő keringészavar áll, mely során előbb az ujjak elfehéredése illetve cianózisa, majd a spazmus oldódása után vérbőség figyelhető meg, mely általában jelentős fájdalommal jár. A jelenség általában mindkét kezet érinti, és a keringészavar csak a rohamok idején áll fenn [13].

2.1.3.4 Belső szervi manifesztációk

2.1.3.4.1 Gasztrointesztinális rendszer

Az SSc-ben szenvedő betegek 90%-ában figyelhető meg emésztőszervrendszeri manifesztáció, mely a traktus bármely részét érintheti. A leggyakrabban a nyelőcső szakasza

érintett, jellemző a diszfágia és a refluxbetegség, továbbá a következményes nyelőcsőgyulladás. A gyomorban és a vékonybelekben motilitási zavar figyelhető meg, ezáltal a következményes pangás bakteriális túlnövést, bélrendszeri gyulladást válthat ki. Emellett kialakulhat az úgynevezett „görögdinnye gyomor”, ami akár életveszélyes vérzést okozhat [14,15].

2.1.3.4.2 Tüdőérintettség

SSc-ben a tüdő manifesztációnak két eltérő formája figyelhető meg: az intersticiális tüdőbetegség (ILD) és a PAH, e két szervi tünet jelenti a vezető halálokokat SSc-ben. AzILD az egész szervezetben jelenlévő fibrózis tüdő manifesztációja, mely intersticiális alveolitis, majd fibrózis képében jelenik meg, melynek kiterjedtsége nagy felbontású komputertomográfiával (HRCT) vizsgálható. A légzésfunkciós vizsgálatok során csökkent forszírozott vitálkapacitás (FVC) és szénmonoxid-diffúziós kapacitás (DLCO) értékek figyelhetőek meg [16]. A tüdőérintettség másik formája a PAH, mely során avaszkuláris ellenállás növekedésének következtében a pulmonális artéria és a jobb kamrai nyomás megemelkedik, mely végső soron a jobb szívfél tágulásához és károsodásához vezet. A PAH vizsgálata echokardiográfiás vizsgálattal és jobb szívfél-katéterezéssel történik [17].

2.1.3.4.3 Szívérintettség

A kardiális érintettség szintén gyakori. A miokardium fibrózisa, illetve az artériák és kapillárisok károsodása következtében kialakuló keringésromlás ingerképzési és ingerületvezetési zavarok kialakulásához valamint a szív pumpafunkciójának gyengüléséhez vezethet [18].

2.1.3.4.4 Veseérintettség

A vesekárosodások háttérében főként a kisartériák obliteratív vaszkulopátiája következtében kialakuló iszkémiás károsodások állnak. A veseérintettség legsúlyosabb formája

az ún. scleroderma renális krízis, ami egy gyorsan progrediáló illetve magas vérnyomással és azotémiával járó állapot, mely súlyos veseelégtelenséghez vezet [19].

2.1.4 Diagnosztika

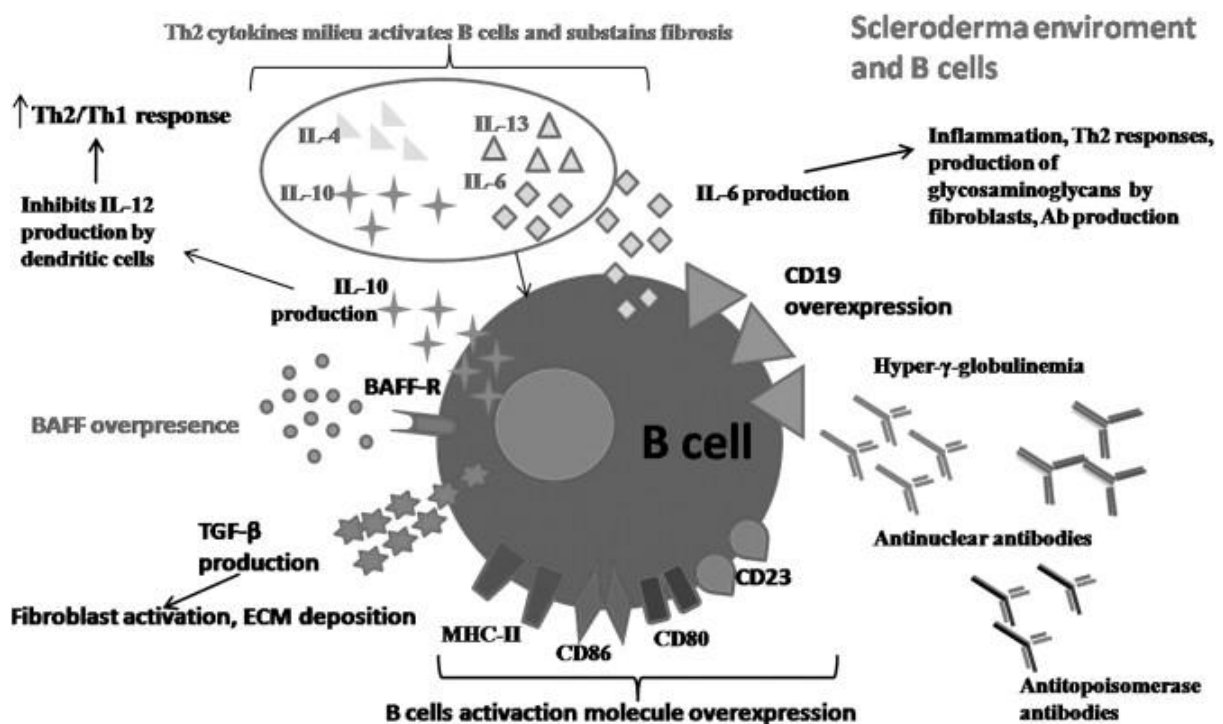
Az ACR és EULAR új klasszifikációs rendszert hozott létre 2013-ban a SSc diagnosztizálására, melynek részleteit az 1. táblázat tartalmazza. A kritériumrendszer szerint amennyiben az SSc-re jellemző bőrvastagodás mindkét kézen az MCP ízületől proximálisan is jelen van, ez önmagában elégséges feltétel az SSc diagnózisának felállításához. Emellett a klasszifikációs rendszer további hét kiegészítő szempontot tartalmaz, melyek a következők: az MCP ízületet proximális irányban nem meghaladó bőrvastagodás jelenléte a kezeken, ujjbegyek vagy csillag alakú hegek jelenléte, teleangiectázia, abnormális körömágy kapillárisok, PAH vagy ILD jelenléte, Raynaud jelenség illetve az SSc-re jellemző autoantitestek (ACA, anti-topo I antitest, anti-RNS pol III antitest) jelenléte. A pontrendszer szerint a 9 vagy annál több pontot elérő betegnél egyértelműen felállítható az SSc diagnózisa [20].

1. táblázat: A szisztémás sclerosis 2013-as ACR/EULAR klasszifikációs kritériumai [20]

Kritérium	Alkritérium	Pontszám
A bőr megvastagodása az ujjakon mindkét kézen az MCP ízületől proximálisan is		9
A bőr megvastagodása az ujjakon (csak a magasabb pontszám számolandó)	Duzzadt ujjak (Puffy fingers)	2
	Teljes ujj, MCP-től disztálisan	4
Ujjbegylézió (csak a magasabb pontszám számolandó)	Ujjbegyek	2
	Csillag alakú heg (pitting scars)	3
Teleangiectázia		2
Kóros körömágy kapilláris mintázat		2
PAH és/vagy ILD		2
Raynaud-jelenség		3
SSc-re jellemző autoantitestek (ACA, anti-topo I, anti-RNS pol III)		3

2.2 B-sejtek szerepe az SSc patogenezisében

Az SSc patogenezise komplex és csak részben tisztázott, azonban ismert, hogy számos immunológiai esemény hozzájárul a betegség kialakulásához [21]. A B-sejtek számos funkciójuk révén szerepet játszanak az SSc patogenezisében, mint például az autoantitestek és citokinek termelése, a T-sejtek és dendritikus sejtek funkcióinak szabályozása és a megváltozott antigénprezentáció [22] (1. ábra).



1.ábra: A B-sejtek szerepe az SSc patogenezisében [22].

SSc-ben a B-sejtek megnövekedett cluster of differentiation 19 (CD19) expresszióját és hiperaktivált állapotát írták le [22]. A CD19 a B-sejtek kritikus sejtfelszíni jelátvitel szabályzó molekulája és transzgenikus egérben a CD19 megnövekedett expressziója robusztus autoantitest termelést váltott ki. Az SSc egyik egérmodelljében, a Tight Skin (TSK) egérben a specifikus B-sejt gátló anti-CD20 antitest kezelés a B-sejtek depléciójá révén megakadályozta krónikus aktiválódásukat és antitesttermelésüket illetve a bőrfibrózis kialakulását [22,23]. Továbbá az anti-CD20 antitest terápia SSc kezelésére is hatékonynak bizonyult [24,25]. Emellett, a B-sejtek infiltrációját írták le SSc-ben szenvedő betegek bőrében és tüdejében [26]. Bőrbioptiás minták transzkriptóm analízise nemrégiben igazolta, hogy a B-sejt aktiváció a

betegség kialakulásának korai eseménye [27]. A megváltozott B-sejt homeosztázis mellett a B-sejt kompartmentek eltérő eloszlását is megfigyelték SSc-ben. SSc-ben szenvedő betegek perifériás vérében a naiv B-sejtek megnövekedett arányban, míg a memória B-sejtek csökkent számban vannak jelen. Ráadásul a memória B-sejtek aktivált állapotát és megnövekedett antitest és feltételezhetően autoantitest termelő képességét írták le [28].

2.2.1 A B-sejtek autoantitest termelése

SSc-ben a B-sejt tolerancia felborulásának legegységesebb jele a betegek 95%-ában kimutatható nagy mennyiségben keringő autoantitest. Jellemzően egy betegnek egyféle antitestje van, amely általában kimutatható a betegség első tüneteinek megjelenésekor, és megmaradnak a betegség lefolyása során. Jellemzőek a különböző sejtmag komponensek ellen irányuló anti-nukleáris autoantitestek (ANA), többek között az anti-Sc170, ACA és anti-RNS pol III antitestek, melyek összefüggést mutatnak a bőrérzékenységgel, a belső szervi érintettséggel, az etnikummal, a nemi különbségekkel és a prognózissal [22].

A rutinszerűen vizsgált autoantitestek közül a dcSSc-ben szenvedő betegekben leggyakrabban előforduló autoantitest az anti-topo I antitest pozitívitás összefüggést mutat a tüdőfibrózissal, a perifériás vaszkuláris károsodással és rosszabb prognózist jelez. Az ACA pozitív betegek leginkább az lcSSc csoporthoz tartoznak, ezen antitest jelenléte a PAH kialakulásának független rizikó faktora. Az anti-RNS pol III antitest a progresszív bőrvastagodással járó dcSSc-re jellemző, ezen betegeknek a renális krízis kialakulására nagyobb az esélyük [29,30]. Az anti-RNS pol III antitest daganatos betegségekkel is összefüggést mutat, ezen betegek tumorszűrése indokolt az SSc diagnózisának felállításával párhuzamosan [31].

Ezen anti-nukleáris antitesteken túl nemrégiben olyan antitesteket is azonosítottak SSc-ben szenvedő betegekben, melyek közvetlen módon járhatnak hozzá a vaszkuláris károsodás és a fibrózis kialakulásához, elősegítik a gyulladásos válasz kialakulását, ezek közé tartoznak az endoteliális sejtek és a fibroblasztok ellen irányuló autoantitestek. Az anti-endoteliális antitestek aktiválhatják az endotél sejteket, az endotél sejtek apoptózisát indukálhatják, ugyanakkor ezen sejtek pusztulásának velejárái is lehetnek [32]. Az anti-fibroblaszt antitestek fokozhatják az adhézis molekulák és profibrotikus citokinek expresszióját a fibroblaszt sejteknek [33]. Az anti-PDGF receptor antitestek a kollagén szintézist indukálhatják és reaktív oxigénradikálok termelődését válthatják ki [34].

2.2.2 A B-sejtek citokintermelése

SSc-ben számos citokin emelkedett szintje figyelhető meg, melyek hozzájárulnak az SSc patogeneziséhez. Számos más sejttípus mellett a B-sejtek is termelnek interleukin (IL)-6-ot, mely képes serkenti a gyulladást illetve a B-sejtek proliferációját, differenciációját és antitesttermelését [22]. Az IL-6 szérumszint és a perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) spontán IL-6 termelésének növekedését figyelték meg SSc-ben szenvedő betegekben, és az IL-6 szérumszint összefüggést mutatott a bőrfibrózissal [35]. Az IL-6-nak profibrotikus hatása is van, fokozza a fibroblasztok proliferációját és kollagén szintézisét [36]. Az SSc TSK egérmodelljében a B-sejtek gátlása csökkentette az IL-6 mRNS szintjét és a fibrózis kialakulását [30]. Az aktivált B-sejtek IL-6 termelése elősegíti a lépben és a nyirokcsomókban a spontán csíráközpontok fejlődését szisztémás lupus erythematosusban (SLE) és lupus egérmodellben, továbbá a plazmasejtek differenciálódását és túlélését, ezáltal hozzájárulva az antitest termeléshez fontos szerepet játszhat az SSc kialakulásában [37,38].

Emellett a B-sejtek a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β) termelése révén is hozzájárulnak a fibrózis kialakulásához. A TGF- β az egyik legfontosabb regulátora a fibrotikus folyamatoknak [39]. SSc-s betegek fibroblasztjaiban a TGF- β jelátviteli útvonalak módosultak, ami a TGF- β autokrin stimulációjához vezet és megnyilvánul a kollagén és más extracelluláris mátrix komponensek fokozott termelődésében. Ezen felül, a TGF- β indukálja további profibrotikus mediátorok termelődését és hozzájárul a fibroblasztok miofibroblaszt irányú differenciációjához is. A profibrotikus citokinek általi állandó fibroblaszt stimuláció az SSc-s fibroblasztok autonom aktivációjához vezethet [1,40].

A B-sejtek nagy része IL-6 termelő effektor B-sejt, melyek gyulladás és autoimmunitás serkentő szereppel bírnak, azonban a B-sejtek egy kis részét alkotják a regulatórikus B-sejtek, melyek részben IL-10 termelésük révén fontos szerepet játszanak az immunválaszok negatív szabályzásában, az autoimmun folyamatok gátlásában és az autoimmunitás megelőzésében [23,41]. SSc-ben a regulatórikus B-sejtek csökkent szintjét figyelték meg, mely negatívan korrelált a betegség aktivitásával. Továbbá a Breg sejtek károsodott funkcióját is leírták már SSc-ben, ezek alapján feltételezik, hogy a regulatórikus B-sejtek hozzájárulhatnak az SSc kialakulásához [42,43].

2.2.3 A B-sejtek, mint antigénprezentáló sejtek

Az SSc-s betegek aktivált B-sejtjei nagy mennyiségben expresszálnak MHC II-t és kostimuláló molekulákat, ezáltal hatékony antigénprezentáló képességgel rendelkeznek. A B-sejtek antigénprezentáló képességük révén elősegítik a 2-es típusú helper T-sejtek (Th2) kialakulását. A Th2 T-sejtek citokin termelésük révén serkentik a B-sejtek antitesttermelését illetve a fibroblasztok kollagéntermelése révén a fibrózis kialakulását [22,26].

2.3 Természetes autoantitestek

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy SSc-ben szenvedő betegekben a csökkent memória B-sejtszám háttérében a non-switched memória (NS) B-sejtek mennyiségének csökkenése állhat [44]. Az NS és a B1 B-sejtek közötti hasonlóságok miatt feltételezhető, hogy az NS B-sejtek képesek természetes autoantitestet termelni [45].

A természetes antitestek különböző evolúciósan konzervált antigének ellen irányuló alacsony affinitású, polireaktív, többnyire immunglobulin M (IgM) izotípusú antitestek [46,47]. A természetes antitestek újszülöttekben és egészséges felnőtt egyénekben külső antigén stimulus vagy immunizáció nélkül is folyamatosan jelen vannak és felismerési profiljuk erősen konzervált az egyének között [48]. Az egyénekre jellemző természetes IgM autoantitest repertoár az élet első éveiben történő kialakulását követően viszonylag állandó marad az élet során [49]. A természetes antitestek fontos szerepet játszanak a patogénekkal és fertőzésekkel szembeni védekezésben, a veleszületett és a szerzett immunválaszok modulálásában, ezáltal a gyulladási és autoimmun folyamatok szabályozásában. Továbbá részt vesznek a szöveti homeosztázis fenntartásában, a B-sejt fejlődés szabályozásában illetve a szövet- és sejttörmelékek eltakarításában [46].

A természetes IgG autoantitestekről kevesebb adat áll rendelkezésre, mint az IgM izotípusúakról, de úgy tűnik, hogy a természetes IgG antitestek szintje folyamatosan változik az életkortól, a nemtől és a betegségtől függően. Ugyanakkor fontos különbséget tenni a patológiás és a természetes IgG antitestek között. A patológiás IgG antitestek jelenléte csak a tolerancia felborulás következtében kialakuló kóros körülmények között figyelhető meg, ezt jelzi, hogy számos autoimmun betegségben megfigyelhető különböző sejt és szöveti komponensek ellen irányuló IgG autoantitestek, mint pl. SLE-ben a kettőszálú DNS (dsDNA) elleni IgG autoantitestek vagy SSc-ben a topo I elleni IgG autoantitestek jelenléte [48,50]. A

természetes antitestek jótékony szerepét alátámasztja a természetes antitestekben gazdag intravénás immunglobulin (IVIg) terápia hatékony alkalmazása számos gyulladásos és autoimmun kórkép kezelésére [51], beleértve az SSc kezelését is [52].

2.3.1 Citrát-szintáz elleni autoantitestek

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a mitokondrium belső membránjában lévő citrát-szintáz (CS) enzim ellen természetes antitestek találhatóak egészséges egyének és autoimmun betegek szérumában is [49]. SLE-ben a dsDNS elleni IgM izotípusú autoantitestek jótékony hatását már kimutatták, kutatócsoportunk pedig SLE-s betegek szérummintáiban összefüggést talált a dsDNS elleni IgM autoantitestek és az anti-CS IgM autoantitestek szintje között [53].

2.3.2 Topoizomeráz I (F4) elleni autoantitestek

Ismert, hogy patológiás autoantitestek a topo I ellen leggyakrabban dcSSc-ben mutathatóak ki, de lcSSc-ben és SLE-ben is előfordulnak. Kutatócsoportunk korábban epitóp térképezéssel kimutatta, hogy dcSSc-ben, lcSSc-ben és SLE-ben az anti-topo I autoantitestek felismerési mintázata különböző. Továbbá, hogy a topo I immundomináns régiójában található F4 fragmens ellen természetes autoantitestek mutathatóak ki egészséges egyéneken és SSc mellett más autoimmun betegségeken is [54]. A dsDNS elleni IgM autoantitestek SLE-s betegek szérummintáiban szoros összefüggést mutattak az anti-topo I F4 fragmense elleni IgM antitestek szintjével is [53], további bizonyítékot szolgáltatva a korábbi felvetésnek, miszerint az anti-topo I F4 autoantitestek természetes autoantitestek.

2.4 Toll-like receptorokon keresztüli szignalizáció

2.4.1 A Toll-like receptorok

Ismert, hogy a B-sejtek funkciója a veleszületett immunrendszer molekulái által is szabályozott, azonban ez SSc-ben kevésbé tanulmányozott [55]. A veleszületett immunrendszer a szervezet első védelmi vonalát alkotja a patogének elleni védekezésben. A behatoló patogének érzékelése a veleszületett immunrendszer mintázat felismerő receptorai által történnek, melyek közül a Toll-like receptorok (TLR) a legősibb csoport és ezek rendelkeznek a legszélesebb kórokozó felismerési spektrummal [56]. A TLR-ek képesek felismerni a kórokozókkal asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP), mint például virális és bakteriális nukleinsavak, lipopoliszacharid (LPS) és flagellin, illetve a sérült szövetekből és apoptotizáló sejtekből felszabaduló károsodás asszociált molekuláris mintázatokat is (DAMP), ilyenek például a hősokk fehérjék, mitokondriális DNS, extracelluláris mátrix komponensek [57]. A tipikus TLR-ek I-es típusú transzmembrán proteinek, melyek a sejtmembránon (TLR2 és TLR4) vagy az endoszómális kompartmentben (TLR3, TLR7 és TLR9) találhatóak és 3 strukturális domént tartalmaznak: a PAMP/DAMP-ok felismeréséért felelős leucin-gazdag ismétlődések (LRR), a transzmembrán domén, és az intracelluláris Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor (TIR) domén, ami a downstream szignalizációs útvonalak aktivációjához szükséges. A TLR-ek széleskörűen expresszálódnak a veleszületett immunrendszer sejtjein, dendritikus sejteken, makrofágokon, természetes ölősejteken (NK-sejtek), az adaptív immunrendszer T- és B-sejtjein, továbbá számos egyéb más testi sejten, mint például epitélisejtek, endotél sejtek és fibroblasztok [57]. Emberben már legalább 10 féle TLR-t azonosítottak, melyek eltérő expresszióval és specificitással rendelkeznek [58]. A TLR-ok a elsődleges védelmi vonalat alkotva a behatoló patogén korai felismerésével hozzájárulnak a hatékony immunválasz kialakulásához. A TLR-ok aktiválódása elősegíti a gyulladáshoz szükséges citokinek, kemokinek és az I-es típusú interferonok termelését és fokozza a kostimuláló molekulák expresszióját az antigénprezentáló sejteken (APC), ezáltal fontos szerepet játszanak az adaptív immunrendszer aktiválásában [59]. Továbbá a TLR-ek érintettek a saját-nem saját struktúrák elkülönítésében illetve a citokintermelés, proliferáció és túlélés szabályozásában [58].

2.4.2 Toll-like receptorok szerepe a szisztémás autoimmun kórképekben

Tekintettel arra, hogy a TLR-ek fontos szereppel bírnak a veleszületett és az adaptív immunrendszer összekapcsolásában, felmerült az az elképzelés, hogy a TLR jelátvitel folyamatos aktivációja vagy nem megfelelő szabályozása hozzájárulhat különböző gyulladásos és autoimmun betegségek kialakulásához [59,60]. Kimutatták, hogy a TLR1-6 expresszálódnak a rheumatoid arthritisben (RA) szenvedő betegek szinoviális fibroblasztjain és szerepet játszhatnak az ízületi gyulladás kialakulásában. SLE-s betegekben a TLR7 és TLR9 megnövekedett expresszióját figyelték meg és azt feltételezik, hogy a TLR7 és TLR9 központi szerepet játszhat az SLE kialakulásában és progressziójában, különösen az SLE két fontos aspektusában, az interferon- α (IFN- α) termelés fokozásában és az autoantitest termelő B-sejtek aktiválásában. Továbbá lupus egérmodellben a TLR7 és TLR9 útvonalak gátlása csökkentette a betegség tüneteit [61].

Számos TLR (TLR3, TLR4 és TLR9) és a TLR4-specifikus koreceptor MD (mieloid differenciációs faktor)-2 emelkedett expresszióját figyelték meg SSc-ben szenvedő betegek bőr és tüdő biopsziás mintáiban, ráadásul szintjük összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és progressziójával. TLR4 hiányos egérben csökkent bőr, tüdő és szív fibrózis képződést figyeltek meg bleomycin kezelést követően [62,63]. A fibroblasztok TLR4-en keresztüli aktivációja a profibrotikus gének expressziójának és a TGF- β profibrotikus hatásának fokozása révén hozzájárul a fibrózis kialakulásához [64]. A metilálatlan citozin-foszfát-guanin oligodeoxinukleotid (CpG) motívumokat felismerő TLR9 megnövekedett expresszióját találták SSc-ben szenvedő betegek bőrbopsziás mintájában és a fibroblasztok TLR9-en keresztüli aktivációja robusztus fibrotikus választ váltott ki [65]. TLR-okon keresztüli szignalizáció gátlása lehetséges terápiás lehetőség lehet az autoimmun betegségek kezelésében [66].

2.4.3 A TLR homológ CD180 molekula

A CD180 vagy RP105 (radioprotective 105 kDa) egy TLR homológ membránprotein, aminek hiányzik az intracelluláris TIR szignalizációs doménja [67]. A CD180 molekulát eredetileg egy B-sejtfelszíni molekulaként azonosították, mely képes poliklonális B-sejt aktivációt, proliferációt és robusztus Ig termelést indukálni [68]. Később leírták, hogy monocitákon és dendritikus sejteken is expresszálódik és a CD180 expressziója korrelál a TLR4 expressziójával. Az MD-1, a CD180 járulékos molekulája homológ a TLR4 MD-2 járulékos

molekulájával, ami felveti a szoros kapcsolatot a CD180 és TLR4 között. A CD180 és az MD-1 segítő molekulája közvetlenül interakcióba lép a TLR4 szignalizációs komplexszel, ezzel meggátolva a mikrobiális ligand bekötődésének lehetőségét, tehát a CD180 a TLR4-válasz negatív regulátoraként működik [67,69].

A B-sejteken lévő CD180 molekula megváltozott expressziója és funkciója kapcsolatban áll számos autoimmun kórképpel [67]. SLE-s és Sjögren szindrómás betegekben a CD180-negatív B-sejtek arányának növekedése figyelhető meg, míg egészséges egyéneknél ritkán található CD180-negatív B-sejt [70,71]. Ráadásul, SLE-ben a betegség súlyossága összefüggést mutatott a CD180-negatív B-sejtek mennyiségével a perifériás vérben [70,72].

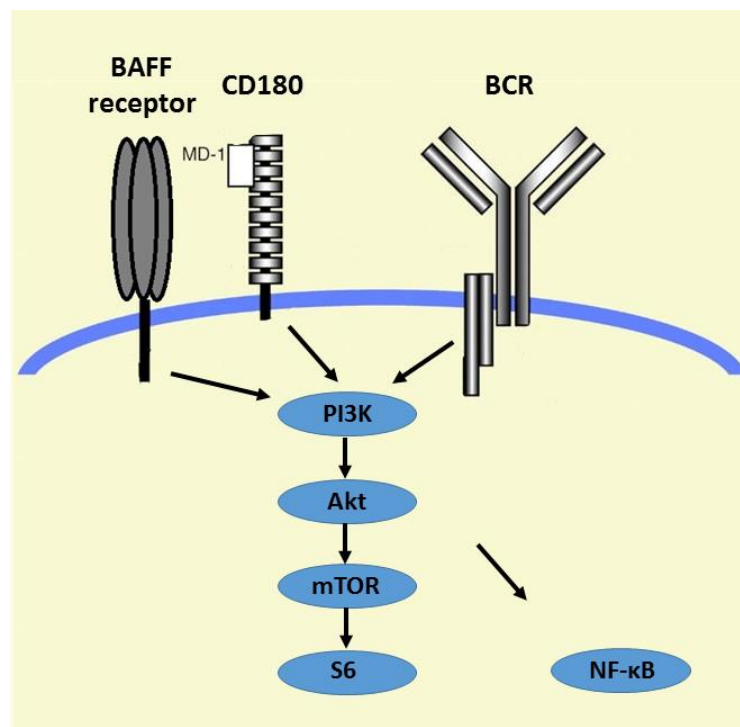
A CD180 molekula természetes ligandja ismeretlen, ezért a CD180 molekulán keresztüli aktiváció vizsgálatához monoklonális anti-CD180 antitestet használnak. Az anti-CD180 antitest képes aktiválni a humán és egér B-sejtek 85 %-át *in vitro* és robosztus Ig termelést kiváltani [68]. Az anti-CD180 antitest egér B-sejteken szinergizál a TLR4 és TLR9 ligandokkal [68]. Anti-CD180 antitest és LPS (TLR4 ligand) vagy CpG együttes adása növelte az egér B-sejtek citokin termelését [73]. TLR9 ligand, CpG és az anti-CD180 antitest együttes adása serkentette a humán perifériás vér B-sejtek proliferációját illetve IgM és IgG antitest termelését [74].

2.5 PI3K/Akt/mTOR szignalizáció

Úgy tűnik, hogy a foszfatidil-inozit-3-kináz (PI3K)/Akt és a mammalian target of rapamycin (mTOR) szignalizációs útvonal kulcsfontosságú szereppel bír az SSc patogenezisében, különösen az SSc két tipikus jellemzőjében, a fibrogenezisben és a B-sejt aktivációban [21,75,76]. PI3K/Akt/mTOR/S6 szignalizáció hiperaktivált állapotát figyelték meg SSc-ben szenvedő betegek bőr fibroblasztjaiban [75] és az útvonal gátlása megakadályozta a TGF- β indukált fibroblaszt növekedést, ezáltal a fibrózis kialakulását bleomycin indukált SSc egérmodellben [75,77,78]. Már felvetették, hogy az mTOR gátló rapamycin lehetséges terápiás szer lehet az SSc kezelésére és egy klinikai tanulmányban a rapamycin kezelés csökkentette az SSc-s betegek bőrpontszámát (MRSS) [79].

Emellett a PI3K/Akt/mTOR útvonal kulcsfontosságú szerepet játszik a B-sejtek aktivációjában, proliferációjában és túlélésében [76,80]. A klasszikus B-sejt receptoron (BCR) és CD19 koreceptoron keresztüli aktivációs szignálok mellett a PI3K a kostimuláló molekulák hatását is integrálja, továbbá a TLR-eken és komplementreceptorokon keresztüli szignálok is a

PI3K-n keresztül hatnak [81–83]. A CD180 molekulán keresztüli stimulációt követően az Akt emelkedett foszforilációját figyelték meg egészséges egyének és B-sejtes krónikus limfocitás leukémiás (B-CLL) betegek B-sejtjeiben [84]. Emellett a PI3K/Akt/mTOR útvonal fontos szerepet játszik a B-sejt aktiváló faktor (BAFF)-mediált B-sejt differenciálódásban és aktiválódásban is [85,86]. A nukleáris faktor κ B (NF- κ B) a PI3K szignalizációs útvonal egyik downstream targetje és a TLR-okon keresztüli szignalizáció az NF- κ B aktivációjához vezet, ami a gyulladásserkentő gének átírásának serkentésével hozzájárul a gyulladás kialakulásához (2. ábra) [87].



2. ábra: A CD180 molekula, a BCR és a BAFF receptorok által is használt PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal sematikus ábrázolása. Az ábrán azokat a fontosabb molekulákat tüntettük fel, melyek az SSc patogenezisében és a B-sejt aktivációban egyaránt fontos szerepet játszhatnak.

2.6 BAFF szignalizáció

A BAFF a tumor nekrozis faktor (TNF) család tagja és fontos szerepet játszik a B-sejtek túlélésében, érésében és homeosztázisában. A BAFF emelkedett szintjét figyelték meg számos autoimmun betegségben, többek között SSc-ben is [88,89]. A megnövekedett mennyiségű

BAFF hozzájárulhat a B-sejt tolerancia felborulásához, azáltal hogy megvédi az alacsonyaffinitású, autoreaktív B-sejteket a pusztulástól, ezáltal hozzájárulhat a szisztémás autoimmun betegségek kialakulásához [90]. BAFF-transzgenikus egérben a BAFF megnövekedett expressziója lupus- és Sjögren-szerű betegséget váltott ki [91]. Az SSc TSK egérmodelljében BAFF antagonistá használata csökkentette a fibrózis kialakulását a bőrben [92]. Bár BAFF elleni autoantitestek jelenlétét leírták egészséges egyéneknél is, feltételezhető, hogy az SLE-s betegekben megfigyelt emelkedett anti-BAFF autoantitestek a BAFF elérhetőségének és aktivitásának szabályzásával hozzájárulhatnak az autoimmun folyamatokhoz [93,94].

A BAFF többféle receptorhoz képes kötődni a B-sejteken, ilyen a BAFF receptor (BAFF-R) és a transzmembrán aktivátor és kalciummodulátor és cyclophilin ligand interaktor (TACI). A BAFF-R a B-sejt homeosztázis pozitív regulátora azáltal hogy a B-sejt fejlődéshez és túléléshez szükséges folyamatos szignált nyújt [95]. A TACI serkenti az Ig izotípusváltást illetve a plazmasejtek differenciációját és túlélését [96]. A BAFF-R a csontvelői plazmasejteken kívül az összes B-sejten expresszálódik, míg a TACI főleg a memória B-sejteken és a plazmasejteken, illetve többnyire az aktivált sejteken expresszálódik, mivel a TACI egy indukálható receptor [91,97]. A TACI expressziója a naiv B-sejteken alacsony, azonban TLR9-en keresztüli stimuláció a TACI expresszió gyors emelkedését idézte elő [98]. SLE-s betegek B-sejtjein csökkent BAFF-R és emelkedett vagy egyenlő TACI expressziót figyeltek meg [99,100]. A TLR szignalizáció befolyásolja a BAFF receptorok expresszióját. A TLR4, TLR7 és TLR9 stimuláció növeli a TACI expresszióját [96,101], a TLR4 és TLR9 stimuláció a BAFF-R expressziójára kifejtett hatása eltérő a tanulmányok között [102,103]. Feltehetőleg a TLR9-en keresztüli aktiváció a TACI expressziójának növelése révén érzékenyebbé teszi a B-sejteket a BAFF hatására emberben és egérben is [101,102].

3 Célkitűzések

Fő célkitűzésünk volt, hogy feltérképezzük a TLR homológ, CD180 molekulán keresztüli B-sejt aktiváció lehetséges szerepét a súlyosabb formájú SSc, a dcSSc patogenezisében.

Konkrét céljaink:

1. A CD180 molekula expressziójának meghatározása korai dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein egészséges egyénekhez viszonyítva.
2. A CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatásának vizsgálata az SSc patogenezisében és a B-sejt aktivációban egyaránt meghatározó szerepet játszó jelátviteli útvonalakhoz kapcsolódó Akt, S6 és NF- κ B molekulák foszforilációjára dcSSc-s betegek B-sejtjeiben egészséges egyénekhez viszonyítva.
3. A BAFF elleni autoantitestek mennyiségének meghatározása dcSSc-ben szenvedő betegek szérummintáiban az egészséges egyénekhez viszonyítva.
4. A BAFF receptorok expressziójának meghatározása dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjein és B-sejt alcsoportjain az egészséges egyénekhez viszonyítva, továbbá annak vizsgálata, hogy a CD180 molekulán keresztüli stimuláció hogyan befolyásolja a BAFF receptorok expresszióját.
5. A CD180 molekulának az SSc patogenezisében betöltött lehetséges szerepének modellezése mandula B-sejtekkel:
 - a. A B-sejtek aktivációjának, citokin és antitesttermelésének vizsgálata mandula B-sejteken.
 - b. Annak vizsgálata, hogy egy másik TLR ligand (CpG) jelenléte hogyan befolyásolja a CD180-on keresztüli stimuláció hatását a B-sejtek ezen funkcióira.

4 Anyag és módszer

4.1 Minták

4.1.1 Perifériás vérminták

Perifériás vér B-sejteken végzett vizsgálatainkhoz a PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinika által gondozott 30 korai dcSSc-ben szenvedő beteg perifériás vérmintáit használtuk fel. Az összes beteg megfelelt az ACR/EULAR által 2013-ban kidolgozott SSc klasszifikációs kritériumrendszernek. A betegek átlagos betegség fennállási ideje 1,73 év volt, a betegség fennállás idő az első nem-Raynaud tünettől lett számítva. A betegek átlagéletkora 48,4 év, átlagos bőrpontszámuk 15,9 volt. Vizsgált betegeink esetében a leggyakoribb belső szervi érintettségek a gyomor- és bélrendszeri érintettség (53,3%), a tüdő érintettség (50%) és a szív érintettség (36,7%) volt. A gyomor és bélrendszeri érintettség meghatározása kontrasztanyagot nyelőcső vizsgálat vagy nyelőcső-gyomortükrözés alapján történt. A tüdőérintettség meghatározása a HRCT-vel igazolt fibrózis jelenléte és/vagy a csökkent FVC alapján történt (FVC <80%). A betegek szívérintettségét a diasztolés diszfunkció vagy a csökkent bal kamrai ejekciós frakció alapján határoztuk meg. Veseérintettségként scleroderma renális krízis került rögzítésre. Mivel az echokardiográfiás és légzésfunkciós vizsgálatokon nem volt PAH-ra utaló jel, a betegeknél nem történt jobb szív fél katéterezés. A vizsgált betegek az immunszuppresszív terápia során mikofenolát mofetil, metotrexát vagy ciklofoszfamid kezelésben részesültek. A betegek részletes adatait a 2. táblázat tartalmazza. A kontrollcsoportot 36 korban és nemből illesztett egészséges egyén alkotta. A vérminták standard eljárás szerint, EDTA tartalmú vákuumcsövekbe történő levétel után kerültek feldolgozásra. Minden résztvevő előzetes tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (ETT TUKEB 47861-6/2018/EKU).

