

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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.

1. Bevezetés

A szisztémás sclerosis (SSc) egy komplex szisztémás autoimmun reumatológiai kórkép, mely érrendszeri károsodással, immunológiai eltérésekkel illetve a bőrt és a belső szerveket érintő fibrózissal jellemezhető. A diffúz kután SSc (dcSSc) a betegség súlyosabb és rosszabb prognózisú formája, mely kiterjedt bőrelváltozással és súlyos kardiális, pulmonális, renális illetve gasztrointesztinális tünetekkel jellemezhető [1]. 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 [2]. Továbbá ismert, hogy a B-sejt aktiváció a betegség kialakulásának korai eseménye [3].

SSc-ben a B-sejt tolerancia felborulásának legegységértelműbb jele a betegek szérumában nagy mennyiségben kimutatható keringő autoantitestek. Jellemzőek a különböző sejtmag komponensek ellen irányuló anti-nukleáris autoantitestek (ANA), többek között az anti-topoizomeráz I (anti-topo I), anti-centromer (ACA) és anti-RNS polimeráz III antitestek, melyek összefüggést mutatnak a betegség súlyosságával [2]. SSc-ben a B-sejtek fokozott IL-6 és TGF- β termelését írták le, melyek hozzájárulnak az antitesttermeléshez és a fibrózis kialakulásához [4,5]. Továbbá az IL-10 termelő regulatórikus B-sejtek csökkent számát és károsodott funkcióját figyelték meg SSc-ben [6].

A megváltozott B-sejt homeosztázis mellett a B-sejt kompartmentek eltérő eloszlását is megfigyelték SSc-ben. A naiv B-sejtek megnövekedett arányban, míg a memória B-sejtek csökkent számban, de aktivált állapotban vannak jelen a betegek perifériás vérében [7]. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy SSc-ben szenvedő betegekben a csökkent memória B-sejtszám háttérében a non-switched memória (NS) B-sejtek mennyiségének csökkenése állhat, melyek feltételezhetően képesek természetes autoantitesteket termelni [8].

A természetes antitestek különböző evolúciósan konzervált antigének ellen irányuló alacsony affinitású, polireaktív, többnyire IgM izotípusú antitestek, fontos szerepet játszanak a patogénekkal és fertőzésekkel szembeni védekezésben, a veleszületett és a szerzett immunválaszok modulálásában, ezáltal a gyulladáshoz és autoimmun folyamatok szabályozásában [9]. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a mitokondrium belső membránjában lévő citrát-szintáz (CS) enzim ellen és a topoizomeráz I F4 epitópja ellen természetes autoantitestek találhatóak egészséges egyének és autoimmun betegek szérumában is [10,11].

Ismert, hogy a B-sejtek funkciója a veleszületett immunrendszer molekulái, pl. a Toll-like receptorok (TLR) által is szabályozott [12]. A TLR-ek képesek felismerni a kórokozókkal asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) és elsődleges védelmi vonalat alkotva a behatoló patogén korai felismerésével hozzájárulnak a hatékony immunválasz kialakulásához [13]. Számos TLR megváltozott expresszióját és funkcióját figyelték meg autoimmun betegségekben [14].

A CD180 egy TLR homológ membránprotein, aminek hiányzik az intracelluláris TIR szignalizációs doménja [15]. A CD180 molekulát eredetileg egy B-sejtfelszíni molekulaként azonosították, mely képes poliklonális B-sejt aktivációt, proliferációt és robosztus Ig termelést indukálni [16]. Szisztémás lupus erythematosus (SLE) betegekben a CD180-negatív B-sejtek arányának növekedése figyelhető meg, ami összefüggést mutatott a betegség súlyosságával [17].

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 fibrogenézisben és a B-sejt aktivációban [18,19]. TLR-eken keresztüli szignálok és a B-sejt aktiváló faktor (BAFF)-mediált hatások szintén a PI3K/Akt/mTOR útvonalon keresztül hatnak [20].

A B-sejtek túlélésében és homeosztázisában fontos szerepet játszó BAFF megnövekedett szintjét figyelték meg SSc-ben, mely az autoreaktív B-sejtek megvédésével hozzájárul a B-sejt tolerancia felborulásához [21,22]. BAFF elleni autoantitestek emelkedett szintjét figyelték meg SLE-ben, mely szabályozhatja a BAFF aktivitását [23]. A BAFF többféle receptorhoz képes kötődni a B-sejteken, ilyen a BAFF receptor (BAFF-R), ami a folyamatos túlélési szignált nyújtva a B-sejt homeosztázis pozitív regulátora, illetve a transzmembrán aktivátor és kalciummodulátor és cyclophilin ligand interaktor (TACI), ami az Ig izotípusváltást és a plazmasejtek differenciációját serkenti [24,25].

2. Célkitűzés

Fő célkitűzésünk volt, hogy feltérképezzük a TLR homológ, CD180 molekulán keresztüli B-sejt aktiváció lehetséges szerepét 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.

3. Anyag és módszer

3.1. Minták

Perifériás vér B-sejteken végzett vizsgálatainkhoz 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 kontrollcsoportot 36 korban és nemben illesztett egészséges egyén alkotta. Vizsgálataink egy részéhez mandula mintákat használtunk fel, melyek rutin torokmandula műtéten átesett tünetmentes gyermekektől származtak.

3.2. Mononukleáris sejtek izolálása, a B-sejtek szeparálása és a sejtek stimulálása

A perifériás vérmintákból illetve a manuálisan homogenizált mandula sejtszuspenzióból a mononukleáris sejtek izolálása fikoll sűrűséggradiens-centrifugálással, majd a B-sejtek tisztítása mágneses gyöngy alapú negatív szelekcióval történt. A CD180 molekula természetes ligandja ismeretlen, ezért a CD180 molekulán keresztüli aktiváció vizsgálatához monoklonális anti-CD180 antitestet használtunk.. A sejtek stimulálásához 1 ug/ml koncentrációban anti-humán CD180 antitestet és a TLR9 ligand CpG-t használtunk.