2. táblázat: A betegek klinikai adatai

Általános jellemzők	dcSSc (n = 30)
Életkor (év), átlag (SD)	48,43 (16,3)
Nem (nő), n (%)	22 (73,3%)
Betegség időtartama (év), átlag (SD)	1,73 (0,9)
Szervi érintettség	
MRSS, átlag (SD)	15,90 (11,1)
Tüdő fibrózis, n (%)	15/30 (50 %)
PAH, n (%)	0/30 (0%)
Renális krízis, n (%)	1/30 (3,3%)
Gasztrointesztinális érintettség, n (%)	16/30 (53,3%)
Szív érintettség, n (%)	11/30 (36,7%)
Antitestek	
Anti-Scl-70+, n (%)	9/30 (30%)
Anti-RNS pol III +, n (%)	4/30 (13,3%)
Immunszuppresszív kezelés, n (%)	13/30 (43,3%)

4.1.2 Mandula minták

Vizsgálataink egy részéhez mandula mintákat használtunk fel, melyek a PTE KK Gyermekgyógyászati Klinikán rutin torokmandula műtéten átesett tünetmentes gyermekektől származtak. A mandulák műtéti eltávolítását követően még aznap lettek feldolgozva. A mandulákat először manuálisan homogenizáltuk, majd a keletkezett sejtszuszpenziót 70 µm-es szűrőn szűrtük át. Minden résztvevő törvényes képviselője előzetes tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatokhoz. A vizsgálatot a Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyezte (RIKEB 7724-PTE 2019).

4.2 Mononukleáris sejtek izolálása és a B-sejtek szeparálása

A perifériás vérmintákból illetve az átszűrt mandula sejtszuszpenzióból a mononukleáris sejtek izolálása Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) sűrűséggrádiens-

centrifugálással történt. A B-sejtek mágneses gyöngy alapú negatív szeparálása a MACS B cell isolation kit II (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) segítségével történt a gyártói protokoll alapján. A tisztítás után a B-sejtek tisztasága > 95% volt.

4.3 Sejtek stimulálása

4.3.1 Perifériás vér B-sejtek stimulálása

A perifériás vér B-sejteken végzett vizsgálatainkban stimulálatlan kontroll és anti-CD180 antitest stimulált kondíciókat vizsgáltunk. A sejtek stimulálásához LEAF Purified anti-human CD180 (RP105) antitestet (Klón: MHR73-11) (BioLegend, San Diego, CA, USA) (a továbbiakban anti-CD180 antitest) használtunk 1 µg/ml koncentrációban.

4.3.2 Mandula B-sejtek stimulálása

A mandula B-sejteken végzett vizsgálatainkban stimulálatlan kontroll, anti-CD180 antitest stimulált, CpG stimulált, CpG+anti-CD180 antitest stimulált kondíciókat vizsgáltunk. A sejtek stimulálásához a fentebb ismertetett anti-CD180 antitestet 1 µg/ml koncentrációban és 1 µg/ml CpG-t (Hu/Ms CpG-B DNA, ODN2006, Hycult Biotech) használtunk.

4.4 RNS izolálás, cDNS szintézis és qPCR

Az izolált B-sejtekből az RNS kivonása a NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA, USA) használatával, a komplementer DNS-ek (cDNS) létrehozása a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) segítségével a gyártói utasításokat követve történt. A vizsgált molekulák mRNS expressziójának meghatározásához SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit-et (Bioline, London, UK) használtunk. Az amplifikáció végrehajtása az Applied Biosystems 7500 RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével történt. A génexpressziót a 7500 Software v2.0.6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével analizáltuk és egy háztartási génre, a Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenázra (GAPDH) normáltuk. A

vizsgált gének expressziójának kiszámítása a 2-ddC_T módszer alapján történt (Relatív kvantifikálás-RQ).

4.4.1 CD180 mRNS expresszió meghatározása

A mandula B-sejtek (n=4) CD180 mRNS expresszió vizsgálatához 3*10⁵ sejt volt stimulálva vagy maradt stimulálatlan 24 órán keresztül 37°C-on.

A B-sejtek CD180 mRNS expressziójának meghatározásához a következő primer szekvenciákat használtuk: CD180 (Forward) 5'-TCT GGC TGC CAA CAG CAT TA-3' CD180 (Reverse) 5'-ATT CGA GCA AGT GCA GTC CA-3', GAPDH (Forward) 5'-ATT CCA TGG CAC CGT CAA GG-3', GAPDH (Reverse) 5'-TCG CCC CAC TTG ATT TTG GA-3'.

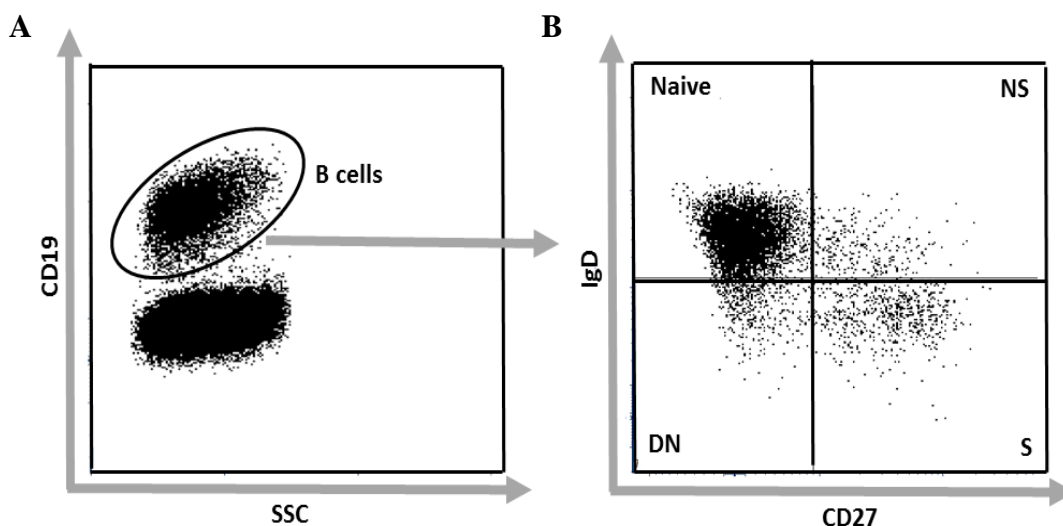
4.4.2 BAFF-R mRNS expresszió meghatározása

A B-sejtek BAFF-R mRNS expressziójának meghatározásához a következő primer szekvenciákat használtuk: BAFF-R (Forward) 5'- GCA GAA ATA AGC GTG CCG TT-3' BAFF-R (Reverse) 5'- AGT TGG TGT TTC ACT GTC TGC-3' GAPDH (Forward) 5'-ATT CCA TGG CAC CGT CAA GG-3', GAPDH (Reverse) 5'-TCG CCC CAC TTG ATT TTG GA-3'.

4.5 Áramlási citometriás vizsgálatok

4.5.1 A B-sejt alcsoportok azonosítása

Áramlási citometriás vizsgálataink során a B-sejtek azonosítása a CD19 sejtvonal marker alapján történt (3.A ábra). A CD19+ B-sejteken belül a CD27 és IgD markerek segítségével a következő 4 B-sejt alcsoportot különítettünk el: CD27+IgD+ non-switched memória (NS), CD27+IgD- switched memória (S), CD27-IgD- kettős negatív (DN) és CD27-IgD+ naiv B-sejtek (3.B ábra).



3. ábra: Kapuzási stratégia a B-sejt alcsoportok azonosításához. (A) A CD19+ B-sejtek azonosítása. (B) A CD19+ B-sejteken belül a CD27 és IgD jelölés alapján a következő B-sejt alcsoportok elkülönítése: CD27+IgD+ non-switched memória (NS), CD27+IgD-switched memória (S), CD27-IgD- kettős negatív (DN) és CD27-IgD+ naiv B-sejtek.

4.5.2 A CD180 fehérje expresszió meghatározása dcSSc-s és HC B-sejteken

A dcSSc-s és egészséges kontroll (HC) B-sejtek CD180 expressziójának meghatározásához $5 \cdot 10^5$ PBMC-t jelöltünk anti-humán AmCyan konjugát CD19 (SJ25C1, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) és fikoeritrin (PE) konjugált CD180 (G28-8, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) antitestekkel. A jelölés során a gyártói utasítás szerint jártunk el, miszerint a sejteket 30 percig inkubáltuk jégen a megfelelő antitest kombinációkkal, majd kétszer mostuk PBS oldattal (Foszfáttal pufferolt sóoldat), majd FACSFIX pufferben (0.5% PFA-PBS) fixáltuk. A jelölt sejtek fluoreszcenciáját FACS Calibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) mértük és az FCS Express 6 szoftverrel (De Novo Software, Pasadena, CA, USA) analizáltuk.

4.5.3 A BAFF-R és TACI expresszió meghatározása dcSSc-s és HC B-sejteken

A BAFF-R és TACI expresszió meghatározásához a dcSSc-s és HC perifériás vér B-sejteken és B-sejt alcsoportokon, $5 \cdot 10^5$ PBMC sejtet stimuláltunk vagy maradt stimulálatlan 24 órán keresztül 37°C -on, majd a következő antitest kombinációkkal jelöltük: anti-humán PE konjugált CD19 (SJ25C1, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), PerCP konjugált IgD (IA6-2, BioLegend, San Diego, CA, USA), APC konjugált CD27 (M-T271, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), FITC konjugált CD27 (L128, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), FITC konjugált BAFF-R (CD268) (11C1, BioLegend, San Diego, CA, USA) és APC konjugált TACI (CD267) (1A1, BioLegend, San Diego, CA, USA). A sejtfelszíni jelölés során a 4.5.2. fejezetben leírt protokoll szerint jártunk el.

4.5.4 Mandula B-sejtek áramlási citometriás vizsgálata

A mandula B-sejtek multiparaméteres áramlási citometriás vizsgálatához $3 \cdot 10^5$ B-sejtet stimuláltunk vagy maradt stimulálatlan 24 órán keresztül 37°C -on, majd a következő antitestek kombinációjával jelöltük: anti-humán CD19 konjugált AmCyan (SJ25C1, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), PE/Cy7 konjugált CD27 (M-T271, BioLegend, San Diego, CA, USA), PerCP konjugált IgD (IA6-2, BioLegend, San Diego, CA, USA), PE konjugált CD180 (G28-8, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) és APC/Cy7 konjugált CD69 (FN50, BioLegend, San Diego, CA, USA). A sejtfelszíni jelölés során a 4.5.2. fejezetben leírt protokoll szerint jártunk el.

4.5.5 Jelátviteli molekulák foszforilációjának vizsgálata dcSSc-s és HC B-sejtekben

A dcSSc-s és HC B-sejtekben az Akt, S6 és NF- κ B foszforilációjának vizsgálatához kondícióként $2 \cdot 10^5$ szeparált B-sejtet tettünk ki 96 lyukú lemez lyukjaiba FBS mentes RPMI médiumban és 37°C -on 1 órán át pihentettük a sejteket. Ezt követően a sejteket anti-CD180 antitesttel stimuláltuk vagy maradtak stimulálatlanul 30 percig 37°C -on. A foszforilációs vizsgálatok a BD Phosflow Protokoll alapján a BD Cytifix Fixation Buffer és a BD Perm III Buffer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) használatával végeztük el. A stimulálást

követően a sejteket azonnal fixáltuk az előmelegített Cytifix Fixation Buffer-rel 10 percig 37°C-on. Mosást követően, a sejtek permeabilizálásához 30 percig inkubáltuk a sejteket jégen előhűtött Perm Buffer III oldattal. Újabb mosást követően a következő antitestekkel jelöltük a sejteket: anti-humán Alexa Fluor488 konjugált Akt (pS473) (M89-61, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), Alexa Fluor647 konjugált S6 (pS235/pS236) (N7-548, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) és PE konjugált NF-κB p65 (pS529) (K10-895.12.50, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubálást követően újra mostuk a sejteket és végül a sejtek azonnal fixálás nélkül kerültek lemérésre FACS Calibur áramlási citométer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) használatával. Az analízis az FCS Express 6 szoftver (De Novo Software, Pasadena, CA, USA) segítségével történt.

4.6 ELISA mérések

4.6.1 Mandula B-sejtek citokin termelésének mérése

A mandula B-sejtek citokin termelésének vizsgálatához $3 \cdot 10^5$ B-sejtet stimuláltunk vagy maradt stimulálatlan 24 órán keresztül 37 °C-on, majd a sejtek felülúszóiból mértük a termelt citokinek mennyiségét. A felülúszók tárolása a felhasználásig -80°C-on történt. Az IL-10 és IL-6 termelést Human IL-10 és IL-6 DuoSet ELISA kitékkel (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) mértük a gyártói protokoll alapján.

4.6.2 Mandula B-sejtek természetes autoantitest termelésének mérése

A mandula B-sejtek természetes autoantitest termelésének vizsgálatához $4 \cdot 10^5$ B-sejtet stimuláltunk vagy maradt stimulálatlan 7 napon keresztül 37°C-on, majd a sejtek felülúszóiból mértük az anti-CS IgM és az anti-topo I (F4 fragmens) IgM autoantitestek szintjét házi ELISA tesztekkel. [49,54]. A felülúszók tárolása a felhasználásig -80°C-on történt.

4.6.2.1 Az anti-citrát szintáz IgM autoantitest mérése

A CS elleni autoantitestek méréséhez 96 lyukú Nunc MaxiSorp™ ELISA lemezt érzékenyítettük sertésszívből származó CS antigénnel (SigmaMerck C3260) 4.5 µg/ml koncentrációban bikarbonát pufferben és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Másnap 0.05% Tween 20 tartalmú PBS oldattal történő mosást követően zselatin oldattal blokkoltuk a lemezt 1 órán át szobahőmérsékleten. A mosás után kerültek fel a lemezre a felülűszók hígítatlanul és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Újabb mosást követően a lemezt 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten HRPO konjugált anti-humán IgM specifikus másodlagos antitesttel (Dako). Majd a mosást követően a reakció kimutatásához 15 percig inkubáltuk 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) szubsztráttal (Orgentec), majd a színreakció leállítására H₂SO₄ STOP oldattal (Orgentec) történt. Az eredmény detektálása 450 nm-en iEMS MF mikrofotométer (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA) segítségével történt.

4.6.2.2 Az anti-topoizomeráz I (F4) IgM autoantitest mérése

A DNS topo I F4 fragmense elleni autoantitestek méréséhez 96 lyukú Nunc MaxiSorp™ ELISA lemezt érzékenyítettük a rekombináns F4-MBP antigénnel és az MBP-vel 10 µg/ml koncentrációban PBS oldatban és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Másnap 0.05% Tween 20 tartalmú PBS oldattal történő mosást követően 3%-os BSA oldattal blokkoltuk a lemezt 1 órán át szobahőmérsékleten. A mosás után kerültek fel a lemezre a felülűszók hígítatlanul és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Újabb mosást követően a lemezt 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten HRPO konjugált anti-humán IgM specifikus másodlagos antitesttel (Dako). Majd a mosást követően a reakció kimutatásához 15 percig inkubáltuk TMB szubsztráttal (Orgentec), majd a színreakció leállítására H₂SO₄ STOP oldattal (Orgentec) történt. Az eredmény detektálása 450 nm-en iEMS MF mikrofotométer (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA) segítségével történt.

4.7 Luminex MAGPIX mérés

A dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok szérummintáiban a BAFF elleni autoantitestek szintjének (átlagos fluoreszcencia intenzitás-MFI) meghatározása MILLIPLEX Map Human Cytokine Autoantibody Panel (HCYTAAB-17K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) használatával történt a gyártói utasítások alapján. A mérés a Luminex MAGPIX készülék (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) használatával, az adatok kiértékelése a Belysa Immunoassay Curve Fitting Software (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) segítségével történt.

4.8 Statisztikai analízis

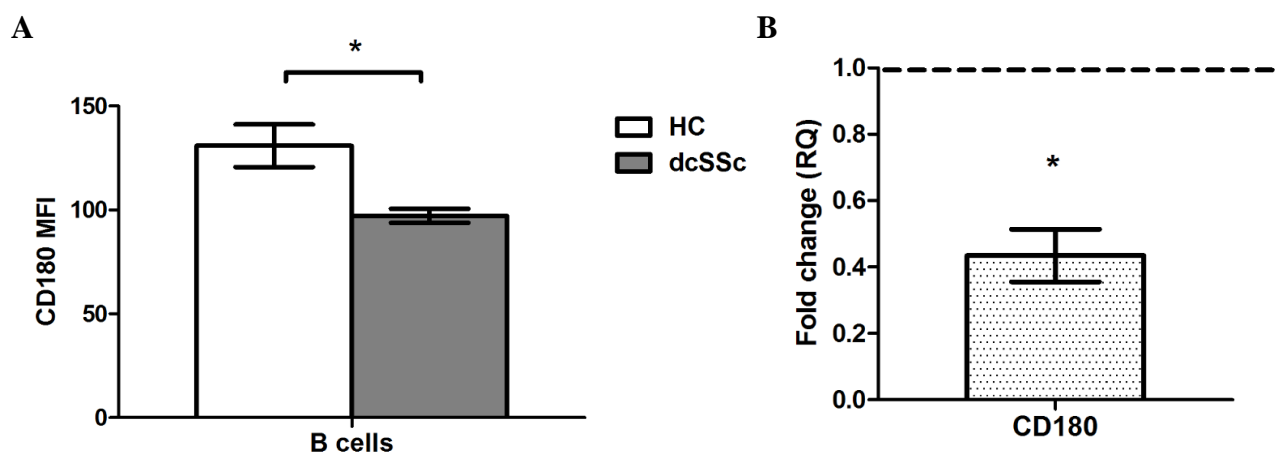
Az eredmények statisztikai analízisét a SPSS v. 25.0 statisztikai szoftverrel (IBM, Armonk, NY, USA) szoftverrel végeztük. Az adatokkal normalitás vizsgálatot végeztünk a Shapiro-Wilk teszttel, melyet követően a normál eloszlású adatainkat kétmintás t-próba segítségével, nem-normál eloszlású adatainkat pedig Mann-Whitney U-teszttel elemeztük, ahol a statisztikailag szignifikáns különbségnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük. Az eredmények ábrázolása a Graphpad Prism 5 szoftverrel (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) történt. A normál eloszlású adatok ábrázolásakor az adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM), míg a nem-normál eloszlású adatok ábrázolásakor a minimum, maximum és medián értékeket valamint az interkvartilis terjedelmet (IQR) jelenítettük meg.

5 Eredmények

5.1 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatásának vizsgálata dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein

5.1.1 A CD180 molekula expressziójának vizsgálata dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein

A B-sejtek megváltozott CD180 expresszióját figyelték meg bizonyos autoimmun kórképekben [67], ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e a különbség a korai dcSSc-ben szenvedő betegek és az egészséges egyének CD180 expressziójában. Ehhez áramlási citometriás vizsgálattal megmértük a CD180 molekula expressziós szintjét (MFI) a dcSSc-ben szenvedő betegek és az egészséges kontrollok perifériás véréből származó B-sejtekben és a CD180 molekula csökkent expresszióját figyeltük meg a dcSSc-s betegekben az egészséges egyénekhez viszonyítva (4.A ábra). Megvizsgálva a CD180 mRNS expresszióját tisztított B-sejtekben hasonló eredményt kaptunk, a CD180 molekula csökkent expresszióját figyeltük meg mRNS szinten is a dcSSc-s betegek B-sejtjeiben az egészséges egyénekhez viszonyítva (4.B ábra).



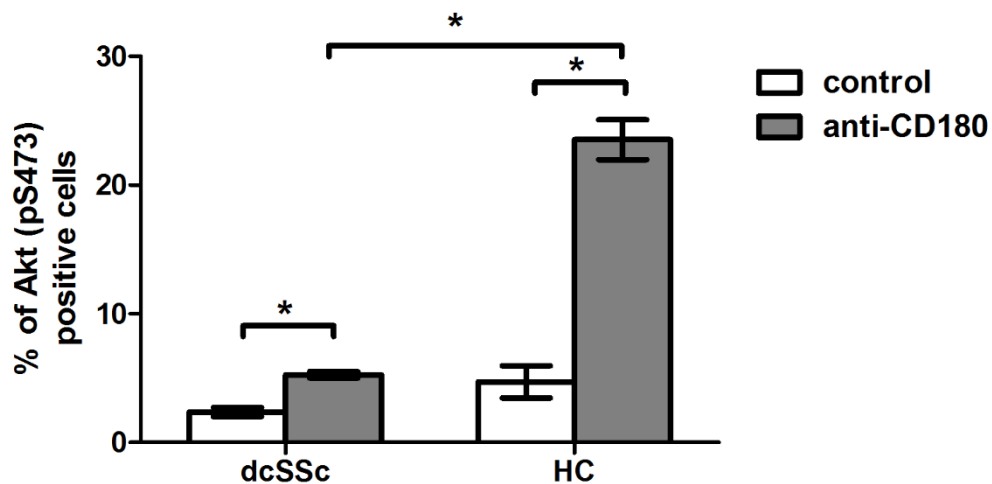
4. ábra: A CD180 expresszió vizsgálata dcSSc-ben (A) A perifériás vér B-sejtek CD180 expressziójának áramlási citometriás vizsgálata dcSSc-ben szenvedő betegekben egészséges egyénekhez viszonyítva. (B) A CD180 mRNS expressziója dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben az egészséges egyénekhez viszonyítva. A

génexpressziós változások az egészséges kontroll mintákhoz vannak hasonlítva (RQ érték). A vízszintes vonal (1-es érték) jelzi a kontroll minták CD180 expresszióját. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 4 és HC n = 4, * p<0,05.

5.1.2 A CD180 ligáció hatásának vizsgálata a PI3K/Akt/mTOR szignalizációra dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben

5.1.2.1 A CD180-on keresztüli stimuláció kisebb mértékben növeli az Akt foszforilációját a B-sejtjeiben dcSSc-ben, mint az egészséges egyéneknél

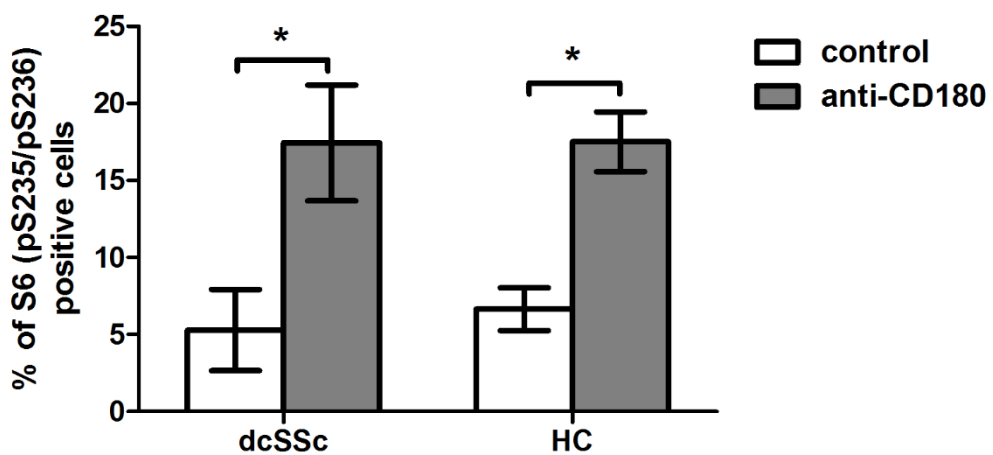
A PI3K útvonal fontos szerepet játszik az SSc számos aspektusában, ezért először megvizsgáltuk a PI3K egyik domináns effektor molekulájának, az Akt-nak a foszforilációját. Az anti-CD180 antitesttel történő stimulálás jelentősen növelte a foszforilált Akt (pS473)-pozitív B-sejtek arányát dcSSc-ben és HC-ban is, azonban dcSSc-ben jelentősen kisebb mértékben, mint a HC-ban (5. ábra).



5. ábra: A CD180 ligáció az Akt foszforilációjára gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok szeparált B-sejtjeiben. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 6 és HC n = 7, * p<0,05.

5.1.2.2 Az S6 foszforilációjában nincs különbség dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok B-sejtjeiben

A PI3K/Akt egyik fontos effektor molekulája az mTOR, az S6 pedig az mTOR egyik szubsztrátja, megmértük az S6 foszforilációjának változását is CD180-on keresztüli aktiváció hatására. Anti-CD180 antitesttel történő kezelés dcSSc-ben és HC-ban is növelte a foszforilált S6 (pS235/pS236)-pozitív B-sejtek arányát, azonban nem találtunk különbséget az S6 foszforilációjában dcSSc és HC között (6. ábra).

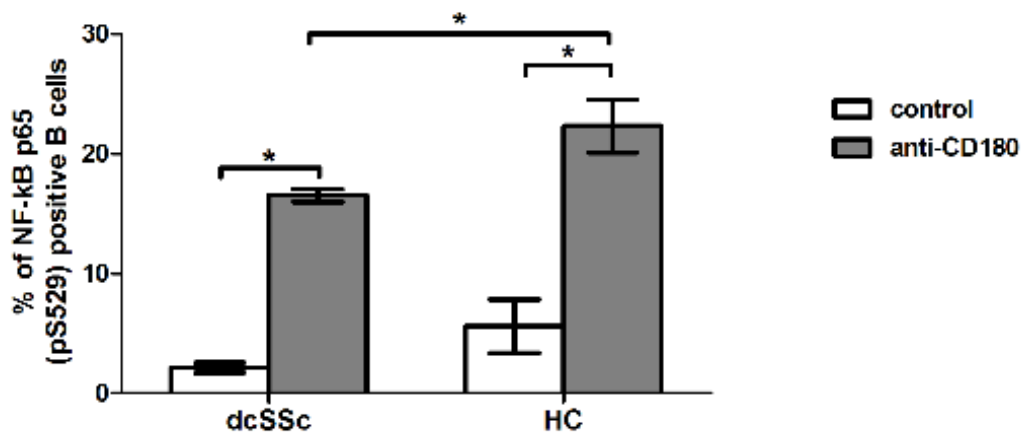


6. ábra: Anti-CD180 antitesttel történő kezelés hatásának vizsgálata áramlási citometriával az S6 foszforilációjára dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok szeparált B-sejtjeiben. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 6 és HC n = 7, * p < 0,05.

5.1.2.3 A B-sejtek NF- κ B foszforilációját kevésbé növelte az anti-CD180 antitest kezelés dcSSc-ben, mint az egészséges egyéneknél

Az NF- κ B egy fontos központi útvonal, mely számos más jelátviteli útvonallal áll kapcsolatban, köztük a PI3K/Akt/mTOR útvonallal is [87], ezért megvizsgáltuk a CD180 ligáció hatását az NF- κ B foszforilációjára is. Anti-CD180 antitesttel történő stimulálás jelentősen növelte a foszforilált NF- κ B p65 (pS529)-pozitív sejtek arányát dcSSc-ben szenvedő

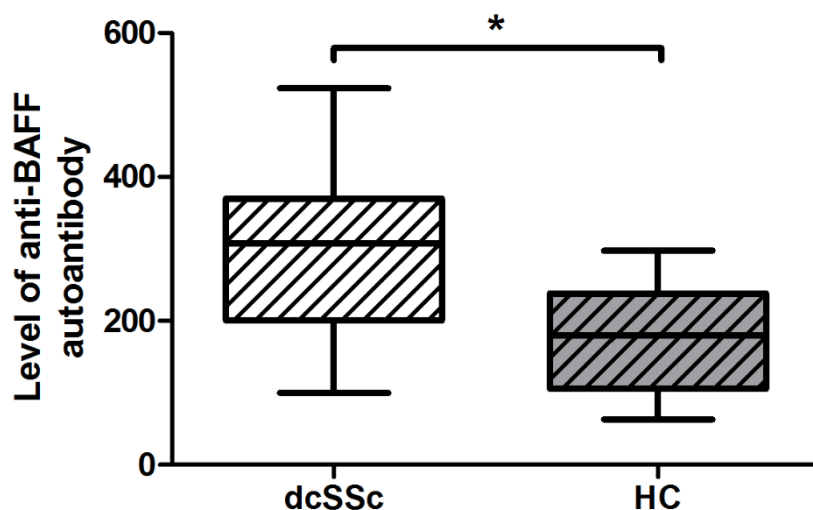
beteg és egészséges kontrollok B-sejtjeiben is, de dcSSc-ben jelentősen kisebb mértékben, mint HC-ban (7. ábra).



7. ábra: A CD180 molekulán keresztüli aktiváció hatásának vizsgálata áramlási citometriával az NF-κB foszforilációjára dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok szeparált B-sejtjeiben. Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 5 és HC n = 4, * p<0,05.

5.1.3 Anti-BAFF autoantitestek mérése dcSSc-ben szenvedő betegek szérummintáiban

A BAFF a PI3K/Akt/mTOR/S6 útvonalon keresztül is kifejti a hatását [91] és a BAFF megnövekedett szintje hozzájárulhat a B-sejtek diszfunkciójához SSc-ben [88]. A BAFF ellen irányuló autoantitestek befolyásolhatják a BAFF hatékonyságát [93], ezért megmértük a BAFF elleni autoantitestek szintjét (MFI) dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok szérummintáiban. Az anti-BAFF autoantitestek szintje szignifikánsan magasabb volt a dcSSc-ben szenvedő betegekben, mint az egészséges kontrollokban (8. ábra).



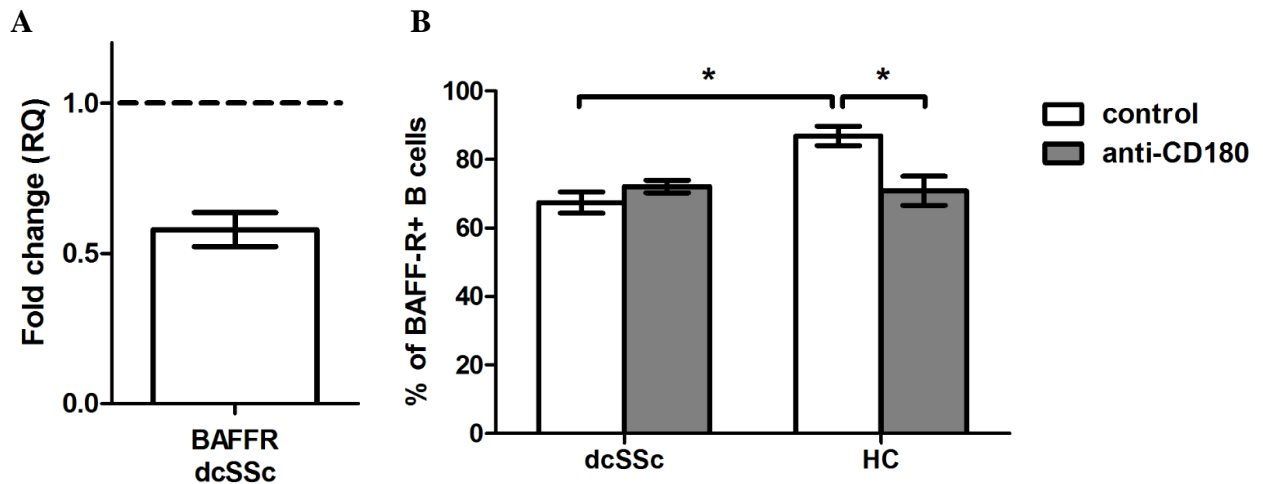
8. ábra: Az anti-BAFF autoantitestek mennyiségének meghatározása dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok szérumban. Az adatok ábrázolásakor a minimum, maximum és medián értékeket valamint az IQR-t jelenítettük meg, dcSSc n=20 és HC n=21, * $p < 0.05$.

5.1.4 A CD180-on keresztüli B-sejt stimuláció BAFF receptorok expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata

5.1.4.1 Anti-CD180 antitesttel történő kezelés a dcSSc-ben szenvedő betegekben megfigyelt szintre csökkenti a BAFF-R expresszióját egészséges egyének B-sejtjein

Ezt követően megvizsgáltuk a BAFF-R expresszióját mRNS és fehérje szinten a dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges egyének B-sejtjeiben. A BAFF-R mRNS csökkent expresszióját figyeltük meg dcSSc-ben szenvedő betegek szeparált B-sejtjeiben az egészségesekhez viszonyítva valós idejű PCR-technikával (9.A ábra). Majd a dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok PBMC mintáinak áramlási citometriás vizsgálatával meghatároztuk a BAFF-R fehérje expresszióját a B-sejtekben és az mRNS szintű vizsgálattal megegyező eredményt kaptunk, a BAFF-R fehérje szintje is jelentősen alacsonyabb volt dcSSc-ben az egészséges egyénekhez viszonyítva (9.B ábra).

Ismert, hogy a TLR-ok befolyásolják a BAFF receptorok expresszióját, ezért megvizsgáltuk, hogy a B-sejtek CD180-on keresztüli stimulációja hogyan hat a BAFF-R expressziójára. A CD180 ligációja az egészséges kontrollokban lecsökkentette a BAFF-R pozitív sejtek arányát dcSSc-ben szenvedő betegek stimulálatlan és anti-CD180 antitest stimulált B-sejtjeiben megfigyelt szintekre, míg a dcSSc-s B-sejtek BAFF-R expressziójára nem volt hatással (9.B ábra).

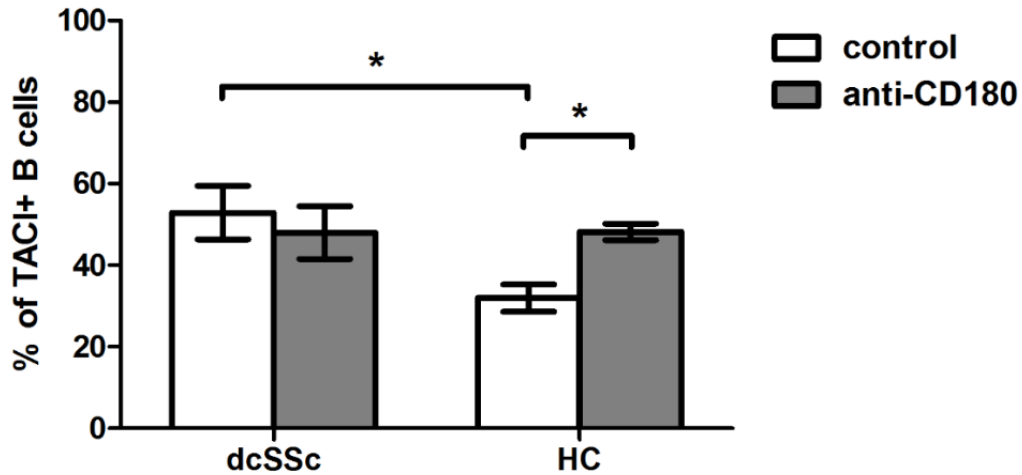


9. ábra: A B-sejtek BAFF-R expressziójának vizsgálata dcSSc-ben és HC-ban. (A) A BAFF-R mRNS expressziója dcSSc-s B-sejtekben (n=3) az egészséges kontrollokhoz (n=3) viszonyítva. A génexpressziót az egészséges kontrollokra normáltuk (RQ érték) és a horizontális vonal (1-es érték) reprezentálja a kontroll mintákat. (B) A BAFF-R fehérje expressziójának áramlási citometriás vizsgálata a stimulálatlan és anti-CD180 antitest stimulált dcSSc-s és HC B-sejteken. Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 4 és HC n = 4, * p<0,05.

5.1.4.2 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció a dcSSc-ben szenvedő betegekben megfigyelt szintre növeli a TACI expresszióját egészséges egyének B-sejtjein

Ismert, hogy a BAFF több receptoron keresztül is hat a B-sejteken, ezért megnéztük egy másik BAFF kötő receptor, a TACI expresszióját is a dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges egyének B-sejtjeiben. A TACI-pozitív sejtek aránya jelentősen magasabb volt a stimulálatlan dcSSc-s B-sejtekben, mint HC-ban. Az anti-CD180 antitesttel történő kezelés a

dcSSc-s B-sejtek TACI expresszióját nem befolyásolta, azonban az egészséges kontrollok B-sejtjeiben jelentősen növelte a TACI expresszióját, ami elérte a dcSSc-ben szenvedő betegek stimulálatlan és anti-CD180 antitesttel stimulált B-sejtjeiben megfigyelt szinteket (10. ábra).



10. ábra: Az anti-CD180 antitesttel történő kezelés hatásának vizsgálata áramlási citometriával a B-sejtek TACI expressziójára dcSSc-ben és HC-ben. Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 4 és HC n = 4, * p<0,05.

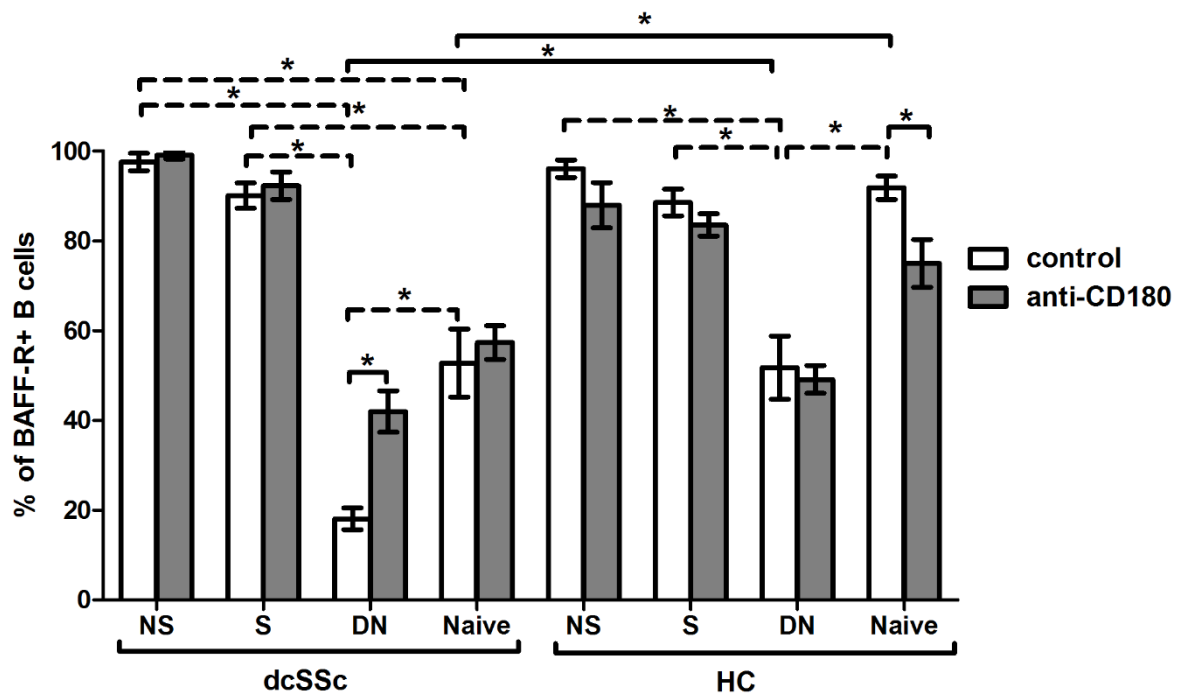
5.1.4.3 Az egészséges kontrollok naiv B-sejtjen megfigyelt magasabb BAFF-R expressziót az anti-CD180 antitest kezelés lecsökkentette a dcSSc-ben szenvedő betegek naiv B-sejtjein megfigyelt szintre

Mivel a BAFF-R csökkent expresszióját figyeltük meg dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben az egészséges egyénekhez viszonyítva, megvizsgáltuk a B-sejt alcsoportok BAFF-R expresszióját. A CD27 és IgD jelölés alapján azonosított 4 B-sejt alcsoportot vizsgáltunk: CD27+IgD+ NS, CD27+IgD- S, CD27-IgD- DN és CD27-IgD+ naiv B-sejtek.

Összehasonlítva a dcSSc-s és HC B-sejt alcsoportok BAFF-R expresszióját, a naiv és DN B-sejtek esetében jóval alacsonyabb volt a BAFF-R expressziója dcSSc-ben, mint HC-ban. Összehasonlítva a stimulálatlan B-sejt alcsoportok BAFF-R expresszióját a vizsgált csoportokon belül, a DN B-sejtekben volt a legalacsonyabb a BAFF-R pozitív sejtek aránya a többi alcsoporthoz viszonyítva dcSSc-ben és HC-ban is. Jelentősen csökkent BAFF-R

expressziót figyeltünk meg a DN és naiv sejtekben a memória sejtekhez viszonyítva dcSSc-ben illetve a DN B-sejtekben a memória és naiv sejtekhez viszonyítva HC-ban.

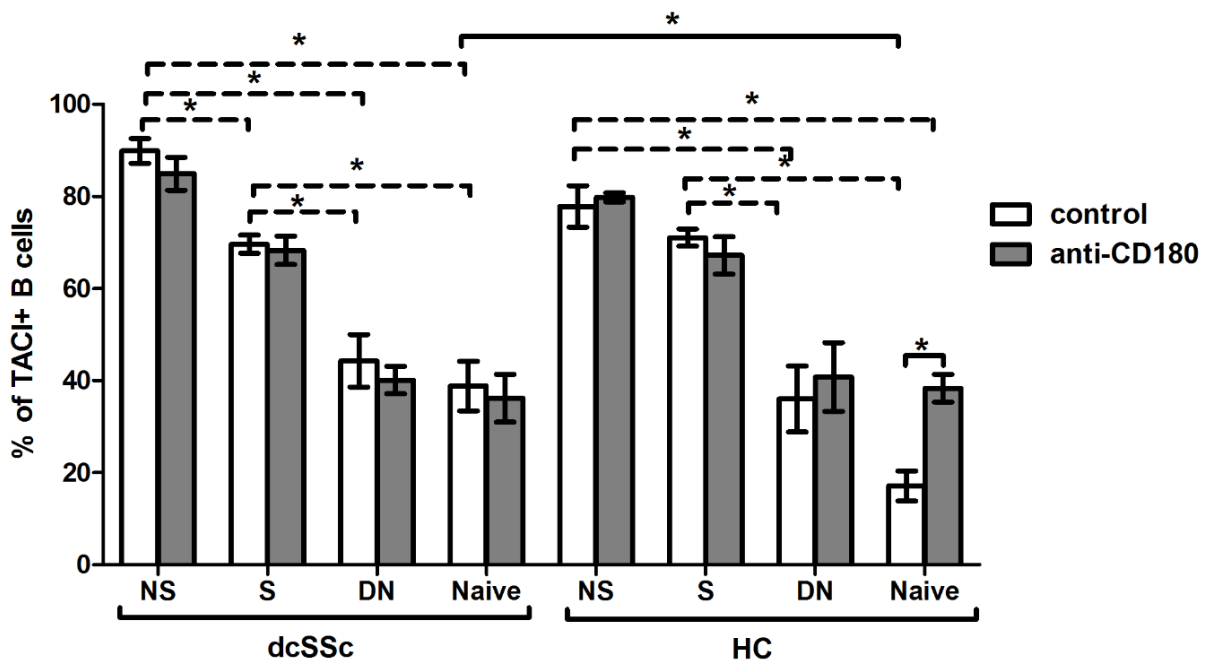
Ezt követően megvizsgáltuk az anti-CD180 antitest stimulálás hatását a B-sejt alcsoportok BAFF-R expressziójára és azt tapasztaltuk, hogy a CD180 ligációja a dcSSc-ben szenvedő betegek DN B-sejtjeiben jelentősen növelte, míg a HC naiv B-sejtjeiben szignifikánsan csökkentette a BAFF-R pozitív sejtek arányát. Összehasonlítva a dcSSc-ben szenvedő betegeket és egészséges kontrollokat az anti-CD180 antitest kezelést követően, nem találtunk különbséget a vizsgált B-sejt alcsoportok BAFF-R expressziójában (11. ábra).



11. ábra: A CD180 stimuláció hatásának vizsgálata a B-sejt alcsoportok BAFF-R expressziójára dcSSc-ben és HC-ban. A BAFF-R+ sejtek arányát a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított 4 B-sejt alcsoportban határoztuk meg: CD27+IgD+ NS, CD27+IgD- S, CD27-IgD- DN és CD27-IgD+ naiv B sejt alcsoport. A folytonos vonal a dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok közötti, illetve a stimulálatlan és anti-CD180 antitest stimulált kondíciók közötti szignifikáns különbségeket jelzi, míg a szaggatott vonal a csoportokon belül a stimulálatlan B-sejt alcsoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatja. Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 4 és HC n = 4, * p<0,05.

5.1.4.4 Az egészséges kontrollok naiv B-sejtjein megfigyelt magasabb TACI expressziót az anti-CD180 antitest kezelés a dcSSc-ben szenvedő betegek naiv B-sejtjein megfigyelt szintre növelte

Mivel a TACI emelkedett expresszióját figyeltük meg dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben az egészséges egyénekhez viszonyítva, megvizsgáltuk a korábban ismertetett 4 vizsgált B-sejt alcsoport (NS, S, DN, naiv) TACI expresszióját. A TACI expressziójában a naiv B-sejtek esetében találtunk különbséget dcSSc és HC között, dcSSc-ben jelentősen magasabb volt a TACI-pozitív sejtek gyakorisága, mint HC-ban. Összehasonlítva a stimulálatlan B-sejt alcsoportok TACI expresszióját a vizsgált csoportokon belül azt tapasztaltuk, hogy a TACI-pozitív sejtek aránya magasabb volt a memória B-sejtekben, különösen az NS B-sejtekben, a DN és naiv sejtekhez viszonyítva dcSSc-ben és HC-ban is. Anti-CD180 antitesttel történő stimulálást követően csak a HC naiv sejtek esetében láttunk különbséget, ahol a CD180 ligáció jelentősen növelte a TACI szintjét (12. ábra).



12. ábra: A B-sejt alcsoportok TACI expressziójának változása CD180 ligáció hatására dcSSc-ben és HC-ban. A TACI+ sejtek arányát vizsgáltuk a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított 4 B-sejt alcsoportban: CD27+IgD+ NS, CD27+IgD- S, CD27-IgD- DN és CD27-IgD+ naiv B sejt alcsoport. A folytonos vonal a dcSSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok közötti, illetve a stimulálatlan és anti-CD180 antitest stimulált kondíciók közötti szignifikáns különbségeket jelzi, míg a szaggatott vonal a

csoportokon belül a stimulálatlan B-sejt alcsoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatja. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, dcSSc n = 4 és HC n = 4, * p<0,05.

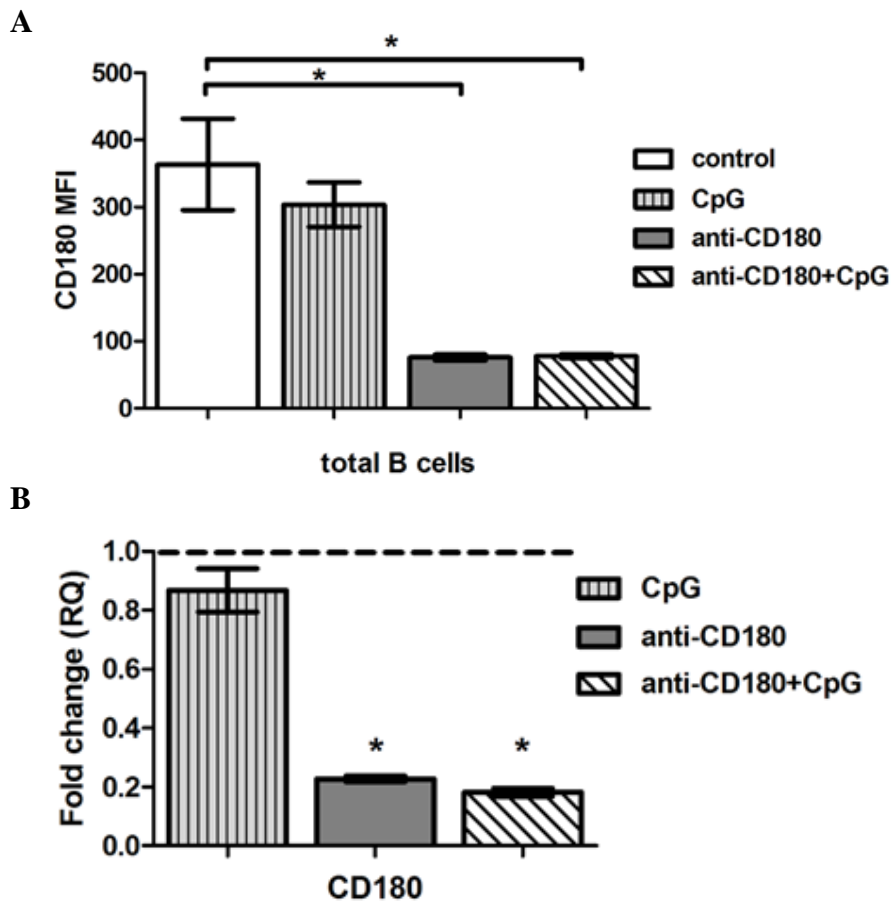
5.2 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatásának vizsgálata a B-sejtfunkciókra mandula B-sejteken

A dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein végzett vizsgálataink alapján feltételeztük, hogy a CD180 molekulának szerepe lehet az SSc patogenezisében. A CD180 molekulán keresztüli stimuláció B-sejt funkciókra gyakorolt további hatásainak vizsgálatához mandula B-sejteket használtunk, mint modell. Egyúttal megvizsgáltuk azt is, hogy egy másik TLR-en keresztüli szimultán stimuláció hogyan befolyásolja az anti-CD180 antitest B-sejt funkciókra kifejtett hatásait.

5.2.1 Az anti-CD180 antitest kezelés csökkenti a B-sejtek CD180 expresszióját

A CD180-negatív sejteket aktivált sejt-ként írták le SLE-ben és tudjuk, hogy az anti-CD180 antitest képes aktiválni a B-sejteket, továbbá, hogy a TLR agonisták képesek csökkenteni a CD180 mRNS expresszióját, ezért feltételeztük, hogy a dcSSc-s B-sejteken megfigyelt csökkent CD180 expresszió a TLR-eken keresztüli aktiváció következménye lehet.

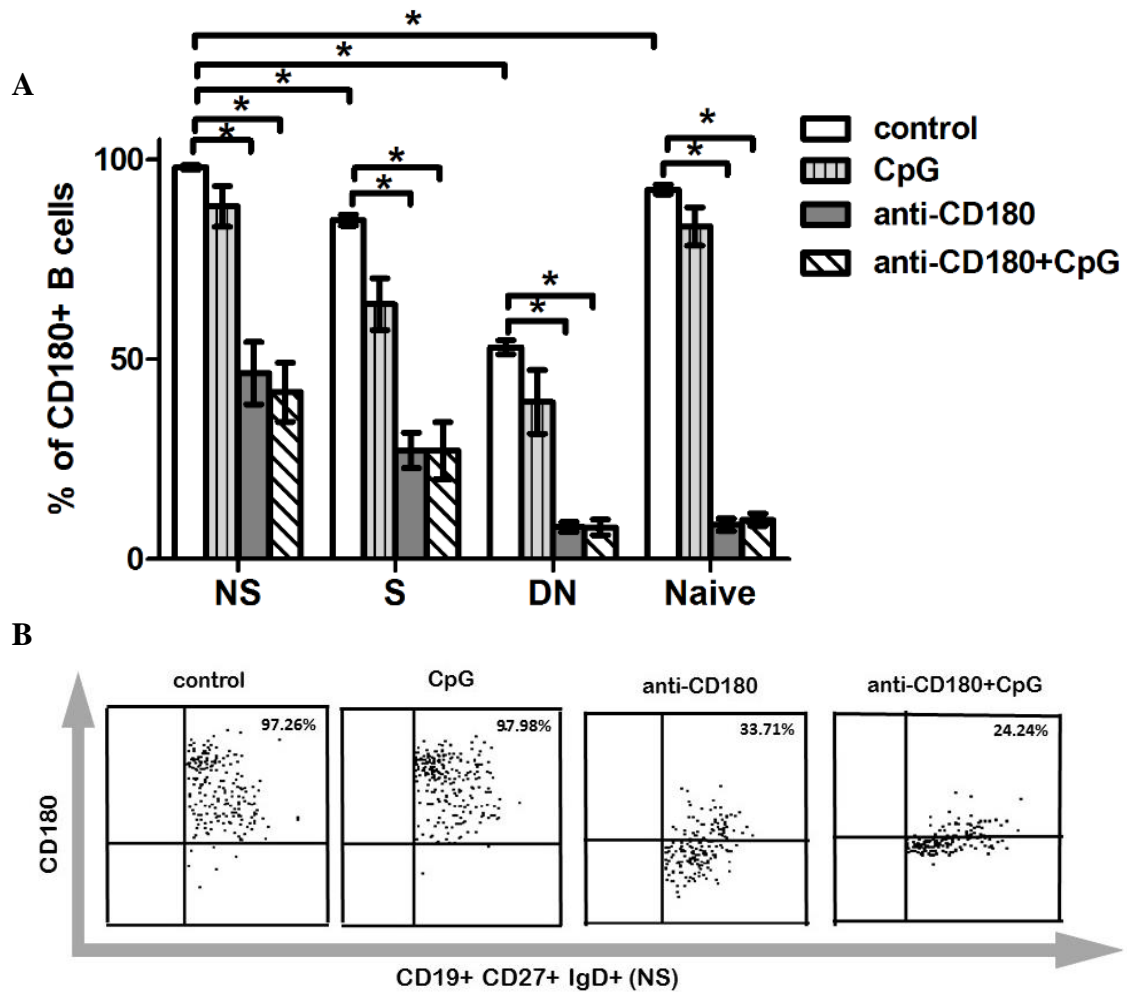
Annak vizsgálatára, hogy a TLR stimuláció a CD180 molekula expresszió csökkenéséhez vezet-e, mandula B-sejteket stimuláltunk anti-CD180 antitesttel. Megmértük a CD180 expresszióját fehérje és mRNS szinten és azt tapasztaltuk, hogy az anti-CD180 antitest kezelést követően csökkent a B-sejtek CD180 expressziója mRNS (11.A ábra) és fehérje (11.B ábra) szinten is. Annak vizsgálatára, hogy egy másik TLR ligand befolyásolja-e a CD180-on keresztül kiváltott CD180 expresszió csökkenést, a TLR9 ligand, CpG-vel és anti-CD180 antitesttel együtt stimuláltuk a sejteket, de a CpG hozzáadása nem befolyásolta az anti-CD180 antitest hatását és önmagában a CpG-vel történő stimulálás nem okozott változást a CD180 fehérje és mRNS expresszióban (13.A és 13.B ábra).



13. ábra: TLR stimuláció hatása a CD180 fehérje és mRNS expresszióra. **(A)** A CD180 expresszió fehérje szintű vizsgálata stimulálatlan (kontroll), CpG, anti-CD180 antitest és CpG+anti-CD180 antitest stimulált mandula B-sejteken (MFI) **(B)** A mandula B-sejtek CD180 mRNS expressziója CpG, anti-CD180 antitest és CpG+anti-CD180 antitest kezelést követően. A génexpressziós változások a stimulálatlan kontroll mintához vannak hasonlítva (RQ érték). A vízszintes vonal (1-es érték) jelzi a stimulálatlan minta CD180 expresszióját. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, $n=4$, * $p<0,05$.

5.2.2 A CD180 pozitív sejtek aránya a non-switched memória B-sejt alcsoportban a legmagasabb

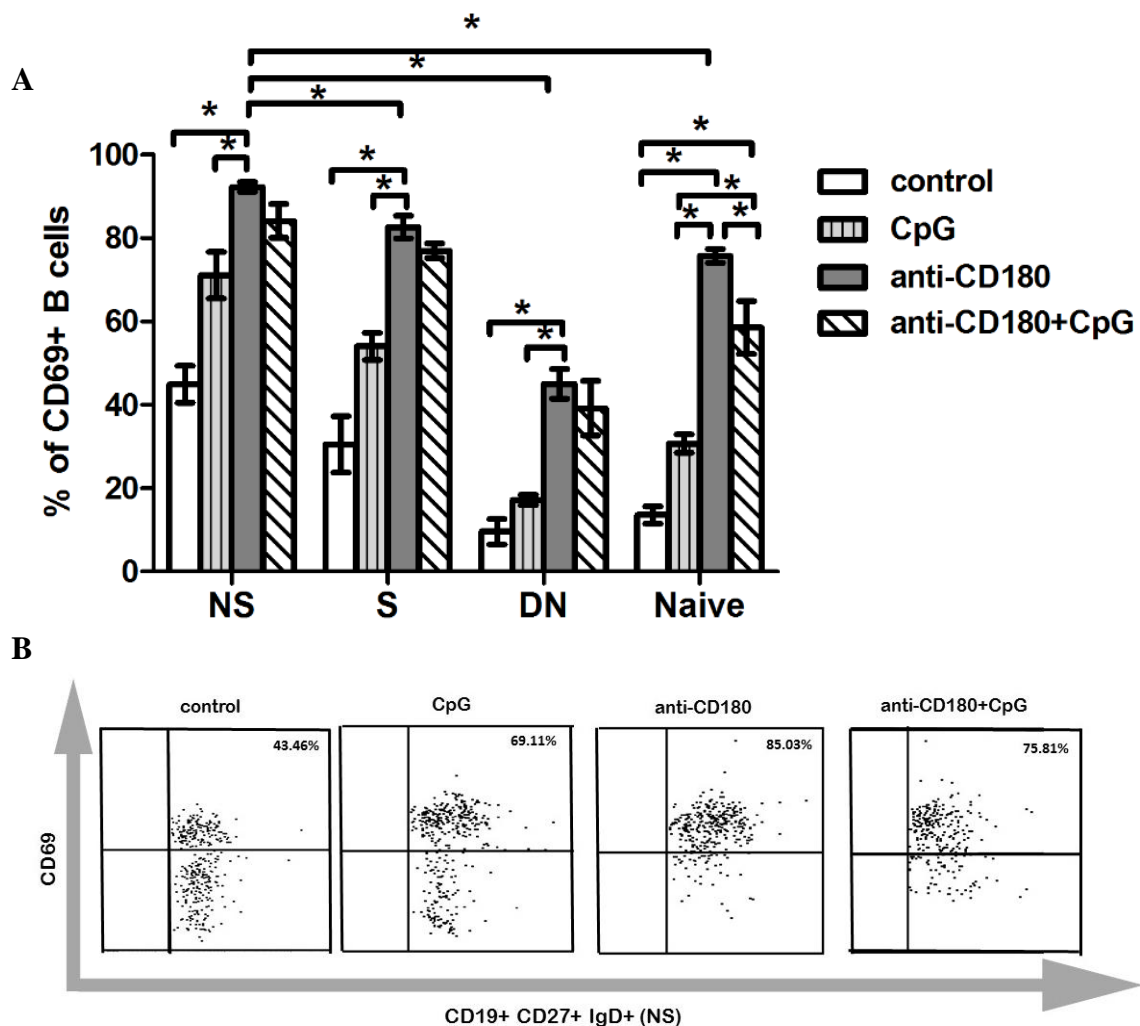
A CD180-on keresztüli stimuláció hatására a B-sejtekben bekövetkező fenotípusos és funkcionális változások meghatározásához először megvizsgáltuk a CD180 expresszióját a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított B-sejt alcsoportokban: CD27+IgD+ NS, CD27+IgD-S, CD27-IgD+ naiv és CD27-IgD- DN B-sejtek. A CD180-pozitív sejtek aránya jelentősen magasabb volt a NS B-sejtekben, mint a többi B-sejt alcsoportban. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a CD180-on keresztüli stimuláció hogyan befolyásolja a B-sejt alcsoportok CD180 expresszióját. Anti-CD180 antitest kezelés hatására mind a 4 alcsoportban szignifikánsan lecsökkent a CD180+ sejtek aránya. CpG hozzáadása nem befolyásolta az anti-CD180 antitest kezelés hatását és önmagában a CpG-vel történő kezelés nem csökkentette a CD180+ sejtek arányát a 4 vizsgált B-sejt alcsoportban (14.A és 14.B ábra).



14. ábra: TLR stimuláció hatása a B-sejt alcsoportok CD180 expressziójára. **(A)** A CD180+ sejtek mennyiségének változása az anti-CD180 antitest, CpG, CpG+anti-CD180 antitest stimulusok hatására a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított 4 vizsgált B-sejt alcsoportban: CD27+IgD+ NS, CD27+IgD- S, CD27-IgD- DN és CD27-IgD+ naiv B-sejtek. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, $n=4$, * $p<0,05$. **(B)** A reprezentatív dot plotokon kiemeltük az NS B-sejtek CD180 expressziójának a CpG, anti-CD180 antitest és CpG+anti-CD180 antitest kezelésekre bekövetkező változásait.

5.2.3 A CD180-on keresztüli stimuláció aktiválja mind a 4 vizsgált B-sejt alcsoportot

Ezután megvizsgáltuk a 4 B-sejt alcsoport aktiválódását 24 órás anti-CD180 antitest, CpG és CpG+anti-CD180 antitest stimulálást követően. Ehhez egy korai aktivációs marker, a CD69 expresszióját mértük. Anti-CD180 antitest kezelés hatására nőtt a CD69+ sejtek aránya mind a 4 alcsoportban a stimulálatlan B-sejtekhez képest. A legnagyobb mértékben a NS memória B-sejtek aktiválódtak. CpG hozzáadása a NS, S és DN B-sejtekben nem befolyásolta a CD69+ sejtek arányát, azonban a naiv B-sejtekben szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a csak anti-CD180 antitesttel kezelthez képest. A CpG önmagában nem okozott jelentős különbséget a vizsgált B-sejt alcsoportok aktivációjában (15.A és 15.B ábra).

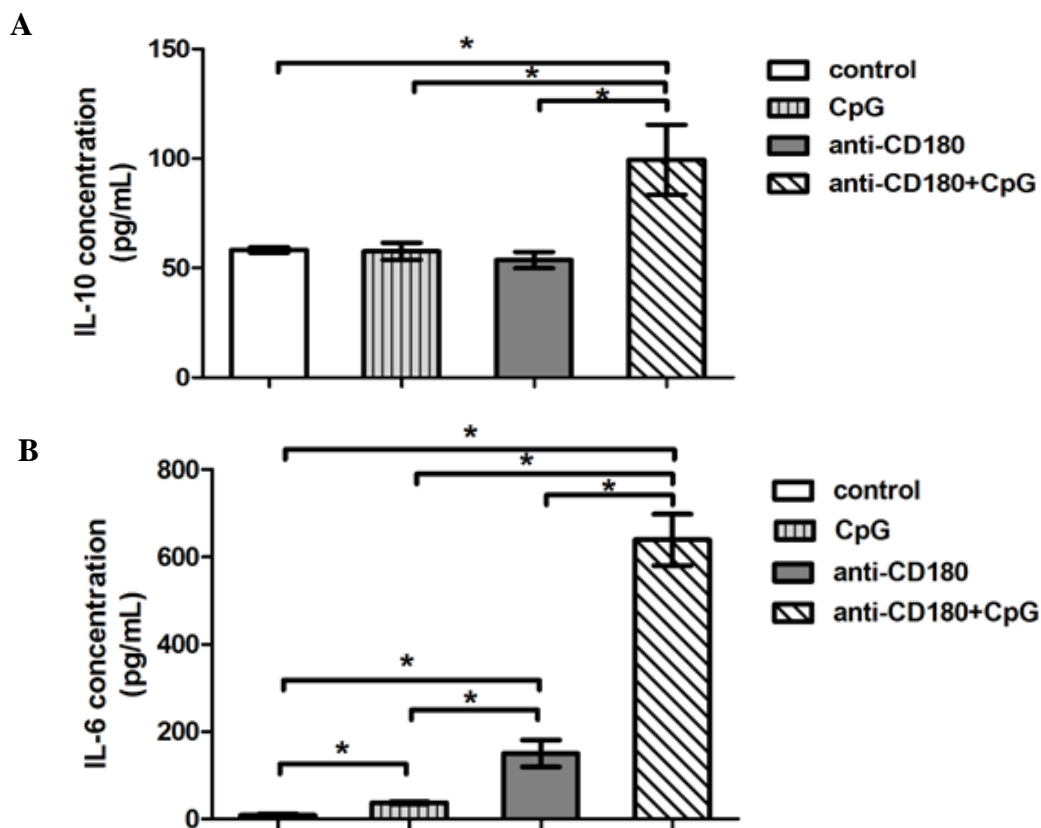


15. ábra: A TLR stimuláció hatása a CD69 aktivációs marker expressziója a B-sejt alcsoportokban. (A) A CD69+ sejtek mennyiségének változása az anti-CD180 antitest, CpG, CpG+anti-CD180 antitest kezelést követően a CD27 és IgD jelölés alapján

azonosított 4 vizsgált B-sejt alcsoportban: CD27+IgD+ NS, CD27+IgD- S, CD27-IgD-DN és CD27-IgD+ naiv B-sejtek. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, n=4, * $p < 0,05$. (B) A reprezentatív dot plotokon kiemeltük az NS B-sejtek CD69 expressziójának a CpG, anti-CD180 antitest és CpG+anti-CD180 antitest kezelések hatására bekövetkező változásait.

5.2.4 A B-sejtek IL-6 termelését fokozza az anti-CD180 antitesttel történő kezelés

A citokinek fontos szerepet játszik az autoimmun betegségekben, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a CD180-on keresztüli aktiváció hogyan befolyásolja a B-sejtek IL-6 és IL-10 termelését. Ennek vizsgálatára 24 órán keresztül stimulált B-sejtek felülúszóiban mértük ezen citokinek koncentrációját. Az anti-CD180 antitest stimulálás önmagában szignifikánsan növelte az IL-6 koncentrációját a mandula B-sejtek felülúszójában a stimulálatlan és CpG stimulált sejtekhez képest, azonban nem volt hatása az IL-10 termelésre. A CpG önmagában szintén csak az IL-6 termelést növelte szignifikánsan, az IL-10 termelést nem. Azonban anti-CD180 antitest és CpG együttes adása jelentősen serkentette az IL-6 és az IL-10 termelést is a stimulálatlan, a CpG simulált és az anti-CD180 antitest stimulált sejtekhez képest (16.A és 16.B ábra).



16. ábra: A TLR stimuláció hatása a mandula B-sejtek citokin termelésére **(A)** Az IL-10 és **(B)** az IL-6 koncentrációja stimulálatlan, anti-CD180 antitest, CpG és CpG+anti-CD180 antitest stimulált B-sejtek felülúszójában. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, $n=4$, * $p<0,05$.

5.2.5 A CD180 stimuláció képes indukálni a természetes autoantitest termelést

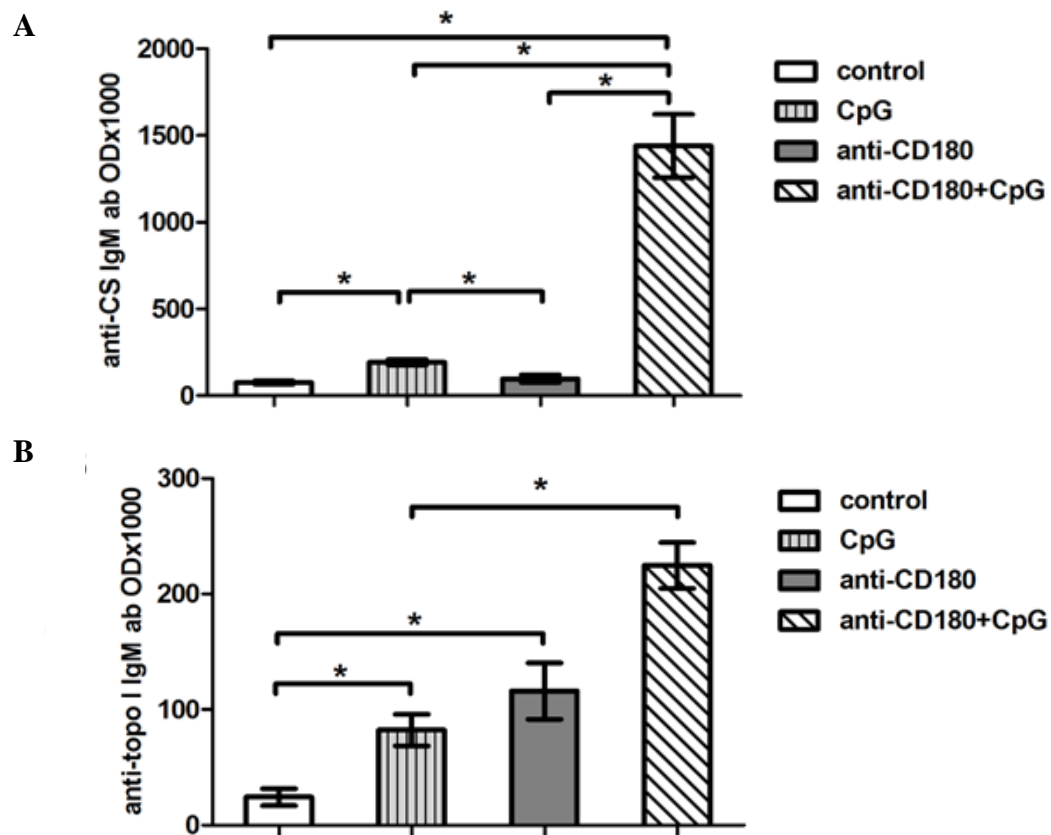
Mivel eredményeink szerint a CD180 stimulálás az NS B-sejteket aktiválja a legnagyobb mértékben és feltételezhetően az NS-sejtek a B1 B-sejtekhez hasonlóan képesek természetes autoantitesteket termelni, kíváncsiak voltunk, hogy a CD180-on keresztüli aktiváció hogyan befolyásolja a B-sejtek természetes autoantitest termelését. A természetes autoantitest termelés vizsgálatához a 7 napon keresztül stimulált mandula B-sejtek felülúszóit használtuk.

5.2.5.1 Az anti-CD180 antitest kezelés csak a CpG-vel együtt növeli az anti-CS IgM antitest termelést

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy az anti-CS IgM autoantitestek jelenlétét egészséges egyéneknél és autoimmun betegekben [49]. Kíváncsiak voltunk, hogy a TLR stimulusknak milyen hatása van a B-sejtek CS elleni természetes autoantitest termelésére. Önmagában az anti-CD180 antitest kezelés nem befolyásolta a B-sejtek anti-CS antitest termelését. Önmagában a CpG szignifikánsan növelte az anti-CS antitest mennyiségét a felülúszóban a stimulálatlan B-sejtekhez képest. Azonban az anti-CD180 antitest és CpG együttes adása serkentette a legnagyobb mértékben a B-sejtek anti-CS antitest termelését a stimulálatlan, a CpG stimulált és az anti-CD180 antitest stimulált sejtekhez képest is.

5.2.5.2 CD180 ligáció fokozza az anti-topo I IgM antitest termelését

Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy topo I (Scl-70) különböző epitópjai ellen az SSc-ben szenvedő betegekben jelenlevő patológiás autoantitestek mellett természetes autoantitestek is termelődnek, melyek egészséges egyéneknél is jelen vannak [54]. Ezért megmértük az anti-topo I (F4) IgM autoantitestek mennyiségét a TLR stimulált felülúszókban. Az anti-CD180 antitest kezelés szignifikánsan emelte az anti-topo I (F4) IgM antitest mennyiségét. Ehhez hasonlóan a CpG kezelés is szignifikáns emelkedést váltott ki. Az anti-CS antitesthez hasonlóan, az anti-CD180 antitest és CpG együttes adása serkentette a leginkább a B-sejtek anti-topo I (F4) IgM autoantitest termelését (17.A és 17.B ábra).



17. ábra: A TLR stimuláció hatása a mandula B-sejtek természetes autoantitest termelésére. **(A)** Az anti-CS IgM és **(B)** az anti-topo I IgM antitest koncentrációja stimulálatlan, anti-CD180 antitest, CpG és CpG+anti-CD180 antitest stimulált B-sejtek felülúszójában. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve, $n=3$, * $p<0,05$.

6 Összefoglalás és következtetések

6.1 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjeire kifejtett hatásának vizsgálata

SSc-ben a veleszületett immunrendszer molekuláinak hozzájárulása a B-sejtek kóros működéséhez kevésbé tanulmányozott. A TLR homológ, CD180 molekula képes aktiválni a B-sejtek többségét és ezáltal fenotípusos és funkcionális változásokat előidézni [68,73,104]. A CD180-negatív B-sejtek emelkedett szintjét mutatták ki SLE-ben szenvedő betegekben és SLE-s egérmodellben [105,106]. Elsőként sikerült meghatároznunk, hogy dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjein a CD180 molekula csökkent expressziója figyelhető meg fehérje és mRNS szinten is, mely felveti a CD180 molekula lehetséges szerepét a B-sejtek diszfunkciójában SSc-ben.

A PI3K/Akt/mTOR szignalizáció hozzájárul a fibrózis kialakulásához SSc-ben és az útvonal gátlása megakadályozza a fibrózis kialakulását bleomycin indukált SSc egérmodellben [75,77,107]. Emellett a PI3K/Akt/mTOR útvonal fontos szereppel bír a B-sejtek aktivációjában és differenciációjában [76] és ismert, hogy a B-sejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak az SSc patogenezisében [21]. Ráadásul, a TLR-ek szintén ezen a jelátviteli úton keresztül hatnak [108] és CD180-on keresztüli stimuláció hatására az Akt emelkedését írták le B-CLL-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben [109]. Kimutattuk, hogy a CD180-on keresztüli stimuláció növelte az Akt és az S6 foszforilációját dcSSc-s és HC B-sejtekben is, azonban dcSSc-ben az Akt alacsonyabb szintű aktivációját figyeltük meg, mint HC-ban, ami a CD180 jelátvitel károsodására utal a PI3K/Akt útvonal tekintetében a dcSSc-s betegek B-sejtjeiben.

Forestier és mtsai. [110] az mTOR csökkent foszforilációját figyelték meg SSc-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben. Ezzel szemben a vizsgálataink során nem találtunk különbséget az S6 foszforilációjában a dcSSc-s és HC B-sejtek között, ami felveti, hogy az SSc-s betegek B-sejtjeiben az mTOR útvonal változásai az S6-on kívül más célmolekulákat is befolyásolhatnak. Az NF- κ B egy fontos központi útvonal, mely kölcsönhatásban áll számos más upstream és downstream jelátviteli útvonallal, köztük a PI3K/Akt/mTOR útvonallal is. Továbbá ismert, hogy a TLR-eken keresztüli stimuláció az NF- κ B aktiválódását válthatja ki [87]. Vizsgálataink során az anti-CD180 antitest kezelés dcSSc-ben és HC-ban is növelte az

NF- κ B foszforilációját a B-sejtekben, azonban dcSSc-ben kisebb mértékben, sugallva a CD180 jelátvitel károsodását az NF- κ B útvonal tekintetében a dcSSc-s betegek B-sejtjeiben.