3.3. RNS izolálás, cDNS szintézis és qPCR

Az izolált B-sejtekből RNS izolálást, majd cDNS átírást követően qPCR technika segítségével határoztuk meg a CD180 és a BAFF-R mRNS expresszióját, melyhez a GAPDH szolgált referenciaként.

3.4. ELISA és MAGPIX vizsgálatok

A stimulált mandula B-sejtek felülúszóiból a természetes autoantitestek (anti-CS és anti-topo I antitestek) szintje házi ELISA tesztekkel, a citokinek (IL-6 és IL-10) mennyisége gyári ELISA kitek segítségével határoztuk meg. A dcSSc-s betegek és HC-k szérumban lévő anti-BAFF autoantitestek mennyiségének meghatározásához Luminex MAGPIX módszert használtunk.

3.5. Áramlási citometria

Áramlási citometriás vizsgálataink során a B-sejtek azonosítása a CD19 sejtvonali marker alapján történt, melyeken 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. Továbbá a CD180, BAFF-R és TACI fehérje expressziók meghatározásához szintén áramlási citometriás vizsgálatokat használtunk. Az Akt, S6 és NF- κ B jelátviteli molekulák foszforilációjának vizsgálatát a BD Phosflow protokoll és áramlási citométer felhasználásával végeztük.

4. Eredmények és következtetések

4.1. 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. A CD180-negatív B-sejtek emelkedett szintjét mutatták ki SLE-ben szenvedő betegekben és SLE-s egérmodellben. 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. Emellett a PI3K/Akt/mTOR útvonal fontos szereppel bír a B-sejtek aktivációjában és differenciációjában és ismert, hogy a B-sejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak az SSc patogenezisében. Ráadásul, a TLR-ek szintén ezen a jelátviteli úton keresztül hatnak és CD180-on keresztüli stimuláció hatására az Akt emelkedését írták le B-CLL-ben szenvedő betegek B-sejtjeiben. 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.

Korábban 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. 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. A BAFF nélkülözhetetlen a B-sejtek túléléséhez, éréséhez és homeosztázisához. A megnövekedett BAFF a B-sejt tolerancia megbontásával hozzájárulhat a szisztémás autoimmun betegségek kialakulásához. SSc-ben szenvedő betegekben a BAFF emelkedett szintjét figyelték meg, ami összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és aktivitásával. Bár a BAFF elleni autoantitestek jelenlétét kimutatták egészséges egyének szérumában is, emelkedett szintje figyelhető meg SLE-s betegekben. 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. A BAFF-R a normál B-sejt fejlődésben és túlélésben játszik szerepet, míg a TACI az Ig izotípusváltást és a plazmasejtek differenciációját serkenti. 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 és tudjuk, hogy az autoantitestek kulcsfontosságú szereppel bírnak az SSc patogenezisében.

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 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, 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.

4.2. 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 illetve, hogy a CD180 internalizálódhat az anti-CD180 antitest bekötődését követően. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a B-sejtek CD180-on keresztüli fokozott aktivációja lehetséges magyarázata lehet az SSc-s betegek B-sejtjein megfigyelt csökkent CD180 expressziónak.

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. Az NS B-sejtek képviselik a humán perifériás vérben a MZ-eredetű B-sejteket 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. A B1 B-sejtekhez hasonlóan az NS B-sejtek is képesek lehetnek természetes autoantitesteket termelni. A természetes IgM autoantitestek polireaktívak, fontos szerepet játszanak a károsodott molekulák és sejtek eltakarításában illetve a gyulladássos és autoimmun

folyamatok szabályzásában. 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. 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 és SLE-ben szenvedő betegekben, ráadásul a B-sejtek IL-6 termelése elősegíti az autoimmun csíráközpontok fejlődését és ezáltal a betegség kialakulását SLE-s egérmódelben. Emellett az IL-6 szerepet játszik a plazmasejtek differenciálódásában és túlélésében. 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, 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, SSc-ben kedvezőtlen hatást fejtene ki a B-sejt funkciókra.

5. Új eredmények összefoglalása

5.1. 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.

5.2. 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.

6. 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. J, V.; ML, W. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **2009**, *1*, 226–235.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Czömpöly, T.; Olasz, K.; Simon, D.; Nyárády, 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*, 1761–8.
11. 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.
12. Kremlitzka, M.; Mácsik-Valent, B.; Erdei, A. Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement. *Immunol. Lett.* **2016**, *178*, 37–44.
13. 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.

14. 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*.
15. Schultz, T.E.; Blumenthal, A. The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *101*, 183–192.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Limon, J.J.; Fruman, D.A. Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 228.
20. Werner, M.; Hobeika, E.; Jumaa, H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol. Rev.* **2010**, *237*, 55–71.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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*.

7. 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 háttérét, illetve azért, hogy mindig barátian 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)

8. Publikációs lista

8.1. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabina Erdő-Bonyár**, Judit Rapp, Tünde Minier, Gábor Ráth, József Najbauer, László Czirják, Péter Németh, Timea 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, Timea 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, Timea 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*

8.2. 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., **Erdo-Bonyar, S.**, Simon, D., Berki, T., Nagy, C., Czeiter, E., Buki, A., Lenzser, G., & Csecsei, P. (2021). A magasabb LIGHT/TNFSF14 szint összefügg a subarachnoidalis 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**

9. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

1. A Magyar Immunológiai Társaság (MIT) 48. vándorgyűlése. 2019.10.16-18. Bükfürdő: 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