A PI3K/Akt/mTOR útvonal szintén fontos szerepet játszik a BAFF által szabályozott B-sejt aktivációban és differenciációban [85,86]. A BAFF nélkülözhetetlen a B-sejtek túléléséhez, éréséhez és homeosztázisához. A megnövekedett BAFF a B-sejt tolerancia megbontásával hozzájárulhat a szisztémás autoimmun betegségek kialakulásához [90,91]. SSc-ben szenvedő betegekben a BAFF emelkedett szintjét figyelték meg, ami összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és aktivitásával [88]. Bár a BAFF elleni autoantitestek jelenlétét kimutatták egészséges egyénekben szérumban is, emelkedett szintje figyelhető meg SLE-s betegekben [94,111]. Megvizsgálva az anti-BAFF autoantitestek szintjét SSc-ben szenvedő betegekben, az SLE-s betegekben megfigyelthez hasonló eredményt kaptunk, dcSSc-ben szenvedő betegekben nagyobb mennyiségben voltak jelen az anti-BAFF autoantitestek, mint az egészséges kontrollokban. Ez alapján feltételezzük, hogy a BAFF elleni autoantitestek megnövekedett szintje az SSc-ben szenvedő betegekben megfigyelt emelkedett BAFF szintre reagáló szabályzó mechanizmus része lehet.

A BAFF a B-sejteken többféle receptorhoz képes kötődni és ezáltal eltérő hatásokat tud kifejteni [91]. A BAFF-R a normál B-sejt fejlődésben és túlélésben játszik szerepet [95], míg a TACI az Ig izotípusváltást és a plazmasejtek differenciációját serkenti [96]. Vizsgálataink során kimutattuk a BAFF-R csökkent expresszióját fehérje és mRNS szinten, illetve a TACI emelkedett expresszióját fehérje szinten dcSSc-ben szenvedő betegek B-sejtjein az egészséges egyénekhez viszonyítva. Az SSc-s betegek B-sejtjeinek csökkent BAFF-R és emelkedett TACI expressziója hozzájárulhat az autoreaktív B-sejtek antitesttermelő plazmasejteké történő differenciálódásában [96,98] és tudjuk, hogy az autoantitestek kulcsfontosságú szereppel bírnak az SSc patogenezisében [112].

A dcSSc-s betegek és egészséges kontrollok B-sejtjein megfigyelt BAFF-R és TACI expresszió különbségek a naiv B-sejtek eltérő expressziójából adódhatnak, mivel a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított B-sejt alcsoportok BAFF-R és TACI expressziójának vizsgálata során a naiv B-sejtek csökkent BAFF-R és emelkedett TACI expresszióját figyeltük meg dcSSc-ben. Az eredmény jelentőségét hangsúlyozza, hogy SSc-s betegekben a naiv B-sejtek megnövekedett aránya figyelhető meg [28,44] és ezek az eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a B-sejt-alcsoportok eloszlásában mutatkozó különbségek - különösen a naiv B-sejtek számának növekedése - fontos szerepet játszhatnak az SSc kialakulásában.

A TLR jelátvitel képes befolyásolni a BAFF receptorok expresszióját [113], ezért megvizsgáltuk, hogy a CD180-on keresztüli aktiváció hogyan befolyásolja a B-sejtek, illetve a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított B-sejt alcsoportok BAFF-R és TACI expresszióját dcSSc-ben és HC-ban. Kimutattuk, hogy a CD180 ligáció a HC B-sejtek BAFF-R expressziójának csökkenését és a TACI expressziójának növekedését eredményezte, elérve a dcSSc-ben megfigyelt szinteket. Ez a változás is a naiv B-sejtekben lévő különbségekből adódhat, mivel a CD180 antitesten keresztüli stimuláció az egészséges kontrollok naiv B-sejtjeiben növelte a BAFF-R és csökkentette a TACI expresszióját, ezáltal elérve a dcSSc-s betegek naiv B-sejtjeiben megfigyelt szinteket. Eredményeink felvetik a CD180 szignalizáció károsodását dcSSc-s betegek B-sejtjeiben, ami hozzájárulhat a BAFF szignalizáció patológiás irányba történő eltolódásához, különösen a naiv B-sejtekben.

6.2 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció mandula B-sejtekre kifejtett hatásainak vizsgálata

Mandula B-sejteken végzett vizsgálataink során kimutattuk, hogy a CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatására lecsökkent a mandula B-sejtek CD180 expressziója. Ismert, hogy SLE-ben a CD180-negatív B-sejtek erősen aktivált sejtek [105] illetve, hogy a CD180 internalizálódhat az anti-CD180 antitest bekötődését követően [73]. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a B-sejtek CD180-on keresztüli fokozott aktivációja lehetséges magyarázata lehet az SSc-s betegek B-sejtjein megfigyelt csökkent CD180 expresszióknak.

Elsőként vizsgáltuk a CD180 molekula expresszióját a CD27 és IgD jelölés alapján azonosított B-sejt alcsoportokban és kimutattuk, hogy a CD180+ sejtek aránya az NS B-sejt alcsoportban volt a legmagasabb. Anti-CD180 antitest kezelés hatására az összes vizsgált B-sejt alcsoportban szignifikánsan lecsökkent a CD180+ sejtek aránya, sugallva, hogy a CD180 ligációja serkenti a CD180 internalizációját. Emellett kimutattuk, hogy az anti-CD180 antitest stimulálás csökkentette a CD180 mRNS expresszióját, tovább erősítve a CD180 B-sejtek általi autoregulációjának lehetőségét.

A CD180-on keresztüli stimuláció képes aktiválni a marginális zóna (MZ) B-sejteket [73]. Az NS B-sejtek képviselik a humán perifériás vérben a MZ-eredetű B-sejteket [45] és eredményeink szerint a CD69, korai aktiváció marker expressziójának vizsgálata során az anti-CD180 antitest stimulálást követően az NS B-sejtek aktiválódtak a legnagyobb mértékben a B-sejt alcsoportok közül.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy az NS B-sejtek csökkent aránya figyelhető meg SSc-ben [44]. A B1 B-sejtekhez hasonlóan az NS B-sejtek is képesek lehetnek természetes autoantitesteket termelni [45]. A természetes IgM autoantitestek polireaktívak, fontos szerepet játszanak a károsodott molekulák és sejtek eltakarításában illetve a gyulladáshoz és autoimmun folyamatok szabályzásában [114]. Megvizsgáltuk a TLR-eken keresztüli stimuláció hatását a mandula B-sejtek természetes autoantitest termelésére és azt tapasztaltuk, hogy az anti-CD180 antitest és TLR9 ligand, CpG együttes adása jelentősen emelte az anti-CS és anti-topo I IgM autoantitestek termelését, sugallva az anti-CD180 antitest és TLR9 ligand egymást erősítő hatását a természetes autoantitest termelésben. Az anti-CD180 antitest kezelés önmagában növelte a termelt anti-topo I IgM antitest mennyiségét, azonban az anti-CS IgM antitest termelését nem befolyásolta. A CS molekula nem célpontja betegség specifikus patológiás antitesteknek, míg a természetes anti-topo I autoantitestek a topo I ellen irányulnak, ami az SSc specifikus patológiás autoantitestek (anti-Scl-70) célantigénje is [54]. A B-sejtek CD180-on keresztüli aktivációja a patológiás antitestek célantigénje ellen irányuló természetes IgM antitestek szintjének szabályzásában játszhat szerepet.

Az IL-6 emelkedett szérumszintje figyelhető meg SSc-ben [35] és SLE-ben szenvedő betegekben [115], ráadásul a B-sejtek IL-6 termelése elősegíti az autoimmun csíráközpontok fejlődését és ezáltal a betegség kialakulását SLE-s egérmodellben [37]. Emellett az IL-6 szerepet játszik a plazmasejtek differenciálódásában és túlélésében [38,116]. Vizsgálataink során az anti-CD180 antitest kezelés serkentette a mandula B-sejtek IL-6 termelését, sőt CpG hozzáadása tovább növelte. Ez alapján feltételezzük, hogy a B-sejtek aktivációja önmagában a CD180-on keresztül vagy a TLR9 liganddal együtt hozzájárulhat a plazmasejtek differenciálódásához és antitest termeléséhez.

Ismert, hogy a regulatórikus B-sejtek száma csökkent és funkciója károsodott az SSc-s betegekben [42], ezért megvizsgáltuk az anti-CD180 antitest kezelés hatását a mandula B-sejtek IL-10 termelésére is. Az IL-10 termelést csak az anti-CD180 antitest és CpG együttes adása fokozta, sugallva a két TLR egymást erősítő hatását.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a CD180 által közvetített B-sejt funkciók szerepet játszhatnak az SSc kialakulásában, ugyanakkor eredményeink arra is utalnak, hogy az anti-CD180 antitest terápia, ami már felmerült az SLE-s betegek kezelése kapcsán [117], SSc-ben kedvezőtlen hatást fejtene ki a B-sejt funkciókra.

7 Új eredmények összefoglalása

7.1 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjeire kifejtett hatásának vizsgálata során:

1. A CD180 molekula fehérje és mRNS szintű csökkent expresszióját találtuk a korai dcSSc-ben szenvedő betegek perifériás vér B-sejtjeiben egészséges egyénekhez viszonyítva.
2. A CD180 molekulán keresztüli stimuláció hatására az Akt és az NF- κ B kisebb, míg az S6 foszforiláció esetében hasonló mértékű növekedését figyeltük dcSSc-s betegek B-sejtjeiben, mint az egészséges kontrollokban.
3. A BAFF elleni autoantitestek emelkedett szérumszintjét mutattuk ki dcSSc-s betegekben az egészséges egyénekhez viszonyítva.
4. A dcSSc-s betegek B-sejtjein csökkent BAFF-R és emelkedett TACI expressziót figyeltünk meg az egészséges egyénekhez viszonyítva, melynek hátterében a naiv B-sejtekben megfigyelt különbségek álltak.
5. A CD180 ligáció hatására az egészséges kontrollok B-sejtjeiben illetve a B-sejt alcsoportok vizsgálata során a naiv B-sejtekben a dcSSc-s betegekben megfigyelt szintre csökkent a BAFF-R expressziója és nőtt a TACI expressziója.

7.2 A CD180 molekulán keresztüli stimuláció B-sejt funkciókra kifejtett hatásának mandula B-sejteken történő vizsgálata során:

6. A mandula B-sejtek és B-sejt alcsoportok CD180 fehérje és mRNS expressziója lecsökken anti-CD180 antitest kezelést követően.
7. Az anti-CD180 antitest kezelés mind a 4 vizsgált mandula B-sejt alcsoportot aktiválta.

8. A CD180 fehérje expressziója a mandula NS B-sejtekben volt a legmagasabb és ők aktiválódtak a legnagyobb mértékben anti-CD180 antitest kezelést követően.
9. A CD180-on keresztüli stimuláció serkentette a mandula B-sejtek IL-6 termelését, de az IL-10 termelésüket nem befolyásolta.
10. Az anti-CD180 antitest önmagában a mandula B-sejtekben csak az anti-topo I IgM antitest termelését fokozta, az anti-CS IgM természetes antitest termelését nem.
11. Az anti-CD180 antitest és a TLR9 ligand CpG szinergista hatását figyeltük meg a mandula B-sejtek citokin és természetes autoantitest termelése során.

8 Irodalomjegyzék

1. Allanore, Y.; Simms, R.; Distler, O.; Trojanowska, M.; Pope, J.; Denton, C.P.; Varga, J. Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*.
2. Denton, C.P.; Khanna, D. Systemic sclerosis. *Lancet* **2017**, *390*, 1685–1699.
3. Carwile LeRoy, E.; Black, C.; Fleischmajer, R.; Jablonska, S.; Krieg, T.; Medsger, T.A.; Wollheim, F. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* **1988**, *15*, 202–205.
4. Van Den Hoogen, F.; Khanna, D.; Fransen, J.; Johnson, S.R.; Baron, M.; Tyndall, A.; Matucci-Cerinic, M.; Naden, R.P.; Medsger, T.A.; Carreira, P.E.; et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 2737–2747.
5. Pearson, D.R.; Werth, V.P.; Pappas-Taffer, L. Systemic sclerosis: Current concepts of skin and systemic manifestations. *Clin. Dermatol.* **2018**, *36*, 459–474.
6. Czirják, L.; Foeldvari, I.; Müller-Ladner, U. Skin involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology* **2008**, *47*, v44–v45.
7. Randone, S.B.; Guiducci, S.; Cerinic, M.M. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2008**, *22*, 339–350.
8. Lóránd, V.; Czirják, L.; Minier, T. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. *Presse Med.* **2014**, *43*, e315–e328.
9. Khanna, P.P.; Furst, D.E.; Clements, P.J.; Maranian, P.; Indulkar, L.; Khanna, D.; D-Penicillamine Investigators Tendon friction rubs in early diffuse systemic sclerosis: prevalence, characteristics and longitudinal changes in a randomized controlled trial. *Rheumatology (Oxford)*. **2010**, *49*, 955–959.
10. Guiducci, S.; Giacomelli, R.; Cerinic, M.M. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun. Rev.* **2007**, *6*, 520–523.
11. Matucci-Cerinic, M.; Kahaleh, B.; Wigley, F.M. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 1953–1962.

12. Elhai, M.; Avouac, J.; Kahan, A.; Allanore, Y. Systemic sclerosis: Recent insights. *Jt. Bone Spine* **2015**, *82*, 148–153.
13. Sunderkötter, C.; Riemekasten, G. Pathophysiology and clinical consequences of Raynaud's phenomenon related to systemic sclerosis. *Rheumatology* **2006**, *45*, iii33–iii35.
14. Savarino, E.; Furnari, M.; de Bortoli, N.; Martinucci, I.; Bodini, G.; Ghio, M.; Savarino, V. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. *Presse Med.* **2014**, *43*, e279–e291.
15. Frech, T.M.; Mar, D. Gastrointestinal and Hepatic Disease in Systemic Sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **2018**, *44*, 15.
16. Wells, A.U. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Presse Med.* **2014**, *43*, e329–e343.
17. Chaisson, N.F.; Hassoun, P.M. Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **2013**, *144*, 1346.
18. Nie, L.Y.; Wang, X.D.; Zhang, T.; Xue, J. Cardiac complications in systemic sclerosis: early diagnosis and treatment. *Chin. Med. J. (Engl.)* **2019**, *132*, 2865.
19. Chrabaszczyk, M.; Małyszko, J.; Sikora, M.; Alda-Malicka, R.; Stochmal, A.; Matuszkiewicz-Rowinska, J.; Rudnicka, L. Renal Involvement in Systemic Sclerosis: An Update. *Kidney Blood Press. Res.* **2020**, *45*, 532–548.
20. Johnson, S.R. New ACR EULAR guidelines for systemic sclerosis classification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2015**, *17*, 1–8.
21. Varga, J.; Trojanowska, M.; Kuwana, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 137–152.
22. Bosello, S.; De Luca, G.; Tolusso, B.; Lama, G.; Angelucci, C.; Sica, G.; Ferraccioli, G. B cells in systemic sclerosis: A possible target for therapy. *Autoimmun. Rev.* **2011**, *10*, 624–630.
23. Brown, M.; O'Reilly, S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **2019**, *195*, 310–321.

24. Kaegi, C.; Wuest, B.; Schreiner, J.; Steiner, U.C.; Vultaggio, A.; Matucci, A.; Crowley, C.; Boyman, O. Systematic Review of Safety and Efficacy of Rituximab in Treating Immune-Mediated Disorders. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1990.
25. Bellan, M.; Patrucco, F.; Barone-Adesi, F.; Gavelli, F.; Castello, L.M.; Nerviani, A.; Andreoli, L.; Cavagna, L.; Pirisi, M.; Sainaghi, P.P. Targeting CD20 in the treatment of interstitial lung diseases related to connective tissue diseases: A systematic review. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102453.
26. Hasegawa, M. B lymphocytes: Shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J. Dermatol.* **2010**, *37*, 3–10.
27. Skaug, B.; Khanna, D.; Swindell, W.R.; Hinchcliff, M.E.; Frech, T.M.; Steen, V.D.; Hant, F.N.; Gordon, J.K.; Shah, A.A.; Zhu, L.; et al. Global skin gene expression analysis of early diffuse cutaneous systemic sclerosis shows a prominent innate and adaptive inflammatory profile. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *79*, 379–386.
28. Sato, S.; Fujimoto, M.; Hasegawa, M.; Takehara, K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 1918–1927.
29. Meyer, O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Jt. Bone Spine* **2006**, *73*, 490–494.
30. Matsushita, T.; Takehara, K. The role of B cells in systemic sclerosis. *Biologics* **2008**, *2*, 389.
31. Shah, A.A.; Rosen, A.; Hummers, L.; Wigley, F.; Casciola-Rosen, L. Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 2787–2795.
32. Riemekasten, G.; Philippe, A.; Näther, M.; Slowinski, T.; Müller, D.N.; Heidecke, H.; Matucci-Cerinic, M.; Czirják, L.; Lukitsch, I.; Becker, M.; et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *70*, 530–536.
33. Chizzolini, C.; Raschi, E.; Rezzonico, R.; Testoni, C.; Mallone, R.; Gabrielli, A.; Facchini, A.; Del Papa, N.; Borghi, M.O.; Dayer, J.M.; et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients

- with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 1602–1613.
34. Svegliati Baroni, S.; Santillo, M.; Bevilacqua, F.; Luchetti, M.; Spadoni, T.; Mancini, M.; Fraticelli, P.; Sambo, P.; Funaro, A.; Kazlauskas, A.; et al. Stimulatory Autoantibodies to the PDGF Receptor in Systemic Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2667–2676.
 35. Sato, S.; Hasegawa, M.; Takehara, K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.* **2001**, *27*, 140–146.
 36. Khan, K.; Xu, S.; Nihtyanova, S.; Derrett-Smith, E.; Abraham, D.; Denton, C.P.; Ong, V.H. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2012**, *71*, 1235–1242.
 37. Arkatkar, T.; Du, S.W.; Jacobs, H.M.; Dam, E.M.; Hou, B.; Buckner, J.H.; Rawlings, D.J.; Jackson, S.W. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3207–3217.
 38. Cassese, G.; Arce, S.; Hauser, A.E.; Lehnert, K.; Moewes, B.; Mostarac, M.; Muehlinghaus, G.; Szyska, M.; Radbruch, A.; Manz, R.A. Plasma Cell Survival Is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 1684–1690.
 39. J, V.; ML, W. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **2009**, *1*, 226–235.
 40. Sakkas, L.I.; Chikanza, I.C.; Platsoucas, C.D. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2006**, *2*, 679–685.
 41. Iwata, Y.; Matsushita, T.; Horikawa, M.; DiLillo, D.J.; Yanaba, K.; Venturi, G.M.; Szabolcs, P.M.; Bernstein, S.H.; Magro, C.M.; Williams, A.D.; et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **2011**, *117*, 530–541.
 42. Mavropoulos, A.; Simopoulou, T.; Varna, A.; Liaskos, C.; Katsiari, C.G.; Bogdanos, D.P.; Sakkas, L.I. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* **2016**, *68*, 494–504.

43. Matsushita, T.; Hamaguchi, Y.; Hasegawa, M.; Takehara, K.; Fujimoto, M. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology* **2016**, *55*, 263–267.
44. Simon, D.; Balogh, P.; Bognár, A.; Kellermayer, Z.; Engelmann, P.; Németh, P.; Farkas, N.; Minier, T.; Lóránd, V.; Czirják, L.; et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 30–36.
45. Weller, S.; Braun, M.C.; Tan, B.K.; Rosenwald, A.; Cordier, C.; Conley, M.E.; Plebani, A.; Kumararatne, D.S.; Bonnet, D.; Tournilhac, O.; et al. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **2004**, *104*, 3647–3654.
46. Maddur, M.S.; Lacroix-Desmazes, S.; Dimitrov, J.D.; Kazatchkine, M.D.; Bayry, J.; Kaveri, S. V. Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2020**, *58*, 213–228.
47. Mannoor, K.; Xu, Y.; Chen, C. Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* **2013**, *46*, 138–147.
48. Nagele, E.P.; Han, M.; Acharya, N.K.; DeMarshall, C.; Kosciuk, M.C.; Nagele, R.G. Natural IgG Autoantibodies Are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and Their Number Is Influenced By Age, Gender, and Disease. *PLoS One* **2013**, *8*, e60726.
49. Czömpöly, T.; Olasz, K.; Simon, D.; Nyárády, Z.; Pálincás, L.; Czirják, L.; Berki, T.; Németh, P. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 1761–8.
50. Lyons, R.; Narain, S.; Nichols, C.; Satoh, M.; Reeves, W.H. Effective Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis of Systemic Autoimmune Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1050*, 217–228.
51. Galeotti, C.; Kaveri, S. V.; Bayry, J. IVIG-mediated effector functions in autoimmune and inflammatory diseases. *Int. Immunol.* **2017**, *29*, 491–498.
52. Baleva, M.; Nikolov, K. The role of intravenous immunoglobulin preparations in the treatment of systemic sclerosis. *Int. J. Rheumatol.* **2011**, *2011*, 829751.

53. Böröcz, K.; Simon, D.; Erdő-Bonyár, S.; Kovács, K.T.; Tuba, É.; Czirják, L.; Németh, P.; Berki, T. Relationship between natural and infection-induced antibodies in systemic autoimmune diseases (SAD): SLE, SSc and RA. *Clin. Exp. Immunol.* **2021**, *203*, 32–40.
54. Simon, D.; Czömpöly, T.; Berki, T.; Minier, T.; Peti, A.; Tóth, E.; Czirják, L.; Németh, P. Naturally occurring and disease-associated auto-antibodies against topoisomerase I: A fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* **2009**, *21*, 415–422.
55. Kremlitzka, M.; Mácsik-Valent, B.; Erdei, A. Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement. *Immunol. Lett.* **2016**, *178*, 37–44.
56. Nie, L.; Cai, S.Y.; Shao, J.Z.; Chen, J. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1523.
57. El-Zayat, S.R.; Sibaii, H.; Mannaa, F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 1–12.
58. Vidya, M.K.; Kumar, V.G.; Sejian, V.; Bagath, M.; Krishnan, G.; Bhatta, R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.* **2018**, *37*, 20–36.
59. Hosseini, A.M.; Majidi, J.; Baradaran, B.; Yousefi, M. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5*, 605.
60. Farrugia, M.; Baron, B. The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. *Int. J. Inflamm.* **2017**, *2017*.
61. Barrat, F.J.; Meeker, T.; Chan, J.H.; Guiducci, C.; Coffmann, R.L. Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 3582–3586.
62. Dowson, C.; Simpson, N.; Duffy, L.; O'Reilly, S. Innate Immunity in Systemic Sclerosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2017**, *19*.
63. Bhattacharyya, S.; Kelley, K.; Melichian, D.S.; Tamaki, Z.; Fang, F.; Su, Y.; Feng, G.; Pope, R.M.; Budinger, G.R.S.; Mutlu, G.M.; et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor- β responses: A novel mechanism for maintaining

- and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 192–205.
64. Bhattacharyya, S.; Varga, J. Endogenous ligands of TLR4 promote unresolving tissue fibrosis: Implications for systemic sclerosis and its targeted therapy. *Immunol. Lett.* **2018**, *195*, 9–17.
 65. Fang, F.; Goncalves Marangoni, R.; Zhou, X.; Yang, Y.; Ye, B.; Shangguang, A.; Qin, W.; Wang, W.; Bhattacharyya, S.; Wei, J.; et al. Toll-like Receptor 9 Signaling Is Augmented in Systemic Sclerosis and Elicits Transforming Growth Factor β -Dependent Fibroblast Activation. *Arthritis Rheumatol.* **2016**, *68*, 1989–2002.
 66. Clanchy, F.I.L.; Sacre, S.M. Modulation of toll-like receptor function has therapeutic potential in autoimmune disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2010**, *10*, 1703–1716.
 67. Schultz, T.E.; Blumenthal, A. The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *101*, 183–192.
 68. Chaplin, J.W.; Kasahara, S.; Clark, E.A.; Ledbetter, J.A. Anti-CD180 (RP105) Activates B Cells To Rapidly Produce Polyclonal Ig via a T Cell and MyD88-Independent Pathway. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4199–4209.
 69. Divanovic, S.; Trompette, A.; Atabani, S.F.; Madan, R.; Golenbock, D.T.; Visintin, A.; Finberg, R.W.; Tarakhovsky, A.; Vogel, S.N.; Belkaid, Y.; et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 571–578.
 70. Koarada, S.; Tada, Y.; Ushiyama, O.; Morito, F.; Suzuki, N.; Ohta, A.; Miyake, K.; Kimoto, M.; Nagasawa, K. B cells lacking RP105, a novel B cell antigen, in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1999**, *42*, 2593–2600.
 71. Kikuchi, Y.; Koarada, S.; Nakamura, S.; Yonemitsu, N.; Tada, Y.; Haruta, Y.; Morito, F.; Ohta, A.; Miyake, K.; Horiuchi, T.; et al. Increase of RP105-lacking activated B cells in the peripheral blood and salivary glands in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2008**, *26*, 5–12.
 72. Fujita, K.; Akasaka, Y.; Kuwabara, T.; Wang, B.; Tanaka, K.; Kamata, I.; Yokoo, T.; Kinoshita, T.; Iuchi, A.; Akishima-Fukasawa, Y.; et al. Pathogenesis of lupus-like nephritis through autoimmune antibody produced by CD180-negative B lymphocytes in NZBWF1 mouse. *Immunol. Lett.* **2012**, *144*, 1–6.

73. Chaplin, J.W.; Chappell, C.P.; Clark, E.A. Targeting antigens to CD180 rapidly induces antigen-specific IgG, affinity maturation, and immunological memory. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2135–2146.
74. Eriksen, A.B.; Indrevær, R.L.; Holm, K.L.; Landskron, J.; Blomhoff, H.K. TLR9-signaling is required for turning retinoic acid into a potent stimulator of RP105 (CD180)-mediated proliferation and IgG synthesis in human memory B cells. *Cell. Immunol.* **2012**, *279*, 87–95.
75. Liang, M.; Lv, J.; Chu, H.; Wang, J.; Chen, X.; Zhu, X.; Xue, Y.; Guan, M.; Zou, H. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *76*, 104–111.
76. Limon, J.J.; Fruman, D.A. Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 228.
77. Yang, L.; Serada, S.; Fujimoto, M.; Terao, M.; Kotobuki, Y.; Kitaba, S.; Matsui, S.; Kudo, A.; Naka, T.; Murota, H.; et al. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. *PLoS One* **2012**, *7*, 41994.
78. Perl, A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat. Publ. Gr.* **2016**.
79. Su, T.I.K.; Khanna, D.; Furst, D.E.; Danovitch, G.; Burger, C.; Maranian, P.; Clements, P.J. Rapamycin versus methotrexate in early diffuse systemic sclerosis: Results from a randomized, single-blind pilot study. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 3821–3830.
80. Porta, C.; Paglino, C.; Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4 APR*, 64.
81. Werner, M.; Hobeika, E.; Jumaa, H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol. Rev.* **2010**, *237*, 55–71.
82. Guo, B.; Rothstein, T.L. B Cell Receptor (BCR) Cross-Talk: IL-4 Creates an Alternate Pathway for BCR-Induced ERK Activation That Is Phosphatidylinositol 3-Kinase Independent. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5375–5381.
83. Pauls, S.D.; Lafarge, S.T.; Landego, I.; Zhang, T.; Marshall, A.J. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: Activation mechanisms, regulation, and impact on cellular functions. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 224.

84. Porakishvili, N.; Vispute, K.; Steele, A.J.; Rajakaruna, N.; Kulikova, N.; Tsertsvadze, T.; Nathwani, A.; Damle, R.N.; Clark, E.A.; Rai, K.R.; et al. Rewiring of sigm-mediated intracellular signaling through the CD180 toll-like receptor. *Mol. Med.* **2015**, *21*, 46–57.
85. Li, P.P.; Liu, D.D.; Liu, Y.J.; Song, S.S.; Wang, Q.T.; Chang, Y.; Wu, Y.J.; Chen, J.Y.; Zhao, W. Di; Zhang, L.L.; et al. BAFF/BAFF-R involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis via PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 290–300.
86. Ge, F.; Wang, F.; Yan, X.; Li, Z.; Wang, X. Association of BAFF with PI3K/Akt/mTOR signaling in lupus nephritis. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 5793.
87. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023.
88. Matsushita, T.; Hasegawa, M.; Yanaba, K.; Kodera, M.; Takehara, K.; Sato, S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 192–201.
89. Bosello, S.; Pers, J.O.; Rochas, C.; Devauchelle, V.; De Santis, M.; Daridon, C.; Saraux, A.; Ferraccioli, G.F.; Youinou, P. BAFF and rheumatic autoimmune disorders: implications for disease management and therapy. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2007**, *20*, 1–8.
90. Thien, M.; Phan, T.G.; Gardam, S.; Amesbury, M.; Basten, A.; MacKay, F.; Brink, R. Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. *Immunity* **2004**, *20*, 785–798.
91. MacKay, F.; Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 491–502.
92. Matsushita, T.; Fujimoto, M.; Hasegawa, M.; Matsushita, Y.; Komura, K.; Ogawa, F.; Watanabe, R.; Takehara, K.; Sato, S. BAFF Antagonist Attenuates the Development of Skin Fibrosis in Tight-Skin Mice. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 2772–2780.
93. Vincent, T.; Plawecki, M.; Goulabchand, R.; Guilpain, P.; Eliaou, J.F. Emerging clinical phenotypes associated with anti-cytokine autoantibodies. *Autoimmun. Rev.*

- 2015, *14*, 528–535.
94. Price, J. V.; Haddon, D.J.; Kemmer, D.; Delepine, G.; Mandelbaum, G.; Jarrell, J.A.; Gupta, R.; Balboni, I.; Chakravarty, E.F.; Sokolove, J.; et al. Protein microarray analysis reveals BAFF-binding autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 5135.
 95. Schiemann, B.; Gommerman, J.L.; Vora, K.; Cachero, T.G.; Shutga-Morskaya, S.; Dobles, M.; Frew, E.; Scott, M.L. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science (80-.)*. **2001**, *293*, 2111–2114.
 96. Zhang, Y.; Li, J.; Zhang, Y.M.; Zhang, X.M.; Tao, J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*.
 97. Mackay, F.; Schneider, P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2008**, *19*, 263–276.
 98. Darce, J.R.; Arendt, B.K.; Wu, X.; Jelinek, D.F. Regulated Expression of BAFF-Binding Receptors during Human B Cell Differentiation. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7276–7286.
 99. Salazar-Camarena, D.C.; Ortiz-Lazareno, P.C.; Cruz, A.; Oregon-Romero, E.; Machado-Contreras, J.R.; Muñoz-Valle, J.F.; Orozco-López, M.; Marín-Rosales, M.; Palafox-Sánchez, C.A. Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2016**, *25*, 582–592.
 100. Zhao, L.D.; Li, Y.; Smith, M.F.; Wang, J.S.; Zhang, W.; Tang, F.L.; Tian, X.P.; Wang, H.Y.; Zhang, F.C.; Ba, D.N.; et al. Expressions of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. *Lupus* **2010**, *19*, 1534–1549.
 101. Abu-Rish, E.Y.; Amrani, Y.; Browning, M.J. Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology* **2013**, *52*, 1190–1201.
 102. Katsenelson, N.; Kanswal, S.; Puig, M.; Mostowski, H.; Verthelyi, D.; Akkoyunlu, M.

- Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 1785–1795.
103. Acosta-Rodríguez, E.E.; Craxton, A.; Hendricks, D.W.; Merino, M.C.; Montes, C.L.; Clark, E.A.; Gruppi, A. BAFF and LPS cooperate to induce B cells to become susceptible to CD95/Fas-mediated cell death. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 990–1000.
104. Roe, K.; Shu, G.L.; Draves, K.E.; Giordano, D.; Pepper, M.; Clark, E.A. Targeting Antigens to CD180 but Not CD40 Programs Immature and Mature B Cell Subsets to Become Efficient APCs. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 1715–1729.
105. Koarada, S.; Tada, Y. RP105-negative B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 259186.
106. Yang, Y.; Wang, C.; Cheng, P.; Zhang, X.; Li, X.; Hu, Y.; Xu, F.; Hong, F.; Dong, G.; Xiong, H. CD180 ligation inhibits TLR7-and TLR9-mediated activation of macrophages and dendritic cells through the Lyn-SHP-1/2 axis in murine lupus. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2643.
107. Zhu, X.; Chu, H.; Jiang, S.; Liu, Q.; Liu, L.; Xue, Y.; Zheng, S.; Wan, W.; Qiu, J.; Wang, J.; et al. Sirt1 ameliorates systemic sclerosis by targeting the mTOR pathway. *J. Dermatol. Sci.* **2017**, *87*, 149–158.
108. Li, X.; Jiang, S.; Tapping, R.I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* **2010**, *49*, 1–9.
109. Porakishvili, N.; Memon, A.; Vispute, K.; Kulikova, N.; Clark, E.A.; Rai, K.R.; Nathwani, A.; Damle, R.N.; Chiorazzi, N.; Lydyard, P.M. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **2011**, *153*, 486–498.
110. Forestier, A.; Guerrier, T.; Jouvray, M.; Giovannelli, J.; Lefèvre, G.; Sobanski, V.; Hauspie, C.; Hachulla, E.; Hatron, P.Y.; Zéphir, H.; et al. Altered B lymphocyte homeostasis and functions in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 244–255.
111. Haddon, D.J.; Diep, V.K.; Price, J. V.; Limb, C.; Utz, P.J.; Balboni, I. Autoantigen microarrays reveal autoantibodies associated with proliferative nephritis and active disease in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 1–12.
112. Senécal, J.-L.; Hoa, S.; Yang, R.; Koenig, M. Pathogenic roles of autoantibodies in

- systemic sclerosis: Current understandings in pathogenesis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2020**, *5*, 103–129.
113. Trembl, L.S.; Carlesso, G.; Hoek, K.L.; Stadanlick, J.E.; Kambayashi, T.; Bram, R.J.; Cancro, M.P.; Khan, W.N. TLR Stimulation Modifies B₂2 Receptor Expression in Follicular and Marginal Zone B Cells. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 7531–7539.
114. Ehrenstein, M.R.; Notley, C.A. The importance of natural IgM: Scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, *10*, 778–786.
115. Chun, H.Y.; Chung, J.W.; Kim, H.A.; Yun, J.M.; Jeon, J.Y.; Ye, Y.M.; Kim, S.H.; Park, H.S.; Suh, C.H. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* **2007**, *27*, 461–466.
116. Jego, G.; Bataille, R.; Pellat-Deceunynck, C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* **2001**, *97*, 1817–1822.
117. You, M.; Dong, G.; Li, F.; Ma, F.; Ren, J.; Xu, Y.; Yue, H.; Tang, R.; Ren, D.; Hou, Y. Ligation of CD180 inhibits IFN- α signaling in a Lyn-PI3K-BTK-dependent manner in B cells. *Cell. Mol. Immunol.* **2017**, *14*, 192–202.

9 Köszönetnyilvánítás

Kiemelt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Simon Diánának, aki PhD munkám során mindig lelkesen és példamutatóan irányította és magas színvonalú szakmai és gyakorlati tanácsaival segítette kutatási tevékenységemet és biztosította azok hátterét, illetve azért, hogy mindig barátián támogatott mindenben és bármikor fordulhattam hozzá tanácsért.

Külön köszönettel tartozom az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetvezetőjének, Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy lehetővé tette számomra az Intézetben való munkát, továbbá kiemelkedő szakmai támogatásáért és a rengeteg lehetőségért, amit számomra nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani a Reumatológiai és Immunológiai Klinika korábbi igazgatójának, Prof. Dr. Czirják Lászlónak, hogy lehetővé tette számomra, hogy betekintést nyerjek a Klinika működésébe és az SSc-s betegek ellátásába, és támogatta az Intézet és a Klinika közös kutatási irányait.

Hálával tartozom az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet összes dolgozójának rengeteg segítségükért és támogatásukért, illetve a mindig jó hangulatú légkörért.

Szeretnék köszönetet mondani a Reumatológiai és Immunológiai Klinika dolgozóinak, hogy az biztosították kísérleteinkhez nélkülözhetetlen SSc-s betegmintákat és klinikai adatokat.

Köszönettel tartozom Dr. Ráth Gábornak (PTE KK Gyermekgyógyászati Klinika), hogy biztosította vizsgálatainkhoz a mandula mintákat.

Köszönöm a Szentágotthai János Kutatóközpont Flow Citometria Core Facility-nek, hogy lehetővé tette számomra a FACS Canto áramlási citométer használatát.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Családomnak, akikre mindig számíthattam tanulmányaim és kutatói pályám során is, és akik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Munkám az alábbi támogatások segítségével valósult meg:

EFOP-3.6.1.-16-2016- 00004, GINOP 2.3.2-15-2016-00050, OTKA K-112939 (Prof. Dr. Czirják László), OTKA K-105962 (Prof. Dr. Berki Tímea), 2020-4.1.1-TKP2020, OTKA FK-139028 (Dr. Simon Diána), ÚNKP-21-3 (saját) és ÚNKP-21-5 (Dr. Simon Diána) kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjai, TKP2021-EGA.10, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Dr. Simon Diána)

10 Publikációs lista

10.1 A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. Szabina Erdő-Bonyár, Judit Rapp, Tünde Minier, Gábor Ráth, József Najbauer, László Czirják, Péter Németh, Tímea Berki, Diána Simon
Toll-Like Receptor Mediated Activation of Natural Autoantibody Producing B Cell Subpopulations in an Autoimmune Disease Model.
International journal of molecular sciences, **2019**, 20(24), 6152.
<https://doi.org/10.3390/ijms20246152> **IF: 4,556**
2. Diána Simon, Szabina Erdő-Bonyár, Judit Rapp, Péter Balogh, Tünde Minier, Gábor Gabriella Nagy, László Czirják, Tímea Berki
Analysis of PI3K Pathway Associated Molecules Reveals Dysregulated Innate and Adaptive Functions of B Cells in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis.
International journal of molecular sciences, **2021**, 22(6), 2877.
<https://doi.org/10.3390/ijms22062877> **IF: 5,923**
3. Szabina Erdő-Bonyár, Judit Rapp, Dávid Szinger, Tünde Minier, Gábor Kumánovics, László Czirják, Tímea Berki, Diána Simon
Ligation of TLR Homologue CD180 of B Cells Activates the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Systemic Sclerosis and Induces a Pathological Shift in the Expression of BAFF Receptors.
International Journal of Molecular Sciences, **2022**, 23(12), 6777.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126777> **IF: 6,208**

10.2 Egyéb publikációk

4. Hayden, Z., Erdő-Bonyár, S., Bóné, B., Balázs, N., Bodó, K., Illes, Z., Berki, T., & Simon, D. (2021). Toll-Like Receptor Homolog CD180 Expression Is Diminished on Natural Autoantibody-Producing B Cells of Patients with Autoimmune CNS Disorders.

Journal of immunology research, 2021, 9953317.
<https://doi.org/10.1155/2021/9953317> **IF: 4,818**

5. Böröcz, K., Simon, D., Erdő-Bonyár, S., Kovács, K. T., Tuba, É., Czirják, L., Németh, P., & Berki, T. (2021). Relationship between natural and infection-induced antibodies in systemic autoimmune diseases (SAD): SLE, SSc and RA. *Clinical and experimental immunology*, 203(1), 32–40. <https://doi.org/10.1111/cei.13521> **IF: 4,330**
6. Olmos Calvo, I., Kuten-Pella, O., Kramer, K., Madár, Á., Takács, S., Kardos, D., Simon, D., Erdő-Bonyár, S., Berki, T., De Luna, A., Nehrer, S., & Lacza, Z. (2021). Optimization of Lyophilized Hyperacute Serum (HAS) as a Regenerative Therapeutic in Osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7496. <https://doi.org/10.3390/ijms22147496> **IF: 5,923**
7. Schranz, D., Molnar, T., Erdo-Bonyar, S., Simon, D., Berki, T., Nagy, C., Czeiter, E., Buki, A., Lenzser, G., & Csecsei, P. (2021). Increased level of LIGHT/TNFSF14 is associated with survival in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta neurologica Scandinavica*, 143(5), 530–537. <https://doi.org/10.1111/ane.13394> **IF: 3,902**
8. Simon, D., Balogh, P., Erdő-Bonyár, S., Böröcz, K., Minier, T., Czirják, L., & Berki, T. (2021). Increased Frequency of Activated Switched Memory B Cells and Its Association With the Presence of Pulmonary Fibrosis in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis Patients. *Frontiers in immunology*, 12, 686483. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.686483> **IF: 7,561**
9. Schranz, D., Molnar, T., Erdo-Bonyar, S., Simon, D., Berki, T., Zavori, L., Szolics, A., Buki, A., Lenzser, G., & Csecsei, P. (2021). Fatty Acid-Binding Protein 3 and CXC-Chemokine Ligand 16 are Associated with Unfavorable Outcome in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 30(11), 106068. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106068> **IF: 2,136**

10. Hau, L., Tényi, T., László, N., Kovács, M. Á., Erdő-Bonyár, S., Csizmadia, Z., ... & Csábi, G. (2022). Anti-Neuronal Autoantibodies (Cell Surface and Onconeural) and Their Association With Natural Autoantibodies in Synthetic Cannabinoid-Induced Psychosis. *Frontiers in Psychiatry*, 13. doi: 10.3389/fpsy.2022.850955 **IF: 4,157**

11. Schranz, D., Molnar, T., Erdő-Bonyár, S., Simon, D., Berki, T., Nagy, C., Czeiter, E., Buki, A., Lenzser, G., & Csecsei, P. (2021). A magasabb LIGHT/TNFSF14 szint összefügg a subarachnoidális vérzésben szenvedők túlélésével. *FOCUS MEDICINAE* 23 : 1 pp. 6-13. , 8 p.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **16,687**

Az összes publikáció összesített impakt faktora: **48,821**

10.3 Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

1. A Magyar Immunológiai Társaság (MIT) 48. vándorgyűlése. 2019.10.16-18. Bükkfürdő: Flow cytometric analysis of tonsillar B cells activated via CD180
2. MEDPÉCS (Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences), 9th of November 2019, Pécs: Flow cytometric analysis of tonsillar B cells activated via CD180
3. EWRR (European Workshop for Rheumatology Research), 13-16th of February 2020, Leuven, Belgium: Activation of B cells via toll-like receptor analogue CD180 shift B cells to natural autoantibody production in a systemic sclerosis disease model
4. A Magyar Immunológiai Társaság (MIT) 49. vándorgyűlése, 2020.10.7-8, Online: A TLR-analóg (CD180) megváltoztatja a B-sejtek aktivációját és eloszlását szisztémás sclerosisban
5. MEDPÉCS (Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences), 17th of November 2020, Online: TLR analogue (CD180) alters B cell activation and distribution in systemic sclerosis
6. A Magyar Immunológiai Társaság (MIT) 50. vándorgyűlése 2021.10.20-22, Kecskemét:
 - a. B-sejtek funkcionális vizsgálata a PI3K jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó molekulák elemzésével szisztémás sclerosisban
 - b. A CD19/IgD/CD27/CD38/CD95 markerekkel definiált memória B-sejt alcsoportok megoszlásának eltérései szisztémás sclerosisban
7. Az "Intelligens szakosodás megvalósítása a Pécsi Tudományegyetemen" című online rendezvény, 2022.03.21-23: B-sejtek funkcionális vizsgálata a PI3K jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó molekulák elemzésével szisztémás sclerosisban

8. 51. Membrán-transzport konferencia, 2022.05.17-20, Sümeg: B-sejtek funkcionális vizsgálata a PI3K jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó molekulák elemzésével szisztémás sclerosisban

9. PTE helyi UNKP rendezvény, 2022.06.02, Pécs: A TLR homológ CD180 molekula szerepe a B-sejtek szignalizációjában, citokin- és antitesttermelésében



Article

Toll-Like Receptor Mediated Activation of Natural Autoantibody Producing B Cell Subpopulations in an Autoimmune Disease Model

Szabina Erdő-Bonyár ^{1,2}, Judit Rapp ¹, Tünde Minier ², Gábor Ráth ³, József Najbauer ¹,
László Czirják ², Péter Németh ¹, Tímea Berki ^{1,*} and Diána Simon ¹

¹ Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs Medical School, H-7624 Pécs, Hungary; erdo-bonyar.szabina@pte.hu (S.E.-B.); rapp.judit@pte.hu (J.R.); najbauer.jozsef@pte.hu (J.N.); nemeth.peter@pte.hu (P.N.); simon.diana@pte.hu (D.S.)

² Department of Rheumatology and Immunology, Clinical Center, University of Pécs Medical School, H-7632 Pécs, Hungary; minier.tunde@pte.hu (T.M.); czirjak.laszlo@pte.hu (L.C.)

³ Department of Pediatrics, Clinical Center, University of Pécs Medical School, H-7623 Pécs, Hungary; rath.gabor@pte.hu

* Correspondence: berki.timea@pte.hu; Tel.: +36-72-536-291; Fax: +36-72-536-289

Received: 15 October 2019; Accepted: 3 December 2019; Published: 6 December 2019



Abstract: Altered expression and function of the Toll-like receptor (TLR) homologue CD180 molecule in B cells have been associated with autoimmune disorders. In this study, we report decreased expression of CD180 at protein and mRNA levels in peripheral blood B cells of diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) patients. To analyze the effect of CD180 stimulation, together with CpG (TLR9 ligand) treatment, on the phenotype defined by CD19/CD27/IgD/CD24/CD38 staining, and function (CD69 and CD180 expression, cytokine and antibody secretion) of B cell subpopulations, we used tonsillar B cells. After stimulation, we found reduced expression of CD180 protein and mRNA in total B cells, and CD180 protein in B cell subpopulations. The frequency of CD180⁺ cells was the highest in the CD19⁺CD27⁺IgD⁺ non-switched (NS) B cell subset, and they showed the strongest activation after anti-CD180 stimulation. Furthermore, B cell activation via CD180 induced IL-6 and natural autoantibody secretion. Treatment with the combination of anti-CD180 antibody and CpG resulted in increased IL-6 and IL-10 secretion and natural autoantibody production of B cells. Our results support the role of CD180 in the induction of natural autoantibody production, possibly by NS B cells, and suggest an imbalance between the pathologic and natural autoantibody production in SSc patients.

Keywords: B cells; non-switched B cells; systemic sclerosis; dcSSc; TLR; CD180; RP105; CpG; IL-6; IL-10; natural autoantibodies; IgM; citrate synthase; DNA topoisomerase I

1. Introduction

The production of scleroderma-specific autoantibodies and secretion of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines by B cells is a well-described result that reflects immune dysregulation affecting B cells in systemic sclerosis (SSc) [1–4]. However, a large number of autoantibodies directed against well-conserved functional structures of the cell (e.g., nucleosome, DNA, nuclear and mitochondrial proteins, and receptors), the so-called natural autoantibodies that serve a protective function, can also be detected in healthy subjects and are dysregulated in patients with systemic autoimmune diseases [4,5].

Autoantibody production is a widely investigated function of B cells in SSc, but less attention has been devoted to their activation by innate immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs), that are involved in recognizing pathogen- and damage-associated molecular patterns. CD180, or RP105

(radioprotective 105 kDa), is a TLR-like membrane protein that lacks an intracellular Toll-IL-1R (TIR) signaling domain [6]. CD180 was originally defined as a B cell surface molecule mediating polyclonal B cell activation, proliferation, and immunoglobulin production [7,8]. It was later described as a TLR homologue also expressed by monocytes and dendritic cells (antigen presenting cells), and the expression of CD180 correlated with TLR4 expression. CD180 and its helper molecule, MD-1, interact directly with the TLR4 signaling complex, inhibiting its ability to bind microbial ligands; thus, it serves as a negative regulator of TLR4 responses of antigen-presenting cells [6,9].

Differential expression and functions of CD180 on B cells have been associated with immune-mediated pathologies, including infection, chronic inflammation, and autoimmune disorders [6]. The severity of the disease in systemic lupus erythematosus (SLE) patients correlated with the amount of CD180-negative B cells in the peripheral blood [10,11]. CD180-negative peripheral blood B cells were also increased in patients with Sjögren's syndrome; furthermore, these cells extensively infiltrated the salivary glands [12].

As the natural ligand of CD180 remains unknown, effects of crosslinking CD180 with monoclonal anti-CD180 antibody has been investigated. Anti-CD180 antibody activates over 85% of human and mouse B cells in vitro and induces robust immunoglobulin production [8]. The stimulation with anti-CD180 antibody synergizes with TLR9 ligands [8,13]. When CpG and anti-CD180 were used simultaneously, the proliferation of peripheral blood B cells was enhanced, and IgG and IgM production increased [13]. Simultaneous treatment with anti-CD180 antibody and LPS or CpG resulted in increased cytokine production of murine B cells [14].

In this study, we investigated the expression of CD180 at protein and mRNA levels in peripheral blood B cells of early diffuse cutaneous SSc (dcSSc) patients, and compared to healthy control (HC) B cells. We found that CD180 expression of dcSSc B cells was significantly lower than in HC B cells. To further investigate the role of CD180 in B cell activation, we used tonsillar B lymphocytes as a model. To investigate the CD180-mediated activation of B cell subsets, we used anti-CD180 antibody to ligate the receptor, and combined with treatment with CpG, a TLR9 ligand. Expression of CD180 in B cell subsets, and molecules of B cell activation, cytokine, and autoantibody production were analyzed. The frequency of CD180⁺ cells was the highest in non-switched memory (NS) B cells, which showed the strongest activation (CD69⁺) upon anti-CD180 stimulation. This activation was not influenced by the addition of CpG. Stimulation with anti-CD180 antibody alone, and in combination with CpG resulted in downregulation of CD180 protein and mRNA expression in total B cells, and decreased CD180 protein expression in B cell subsets. Activation via CD180 induced the elevation of IL-6 production and the anti-DNA topoisomerase I (anti-topo I) IgM natural autoantibody secretion, which were enhanced by the addition of CpG. Furthermore, treatment with the combination of anti-CD180 antibody and CpG resulted in increased IL-10 secretion and anti-citrate synthase IgM natural autoantibody production of B cells. Our results support the role of CD180 in the induction of natural autoantibody production, possibly by NS B cells, which are diminished in SSc patients, resulting in an imbalance between the pathologic and natural autoantibody production.

2. Results

2.1. CD180 Expression Is Decreased in dcSSc B Cells

Since it was described in other autoimmune diseases that differential expression of CD180 (RP105) might have a pathological role in B cell activation and autoantibody production [10–12,15], first we determined the CD180 expression of monocytes, T cells, and B cells. We compared the level (mean fluorescence intensity, MFI) of CD180 in PBMC samples of early, untreated dcSSc patients and HCs with flow cytometry. We found that the MFI of CD180 labeling was the highest in B cells, followed by monocytes, and T cells showed the lowest expression. The expression of CD180 in monocytes and T cells was similar in patients and HCs, while its level was significantly lower in B cells of dcSSc patients than in HC B cells (Figure 1A,B). Next, we examined the mRNA expression of the CD180

gene in purified B cells of early, untreated dcSSc patients and compared to HCs. We found highly downregulated expression of CD180 mRNA in dcSSc patients (Figure 1C).

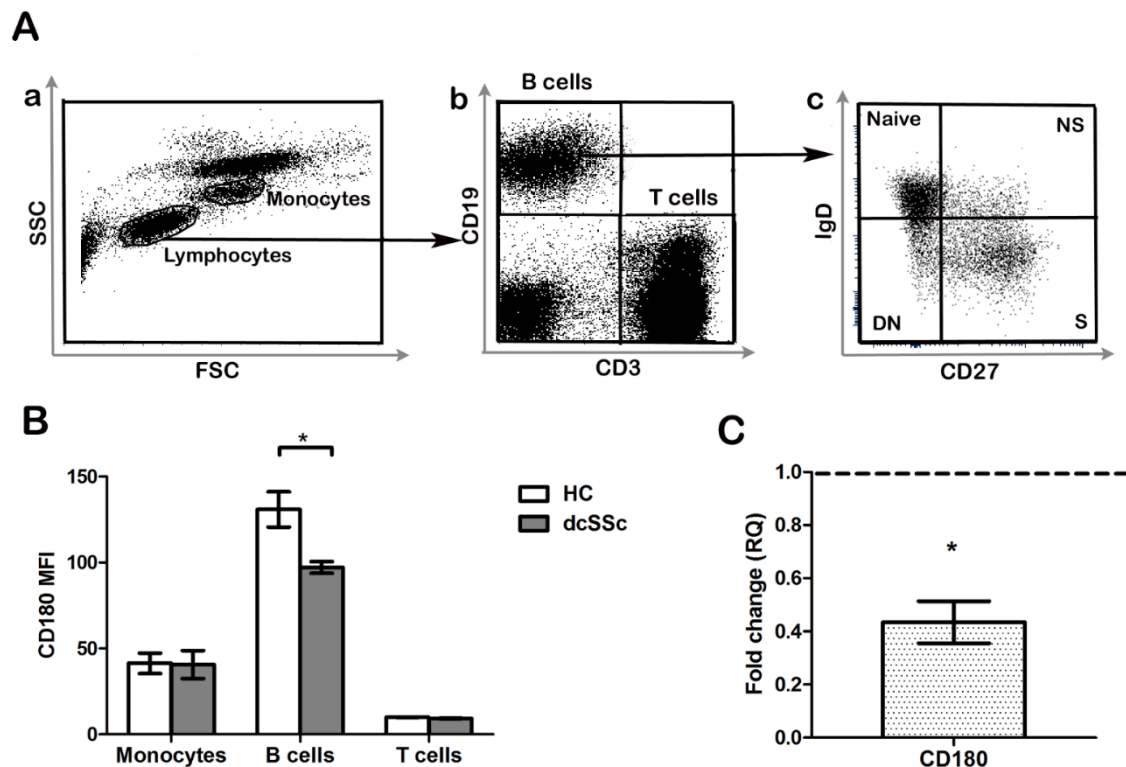


Figure 1. Analysis of CD180 expression in diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) B cells. (A) Representative flow cytometry plots of peripheral blood leukocytes (a), B and T cells (b), and CD19⁺ B cells stained with CD27 and IgD defining the following four subsets: CD27⁺IgD⁺ non-switched memory (NS) B cells, CD27⁺IgD⁻ switched memory (S) B cells, CD27⁻IgD⁺ naive B cells, and CD27⁻IgD⁻ double negative (DN) B cells (c). (B) Flow cytometric analysis of CD180 expression in peripheral blood B cells, T cells, and monocytes of early untreated dcSSc patients compared to healthy controls (HCs). (C) CD180 mRNA expression in B cells of early untreated dcSSc patients compared to HCs. Gene expression was normalized to HCs and the horizontal line (value 1) represents the expression of control samples. Changes in gene expression are shown as relative quantification (RQ) values. Data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 4$ HC and $n = 4$ dcSSc, * $p < 0.05$.

2.2. TLR Ligation Results in Reduced CD180 mRNA and Protein Expression of B Cells

The CD180-negative B cells were described as highly activated cells in SLE [11], and stimulation via CD180 is known to activate B cells [6]. Furthermore, TLR ligands were reported to downregulate the mRNA expression of CD180 molecule [16], thus we hypothesized that the decreased CD180 expression of dcSSc B cells could be a result of activation through TLRs. To investigate whether TLR stimulation leads to diminished expression of CD180 molecules in B cells, we stimulated tonsillar B cells with anti-CD180 antibody. We measured the expression of CD180 at protein and mRNA levels, and found that following anti-CD180 ligation, the MFI and mRNA levels of CD180 significantly decreased (Figure 2A,B). To study the influence of other TLR ligands on the activation via CD180, we co-treated the B cells with CpG, and found that the expression of CD180 was similar to anti-CD180-stimulated cells both at protein (Figure 2A) and mRNA (Figure 2B) levels. Treatment with CpG alone did not result in changes of CD180 MFI (Figure 2A) or CD180 mRNA (Figure 2B) levels in B cells.

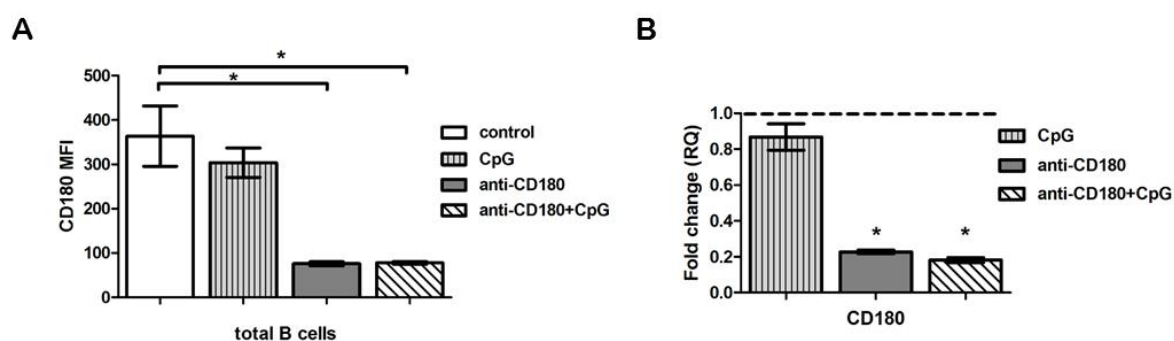


Figure 2. Effect of Toll-like receptor (TLR) stimulation on CD180 protein and mRNA expression. (A) CD180 expression of unstimulated (control), CpG, anti-CD180 antibody-stimulated, and anti-CD180 + CpG-treated (24 h) tonsillar B cells (mean fluorescence intensity, MFI). (B) CD180 mRNA expression in tonsillar B cells following CpG, anti-CD180, and anti-CD180 + CpG stimulation (24 h). Changes in gene expression are shown as RQ values, normalized to unstimulated controls. The horizontal line (value 1) represents the CD180 mRNA of unstimulated control samples. Data are shown as mean \pm SEM, $n = 4$, * $p < 0.05$.

2.3. The Frequency of CD180⁺ Cells Is the Highest in the Non-Switched Memory B Cell Subset

To assess phenotypical and functional alterations of B cells upon anti-CD180 stimulation, first we investigated the expression of CD180 in B cell subsets, defined by CD27 and IgD labeling (Figure 1A). Using tonsillar B cells, we analyzed the following subpopulations: CD27⁺IgD⁺ non-switched memory (NS) B cells, CD27⁺IgD⁻ switched memory (S) B cells, CD27⁻IgD⁺ naive B cells (N), and CD27⁻IgD⁻ double negative (DN) B cells. We found that the percentage of CD180⁺ cells was significantly higher in NS B cells compared to all other subsets, namely, naive, S, and DN B cells (Figure 3A,B). Next, we measured the changes in the percentage of CD180⁺ B cells in the NS, S, naive, and DN B cell subpopulations upon anti-CD180 stimulation, and found that the frequency of CD180⁺ cells was significantly decreased in all four B cell subsets (Figure 3B). Addition of CpG to the anti-CD180 antibody-treated B cells did not result in further changes in the ratio of CD180⁺ B cell subpopulations (Figure 3B). Treatment with CpG alone did not reduce the percentage of CD180⁺ cells in the investigated B cell subsets (Figure 3B). The overall pattern of the changes in CD180 MFI in the investigated B cell subsets was similar to that found in the frequency of CD180⁺ cells, but the CD180 MFI in unstimulated B cells was the highest in naive B cells (Figure 3C). We also investigated the expression of CD180 in regulatory B cells (Bregs). There is still no consensus on the phenotype of Bregs, multiple subsets with many similarities in phenotype and effector functions have been described [17]. In humans, both CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} [18] and CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ [19] Bregs have been defined. Based on these findings, we analyzed the CD180 expression of Breg subsets with these phenotypes using flow cytometry. We found that the percentage of CD180⁺ cells and the MFI of CD180 labeling was significantly decreased after anti-CD180 antibody treatment, and also after combined treatment with anti-CD180 antibody and CpG (Figure 3D,E).

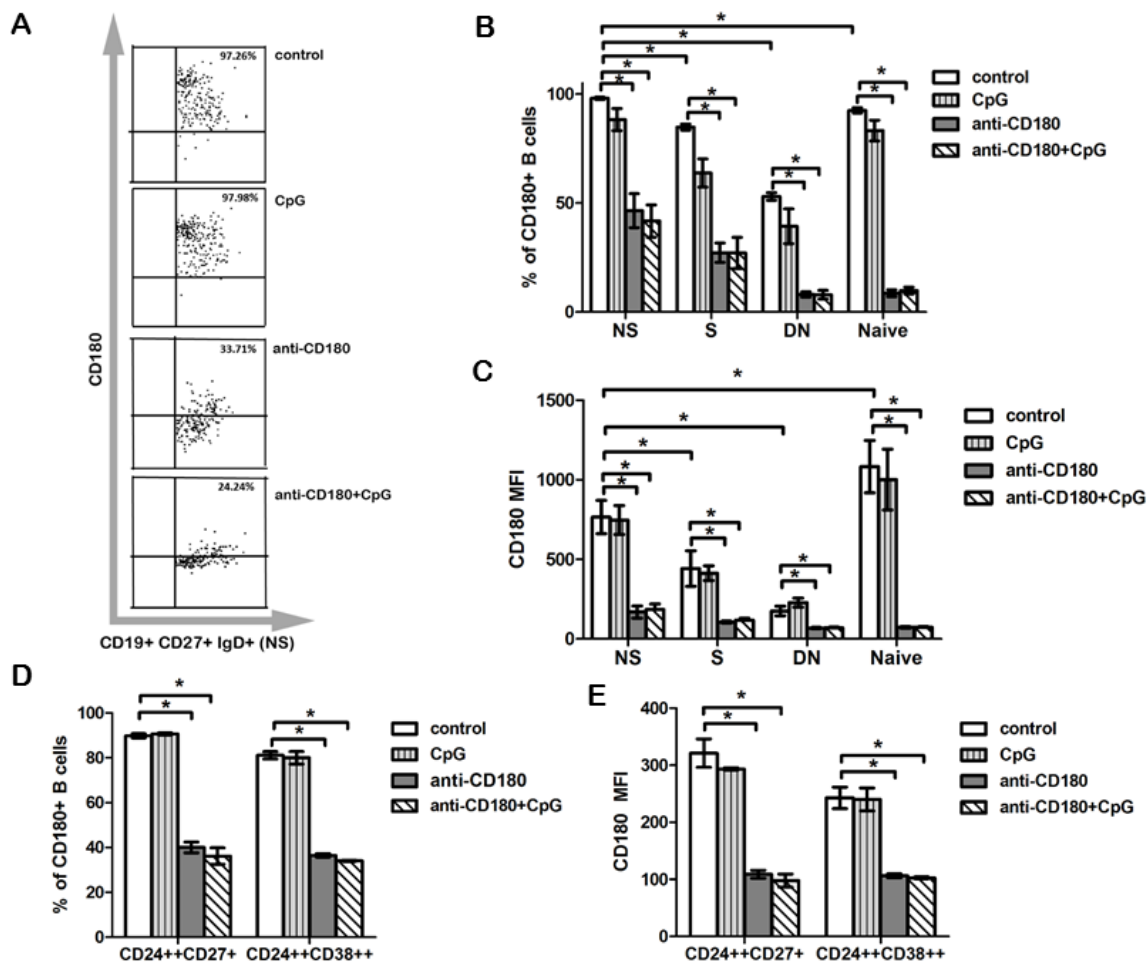


Figure 3. Effect of TLR stimulation on CD180 expression in B cell subpopulations. Flow cytometric analysis of the distribution of CD180⁺ B cells and CD180 MFI in CD27⁺IgD⁺ non-switched memory (NS), CD27⁺IgD⁻ switched memory (S), CD27⁻IgD⁺ naive, and CD27⁻IgD⁻ double negative (DN) B cell subsets (A–C), and in CD24^{high}CD38^{high} and CD24^{high}CD27⁺ Breg subsets (D,E). Representative dot plots show the changes of CD180 positivity in control and treated NS B cells (A). Changes of CD180⁺ cell ratios (B) and CD180 MFI (C) in different B cell subsets defined by CD27 and IgD staining after CpG, anti-CD180 antibody stimulation or anti-CD180 + CpG treatment. Changes of CD180⁺ cell ratios (D) and CD180 MFI (E) in Breg subsets defined by CD24, CD27, and CD38 staining after CpG, anti-CD180 antibody stimulation or anti-CD180 + CpG treatment. Data are presented as means \pm SEM, $n = 4$, * $p < 0.05$.

2.4. Anti-CD180 Stimulation Resulted in Activation of B Cell Subsets

We also examined the activation of the B cell subsets defined by CD27 and IgD labeling after 24 h of anti-CD180, CpG, and anti-CD180 + CpG stimulation by detecting CD69, an early activation marker. Upon anti-CD180 stimulation, the frequency of CD69⁺ cells was increased in all investigated subsets compared to CpG stimulation, showing the highest ratio in NS B cells (Figure 4A,B). This result is consistent with our observation that NS B cells show the highest ratio of CD180⁺ cells. CpG, when used together with anti-CD180 antibody stimulation, did not alter the percentage of CD69⁺ cells in NS, S, or DN B cells compared to anti-CD180 stimulation alone. However, a significant decrease in the frequency of CD69⁺ naive B cells was observed, compared to anti-CD180 ligation alone (Figure 4B). The overall pattern of the changes in CD69 MFI was similar to that found in the frequency of CD69⁺ cells, and after anti-CD180 antibody stimulation, the CD69 MFI was the highest in NS B cells. Yet, CD69 MFI was not significantly different between CpG- and anti-CD180 + CpG-stimulated DN B cells,

while combined anti-CD180 and CpG treatment compared to anti-CD180 antibody stimulation alone significantly reduced the MFI of CD69 in DN B cells (Figure 4C).

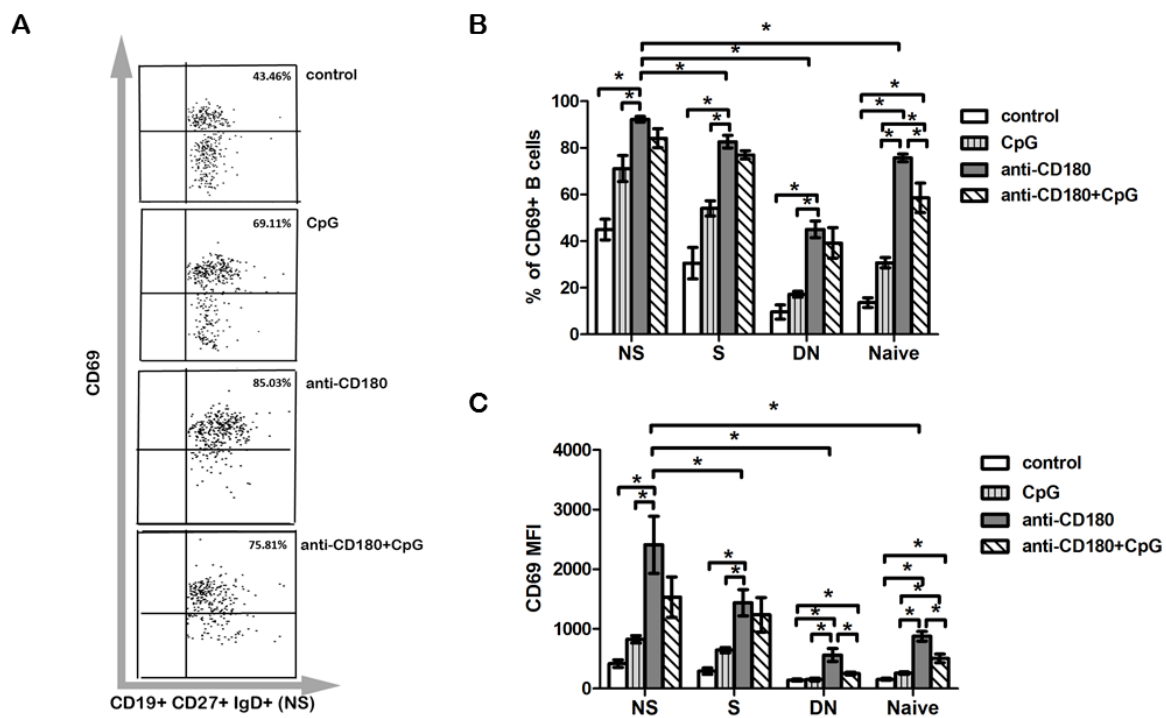


Figure 4. Expression of CD69 activation marker on B cell subpopulations. Representative dot plots show the changes of CD69 positivity in control and treated NS B cells (A). The percentage of CD69⁺ (B) B cells and CD69 MFI (C) in CD27⁺IgD⁺ non-switched memory (NS), CD27⁺IgD⁻ switched memory (S), CD27⁻IgD⁺ naive, and CD27⁻IgD⁻ double negative (DN) B cell subsets defined by CD27 and IgD in anti-CD180 antibody, CpG-stimulated, and in anti-CD180 and CpG co-treated tonsillar B cells. Data are presented as means \pm SEM, $n = 4$, * $p < 0.05$.

2.5. TLR Stimulation Differentially Affects IL-6 and IL-10 Production of B Cells

Recently, it was described that prominent IL-6 production by activated B cells promotes spontaneous germinal center formation and plasma cell differentiation, further supporting the role of this cytokine in the pathogenesis of systemic autoimmune diseases [20]. To test whether anti-CD180 stimulation influences B cell-derived IL-6 production, or induces the production of Breg cytokine IL-10, we measured the concentration of these cytokines in the supernatant of separated B cells after 24 h of stimulation. Anti-CD180 stimulation alone significantly increased the concentration of IL-6 in the supernatant of tonsillar B cells compared to both unstimulated and CpG-stimulated cells, while it had no significant effect on the production of IL-10. CpG on its own significantly elevated the concentration of IL-6 in the supernatant, but did not increase the production of IL-10. However, supplementing anti-CD180 antibody with CpG significantly augmented the production of both IL-6 and IL-10 compared to unstimulated, CpG-, and anti-CD180-stimulated B cells (Figure 5A,B).

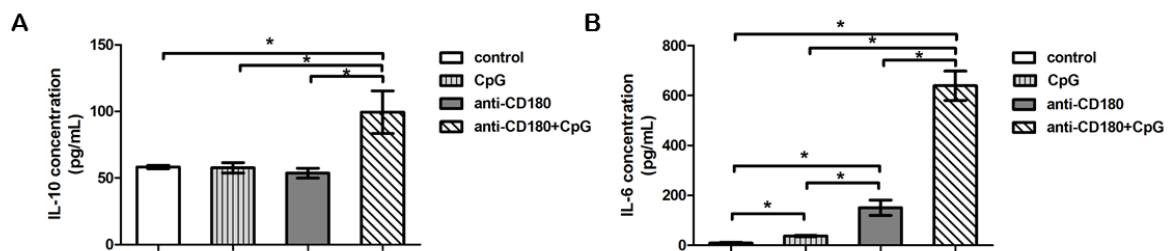


Figure 5. TLR induced cytokine production of total B cells. Detection of IL-6 (A) and IL-10 cytokines (B) in the supernatant of tonsillar B cells stimulated with CpG, anti-CD180 antibody, or anti-CD180 + CpG, or left unstimulated (control), as measured by ELISA. Data are presented as means \pm SEM, $n = 4$, * $p < 0.05$.

2.6. CD180 Stimulation Induces Natural Autoantibody Production

Since CD180 stimulation resulted in the most pronounced activation of NS memory B cells, resembling the B1 B cell population, which includes cells responsible for natural IgM autoantibody production [21], we investigated the effect of CD180 ligation on the production of natural autoantibodies by tonsillar B cells. In our previous studies, we detected anti-citrate synthase (CS) IgM antibodies in HCs and patients with autoimmune diseases [22,23]. Here we measured the anti-CS IgM autoantibody in the supernatant of anti-CD180-stimulated and control tonsillar B cells after 7 days of culture, but did not find any differences between the control and anti-CD180-stimulated samples. Treatment with CpG alone resulted in a significant increase in the level of anti-CS IgM in the supernatant. Combined treatment with anti-CD180 antibody and CpG significantly increased the production of anti-CS IgM autoantibody compared to unstimulated, CpG-, and anti-CD180-stimulated B cells (Figure 6A).

Previously, we reported that different epitopes of topoisomerase I (Scl-70) induce not only pathologic autoantibodies in dcSSc patients, but the antigen has epitopes (including F4) that induce natural autoantibody production in healthy individuals as well [24]. Therefore, we also measured the level of anti-topoisomerase I F4 fragment (anti-topo I) antibody in the supernatant of CD180-stimulated B cells. Anti-CD180 itself significantly raised the level of anti-topo I IgM antibodies in the supernatant of tonsillar B cells similarly to CpG, and the level was further elevated with addition of CpG (Figure 6B). Further, we measured the production of pathologic autoantibodies in the supernatant of anti-CD180- and anti-CD180 + CpG-stimulated tonsillar B cells. Antinuclear antibodies (ANA), anti-dsDNA, and anti-nucleosome antibodies were not detectable in the supernatant of B cells under the investigated conditions.

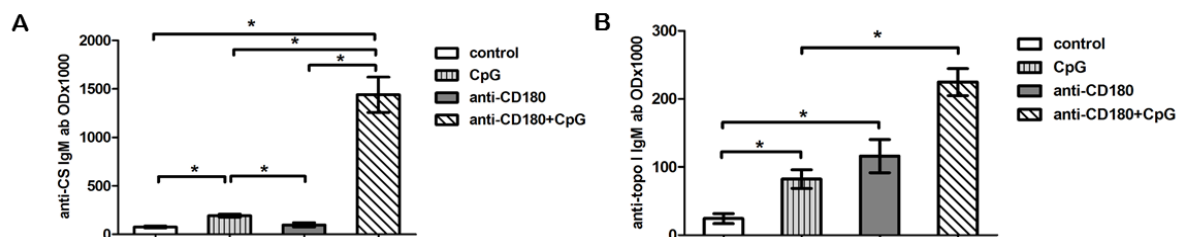


Figure 6. Induction of natural autoantibody production by TLR stimulation. Anti-citrate synthase IgM and (A) anti-DNA topoisomerase I IgM (B) production of B cells stimulated with CpG, anti-CD180 antibody, or anti-CD180 + CpG, or left unstimulated (control). Data are presented as means \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0.05$.

3. Discussion

In SSc, data on the role of innate immune molecules in the dysregulated B cell functions are scarce. The TLR homologue CD180 molecule activates the majority of B cells, resulting in phenotypic and functional alterations [8,14,25]. CD180-negative B cells, macrophages, and dendritic cells were

shown to be elevated in SLE and in lupus-prone mice [15,26]. Here, we demonstrated that the expression of CD180 is decreased in early dcSSc peripheral blood B cells compared to HCs, while the percentage of CD180-negative monocytes was unaltered, emphasizing the potential role of CD180 in B cell dysfunction in SSc. CD180-negative B cells in SLE were described as highly activated cells [15], and CD180 can be internalized after ligation by anti-CD180 antibody [14]; thus, B cell activation via CD180 might be a possible explanation for the decreased expression of CD180 in SSc B cells.

We were the first to investigate the distribution of CD180 molecules in tonsillar B cell subpopulations defined by CD27 and IgD labeling, and found that the frequency of CD180⁺ cells was the highest among NS cells. The percentage of CD180⁺ cells was significantly decreased in all subsets upon anti-CD180 stimulation, suggesting that ligation of CD180 triggered its internalization. Interestingly, we also found that anti-CD180 stimulation downregulated the mRNA expression of CD180, strengthening the possibility of autoregulation of CD180 expression by B cells. Signaling via TLRs can interfere with CD180 signals, since ligands of TLR7 and TLR9 have already been shown to downregulate CD180 expression in human peripheral blood B cells [16]. Nevertheless, according to our results, co-treatment with anti-CD180 and CpG reduced the expression of CD180 to a similar level as anti-CD180 did on its own, while CpG treatment alone had no significant effect on the expression of CD180. All investigated B cell subsets were activated by anti-CD180 and anti-CD180 and CpG co-treatment, as indicated by CD69 expression.

Anti-CD180 antibody is known to activate marginal zone (MZ) B cells and induces overexpression of CD69 in mice [14]. NS B cells in human peripheral blood represent MZ-derived B cells [21], and according to our results, ratio of CD69⁺ cells was the highest among NS B cells upon anti-CD180 stimulation. Moreover, the combination of anti-CD180 stimulation with CpG showed no additional effect on the activation of NS B cells.

We have already described that the percentage of NS B cells is lower in SSc than in HC [27]. NS B cells resemble B1 B cells with innate-like features [21], suggesting that they produce natural autoantibodies. Natural IgM autoantibodies are polyreactive and serve as scavengers of damaged molecules and cells, and therefore have been implicated in the control of inflammation and autoimmune diseases [28]. The therapeutic effects of intravenous immunoglobulins (IVIg) could partly be due to the appropriate pool of natural autoantibodies [29], and IVIg seems to be beneficial in SSc [30]; therefore, we also examined the effect of anti-CD180 and anti-CD180 and CpG co-treatment on the production of natural and pathologic autoantibodies of tonsillar B cells. Pathologic autoantibodies were undetectable in the supernatant of cells, while anti-CD180 and CpG co-treatment significantly enhanced the production of both anti-CS and anti-topoisomerase I IgM antibodies, suggesting the synergistic beneficial effect of anti-CD180 antibody and TLR9 ligand on natural antibody production of B cells. Interestingly, anti-CD180 stimulation increased the level of anti-topoisomerase I IgM, while it had no influence on anti-CS IgM production. However, CpG stimulation increased the level of anti-topoisomerase I IgM and anti-CS IgM as well. CS molecule is not the target of a disease-specific pathologic antibody, while natural anti-topoisomerase I autoantibodies recognize distinct epitopes of topoisomerase I, which is the target antigen of an SSc-specific pathologic autoantibody (anti-Scl-70) [24]. The onset of autoimmune diseases may correlate with a switch from production of self-reactive low-affinity IgM to high-affinity IgG isotype autoantibodies by B cells. B cell activation via CD180 may have a role in regulating the level of natural IgM antibodies directed against the target antigens of pathologic antibodies.

The serum concentration of IL-6 is elevated both in SSc [31] and SLE patients [32]; furthermore, IL-6 production by B cells drives autoimmune germinal center formation in a mouse model of SLE, promoting the disease [20]. We found that anti-CD180 stimulation enhanced the IL-6 production by tonsillar B cells, which was further augmented by the addition of CpG. IL-6 was shown to have a pronounced effect on plasma cell survival [33], and if combined with IL-2 or IL-10, IL-6 enhanced the generation of early plasma cells [34]. Moreover, in SLE patients, endogenous IL-6 produced by B cells bound to IL-6R of B cells and drove them into terminal differentiation [35]. Consequently, B cell

activation via CD180 alone or together with the TLR9 ligand may help plasma cell differentiation and antibody production. Bregs are decreased and functionally impaired in SSc patients [36], thus we also investigated the effect of anti-CD180 treatment on the IL-10 production of B cells. We found that CpG alone did not induce the production of IL-10, which is in agreement with the findings of Gantner et al. [37]. The concentration of IL-10 was increased only when anti-CD180 antibody was combined with CpG, suggesting their synergistic effect on Bregs. However, CD180 expression was significantly decreased in CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} and CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ Breg subsets after anti-CD180 antibody treatment, and also after combined treatment with anti-CD180 antibody and CpG, suggesting that anti-CD180 antibody stimulation alone may influence Breg functions other than the production of IL-10.

Our findings suggest that the TLR homologue CD180 molecule may be involved in B cell dysfunction in early dcSSc. We also described the effects of anti-CD180 activation on natural autoantibody and cytokine production of tonsillar B cells and conclude that our data raise the possibility that anti-CD180 stimulation might shift the type of antibodies produced by B cells towards the natural autoantibodies.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

Diffuse cutaneous systemic sclerosis patients (dcSSc) enrolled for the gene expression and flow cytometric studies all fulfilled the 2013 ACR/EULAR SSc classification criteria. Disease duration was 1.75 ± 0.96 years, age at enrollment was 39 ± 22.73 years. None of the patients were on current or previous immunosuppressive therapy. The controls were age- and sex-matched healthy individuals (HC). All participants gave their informed consent to the study following approval by the Hungarian National Ethics Committee (ETT TUKEB 47861-6/2018/EKU) and Regional Clinical Research Ethics Committee (7724-PTE 2019).

4.2. Mononuclear Cell Isolation, B Cell Separation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) density gradient centrifugation of peripheral blood samples (SSc $n = 4$, HC $n = 4$). Negative selection of B cells was performed using the MACS B cell isolation kit II (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's protocol. B cell purity was >95%.

Tonsil tissue was collected from asymptomatic children who underwent routine tonsillectomy at the Department of Pediatrics, University of Pécs. After surgical removal, the tonsils were transported immediately to the laboratory and they were prepared the same day.

Tonsils were manually homogenized, and the cell suspension was filtered through a 70 μm sterile cell strainer, followed by isolation of mononuclear cells and separation of B cells, as described above.

4.3. Cell Stimulation

For RNA isolation, B cell subset analysis and cytokine measurements, 3×10^5 B cells were stimulated with LEAF Purified anti-human CD180 (RP105) antibody (Clone: MHR73-11) (BioLegend, San Diego, CA, USA) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hereafter referred to as anti-CD180) or anti-CD180 in combination with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CpG (Hu/Ms CpG-B DNA, ODN2006, Hycult Biotech, Wayne, NJ, USA) or with CpG alone or were left unstimulated for 24 h at 37 °C. To assess natural and pathologic antibody production, 4×10^5 B cells were stimulated with anti-CD180, or CpG or anti-CD180 in combination with CpG, or left unstimulated for 7 days at 37 °C.

4.4. RNA Isolation, cDNA Synthesis, and qPCR

Total RNA was extracted from isolated B cells using the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA, USA). Following cDNA generation (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit,

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), the CD180 mRNA expression was analyzed individually in dcSSc patients ($n = 4$) and HCs ($n = 4$) using Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To determine the CD180 mRNA expression of tonsillar B cells ($n = 4$), the SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit (Bioline, London, UK) was used. Amplifications were performed using an Applied Biosystems 7500 RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression was analyzed with 7500 Software v2.0.6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and normalized to GAPDH (a “housekeeping” gene) as reference. Fold changes (RQ) were calculated according to the 2^{-ddC_T} method.

4.5. Flow Cytometric Analysis

To measure the expression of CD180 of B cells, PBMCs from dcSSc patients ($n = 4$) and HCs ($n = 4$) were labeled with the combination of anti-human CD19-AmCyan (SJ25C1, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and anti-human CD180-PE (G28-8, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) antibodies. Multiparametric flow cytometry was performed on tonsillar B cells ($n = 4$) with antibodies specific for CD19, CD27, IgD, CD24, CD38, CD180, and CD69. Purity of B cells was assessed using anti-human CD19-AmCyan antibody. To distinguish between memory B cell subsets and to evaluate the expression of CD180 and the activation marker CD69, four-color analysis was conducted using the combination of anti-human CD27-PE/Cy7 (M-T271, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-human IgD-PerCP (IA6-2, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD180-PE (G28-8, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and anti-human CD69-APC/Cy7 (FN50, BioLegend, San Diego, CA, USA), while Breg subsets were defined by anti-human CD27-PE/Cy7, anti-human CD24-BV421 (ML5, BioLegend, San Diego, CA, USA), and anti-human CD38-APC/Cy7 (HIT2, BioLegend, San Diego, CA, USA) antibodies following the manufacturer’s instructions. Briefly, PBMCs or separated B cells were incubated with the appropriate antibodies for 30 min on ice, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and fixed with FACSFix (0.5% PFA in PBS). Fluorescence of the labeled cells was recorded using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed with FCS Express 6 software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA).

4.6. IL-10 and IL-6 ELISA

Supernatant of anti-CD180, CpG, and CpG + anti-CD180 stimulated, and unstimulated B cells were collected ($n = 4$) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until being measured. IL-10 and IL-6 production was quantified using Human IL-10 and IL-6 DuoSet ELISA kits (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer’s protocols. The reaction was developed with TMB and measured at 450 nm using an iEMS MF microphotometer (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA).

4.7. Measurement of Natural and Pathologic Autoantibodies

The supernatant obtained from tonsillar B cells treated with anti-CD180, CpG, or CpG + anti-CD180, or left unstimulated were collected ($n = 3$) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until being measured. The levels of anti-citrate synthase (anti-CS) IgM autoantibodies and anti-topoisomerase I (fragment F4) IgM autoantibodies were determined with in-house ELISAs, as previously described [23,24]. The amounts of autoantibodies against dsDNA, nucleosome, and antinuclear antibodies (ANA) in the supernatant of tonsillar B cells were measured using commercial ELISA kits (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz, Germany). The reaction was developed with TMB and measured at 450 nm using an iEMS MF microphotometer (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA).

4.8. Statistical Analysis

Statistical evaluation was performed with SPSS v. 25.0 statistics package (IBM, Armonk, NY, USA) using Student’s *t*-tests and ANOVA where *p*-values < 0.05 were considered significant.

Author Contributions: Conceptualization: D.S. and T.B.; methodology: D.S., J.R., and T.B.; software: D.S. and T.B.; validation: D.S. and T.B.; formal analysis: D.S. and T.B.; investigation: S.E.-B. and D.S.; resources: T.B., P.N., and L.C.; data curation: S.E.-B., D.S., T.M., and G.R.; writing—original draft preparation: D.S., S.E.-B., and T.B.; writing—review and editing: D.S., T.B., and J.N.; visualization: S.E.-B., D.S., and T.B.; supervision: D.S. and T.B.; project administration: D.S. and T.B.; funding acquisition: T.B., L.C., and P.N.

Funding: This work was supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA) K-75912, K-112939 to L.C. and K-105962 to T.B. The work was also supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund as part of the project “PEPSYS—Complexity of peptide-signalization and its role in systemic diseases” of GINOP 2.3.2-15-2016-00050 and EFOP 3.6.1-16-2016-00004 grants.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Abbreviations

ANA	Antinuclear antibodies
Breg	Regulatory B cell
CpG	5′—C—phosphate—G—3′ dinucleotide
CS	Citrate synthase
dcSSc	Diffuse cutaneous systemic sclerosis
DN B	Double negative B cell
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FSC	Forward scatter
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HC	Healthy control
Hu	Human
LEAF	Low endotoxin, azide-free
MFI	Mean fluorescence intensity
Ms	Mouse
MZ	Marginal zone
NS B	Non-switched B cell
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PFA	Paraformaldehyde
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RQ	Relative quantification
S B	Switched B cell
SLE	Systemic lupus erythematosus
SSc	Systemic sclerosis
SSC	Side scatter
TLR	Toll-like receptor
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine
Topo I	Topoisomerase I

References

- Varga, J.; Trojanowska, M.; Kuwana, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 137–152. [[CrossRef](#)]
- Cabral-Marques, O.; Riemekasten, G. Functional autoantibodies directed against cell surface receptors in systemic sclerosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 160–168. [[CrossRef](#)]
- Johnson, M.E.; Grasseti, A.V.; Taroni, J.N.; Lyons, S.M.; Schweppe, D.; Gordon, J.K.; Spiera, R.F.; Lafyatis, R.; Anderson, P.J.; Gerber, S.A.; et al. Stress granules and RNA processing bodies are novel autoantibody targets in systemic sclerosis. *Arthritis Res.* **2016**, *18*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Senécal, J.; Hoa, S.; Yang, R.; Koenig, M. Pathogenic roles of autoantibodies in systemic sclerosis: Current understandings in pathogenesis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2019**. [[CrossRef](#)]
- Mannoor, K.; Xu, Y.; Chen, C. Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* **2013**, *46*, 138–147. [[CrossRef](#)]

6. Schultz, T.E.; Blumenthal, A. The RP105/MD-1 complex: Molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *101*, 183–192. [[CrossRef](#)]
7. Valentine, M.A.; Clark, E.A.; Shu, G.L.; Norris, N.A.; Ledbetter, J.A. Antibody to a novel 95-kDa surface glycoprotein on human B cells induces calcium mobilization and B cell activation. *J. Immunol.* **1988**, *140*, 4071–4078.
8. Chaplin, J.W.; Kasahara, S.; Clark, E.A.; Ledbetter, J.A. Anti-CD180 (RP105) activates B cells to rapidly produce polyclonal Ig via a T cell and MyD88-independent pathway. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4199–4209. [[CrossRef](#)]
9. Divanovic, S.; Trompette, A.; Atabani, S.F.; Madan, R.; Golenbock, D.T.; Visintin, A.; Finberg, R.W.; Tarakhovskiy, A.; Vogel, S.N.; Belkaid, Y.; et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 571–578. [[CrossRef](#)]
10. Fujita, K.; Akasaka, Y.; Kuwabara, T.; Wang, B.; Tanaka, K.; Kamata, I.; Yokoo, T.; Kinoshita, T.; Iuchi, A.; Akishima-Fukasawa, Y.; et al. Pathogenesis of lupus-like nephritis through autoimmune antibody produced by CD180-negative B lymphocytes in NZBWF1 mouse. *Immunol. Lett.* **2012**, *144*, 1–6. [[CrossRef](#)]
11. Koarada, S.; Tada, Y.; Ushiyama, O.; Morito, F.; Suzuki, N.; Ohta, A.; Miyake, K.; Kimoto, M.; Nagasawa, K. B cells lacking RP105, a novel B cell antigen, in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1999**, *42*, 2593–2600. [[CrossRef](#)]
12. Kikuchi, Y.; Koarada, S.; Nakamura, S.; Yonemitsu, N.; Tada, Y.; Haruta, Y.; Morito, F.; Ohta, A.; Miyake, K.; Horiuchi, T.; et al. Increase of RP105-lacking activated B cells in the peripheral blood and salivary glands in patients with Sjögren’s syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2008**, *26*, 5–12. [[PubMed](#)]
13. Eriksen, A.B.; Indrevær, R.L.; Holm, K.L.; Landskron, J.; Blomhoff, H.K. TLR9-signaling is required for turning retinoic acid into a potent stimulator of RP105 (CD180)-mediated proliferation and IgG synthesis in human memory B cells. *Cell Immunol.* **2012**, *279*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chaplin, J.W.; Chappell, C.P.; Clark, E.A. Targeting antigens to CD180 rapidly induces antigen-specific IgG, affinity maturation, and immunological memory. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2135–2146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Koarada, S.; Tada, Y. RP105-negative B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 259186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. You, M.; Dong, G.; Li, F.; Ma, F.; Ren, J.; Xu, Y.; Yue, H.; Tang, R.; Ren, D.; Hou, Y. Ligation of CD180 inhibits IFN- α signaling in a Lyn-PI3K-BTK-dependent manner in B cells. *Cell Mol. Immunol.* **2017**, *14*, 192–202. [[CrossRef](#)]
17. Rosser, E.C.; Mauri, C. Regulatory B cells: Origin, phenotype, and function. *Immunity* **2015**, *42*, 607–612. [[CrossRef](#)]
18. Blair, P.A.; Noreña, L.Y.; Flores-Borja, F.; Rawlings, D.J.; Isenberg, D.A.; Ehrenstein, M.R.; Mauri, C. CD19+CD24hiCD38hi B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **2010**, *32*, 129–140. [[CrossRef](#)]
19. Iwata, Y.; Matsushita, T.; Horikawa, M.; Dilillo, D.J.; Yanaba, K.; Venturi, G.M.; Szabolcs, P.M.; Bernstein, S.H.; Magro, C.M.; Williams, A.D.; et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **2011**, *117*, 530–541. [[CrossRef](#)]
20. Arkatkar, T.; Du, S.W.; Jacobs, H.M.; Dam, E.M.; Hou, B.; Buckner, J.H.; Rawlings, D.J.; Jackson, S.W. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3207–3217. [[CrossRef](#)]
21. Weller, S.; Braun, M.C.; Tan, B.K.; Rosenwald, A.; Cordier, C.; Conley, M.E.; Plebani, A.; Kumararatne, D.S.; Bonnet, D.; Tournilhac, O.; et al. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **2004**, *104*, 3647–3654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Czömpöly, T.; Olasz, K.; Nyárady, Z.; Simon, D.; Bovári, J.; Németh, P. Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies. *Autoimmun Rev.* **2008**, *7*, 463–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Czömpöly, T.; Olasz, K.; Simon, D.; Nyárady, Z.; Pálkás, L.; Czirják, L.; Berki, T.; Németh, P. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 1761–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Simon, D.; Czömpöly, T.; Berki, T.; Minier, T.; Peti, A.; Tóth, E.; Czirják, L.; Németh, P. Naturally occurring and disease-associated auto-antibodies against topoisomerase I: A fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* **2009**, *21*, 415–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Roe, K.; Shu, G.L.; Draves, K.E.; Giordano, D.; Pepper, M.; Clark, E.A. Targeting Antigens to CD180 but Not CD40 Programs Immature and Mature B Cell Subsets to Become Efficient APCs. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 1715–1729. [[CrossRef](#)]
26. Yang, Y.; Wang, C.; Cheng, P.; Zhang, X.; Li, X.; Hu, Y.; Xu, F.; Hong, F.; Dong, G.; Xiong, H. CD180 Ligation Inhibits TLR7- and TLR9-Mediated Activation of Macrophages and Dendritic Cells Through the Lyn-SHP-1/2 Axis in Murine Lupus. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Simon, D.; Balogh, P.; Bognár, A.; Kellermayer, Z.; Engelmann, P.; Németh, P.; Farkas, N.; Minier, T.; Lóránd, V.; Czirják, L.; et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 30–36. [[PubMed](#)]
28. Ehrenstein, M.R.; Notley, C.A. The importance of natural IgM: Scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 778–786. [[CrossRef](#)]
29. Vani, J.; Elluru, S.; Negi, V.S.; Lacroix-Desmazes, S.; Kazatchkine, M.D.; Bayry, J.; Bayary, J.; Kaveri, S.V. Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. *Autoimmun. Rev.* **2008**, *7*, 440–444. [[CrossRef](#)]
30. Baleva, M.; Nikolov, K. The role of intravenous immunoglobulin preparations in the treatment of systemic sclerosis. *Int. J. Rheumatol.* **2011**, *2011*, 829751. [[CrossRef](#)]
31. Sato, S.; Hasegawa, M.; Takehara, K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J. Derm. Sci.* **2001**, *27*, 140–146. [[CrossRef](#)]
32. Chun, H.Y.; Chung, J.W.; Kim, H.A.; Yun, J.M.; Jeon, J.Y.; Ye, Y.M.; Kim, S.H.; Park, H.S.; Suh, C.H. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* **2007**, *27*, 461–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cassese, G.; Arce, S.; Hauser, A.E.; Lehnert, K.; Moewes, B.; Mostarac, M.; Muehlinghaus, G.; Szyska, M.; Radbruch, A.; Manz, R.A. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 1684–1690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jegou, G.; Bataille, R.; Pellat-Deceunynck, C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* **2001**, *97*, 1817–1822. [[CrossRef](#)]
35. Kitani, A.; Hara, M.; Hirose, T.; Harigai, M.; Suzuki, K.; Kawakami, M.; Kawaguchi, Y.; Hidaka, T.; Kawagoe, M.; Nakamura, H. Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: Analysis of IL-6 production and IL-6R expression. *Clin. Exp. Immunol.* **1992**, *88*, 75–83. [[CrossRef](#)]
36. Mavropoulos, A.; Simopoulou, T.; Varna, A.; Liaskos, C.; Katsiari, C.G.; Bogdanos, D.P.; Sakkas, L.I. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* **2016**, *68*, 494–504. [[CrossRef](#)]
37. Gantner, F.; Hermann, P.; Nakashima, K.; Matsukawa, S.; Sakai, K.; Bacon, K.B. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 1576–1585. [[CrossRef](#)]





Article

Analysis of PI3K Pathway Associated Molecules Reveals Dysregulated Innate and Adaptive Functions of B Cells in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis

Diána Simon ^{1,*}, Szabina Erdő-Bonyár ¹, Judit Rapp ¹, Péter Balogh ¹, Tünde Minier ², Gabriella Nagy ², László Czirják ² and Tímea Berki ¹

¹ Clinical Center, Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs Medical School, H-7624 Pécs, Hungary; erdo-bonyar.szabina@pte.hu (S.E.-B.); rapp.judit@pte.hu (J.R.); balogh.peter@pte.hu (P.B.); berki.timea@pte.hu (T.B.)

² Clinical Center, Department of Rheumatology and Immunology, University of Pécs Medical School, H-7632 Pécs, Hungary; minier.tunde@pte.hu (T.M.); nagy.gabriella@pte.hu (G.N.); czirjak.laszlo@pte.hu (L.C.)

* Correspondence: simon.diana@pte.hu

Abstract: B cell activation is an early event in the development of systemic sclerosis (SSc). The classical activation of B cells downstream of the B-cell receptor (BCR) involves the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway that integrates the effects of multiple co-stimulatory receptors. Our analysis of PI3K pathway associated molecules in peripheral blood B cells of early diffuse cutaneous SSc (dcSSc) patients showed altered mRNA expression of Toll-like receptor (TLR) homolog CD180, TLR4, complement component 3, IL-4 receptor and secreted phosphoprotein 1 (SPP1). Parallel to this, we found elevated basal SPP1 secretion in dcSSc B cells, but, with BCR + IL-4 receptor co-stimulation, we could not induce further secretion. CD180 stimulation alone resulted in NF-κB activation in more B cells than CD180 + BCR co-stimulation both in dcSSc and healthy control (HC), but the co-engagement increased the phosphorylation of NF-κB only in dcSSc B cells. Additionally, in contrast with HC B cells, the lower basal production of IL-10 by dcSSc B cells could not be elevated with CD180 stimulation. Furthermore, activation via CD180 increased the percentage of CD86+ switched memory (CD27+IgD⁻) B cells in dcSSc compared to HC. Our results suggest that alternative B cell activation and CD180 dysfunction cause imbalance of regulatory mechanisms in dcSSc B cells.

Keywords: B cells; systemic sclerosis; dcSSc; PI3K pathway; CD180; SPP1; NF-κB; IL-10; switched memory B cells



Citation: Simon, D.; Erdő-Bonyár, S.; Rapp, J.; Balogh, P.; Minier, T.; Nagy, G.; Czirják, L.; Berki, T. Analysis of PI3K Pathway Associated Molecules Reveals Dysregulated Innate and Adaptive Functions of B Cells in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2877. <https://doi.org/10.3390/ijms22062877>

Academic Editor: László Kovács

Received: 29 January 2021

Accepted: 10 March 2021

Published: 12 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease with vascular damage and consequent ischemic-reperfusion injury and multiorgan fibrosis [1]. All these phenomena are clearly involved in the pathogenesis of the disease, but their connection remains elusive. Importantly, these events show strong correlation with accompanying severe immune dysregulation, including the production of scleroderma-specific autoantibodies, secretion of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines by B cells [2–4]. Transcriptome profiling has already identified Th1, Th2 and B cell activation in early SSc skin biopsies [5]. In contrast to early diffuse cutaneous SSc (dcSSc), established disease did not show similar prominent immune signature, suggesting that activation of B cells is an early event in SSc development.

The classical activation of B cells downstream of B-cell receptor (BCR) and CD19 co-receptor engagement involves phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) signaling pathway, which also integrates the effects of the co-stimulatory interleukin 4 (IL-4) receptor (IL-4R) [6,7]. Moreover, Toll-like receptor (TLR) and complement receptor signaling seem to also be mediated by PI3K [8].

The involvement of PI3K pathway was found in fibrogenesis in SSc [9,10]. Dermal fibroblasts of SSc patients showed hyperactivity of PI3K signaling [9] and inhibition of this pathway in an SSc mouse model repressed TGF β 1-induced expression of type 1 collagen in lung and dermal fibroblasts [10]. Additionally, in a murine ischemia-reperfusion injury model, the inhibition of PI3K pathway reduced acute tubular necrosis and the infiltration of B cells into the injured kidneys [11]. Consequently, PI3K signaling seems to be associated with the two fundamental phenomena of SSc [1].

In this study, we analyzed the mRNA expression of molecules associated with PI3K signaling pathway in peripheral blood B cells of patients with early dcSSc and compared to healthy control (HC) B cells. We found that the expression of innate signals related TLR4 and complement component 3 (C3) were upregulated, accompanied by decreased expression of the TLR homolog CD180. Furthermore, we demonstrated elevated mRNA levels of secreted phosphoprotein 1 (SPP1) and IL-4R in B cells of dcSSc patients. We explored the production of SPP1 by B cells upon BCR and IL-4R co-engagement and found that the basal SPP1 secretion by dcSSc B cells reached the level of SPP1 produced by co-stimulated HC B cells. We also studied the influence of the TLR homolog CD180 engagement on B cell activation and found less B cells with phosphorylated NF- κ B in dcSSc than in HC. Nevertheless, BCR and CD180 co-ligation increased the phosphorylation of NF- κ B in B cells in dcSSc, but not in HC. In addition, we measured lower basal regulatory cytokine IL-10 production by dcSSc B cells, which could not be augmented with CD180 stimulation. We also analyzed the activation of memory B cell subsets and found that the percentage of CD86+ switched memory (CD27+IgD-) B cells was higher in dcSSc than in HC after anti-CD180 treatment. Our results reveal dysregulation of PI3K pathway associated molecules in early dcSSc B cells, which may play a role in B cell dysfunction in SSc.

2. Results

2.1. mRNA Expression of CD180, TLR4, C3, SPP1 and IL-4R Are Dysregulated in dcSSc B Cells

First, we determined the mRNA expression of 92 PI3K signaling pathway related genes in B cells of early, untreated dcSSc patients using pooled cDNAs ($n = 5$) and compared to five HCs. We found highly upregulated expression of mRNA for C3 (RQ = 9.333), SPP1 (RQ = 5.305), TLR4 (RQ = 2.654) and IL-4R (RQ = 2.065) in B cells of dcSSc patients. In addition to these secreted (C3 and SPP1) and membrane bound (TLR4 and IL-4R) proteins, we found highly upregulated expression of mRNA of phospholipase-C β 1 (PLCB1; RQ = 4.698) and phospholipase-C γ 1 (PLCG1; RQ = 2.141), two intracellular enzymes of the PI3K pathway (Figure 1A). Furthermore, we found that the mRNA expression of CD180 was the mostly downregulated (RQ = 0.517) in dcSSc samples compared to HC samples (Figure 1A).

Next, we tested whether immunosuppressive therapy influences the PI3K signaling pathway related mRNA expression in B cells of early dcSSc patients. Using pooled cDNA samples ($n = 3$) we found that the therapy did not cause significant changes in the upregulated mRNA expression of TLR4 (RQ = 4.076), C3 (RQ = 5.572) and PLCB1 (RQ = 6.812). Interestingly, the SPP1, IL-4R and PLCG1 mRNA levels in dcSSc came close to the mRNA levels of HC B cells (RQ = 1.147, RQ = 1.308 and RQ = 1.296, respectively) (Figure 1B). Downregulation of CD180 expression of B cells remained in patients receiving immunosuppressive therapy (RQ = 0.560 and RQ = 0.587) (Figure 1B).

The mRNA expression of C3, TLR4 and CD180 were not influenced by immunosuppressive therapy; therefore, we chose these molecules for further analysis. We determined the mRNA expression of C3, TLR4 and CD180 of B cells with qPCR in further six early dcSSc patients and five HCs individually. The results were similar to what we found with the qPCR array of the 92 genes (Figure 1C).

We previously reported that the CD180 protein expression of B cells was significantly lower in early dcSSc than in HC [12]. In this study, we sought to investigate the TLR4 and C3 protein expression of dcSSc and HC B cells with flow cytometry, but the statistical

analysis of the mean fluorescence intensity (MFI) values of C3 and TLR4 labeling of B cells was not applicable due to the high standard deviations of data. Individual variations in C3 and TLR4 expression might be a possible explanation for this (data not shown).

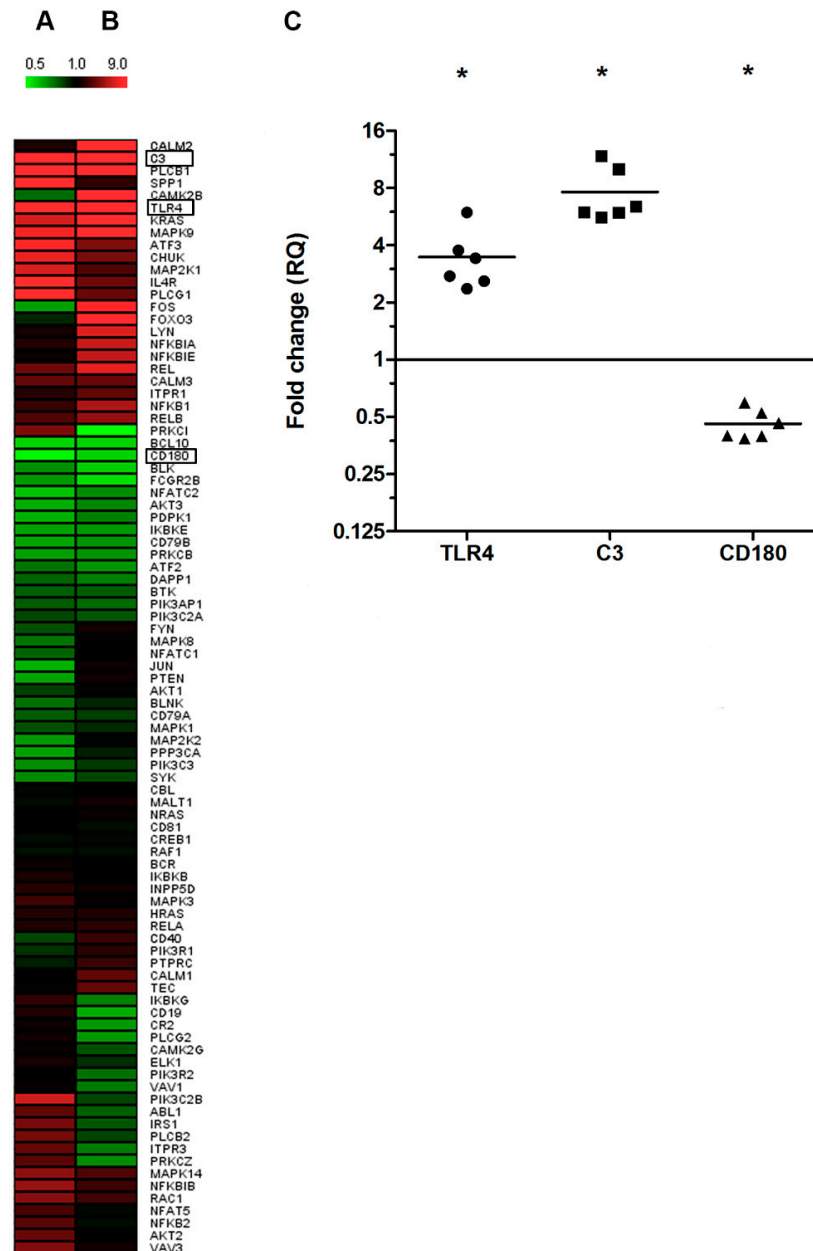


Figure 1. Gene expression analysis of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway related molecules in B cells. (A) Heatmap representing the mRNA expression of 92 molecules associated with PI3K pathway in B cells of early diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) patients untreated ($n = 5$) and (B) under immunosuppressive therapy (mycophenolate mofetil, azathioprine or methotrexate, $n = 3$). Gene expression was normalized to healthy controls (HCs) ($n = 5$) and value 1 represents the expression of control samples. Colors represent the level of gene expression where the highly upregulated is bright red and the highly suppressed is bright green. (C) Individual qPCR validation of complement component 3 (C3), Toll-like receptor 4 (TLR4) and CD180 gene expression in B cells of dcSSc patients ($n = 6$) compared to HCs ($n = 5$). Gene expression was normalized to HC, and the horizontal line (value 1) represents the expression of control samples. Changes in gene expression are shown as RQ values. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.2. Basal SPP1 Production of dcSSc B Cells Is Similar to IL-4R and BCR Co-Stimulated HC B Cells

The combined action of the IL-4R mediated alternate and the classical BCR signaling pathways results in the overexpression of SPP1 [13] and the plasma SPP1 level is elevated in SSc [14]. Moreover, the level of IL-4 is elevated in serum and skin samples of SSc patients [15,16]. Consequently, we analyzed the effect of IL-4R and BCR co-engagement on the production of SPP1 and found that the concentration of SPP1 was significantly higher in the supernatant of unstimulated B cells in dcSSc than in HC. BCR and IL-4R co-stimulation could not further increase the secretion of SPP1 by dcSSc B cells, and the level of SPP1 in the supernatant of co-treated HC B cells only reached the basal SPP1 production of dcSSc B cells (Figure 2).

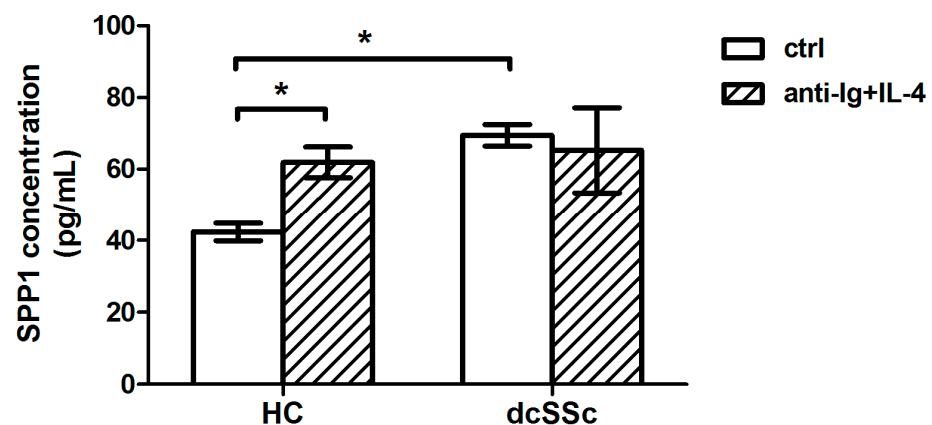


Figure 2. Alternate B cell receptor (BCR) signaling induced secreted phosphoprotein 1 (SPP1) production by B cells. Measurement of SPP1 level in the supernatant of B cells of dcSSc patients ($n = 4$) and HCs ($n = 3$), stimulated with anti-Ig + IL-4 or left unstimulated (ctrl) for 24 h, as measured by ELISA. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.3. CD180 Stimulation Alone and in Combination with BCR Ligation Induces the Phosphorylation of NF- κ B in dcSSc B Cells

Ligation of CD180 in chronic lymphocytic leukemia B cells leads to the activation of BTK/PI3K/AKT or p38 MAPK pathways [17] and both pathways have been shown to affect the activity of NF- κ B [18,19]. Hence, we investigated the effect of co-stimulation via BCR and CD180 on NF- κ B activation and found that CD180 ligation on its own significantly increased the percentage of NF- κ B p65 (pS529) positive B cells in both dcSSc and HC compared to unstimulated controls and the phosphorylation of NF- κ B in B cells was significantly lower in dcSSc than in HC. However, BCR and CD180 co-engagement significantly enhanced the phosphorylation of NF- κ B in dcSSc (Figure 3). Lipopolysaccharide (LPS) is a well-known ligand of TLR4, but TLR4 has also been shown to be activated by endogenous ligands. The expression of both TLR4 and its endogenous ligands are increased in skin and lung biopsy specimens of SSc patients. These endogenous ligands of TLR4 include damage-associated molecules such as connective tissue molecules (e.g., tenascin C) and cellular stress proteins (e.g., HMGB1). Induction of TLR4 signaling leads to pro-fibrotic responses, mediated by MyD88 resulting in the activation of NF- κ B [20]. Hence, we tried to trigger TLR4 signaling in HC and dcSSc B cells using LPS, HMGB1 and tenascin C, but we could not detect any changes in the phosphorylation level of NF- κ B (data not shown).

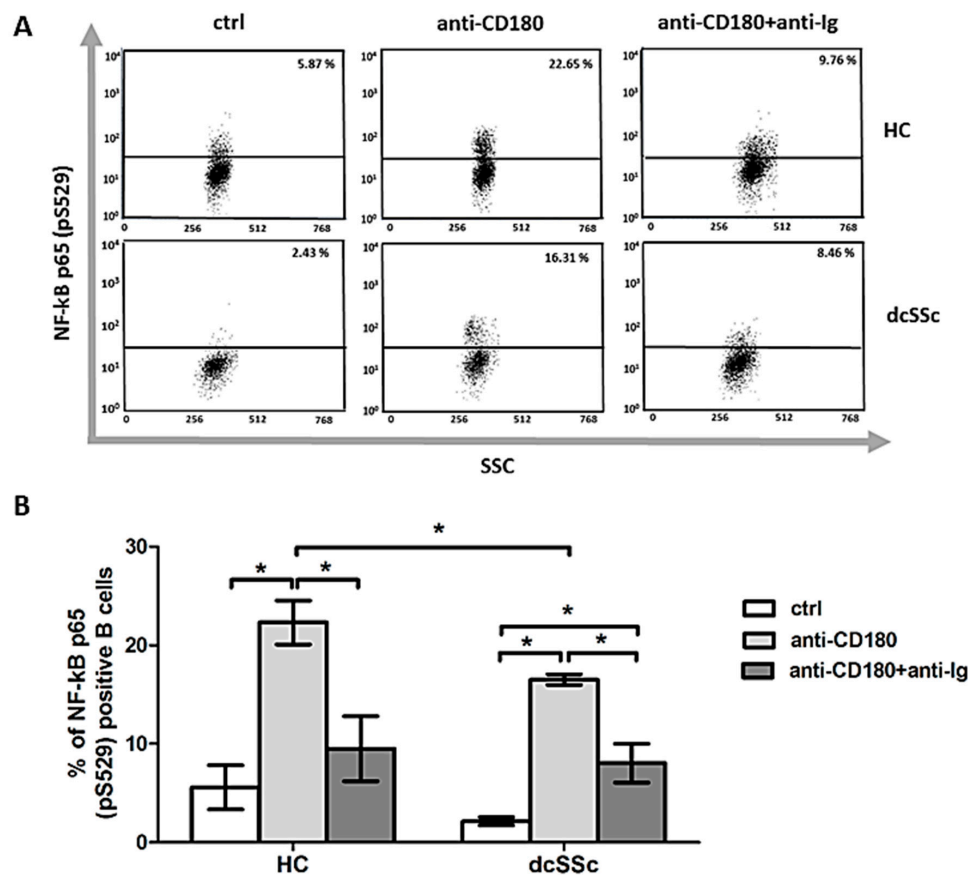


Figure 3. Induction of phosphorylation of NF- κ B by CD180 ligation and BCR and CD180 co-engagement. Representative dot plots (A) and changes (B) of the phosphorylation of NF- κ B p65 (pS529) molecule in purified B cells of dcSSc patients ($n = 5$) and in HCs ($n = 4$) after stimulation with anti-CD180 or anti-CD180 + anti-Ig or left unstimulated (ctrl) for 30 min detected by flow cytometry. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.4. Basal IL-10 Production of B Cells Is Lower in dcSSc and Cannot Be Increased with Ligation of CD180

Since the function of regulatory B cells in SSc is impaired [21], and we previously found that the CD180 expression of these cells is downregulated by anti-CD180 treatment [12], we investigated whether stimulation of B cells via CD180 has different effect on IL-10 production in dcSSc and HC. The concentration of IL-10 in the supernatant of both unstimulated and anti-CD180 stimulated B cells were significantly lower in SSc than in HC. Moreover, ligation of CD180 significantly increased the IL-10 production of B cells only in HC (Figure 4).

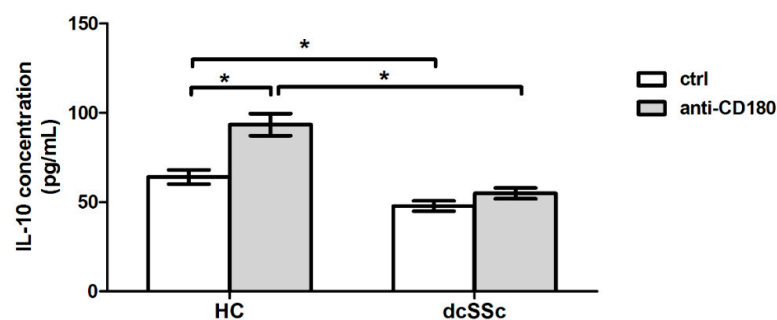


Figure 4. IL-10 production of anti-CD180 antibody stimulated B cells. IL-10 secretion of B cells stimulated with anti-CD180 or left unstimulated (ctrl) for 24 h (dcSSc $n = 5$, HC $n = 3$), as measured by ELISA. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.5. CD180 Expression Is Decreased in Naive and Double Negative B Cells in dcSSc

As we found that the expression of CD180 was lower in total B cells in dcSSc than in HC, we compared the level (mean fluorescence intensity, MFI) of CD180 in B cell subsets between dcSSc and HC. We analyzed the following B cell subsets defined by CD27 and IgD staining: CD27+IgD+ non-switched memory (NS), CD27+IgD– switched memory (S), CD27–IgD– double negative (DN) and CD27–IgD+ naive B cells. We found that the MFI of CD180 labeling was lower in naive and DN B cells in dcSSc than HC (Figure 5).

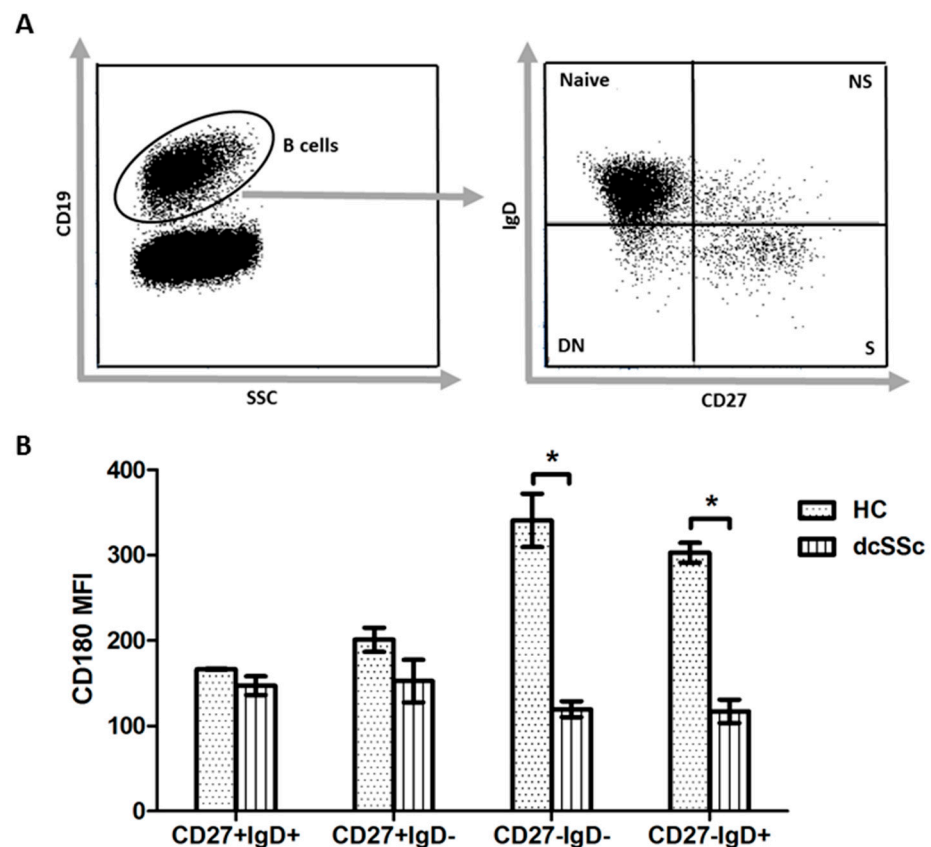


Figure 5. Expression of CD180 in B cell subsets. (A) Gating strategy of CD19+ B cells stained with CD27 and IgD to define the following four subsets: CD27+IgD+ non-switched memory (NS) B cells, CD27+IgD– switched memory (S) B cells, CD27–IgD– double negative (DN) B cells and CD27–IgD+ naive B cells. (B) The mean fluorescence intensity (MFI) of CD180 in NS, S, DN and naive B cells in dcSSc ($n = 4$) and HC ($n = 3$), as measured by flow cytometry. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.6. Stimulation Via CD180 Enhances the Activation of Switched Memory B Cells in dcSSc Compared to HC

Activated memory B cells are reported in SSc by multiple research groups including ours [22–25]. According to our previous results memory B cells are activated via CD180 [26], thus we compared the CD86 expression of non-switched (CD27+IgD+) and switched (CD27+IgD–) memory B cell subsets in dcSSc and HC after anti-CD180 stimulation and found that the percentage of CD86+ switched memory B cells was significantly higher in dcSSc than in HC. Nevertheless, the frequency of CD86+ cells was increased in both memory B cell subsets both in dcSSc and HC (Figure 6).

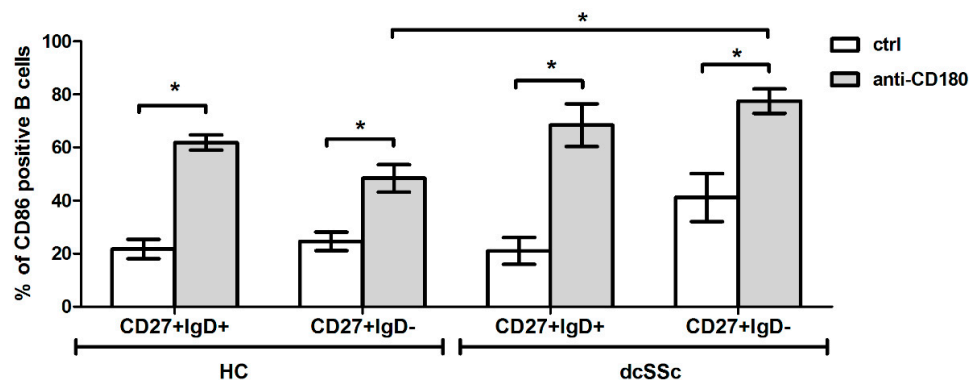


Figure 6. The percentage of CD86 positive B cells in CD27+IgD+ non-switched memory and CD27+IgD- switched memory B cell subsets in anti-CD180 antibody stimulated and unstimulated (24 h) dcSSc ($n = 4$) and HC ($n = 5$) B cells, as measured by flow cytometry. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

3. Discussion

The involvement of PI3K pathway in fibrosis and ischemia/reperfusion injury—two key mechanisms in the pathogenesis of SSc—has already been shown [9–11]. PI3K pathway also plays an important role in B cell differentiation, activation, survival and migration [6] and the activation of B cells is an early event in the pathogenesis of SSc. We were the first to investigate the expression of 92 PI3K signaling pathway related genes in peripheral blood B cells of early dcSSc patients and found highly upregulated mRNA expression of C3, TLR4, SPP1 and IL-4R accompanied by decreased CD180 mRNA level.

SPP1 has pro-inflammatory and pro-fibrotic properties and also regulates fibroblast activation and myofibroblast differentiation [27,28]. The Th2 cytokine IL-4 also contributes to inflammation and fibrosis in SSc [29] and inhibition of IL-4 or its receptor has already been suggested as potential therapy in SSc [30]. Guo et al. reported that the combined action of the IL-4R mediated alternate and the classical BCR signaling pathways resulted in the overexpression of SPP1 [13], which is in agreement with our finding of increased production of SPP1 of HC B cells after IL-4R and BCR co-engagement. We also found that the SPP1 concentration in the supernatant of unstimulated B cells was higher in dcSSc than in HC, which is supported by the elevated plasma SPP1 level described in SSc [14]. As Guo et al. [13] used naive B cells for the experiment, the increase in naive B cells in SSc compared to HC might explain the mRNA overexpression of SPP1 and IL-4R in dcSSc, as well as the differences in the basal production of SPP1 in dcSSc and HC. However, BCR and IL-4R co-stimulation could not further elevate the SPP1 production of dcSSc B cells, and this co-stimulation increased the SPP1 production of HC B cells reaching the level of unstimulated dcSSc B cells. Our results suggest the role of the alternative B cell activation in the pathogenesis of SSc.

B cells have mainly been investigated regarding their adaptive functions in SSc, thus it was unexpected to find the elevated expression of innate immune molecules TLR4 and C3 in peripheral blood B cells of dcSSc patients. TLRs recognize pathogen and damage associated molecular patterns and have been identified as key drivers of fibrogenesis in SSc, dominated by TLR4. Expression of TLR4 and its endogenous ligands is elevated in skin biopsies of SSc, and dermal and lung fibrosis was attenuated in bleomycin-treated TLR knockout mice [20]. Blockade of TLR4-dependent signaling was already suggested as therapy in SSc [1]. Our investigation on TLR4 revealed that neither LPS nor its endogenous damage associated ligands (HMGB1 and tenascin C) were able to activate signaling through TLR4. Local complement activation and abnormal deposition of complement components were detected in skin biopsies of SSc patients, but not in HCs [26]. According to its originally described function, C3 acts exclusively extracellular, but new evidence has shed light on its intracellular functions. Furthermore, the latter are thought to be evolutionary more ancient [31]. Intracellular C3 expression has been linked to cell survival and metabolism in

T cells [32]. Thus, our finding that C3 gene expression is upregulated in dcSSc B cells may point to a possible role of C3 in B cell dysfunctions in dcSSc.

CD180 was originally defined as a B cell surface molecule mediating activation and proliferation [33] and was later described as a TLR homolog expressed by dendritic cells and macrophages. We previously demonstrated that the expression of CD180 in anti-CD180 activated B cells was decreased [12], supporting the theory proposed by Chaplin et al. [34] that CD180 can be internalized after ligation, thus decreased level of CD180 could reflect the enhanced activation of B cells via CD180. The MyD88-independent pathways of CD180 signaling under pathologic conditions has only been investigated in chronic lymphocytic leukemia cells showing the activation of BTK/PI3K/AKT or p38 MAPK pathways [17]. Both of these pathways have been shown to affect the activity of NF- κ B [18,19]. According to our results, the co-activation via CD180 and BCR and anti-CD180 stimulation on its own resulted in increased phosphorylation of NF- κ B in dcSSc B cells, but the level of phosphorylation was not higher in dcSSc than in HC, even though the CD180 MFI of naive B cells was lower in dcSSc than in HC and naive B cells are increased in SSc compared to HC. Since NF- κ B is a central mediator of pro-inflammatory gene induction and functions [35], activation of dcSSc B cells via CD180 and BCR could contribute to inflammation, which is a crucial player in the pathogenesis of SSc.

The impaired function of regulatory B cells has already been described in SSc [21], which is supported by our results showing that the basal IL-10 secretion by B cells was lower in dcSSc. Pararasa et al. [36] analyzed the intracellular IL-10 staining in CD27–IgD–, CD27–IgD+, CD27+IgD– and CD27+IgD+ sorted peripheral blood B cells and found that only CD27–IgD+ B cell were capable of IL-10 production. Therefore, the lower basal IL-10 production of B cells in dcSSc than HC cannot be explained by the increased naive and decreased memory B cells in SSc compared to HC. Furthermore, only HC B cells produced higher amounts of IL-10 after anti-CD180 treatment, suggesting the role of CD180 in the dysfunction of IL-10 producing regulatory B cells in dcSSc.

Anti-CD180 stimulation activates over 85% of human and mouse B cells in vitro [37], and we found that it activated the investigated memory B cell subsets both in dcSSc and HC. In our previous study, we reported that the relative frequency of switched memory B cells, responsible for the production of pathologic autoantibodies, is associated with the severe form of SSc [25]. Here, we demonstrated that the percentage of CD86+ switched memory B cells was higher after anti-CD180 treatment in dcSSc than in HC, suggesting that B cell activation via CD180 could have a role in the pathological antibody production in SSc. According to our results, anti-CD180 antibody therapy, which has already been suggested in SLE [38], could enhance B cell dysfunction in SSc.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

Twenty-one patients with early dcSSc (disease duration was 2.05 (\pm 1.2) years based on the date of the first non-Raynaud's symptom) were enrolled for the study. They all fulfilled the 2013 ACR/EULAR SSc classification criteria. Mean (SD) age at enrollment was 46.43 (\pm 17.2) years, mean (SD) modified Rodnan skin score was 14.65 (\pm 7.6) points, and frequent internal organ involvements were gastrointestinal involvement (57.1%), cardiac involvement (42.9%) and interstitial lung disease (33.3%). The aforementioned internal organ changes corresponded to the involvement seen in early phase of disease. The detailed characteristics of the patients are shown in Table 1. Controls ($n = 18$) were age- and sex-matched healthy individuals (HC). All participants gave a written informed consent to the study, after approval by the Hungarian National Ethics Committee.

Table 1. Patients' characteristics.

Characteristics	dcSSc Patients (n = 21)
Age (years), mean (SD)	46.43 (17.2)
Gender (female), n (%)	15 (71.4%)
Disease duration ¹ (years), mean (SD)	2.05 (1.2)
Organ involvement	
MRSS mean (SD)	14.65 (7.6)
Lung fibrosis ² , n (%)	7/21 (33.3%)
Pulmonary arterial hypertension (PAH) ³ , n (%)	0/21 (0%)
Renal involvement ⁴ , n (%)	0/21 (0%)
Gastrointestinal involvement ⁵ , n (%)	12/21 (57.1%)
Cardiac involvement ⁶ , n (%)	9/21 (42.9%)
Current digital ulcers, n (%)	3/21 (14.3%)
Digital ulcers in case history, n (%)	5/21 (23.8%)
Digital pitting scar, n (%)	6/21 (28.6%)
Small joint contractures, n (%)	11/21 (52.4%)
Large joint contractures, n (%)	7/21 (33.3%)
Any joint contracture, n (%)	12/21 (57.1%)
Tendon friction rubs in case history, n (%)	1/21 (4.8%)
Arthritis, n (%)	2/21 (9.5%)
Subcutaneous calcinosis, n (%)	3/21 (14.3%)
Antibodies	
Anti-Scl-70+, n (%)	7/21 (33.3%)
Anti-RNA-polymerase III+, n (%)	3/21 (14.3%)
anti-centromere+, n (%)	1/21 (4.8%)
anti-PmScl+, n (%)	2/21 (9.5%)
anti-Th/To+, n (%)	1/21 (4.8%)
anti-fibrillarin+, n (%)	1/21 (4.8%)
Immunosuppressive therapy ⁷ , n (%)	7/21 (33.3%)

¹ Onset of the disease was defined as the date of the first non-Raynaud's symptom; ² pulmonary fibrosis was characterized by detection of fibrosis with high resolution CT and/or decreased forced vital capacity (FVC < 80%); ³ no signs suggestive of PAH on echocardiography and spirometry with diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) determination, therefore no right heart catheterization performed in patients; ⁴ scleroderma renal crisis was recorded as kidney involvement; ⁵ gastroesophageal involvement was established with barium swallow or esophago-gastroscopy; ⁶ cardiac involvement was defined by diastolic dysfunction or decreased left ventricular ejection fraction; ⁷ mycophenolate mofetil, azathioprine or methotrexate.

4.2. Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation and B Cell Separation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) density gradient centrifugation of peripheral blood samples. MACS B cell isolation kit II (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) was used for negative selection of B cells according to the manufacturer's instructions.

4.3. Cell Stimulation

For Phosflow assay, 2×10^5 B cells per condition were seeded onto a 96-well plate in RPMI-1640 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) culture medium without FBS (SSc $n = 5$, HC $n = 4$) for 1 h. B cells were then stimulated with LEAF Purified anti-human CD180 (RP105) antibody (Clone: MHR73-11) (BioLegend, San Diego, CA, USA) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (anti-CD180), or anti-CD180 in combination with affinity purified F(ab')₂ fragment of goat anti-human IgM + IgG (H + L) (Jackson Immunoresearch Laboratories, London, UK) at 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (anti-Ig) or left unstimulated for 30 min at 37 °C. To investigate the activation of the memory B cell subsets, 5×10^5 PBMCs were stimulated with anti-CD180 or left unstimulated for 24 h 37 °C (SSc $n = 4$ HC $n = 5$). To assess IL-10 production, 2×10^5 B cells were stimulated with anti-CD180 or left unstimulated for 24 h at 37 °C (SSc $n = 5$, HC $n = 3$). To investigate SPP1 secretion, 2×10^5 B cells were co-treated with anti-Ig + IL-4

(Human IL-4 Recombinant Protein at 10 ng/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or left unstimulated for 24 h at 37 °C (SSc $n = 4$, HC $n = 3$).

4.4. RNA Isolation, cDNA Synthesis and qPCR

Total RNA was extracted from isolated B cells using NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA, USA). Following cDNA generation (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), TaqMan™ Human B cell PI3K Signaling Array (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to detect the expression of 92 genes using pooled cDNA samples of early untreated dcSSc patients ($n = 5$), patients treated with immunosuppressive therapy ($n = 3$) and HCs ($n = 5$). Amplifications were run on Applied Biosystems 7500 RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression was analyzed with 7500 Software v2.0.6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and normalized to 4 housekeeping genes. The mRNA expression of TLR4, CD180 and C3 was also analyzed individually in early dcSSc patients ($n = 6$) and HCs ($n = 5$) using Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and normalized to GAPDH. Fold changes (RQ) were calculated according to the 2-ddCT method.

4.5. Cell Phenotyping

To analyze the expression of CD180 on B cells defined by CD27 and IgD staining and investigate the expression of the activation marker CD86 of CD27+IgD+ non-switched and CD27+IgD− switched memory B cell subsets after anti-CD180 stimulation, samples of 4 dcSSc patients and 5 HCs were analyzed using the combination of anti-human CD19-AmCyan (SJ25C1, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-human CD27−PE/Cy7 (M-T271, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-human IgD−PerCP (IA6-2, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-human CD180-PE (G28-8, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and anti-human CD86-Pacific Blue (IT2.2, BioLegend, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocols. Briefly, PBMCs were incubated with the appropriate antibodies for 30 min on ice, washed twice in phosphate buffered saline and fixed with 1% paraformaldehyde. Fluorescence of the labeled cells was recorded using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FCS Express 6 software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA).

4.6. Analysis of Phosphorylation of NF-κB p65

For Phosflow assay, we used the PE Mouse anti-human NF-κB p65 (pS529) (K10-895.12.50, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) antibody. Phosflow assay was performed in purified B cells of dcSSc patients ($n = 5$) and HCs ($n = 4$) according to BD Phosflow Protocol using BD Cytfix Fixation Buffer and BD Perm II Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Briefly, after stimulation, cells were immediately fixed with pre-warmed Cytfix Fixation buffer for 10 min at 37 °C. Cells were then washed and permeabilized with pre-cooled Perm Buffer II for 30 min on ice. After washing the cells three times, they were stained with PE Mouse anti-human NF-κB p65 (pS529) and incubated for 30 min at room temperature. Then, cells were washed and immediately measured without fixation. Fluorescence of the labeled cells was recorded using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FCS Express 6 software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA).

4.7. SPP1 ELISA

The supernatant obtained from dcSSc ($n = 4$) and HCs ($n = 3$) B cells co-treated with anti-Ig + IL-4 or left unstimulated for 24 h were collected and stored at −80 °C until being measured. The concentration of SPP1 was determined with Human Osteopontin (OPN) DuoSet ELISA kit (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendation. The reaction was developed with TMB and measured at 450 nm using an iEMS MF microphotometer (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA).

4.8. IL-10 ELISA

Supernatant from anti-CD180 stimulated for 24 h and unstimulated B cells were collected (SSc $n = 5$, HC $n = 3$), centrifuged and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until being measured. IL-10 production was quantified using Human IL-10 DuoSet ELISA kit (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol. The reaction was developed with TMB and measured at 450 nm using an iEMS MF microphotometer (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA).

4.9. Statistical Analysis

Statistical evaluation was performed with SPSS v.25.0 statistics package (IBM, Armonk, NY, USA) using Student *t*-tests and ANOVA with post-hoc Tukey test where *p* values < 0.05 were considered significant.

Author Contributions: Conceptualization: D.S. and T.B.; methodology: D.S., J.R., P.B. and T.B.; software: D.S. and T.B.; validation: D.S. and T.B.; formal analysis: D.S. and T.B.; investigation: D.S., S.E.-B. and T.B.; resources: T.B., P.B. and L.C.; data curation: S.E.-B., D.S., J.R., T.M. and G.N.; writing—original draft preparation: D.S. and S.E.-B.; writing—review and editing: D.S. and T.B.; visualization: S.E.-B., D.S. and T.B.; supervision: D.S. and T.B.; project administration: D.S. and T.B.; and funding acquisition: T.B., P.B. and L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by GINOP-232-15-2016-00050, EFOP 361-16-2016-00004 and PTE ÁOK-KA 2020/10 grants. The study was also funded by the Thematic Excellence Program 2020—Institutional Excellence Sub-programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the second thematic programme of the University of Pécs.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of the Hungarian Medical Research Council (ETT-TUKÉB) (47861-6/2018/EKU, 11 August 2018).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The research was performed in collaboration with the Flow Cytometry Core Facility at the Szentágotthai Research Centre of the University of Pécs.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Varga, J.; Trojanowska, M.; Kuwana, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 137–152. [[CrossRef](#)]
2. Simon, D.; Czömpöly, T.; Berki, T.; Minier, T.; Peti, A.; Tóth, E.; Czirják, L.; Németh, P. Naturally occurring and disease-associated auto-antibodies against topoisomerase I: A fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* **2009**, *21*, 415–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cabral-Marques, O.; Riemekasten, G. Functional autoantibodies directed against cell surface receptors in systemic sclerosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 160–168. [[CrossRef](#)]
4. Johnson, M.E.; Grassetti, A.V.; Taroni, J.N.; Lyons, S.M.; Schweppe, D.; Gordon, J.K.; Spiera, R.F.; Lafyatis, R.; Anderson, P.J.; Gerber, S.A.; et al. Stress granules and RNA processing bodies are novel autoantibody targets in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Skaug, B.; Khanna, D.; Swindell, W.R.; Hinchcliff, M.E.; Frech, T.M.; Steen, V.D.; Hant, F.N.; Gordon, J.K.; Shah, A.A.; Zhu, L.; et al. Global skin gene expression analysis of early diffuse cutaneous systemic sclerosis shows a prominent innate and adaptive inflammatory profile. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *79*, 379–386. [[CrossRef](#)]
6. Werner, M.; Hobeika, E.; Jumaa, H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol. Rev.* **2010**, *237*, 55–71. [[CrossRef](#)]
7. Guo, B.; Rothstein, T.L. B Cell Receptor (BCR) Cross-Talk: IL-4 Creates an Alternate Pathway for BCR-Induced ERK Activation That Is Phosphatidylinositol 3-Kinase Independent. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5375–5381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Pauls, S.D.; Lafarge, S.T.; Landego, I.; Zhang, T.; Marshall, A.J. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: Activation mechanisms, regulation, and impact on cellular functions. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 224. [[CrossRef](#)]
9. Liang, M.; Lv, J.; Chu, H.; Wang, J.; Chen, X.; Zhu, X.; Xue, Y.; Guan, M.; Zou, H. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *76*, 104–111. [[CrossRef](#)]
10. Yang, L.; Serada, S.; Fujimoto, M.; Terao, M.; Kotobuki, Y.; Kitaba, S.; Matsui, S.; Kudo, A.; Naka, T.; Murota, H.; et al. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41994. [[CrossRef](#)]
11. Kim, N.; Woo, D.C.; Joo, S.J.; Song, Y.; Lee, J.J.; Woo, C.W.; Kim, S.T.; Hong, S.; Cho, Y.M.; Han, D.J. Reduction in renal ischemia-reperfusion injury in mice by a phosphoinositide 3-kinase p110gamma-specific inhibitor. *Transplantation* **2015**, *99*, 2070–2076. [[CrossRef](#)]
12. Erdő-Bonyár, S.; Rapp, J.; Minier, T.; Ráth, G.; Najbauer, J.; Czirájk, L.; Németh, P.; Berki, T.; Simon, D. Toll-like receptor mediated activation of natural autoantibody producing b cell subpopulations in an autoimmune disease model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6152. [[CrossRef](#)]
13. Guo, B.; Tumang, J.R.; Rothstein, T.L. B cell receptor crosstalk: B cells express osteopontin through the combined action of the alternate and classical BCR signaling pathways. *Mol. Immunol.* **2009**, *46*, 587–591. [[CrossRef](#)]
14. Lorenzen, J.M.; Krämer, R.; Meier, M.; Werfel, T.; Wichmann, K.; Hoepfer, M.M.; Riemekasten, G.; Becker, M.O.; Haller, H.; Witte, T. Osteopontin in the development of systemic sclerosis-relation to disease activity and organ manifestation. *Rheumatology* **2010**, *49*, 1989–1991. [[CrossRef](#)]
15. Hasegawa, M.; Fujimoto, M.; Kikuchi, K.; Takehara, K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **1997**, *24*, 328–332.
16. Salmon-Ehr, V. Expression of Interleukin-4 in Scleroderma Skin Specimens and Scleroderma Fibroblast Cultures. *Arch. Dermatol.* **1996**, *132*, 802. [[CrossRef](#)]
17. Porakishvili, N.; Vispute, K.; Steele, A.J.; Rajakaruna, N.; Kulikova, N.; Tsertsvadze, T.; Nathwani, A.; Damle, R.N.; Clark, E.A.; Rai, K.R.; et al. Rewiring of sigm-mediated intracellular signaling through the CD180 toll-like receptor. *Mol. Med.* **2015**, *21*, 46–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Fruman, D.A.; Chiu, H.; Hopkins, B.D.; Bagrodia, S.; Cantley, L.C.; Abraham, R.T. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **2017**, *170*, 605–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kyriakis, J.M.; Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 807–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bhattacharyya, S.; Kelley, K.; Melichian, D.S.; Tamaki, Z.; Fang, F.; Su, Y.; Feng, G.; Pope, R.M.; Budinger, G.R.S.; Mutlu, G.M.; et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-β responses: A novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 192–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mavropoulos, A.; Simopoulou, T.; Varna, A.; Liaskos, C.; Katsiari, C.G.; Bogdanos, D.P.; Sakkas, L.I. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* **2016**, *68*, 494–504. [[CrossRef](#)]
22. Sato, S.; Fujimoto, M.; Hasegawa, M.; Takehara, K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 1918–1927. [[CrossRef](#)]
23. López-Cacho, J.M.; Gallardo, S.; Posada, M.; Aguerri, M.; Calzada, D.; Mayayo, T.; González-Rodríguez, M.L.; Rabasco, A.M.; Lahoz, C.; Cárdbaba, B. Association of immunological cell profiles with specific clinical phenotypes of scleroderma disease. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yoshizaki, A.; Sato, S. Abnormal B lymphocyte activation and function in systemic sclerosis. *Ann. Dermatol.* **2015**, *27*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Simon, D.; Balogh, P.; Bognár, A.; Kellermayer, Z.; Engelmann, P.; Németh, P.; Farkas, N.; Minier, T.; Lóránd, V.; Czirájk, L.; et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 30–36. [[PubMed](#)]
26. Scambi, C.; Ugolini, S.; Sakari Jokiranta, T.; De Franceschi, L.; Bortolami, O.; La Verde, V.; Guarini, P.; Caramaschi, P.; Ravagnani, V.; Martignoni, G.; et al. The local complement activation on vascular bed of patients with systemic sclerosis: A hypothesis-generating study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0114856. [[CrossRef](#)]
27. Wu, M.; Schneider, D.J.; Mayes, M.D.; Assassi, S.; Arnett, F.C.; Tan, F.K.; Blackburn, M.R.; Agarwal, S.K. Osteopontin in systemic sclerosis and its role in dermal fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132*, 1605–1614. [[CrossRef](#)]
28. Corallo, C.; Volpi, N.; Franci, D.; Montella, A.; Biagioli, M.; Mariotti, G.; D’Onofrio, F.; Gonnelli, S.; Nuti, R.; Giordano, N. Is osteopontin involved in cutaneous fibroblast activation? its hypothetical role in scleroderma pathogenesis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2014**, *27*, 97–102. [[CrossRef](#)]
29. Huang, X.L.; Wang, Y.J.; Yan, J.W.; Wan, Y.N.; Chen, B.; Li, B.Z.; Yang, G.J.; Wang, J. Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. *Inflamm. Res.* **2015**, *64*, 151–159. [[CrossRef](#)]
30. Gasparini, G.; Cozzani, E.; Parodi, A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. *Cytokine* **2020**, *125*. [[CrossRef](#)]
31. Elvington, M.; Liszewski, M.K.; Atkinson, J.P. Evolution of the complement system: From defense of the single cell to guardian of the intravascular space. *Immunol. Rev.* **2016**, *274*, 9–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Liszewski, M.K.; Elvington, M.; Kulkarni, H.S.; Atkinson, J.P. Complement's hidden arsenal: New insights and novel functions inside the cell. *Mol. Immunol.* **2017**, *84*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Valentine, M.A.; Clark, E.A.; Shu, G.L.; Norris, N.A.; Ledbetter, J.A. Antibody to a novel 95-kDa surface glycoprotein on human B cells induces calcium mobilization and B cell activation. *J. Immunol.* **1988**, *140*, 4071–4078. [[PubMed](#)]
34. Chaplin, J.W.; Chappell, C.P.; Clark, E.A. Targeting antigens to CD180 rapidly induces antigen-specific IgG, affinity maturation, and immunological memory. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2135–2146. [[CrossRef](#)]
35. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pararasa, C.; Zhang, N.; Tull, T.J.; Chong, M.H.A.; Siu, J.H.Y.; Guesdon, W.; Chavele, K.M.; Sanderson, J.D.; Langmead, L.; Kok, K.; et al. Reduced CD27–IgD– B cells in blood and raised CD27–IgD– B cells in gut-associated lymphoid tissue in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chaplin, J.W.; Kasahara, S.; Clark, E.A.; Ledbetter, J.A. Anti-CD180 (RP105) Activates B Cells To Rapidly Produce Polyclonal Ig via a T Cell and MyD88-Independent Pathway. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4199–4209. [[CrossRef](#)]
38. You, M.; Dong, G.; Li, F.; Ma, F.; Ren, J.; Xu, Y.; Yue, H.; Tang, R.; Ren, D.; Hou, Y. Ligation of CD180 inhibits IFN- α signaling in a Lyn-PI3K-BTK-dependent manner in B cells. *Cell. Mol. Immunol.* **2017**, *14*, 192–202. [[CrossRef](#)]



Article

Ligation of TLR Homologue CD180 of B Cells Activates the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Systemic Sclerosis and Induces a Pathological Shift in the Expression of BAFF Receptors

Szabina Erdő-Bonyár¹, Judit Rapp¹, Dávid Szinger¹, Tünde Minier², Gábor Kumánovics² , László Czirják²,
Timea Berki^{1,*} and Diána Simon¹

¹ Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Hungary; erdo-bonyar.szabina@pte.hu (S.E.-B.); rapp.judit@pte.hu (J.R.); szinger.david96@gmail.com (D.S.); simon.diana@pte.hu (D.S.)

² Department of Rheumatology and Immunology, Clinical Center, University of Pécs Medical School, 7632 Pécs, Hungary; minier.tunde@pte.hu (T.M.); kumanovics.gabor@pte.hu (G.K.); czirjak.laszlo@pte.hu (L.C.)

* Correspondence: berki.timea@pte.hu; Tel.: +36-72-536-291; Fax: +36-72-536-289

Abstract: The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways are known to play a key role in B-cell activation and fibrosis in systemic sclerosis (SSc). Receptors of B-cell activator factor (BAFF) utilize these pathways, which can be influenced by Toll-like receptors (TLRs), as TLRs can alter the expression of BAFF-binding receptors. Our results show that B-cell stimulation via TLR homologue CD180 phosphorylates Akt in diffuse cutaneous SSc (dcSSc) to a lower extent than in healthy controls (HCs). We found basal downregulated BAFF receptor (BAFF-R) and enhanced transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) expression in dcSSc B cells, which might enhance the formation of autoantibody-secreting plasma cells. Moreover, this pathological shift was observed in naive B cells, emphasizing the importance of their increase in SSc. Additionally, we measured higher serum levels of autoantibodies to BAFF in dcSSc patients, suggesting that an imbalance in the complex system of BAFF/anti-BAFF autoantibodies/BAFF-binding receptors may contribute to the development of SSc. Anti-CD180 antibody treatment had opposite effects on the expression of BAFF-R and TACI in HC B cells, resulting in similar levels as observed in SSc B cells without stimulation, which argues against the usefulness of such therapy in SSc.

Keywords: CD180; TLR; B cells; PI3K/Akt; mTOR; BAFF-R; TACI; anti-BAFF autoantibody; systemic sclerosis



Citation: Erdő-Bonyár, S.; Rapp, J.; Szinger, D.; Minier, T.; Kumánovics, G.; Czirják, L.; Berki, T.; Simon, D. Ligation of TLR Homologue CD180 of B Cells Activates the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Systemic Sclerosis and Induces a Pathological Shift in the Expression of BAFF Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6777. <https://doi.org/10.3390/ijms23126777>

Academic Editors: Sang-Bae Han and Gabriella Sármay

Received: 31 May 2022

Accepted: 17 June 2022

Published: 17 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways have been proposed to be implicated to play a crucial role in the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc)—in particular, in two critical aspects, fibrogenesis and B-cell activation [1,2], which are two typical features of SSc [3]. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway has a central role in many aspects of cell growth and survival [4]. Hyperactivity of PI3K/Akt/mTOR/S6 signaling has been found in the dermal fibroblasts of SSc patients [1] and inhibition of this pathway leads to significant protection against TGFβ-induced fibroblast growth in an SSc mouse model [1,5,6]. The central role of the PI3K/Akt/mTOR axis has also been shown in B-cell activation [7], and B-cell activator factor (BAFF) was also linked to the PI3K/Akt/mTOR pathway in lupus nephritis [8].

BAFF is an important factor for B-cell proliferation and maturation and the increased amount of BAFF may contribute to the development of autoimmune disorders [8,9]. Overexpression of BAFF produced a lupus- and Sjögren-like syndrome in mice [9] and elevated

levels of BAFF have been described in several autoimmune disorders, including SSc [10]. Autoantibodies against BAFF have been described in healthy controls (HCs), but elevated levels in systemic lupus erythematosus (SLE) patients may contribute to autoimmune processes by regulating the availability and activity of BAFF [11,12]. BAFF can bind to multiple receptors on B cells, such as the BAFF receptor (BAFF-R) and transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI). BAFF-R is important in the survival and differentiation of B cells [9,13], while TACI has an essential role in isotype switching and plasma cell differentiation [9,14].

Toll-like receptors (TLRs) can influence the expression and signaling of BAFF receptors [15,16]. Binding of BAFF activates NF- κ B signaling [14], and we previously showed that ligation of the TLR homologue CD180 induces the phosphorylation of NF- κ B in B cells to a different extent in diffuse cutaneous SSc (dcSSc) and HCs [17]. Stimulation via CD180 leads to the activation of the vast majority of B cells [18]. Previously, we reported decreased expression of CD180 in the B cells of dcSSc patients [19], and CD180 was described to utilize the PI3K/Akt pathway in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) [20]. Consequently, the purpose of this study was to investigate the effects of CD180 ligation on the PI3K/Akt/mTOR pathway and the expression of BAFF receptors in peripheral blood B cells in dcSSc patients compared to HCs. An additional goal was to measure the serum levels of anti-BAFF antibodies to assess whether the complex system of anti-BAFF antibodies and BAFF-binding receptors regulating BAFF signaling could contribute to the development of SSc.

2. Results

2.1. Stimulation via CD180 Induces the Phosphorylation of Akt to a Lower Extent in dcSSc B Cells

First, we investigated the effect of stimulation via CD180 on the activation of Akt, a dominant effector molecule of PI3K [21], in separated B cells of dcSSc patients and HCs, and found that the CD180 ligation significantly increased the percentage of phosphorylated Akt (pS473)-positive B cells in both dcSSc and HCs compared to unstimulated controls. However, the phosphorylation of Akt in the anti-CD180 antibody stimulated B cells was significantly lower in dcSSc than in HCs (Figure 1A). Since PI3K/Akt is a major activator of mTOR and S6 is a substrate of mTOR [22], we also measured the changes in the phosphorylation of S6. Stimulation via CD180 enhanced the ratio of phosphorylated S6 (pS235/pS236)-positive B cells to a similar extent in dcSSc and HCs (Figure 1B).

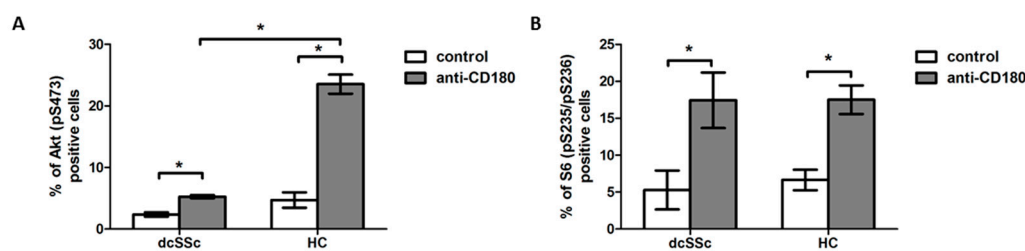


Figure 1. Induction of phosphorylation of Akt and S6 by CD180 ligation. Changes in the phosphorylation of Akt (pS473) (A) and S6 (pS235/pS236) (B) molecules in purified B cells of diffuse cutaneous SSc (dcSSc) patients ($n = 6$) and healthy controls (HCs) ($n = 7$) after stimulation with anti-CD180 antibody or left unstimulated (control) for 30 min, detected by flow cytometry. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.2. Anti-BAFF Autoantibody Serum Level Is Higher in dcSSc

BAFF utilizes the PI3K/Akt/mTOR/S6 signaling pathway [9] and BAFF is proposed to play a crucial role in the B-cell dysfunction in SSc [10]. The effect of elevated BAFF is reported to be regulated by the presence of autoantibodies directed against BAFF [11]; therefore, we compared the levels (mean fluorescence intensity, MFI) of autoantibodies against BAFF in the serum samples of dcSSc patients and healthy subjects. We found that the anti-BAFF autoantibody level was significantly higher in dcSSc than in HCs (Figure 2).

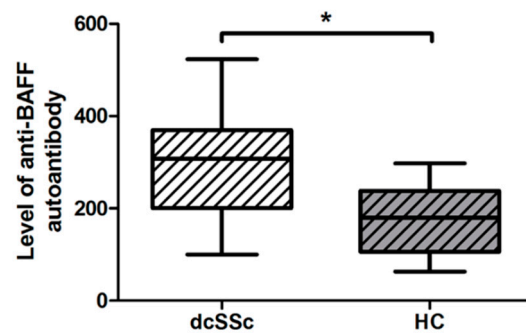


Figure 2. Difference in the serum level of autoantibody directed against BAFF in dcSSc ($n = 20$) and HCs ($n = 21$), measured by Luminex MAGPIX. The boxes show interquartile ranges (IQR), the horizontal lines represent medians, and the whiskers indicate the lowest and highest values. * $p < 0.05$.

2.3. Decreased Basal Expression of BAFF-R Is Accompanied by Elevated Expression of TACI in dcSSc B Cells

As BAFF exerts its effects via different receptors [9], first, we analyzed the expression of BAFF-R in purified B cells of dcSSc and HCs. The BAFF-R mRNA expression was downregulated in dcSSc compared to HC B cells (Figure 3A). Next, we examined the protein expression of BAFF-R in B cells in PBMC samples of dcSSc patients and HCs with flow cytometry. The results were similar to what we found when analyzing the BAFF-R mRNA expression; the protein level of BAFF-R was significantly lower in dcSSc than in HC B cells (Figure 3B).

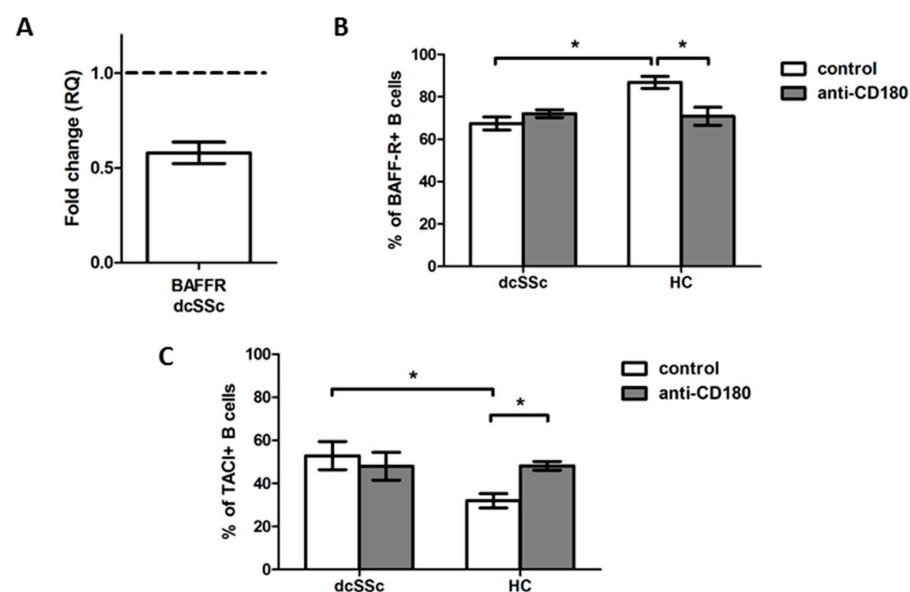


Figure 3. Analysis of BAFF-R and TACI expression in dcSSc and HC total B cells. (A) BAFF-R mRNA expression in total B cells of dcSSc patients ($n = 3$) compared to HCs ($n = 3$). Gene expression was normalized to HCs and the horizontal line (value 1) represents the expression of control samples. Changes in gene expression are shown as relative quantification (RQ) values. Data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Alterations in the protein expression of BAFF-R (B) and TACI (C) in anti-CD180 antibody stimulated and unstimulated dcSSc ($n = 4$) and HC ($n = 4$) total B cells, as measured by flow cytometry. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

TLRs are reported to alter the expression of the receptors of BAFF [15,16]; thus, we also investigated whether stimulation of B cells via CD180 has different effects on the protein expression of BAFF-R in dcSSc and HCs. The ligation of CD180 significantly decreased the percentage of BAFF-R-positive B cells only in HCs, to the levels of unstimulated and

stimulated dcSSc B cells. We found that the expression of BAFF-R was lower in total B cells in dcSSc than in HCs, but the stimulation via CD180 had no effect on the BAFF-R expression of dcSSc B cells (Figure 3B); therefore, we examined the expression of TACI in the total B cells of dcSSc and HCs. The percentage of TACI-positive B cells was higher in the unstimulated dcSSc than in HCs. Moreover, the anti-CD180 antibody stimulation significantly increased the TACI expression of B cells only in HCs, reaching the levels of unstimulated and stimulated dcSSc B cells (Figure 3C).

2.4. Basal Expression of BAFF-R Is Higher in HC Naive B Cells and Is Reduced by Anti-CD180 Antibody Treatment to the Level of dcSSc Naive B Cells

As we found that the expression of BAFF-R was lower in total B cells in dcSSc than in HCs, we investigated the expression of BAFF-R in B cell subsets. We analyzed the following B cell subpopulations defined by CD27 and IgD staining: CD27+IgD+ non-switched memory (NS), CD27+IgD- switched memory (S), CD27-IgD- double negative (DN) and CD27-IgD+ naive B cells. We compared the expression of BAFF-R of B cell subgroups between dcSSc and HCs and found that the basal BAFF-R expression was significantly lower in naive and DN B cells in dcSSc than HCs. Then, we analyzed the differences in the percentage of BAFF-R-positive cells in the unstimulated B cell subsets between the studied groups. We found that the ratio of BAFF-R-positive cells was the lowest in DN B cells compared to all other subsets, namely NS, S and naive B cells both in dcSSc and HCs. The expression of BAFF-R was significantly decreased in DN and naive B cells compared to memory B cells in dcSSc and was lower in DN B cells compared to memory and naive B cells in HCs. Next, we examined the effect of stimulation with anti-CD180 antibody on the expression of BAFF-R. Ligation via CD180 significantly increased the BAFF-R-positive cells in the DN B cells of dcSSc patients and significantly decreased it in the naive B cells of HCs. However, between dcSSc and HC samples, no differences were observed in the BAFF-R expression of any investigated B cell subsets after anti-CD180 antibody stimulation (Figure 4).

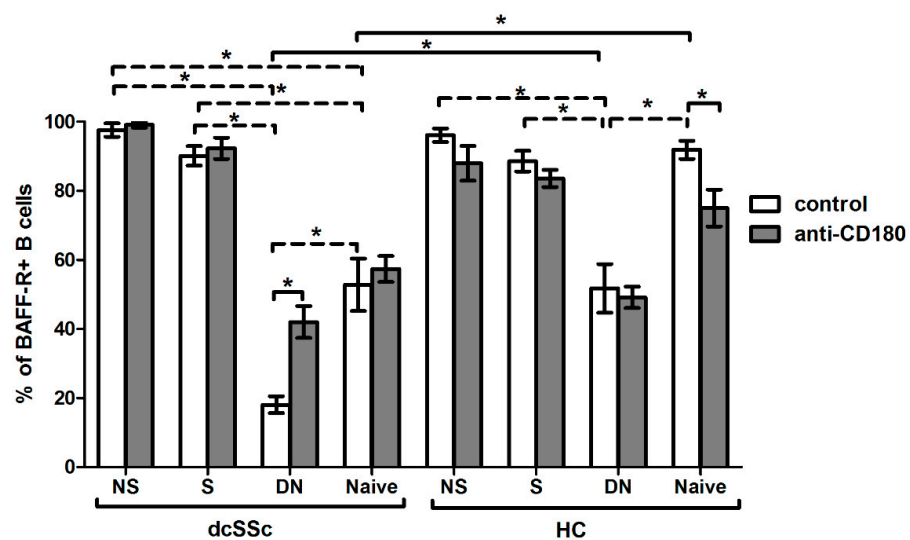


Figure 4. Effect of CD180 stimulation on BAFF-R expression of B cell subpopulations in dcSSc ($n = 4$) and HCs ($n = 4$). The percentage of BAFF-R-positive B cells in the four investigated B cell subsets, defined by CD27 and IgD labeling: CD27+IgD+ non-switched memory (NS), CD27+IgD- switched memory (S), CD27-IgD- double negative (DN) and CD27-IgD+ naive B cell subsets after anti-CD180 antibody stimulation or left unstimulated (control). The solid lines show significant differences between dcSSc patients and HCs, and between unstimulated and stimulated conditions, while the dashed lines indicate significant differences between unstimulated B cell subsets within groups. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

2.5. Basal Expression of TACI Is Lower in HC Naive B Cells, and Is Increased with Ligation of CD180 to the Level of dcSSc Naive B Cells

We found a higher percentage of TACI-positive total B cells in dcSSc than in HCs; thus, we investigated the expression of TACI in the four described B cell subsets, namely NS, S, DN and naive, and found that the ratios of TACI-positive cells in the B cell subsets were similar between dcSSc and HCs, except in the naive cells, where the frequency of TACI-positive cells was significantly higher in dcSSc than in HCs under the unstimulated condition. Then, we examined the differences between the unstimulated B cell subsets within the investigated groups, and our results showed that the expression of TACI was higher in memory B cells, especially in NS B cells, compared to DN and naive cells both in dcSSc and HCs. Stimulation with anti-CD180 antibody did not change the expression of TACI in the B cell subsets of any groups, except in HC naive cells, where ligation of CD180 increased the level of TACI (Figure 5).

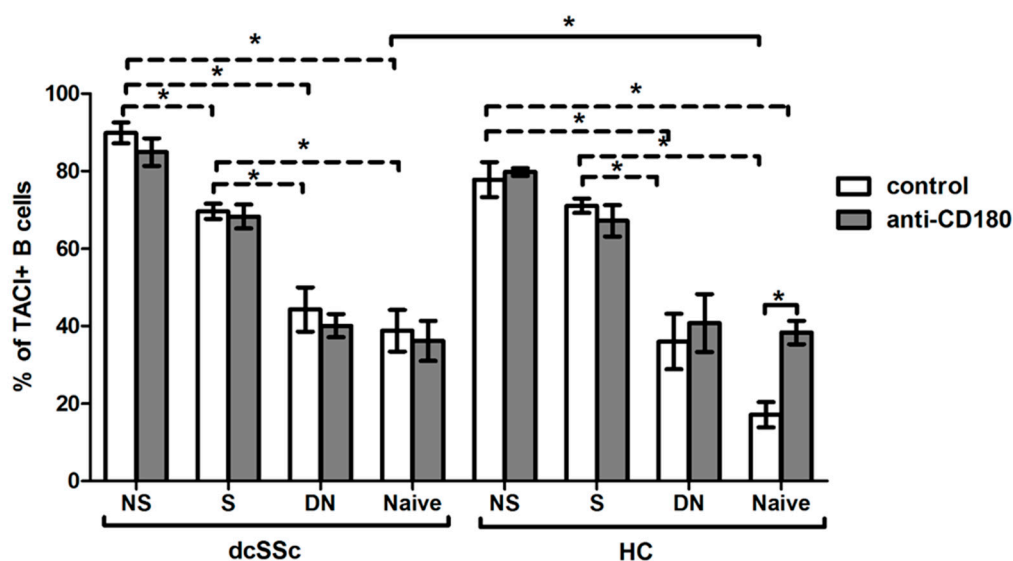


Figure 5. Changes in the TACI expression of B cell subsets in dcSSc ($n = 4$) and HCs ($n = 4$) after CD180 stimulation. The ratio of TACI-positive B cells in CD27+IgD+ non-switched memory (NS), CD27+IgD- switched memory (S), CD27-IgD- double negative (DN) and CD27-IgD+ naive B cell subsets with anti-CD180 antibody stimulation or left unstimulated. The solid lines show significant differences between dcSSc patients and HCs, and between unstimulated and stimulated conditions, while the dashed lines indicate significant differences between unstimulated B cell subsets within groups. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$.

3. Discussion

The activation of PI3K/Akt/mTOR signaling is involved in the fibrogenesis in SSc and inhibition of this axis has been shown to exert anti-fibrotic effects in an SSc mouse model [1,5,23]. According to a single-blind pilot study, the modified Rodnan skin score (MRSS) of SSc patients decreased after rapamycin treatment [24]. The involvement of the PI3K/Akt/mTOR pathway has also been shown in B-cell activation and differentiation [2], and it is evident that B cells play an essential role in the pathogenesis of SSc [3]. Moreover, TLR signaling can also act through this pathway [25], and elevated Akt phosphorylation has been described in HC and CD180-Responder B-CLL B cells after CD180 ligation [26]. Here, we demonstrated that stimulation via CD180 induced the phosphorylation of Akt and S6 both in dcSSc and HC B cells, but the activation of Akt was weaker in dcSSc than HCs, suggesting an impairment of the CD180 signaling regarding the PI3K/Akt pathway in dcSSc B cells. Forestier et al. [27] described a decrease in mTOR phosphorylation in the B cells of SSc patients compared to HCs. Our results did not show any differences in S6

phosphorylation between dcSSc and HC B cells, suggesting that alterations in the mTOR pathway in SSc B cells may influence other downstream molecules besides S6.

The PI3K/Akt/mTOR pathway also plays an important role in BAFF-mediated B-cell differentiation and activation [8,28]. BAFF is essential to B-cell survival, maturation and homeostasis, and excessive amounts of BAFF could potentially contribute to the breakdown of B-cell tolerance by rescuing low-affinity self-reactive B cells from deletion, which may play a key role in the development of systemic autoimmune diseases [9,29]. Elevated BAFF serum levels were found in SSc and were associated with the severity and activity of the disease [10]. Although autoantibodies against BAFF were detected in HCs, the serum levels of anti-BAFF autoantibodies were higher in SLE patients than HCs [12,30]. Investigating the amount of anti-BAFF autoantibodies in SSc patients, we found similar results as dcSSc patients had higher levels of anti-BAFF autoantibodies than HCs. Consequently, the increased levels of autoantibodies against BAFF may be a regulatory mechanism in response to the elevated BAFF levels observed in SSc.

BAFF can bind to different receptors expressed on B cells, including BAFF-R and TACI [9]. BAFF-R is a positive regulator of B-cell homeostasis as it provides constitutive signals essential for B-cell development and survival [31]. TACI can enhance immunoglobulin class switching and the differentiation and survival of plasma cells [15]. Decreased BAFF-R expression and increased, but also unaltered, TACI expression was observed in SLE patients compared to HCs [32,33]. In this study, we found lower BAFF-R expression at mRNA and protein level and higher TACI expression at protein level in total B cells in dcSSc compared to HCs. The downregulation of BAFF-R and the enhanced TACI expression in SSc B cells may contribute to the differentiation of autoreactive B cells into autoantibody-secreting plasma cells [15,34], and autoantibodies are well known to play a crucial role in the pathogenesis of SSc [35].

BAFF-R is expressed by almost all B cell subsets, while TACI is expressed mainly by memory B cells and plasma cells, and mostly by activated cells, since TACI is an inducible receptor [14]. Darce et al. [34] found that human naive B cells have low TACI expression, but activation via TLR9 induces a rapid increase in TACI expression. According to our results, the differences in BAFF-R and TACI expression of total B cells between dcSSc patients and HCs could be due to the changes in the expression of naive B cells, since we found decreased expression of BAFF-R and augmented expression of TACI in naive B cells. The relevance of these findings is underlined by the elevated amount of naive B cells observed in SSc [36,37], and these results provide further evidence that differences in the distribution of B cell subsets—in particular, the increase in naive B cells—may play an important role in the development of SSc.

Altered expression of TLRs has been found to be associated with vascular damage in autoimmune diseases [38], and TLR signaling can influence the expression of BAFF receptors; TLR4, TLR7 and TLR9 stimulation resulted in the upregulated expression of TACI [15,16], but the changes observed in the expression of BAFF-R after B-cell activation via TLR4 and TLR9 vary between studies [38,39]. Activation via TLR9 was suggested to make B cells more sensitive to the effects of BAFF both in humans and mice, through the upregulation of TACI [16,38]. We showed that stimulation via CD180 resulted in a decrease in BAFF-R and an increase in TACI expression in HC total B cells, reaching the levels of dcSSc B cells. These changes can also be explained by the differences observed in naive B cells, because CD180 ligation augmented the expression of BAFF-R and reduced the expression of TACI in HC naive B cells, resulting in similar levels observed in the naive B cells of the dcSSc patients.

Although our study carries the limitation that the number of patients enrolled was relatively low, it is an advantage that they formed a homogeneous group of early dcSSc cases. Therefore, we can conclude that B-cell activation via CD180 utilizes the PI3K/Akt/mTOR pathway in SSc and may contribute to a pathological shift in BAFF signaling, particularly in naive B cells, which adds to our previous findings proposing that the anti-CD180 antibody therapy suggested in SLE may not be beneficial in SSc.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

Table 2013. ACR/EULAR SSc classification criteria. Mean (SD) disease duration was 1.73 (± 0.9) years based on the date of the first non-Raynaud's symptom, mean (SD) age at enrollment was 49.88 (± 15.6) years, mean (SD) modified Rodnan skin score was 16.42 (± 11.9) points, and frequent internal organ involvements were interstitial lung disease (73.1%), gastrointestinal involvement (69.2%) and cardiac involvement (53.9%). The aforementioned internal organ changes corresponded to the involvement seen in the early phase of disease. The detailed characteristics of the patients are shown in Table 1. Controls ($n = 33$) were age- and sex-matched healthy individuals (HCs). All participants gave written informed consent to participate in the study, after approval by the Hungarian National Ethics Committee (ETT TUKEB 47861-6/2018/EKU).

Table 1. Patients' characteristics.

Characteristics	dcSSc Patients ($n = 26$)
Age (years), mean (SD)	49.88 (15.6)
Gender (female), n (%)	22 (84.6%)
Disease duration ¹ (years), mean (SD)	1.73 (0.9)
Organ involvement	
MRSS mean (SD)	16.42 (11.9)
Lung fibrosis ² , n (%)	19/26 (73.1%)
Pulmonary arterial hypertension ³ , n (%)	0/26 (0%)
Renal involvement ⁴ , n (%)	1/26 (3.9%)
Gastrointestinal involvement ⁵ , n (%)	18/26 (69.2%)
Cardiac involvement ⁶ , n (%)	14/26 (53.9%)
Antibodies	
Anti-Scl-70+, n (%)	12/26 (46.2%)
Anti-RNA-polymerase III+, n (%)	4/26 (15.4%)
Immunosuppressive therapy ⁷ , n (%)	17/26 (65.4%)

¹ Onset of the disease was defined as the date of the first non-Raynaud's symptom; ² pulmonary fibrosis was characterized by detection of fibrosis with high-resolution CT and/or decreased forced vital capacity (FVC < 80%); ³ no signs suggestive of PAH on echocardiography and spirometry with DLCO determination; therefore, no right heart catheterization performed in patients; ⁴ scleroderma renal crisis was recorded as kidney involvement; ⁵ gastroesophageal involvement was established with barium swallow or esophago-gastroscopy; ⁶ cardiac involvement was defined by diastolic dysfunction or decreased left ventricular ejection fraction; ⁷ mycophenolate mofetil ($n = 2$), methotrexate ($n = 4$) or cyclophosphamide ($n = 11$).

4.2. Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation and B Cell Separation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) density gradient centrifugation of peripheral blood samples. The negative selection of B cells was performed using the MACS B cell isolation kit II (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's instructions. The purity of B cells was over 95%.

4.3. Anti-CD180 Antibody Stimulation

For Phosflow measurements in dcSSc patients ($n = 6$) and HC ($n = 7$), 2×10^5 B cells per condition were placed onto a 96-well plate in RPMI culture medium without FBS for 1 h. Then, the B cells were stimulated with LEAF purified anti-human CD180 (RP105) antibody (Clone: MHR73-11) (Bio-Legend, San Diego, CA, USA) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (anti-CD180) or left unstimulated for 30 min at 37 °C. To investigate the expression of BAFF-R and TACI of total B cells and B cell subsets in dcSSc ($n = 4$) and HCs ($n = 4$), 5×10^5 PBMCs were stimulated with anti-CD180 antibody or left unstimulated for 24 h 37 °C.

4.4. RNA Isolation, cDNA Synthesis and qPCR for the Evaluation of BAFF-R Expression

To determine the BAFF-R mRNA expression of total B cells in dcSSc ($n = 3$) and HCs ($n = 3$), total RNA was extracted from isolated B cells using the NucleoSpin RNA

XS kit (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA, USA). Following cDNA generation (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), the SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit (Bioline, London, UK) was used to determine the BAFF-R mRNA expression of total B cells in dcSSc ($n = 3$) and HCs ($n = 3$). Amplifications were performed on the Applied Biosystems 7500 RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression was analyzed with 7500 Software v2.0.6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and normalized to GAPDH (a “housekeeping” gene) as a reference. Fold changes (RQ) were calculated according to the 2-ddCT method.

4.5. Flow Cytometric Analysis of BAFF-R and TACI Expression

To measure the expression of BAFF-R and TACI of total B cells and B cell subgroups in dcSSc ($n = 4$) and HCs ($n = 4$), PBMCs were labeled using the combination of the following monoclonal antibodies: anti-human CD19-PE (SJ25C1, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-human IgD-PerCP (IA6-2, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-human CD27-APC (M-T271, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-human CD27-FITC (L128, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) anti-human BAFF-R (CD268)-FITC (11C1, BioLegend, San Diego, CA, USA) and anti-human TACI (CD267)-APC (1A1, BioLegend, San Diego, CA, USA), following the manufacturer’s protocols. Briefly, PBMCs were incubated with the appropriate antibodies for 30 min on ice, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with FACSFix (0.5% PFA in PBS). Fluorescence of the labeled cells was measured using a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FCS Express 6 software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA).

4.6. Assessment of the Phosphorylation of Akt and S6

To analyze the phosphorylation of Akt (pS473) and S6 (pS235/pS236) of B cells in dcSSc ($n = 6$) and HCs ($n = 7$), we used the anti-human Akt (pS473)–Alexa Fluor488 (M89-61, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and S6 (pS235/pS236)–Alexa Fluor647 (N7-548, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) antibody. Phosflow assay was performed in purified B cells according to the BD Phosflow Protocol, using BD Cytofix Fixation Buffer and BD Perm III Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Briefly, after stimulation, cells were immediately fixed with pre-warmed Cytofix Fixation buffer for 10 min at 37 °C. Following washing, cells were permeabilized using pre-cooled Perm Buffer III for 30 min on ice. Then, the cells were washed three times and they were stained and were incubated for 30 min at room temperature. Afterwards, the cells were washed and immediately measured without fixation using a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FCS Express 6 software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA).

4.7. Anti-BAFF Autoantibody Measurement

The levels (mean fluorescence intensity, MFI) of autoantibodies against BAFF in the serum samples of dcSSc ($n = 20$) patients and HCs ($n = 21$) were determined using the MILLIPLEX Map Human Cytokine Autoantibody Panel (HCYTAAB-17K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer’s recommendations. The assay was run with the Luminex MAGPIX instrument (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Data were analyzed with Belysa Immunoassay Curve Fitting Software (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

4.8. Statistical Analysis

SPSS v. 27.0 statistics package (IBM, Armonk, NY, USA) was used for statistical evaluation using Student t-tests and Mann–Whitney U-test, where p values < 0.05 were considered significant.

Author Contributions: Conceptualization: S.E.-B., D.S. (Diána Simon) and T.B.; methodology: S.E.-B., J.R., D.S. (Dávid Szinger) and D.S. (Diána Simon); software: S.E.-B., D.S. (Diána Simon) and T.B.; validation: D.S. (Diána Simon) and T.B.; formal analysis: S.E.-B. and D.S. (Diána Simon); investigation: S.E.-B. and D.S. (Diána Simon); resources: D.S. (Diána Simon) and T.B.; data curation: S.E.-B., D.S. (Diána Simon), J.R., D.S. (Dávid Szinger), T.M., G.K. and L.C.; writing—original draft preparation: S.E.-B. and D.S. (Diána Simon); writing—review and editing: S.E.-B., D.S. (Diána Simon) and T.B.; visualization: S.E.-B. and D.S. (Diána Simon); supervision: D.S. (Diána Simon) and T.B.; project administration: S.E.-B. and D.S. (Diána Simon); funding acquisition: D.S. (Diána Simon) and T.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Fund (OTKA FK-139028) and the ÚNKP-21-3 and ÚNKP-21-5 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the Source of the National Research, Development and Innovation Fund. The research was financed by the Thematic Excellence Programme 2021 Health sub-program of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the EGA-10 project of the University of Pécs.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of the Hungarian Medical Research Council (ETT-TUKEB) (47861-6/2018/EKU 11 August 2018).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and PTE ÁOK-KA 2021/19.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Liang, M.; Lv, J.; Chu, H.; Wang, J.; Chen, X.; Zhu, X.; Xue, Y.; Guan, M.; Zou, H. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *76*, 104–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Limon, J.J.; Fruman, D.A. Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Varga, J.; Trojanowska, M.; Kuwana, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2017**, *2*, 137–152. [[CrossRef](#)]
4. Porta, C.; Paglino, C.; Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 64. [[CrossRef](#)]
5. Yang, L.; Serada, S.; Fujimoto, M.; Terao, M.; Kotobuki, Y.; Kitaba, S.; Matsui, S.; Kudo, A.; Naka, T.; Murota, H.; et al. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Perl, A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 169–182. [[CrossRef](#)]
7. Pauls, S.D.; Lafarge, S.T.; Landego, I.; Zhang, T.; Marshall, A.J. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: Activation mechanisms, regulation, and impact on cellular functions. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 224. [[CrossRef](#)]
8. Ge, F.; Wang, F.; Yan, X.; Li, Z.; Wang, X. Association of BAFF with PI3K/Akt/mTOR signaling in lupus nephritis. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 5793. [[CrossRef](#)]
9. MacKay, F.; Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 491–502. [[CrossRef](#)]
10. Matsushita, T.; Hasegawa, M.; Yanaba, K.; Kodera, M.; Takehara, K.; Sato, S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 192–201. [[CrossRef](#)]
11. Vincent, T.; Plawewski, M.; Goulabchand, R.; Guilpain, P.; Eliaou, J.F. Emerging clinical phenotypes associated with anti-cytokine autoantibodies. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 528–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Price, J.V.; Haddon, D.J.; Kemmer, D.; Delepine, G.; Mandelbaum, G.; Jarrell, J.A.; Gupta, R.; Balboni, I.; Chakravarty, E.F.; Sokolove, J.; et al. Protein microarray analysis reveals BAFF-binding autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 5135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pieper, K.; Grimbacher, B.; Eibel, H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 959–971. [[CrossRef](#)]
14. Mackay, F.; Schneider, P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2008**, *19*, 263–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhang, Y.; Li, J.; Zhang, Y.M.; Zhang, X.M.; Tao, J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 247426. [[CrossRef](#)]

16. Abu-Rish, E.Y.; Amrani, Y.; Browning, M.J. Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology* **2013**, *52*, 1190–1201. [[CrossRef](#)]
17. Simon, D.; Erdő-Bonyár, S.; Rapp, J.; Balogh, P.; Minier, T.; Nagy, G.; Cziráj, L.; Berki, T. Analysis of PI3K Pathway Associated Molecules Reveals Dysregulated Innate and Adaptive Functions of B Cells in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2877. [[CrossRef](#)]
18. Chaplin, J.W.; Kasahara, S.; Clark, E.A.; Ledbetter, J.A. Anti-CD180 (RP105) Activates B Cells To Rapidly Produce Polyclonal Ig via a T Cell and MyD88-Independent Pathway. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4199–4209. [[CrossRef](#)]
19. Erdő-Bonyár, S.; Rapp, J.; Minier, T.; Ráth, G.; Najbauer, J.; Cziráj, L.; Németh, P.; Berki, T.; Simon, D. Toll-like receptor mediated activation of natural autoantibody producing b cell subpopulations in an autoimmune disease model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6152. [[CrossRef](#)]
20. Porakishvili, N.; Vispute, K.; Steele, A.J.; Rajakaruna, N.; Kulikova, N.; Tsertsvadze, T.; Nathwani, A.; Damle, R.N.; Clark, E.A.; Rai, K.R.; et al. Rewiring of sigm-mediated intracellular signaling through the CD180 toll-like receptor. *Mol. Med.* **2015**, *21*, 46–57. [[CrossRef](#)]
21. Teng, Y.; Fan, Y.; Ma, J.; Lu, W.; Liu, N.; Chen, Y.; Pan, W.; Tao, X. The pi3k/akt pathway: Emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders. *Cells* **2021**, *10*, 1219. [[CrossRef](#)]
22. Hay, N.; Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1926–1945. [[CrossRef](#)]
23. Zhu, X.; Chu, H.; Jiang, S.; Liu, Q.; Liu, L.; Xue, Y.; Zheng, S.; Wan, W.; Qiu, J.; Wang, J.; et al. Sirt1 ameliorates systemic sclerosis by targeting the mTOR pathway. *J. Dermatol. Sci.* **2017**, *87*, 149–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Su, T.I.K.; Khanna, D.; Furst, D.E.; Danovitch, G.; Burger, C.; Maranian, P.; Clements, P.J. Rapamycin versus methotrexate in early diffuse systemic sclerosis: Results from a randomized, single-blind pilot study. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 3821–3830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, X.; Jiang, S.; Tapping, R.I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* **2010**, *49*, 1–9. [[CrossRef](#)]
26. Porakishvili, N.; Memon, A.; Vispute, K.; Kulikova, N.; Clark, E.A.; Rai, K.R.; Nathwani, A.; Damle, R.N.; Chiorazzi, N.; Lydyard, P.M. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **2011**, *153*, 486–498. [[CrossRef](#)]
27. Forestier, A.; Guerrier, T.; Jouvray, M.; Giovannelli, J.; Lefèvre, G.; Sobanski, V.; Hauspie, C.; Hachulla, E.; Hatron, P.Y.; Zéphir, H.; et al. Altered B lymphocyte homeostasis and functions in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 244–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, P.P.; Liu, D.D.; Liu, Y.J.; Song, S.S.; Wang, Q.T.; Chang, Y.; Wu, Y.J.; Chen, J.Y.; Zhao, W.D.; Zhang, L.L.; et al. BAFF/BAFF-R involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis via PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 290–300. [[CrossRef](#)]
29. Thien, M.; Phan, T.G.; Gardam, S.; Amesbury, M.; Basten, A.; MacKay, F.; Brink, R. Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. *Immunity* **2004**, *20*, 785–798. [[CrossRef](#)]
30. Haddon, D.J.; Diep, V.K.; Price, J.V.; Limb, C.; Utz, P.J.; Balboni, I. Autoantigen microarrays reveal autoantibodies associated with proliferative nephritis and active disease in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 162. [[CrossRef](#)]
31. Schiemann, B.; Gommerman, J.L.; Vora, K.; Cachero, T.G.; Shutga-Morskaya, S.; Dobles, M.; Frew, E.; Scott, M.L. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **2001**, *293*, 2111–2114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Salazar-Camarena, D.C.; Ortiz-Lazareno, P.C.; Cruz, A.; Oregon-Romero, E.; Machado-Contreras, J.R.; Muñoz-Valle, J.F.; Orozco-López, M.; Marín-Rosales, M.; Palafox-Sánchez, C.A. Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2016**, *25*, 582–592. [[CrossRef](#)]
33. Zhao, L.D.; Li, Y.; Smith, M.F.; Wang, J.S.; Zhang, W.; Tang, F.L.; Tian, X.P.; Wang, H.Y.; Zhang, F.C.; Ba, D.N.; et al. Expressions of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. *Lupus* **2010**, *19*, 1534–1549. [[CrossRef](#)]
34. Darce, J.R.; Arendt, B.K.; Wu, X.; Jelinek, D.F. Regulated Expression of BAFF-Binding Receptors during Human B Cell Differentiation. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7276–7286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Senécal, J.-L.; Hoa, S.; Yang, R.; Koenig, M. Pathogenic roles of autoantibodies in systemic sclerosis: Current understandings in pathogenesis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2019**, *5*, 103–129. [[CrossRef](#)]
36. Sato, S.; Fujimoto, M.; Hasegawa, M.; Takehara, K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 1918–1927. [[CrossRef](#)]
37. Simon, D.; Balogh, P.; Bognár, A.; Kellermayer, Z.; Engelmann, P.; Németh, P.; Farkas, N.; Minier, T.; Lóránd, V.; Cziráj, L.; et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 30–36.
38. Katsenelson, N.; Kanswal, S.; Puig, M.; Mostowski, H.; Verthelyi, D.; Akkoyunlu, M. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 1785–1795. [[CrossRef](#)]
39. Acosta-Rodríguez, E.E.; Craxton, A.; Hendricks, D.W.; Merino, M.C.; Montes, C.L.; Clark, E.A.; Gruppi, A. BAFF and LPS cooperate to induce B cells to become susceptible to CD95/Fas-mediated cell death. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 990–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]