

A B limfociták funkcionális jellemzése és szerepe autoimmun thyreoiditisben és az ehhez társuló infertilitásban

Doktori (PhD) értekezés

Serény-Litvai Tímea

Témavezető:

Prof. Dr. Berki Tímea

Programvezető:

Prof. Dr. Berki Tímea

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Reglódi Dóra

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ,
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Pécs, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	7
1.1. B limfociták fejlődése.....	7
1.2. BCR szignalizáció	10
1.2.1. Ca^{2+} jelátviteli kaszkád B sejt receptor stimulációt követően.....	10
1.2.2. Grb2 aktiválószerere mIgG típusú BCR jelátvitel során	12
1.3. BCR jelátvitel defektusok, autoimmunitás.....	13
1.4. Hashimoto thyreoiditis	16
1.5. Hashimoto thyreoiditis immunológiai háttere	17
2. Célkitűzés.....	19
3. Anyagok és módszerek	21
3.1. Mintagyűjtés és perifériás vér mononukleáris sejtek izolálása	21
3.2. Sejtfelszíni jelölés.....	24
3.3. Sejtek Fluo-4 AM festékkel való feltöltése	25
3.4. Áramlási citometria	25
3.5. Kapuzási stratégia.....	26
3.6. Kinetikus függvény létrehozása, paraméterei.....	28
3.7. Az aktiválószerrek optimális koncentrációjának kiválasztása.....	30
3.8. Az IgD preaktiváló hatásának tesztelése	30
3.9. Reprodukálhatóság	30
3.10. Statisztika.....	31
B limfociták BCR stimulációt követő kalcium beáramlásának módszertana	34
4. Eredmények	34
4.1. Az aktiválószerrek titrálása, a megfelelő koncentráció kiválasztása	34
4.2. Az anti-IgD jelölés preaktiváló hatása.....	36
4.3. A Ca^{2+} flux kinetikai görbék mintázata megfelelt a B sejt alcsoportok differenciálódási stádiumának	40
5. Diskusszió	47
6. Összefoglalás	52

BCR stimulációra adott fokozott válaszkészség a Hashimoto thyreoiditishez kapcsolódó infertilitásban.....	53
7. Eredmények	53
7.1. Prevalencia.....	53
7.2. Bazális Fluo-4 Medián Fluoreszcencia Intenzitás	54
7.3. B limfocita alcsoportok Fluo-4 MFI változása BCR stimulációt követően	57
7.3.1. A naív B sejtek Fluo-4 MFI változása BCR stimulációt követően	57
7.3.2. A memória B sejtek Fluo-4 MFI változása BCR stimulációt követően.....	60
8. Diskusszió	63
9. Összefoglalás	66
10. Új eredmények	67
Irodalomjegyzék.....	69
Publikációs lista.....	79
Köszönetnyilvánítás	81

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AM: Acetoximetil

Anti-Tg: Anti-Tireoglobulin

anti-TPO: Anti-Tireo-peroxidáz

AUC: Area under the curve, görbe alatti terület

APC: Allophycocyanin

APC-Cy7: Allophycocyanin-cyanine 7

APRIL: A proliferation-inducing ligand

ASC: Antibody-secreting cells, antitest-termelő sejtek

BAFF: B sejt aktiváló faktor

BAFFR: B sejt aktiváló faktor receptor

BCR: B sejt receptor

BLNK: B cell linker protein

BMI: Testtömeg-index

Btk: Bruton-féle tirozin kináz

CRP: C-reaktív protein

CRAC: Kalcium felszabadulás aktiválta kalcium csatorna

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetil-szulfoxid

DN: Kettős negatív memória B sejt

EK: Egészséges kontroll

ER: Endoplazmatikus retikulum

Fab: Fragment antigen binding

FBS: Fötális borjúsavó

Fc: Fragment crystalline

FMO: Fluorescent Minus One

FSC: Forward scatter

FSH: Folliculus stimuláló hormon

GC: Germinális központ

Grb2: Growth factor receptor-bound protein-2

GWAS: Genome wide association study

H1: Hashimoto thyreoiditis-es, hipotiroid csoport, levotiroxin kezelés előtt

H2: Hashimoto thyreoiditis-es, eutiroid csoport, levotiroxin kezelés után

HIE: Hashimoto thyreoiditis-es, infertilis, eutiroid csoport

HT: Hashimoto thyreoiditis

IC: Intracelluláris

Ig: Immunglobulin

IL-4: Interleukin-4

INF: Interferon

IP₃: Inozitol-1,4,5-trifoszfát

IP₃R: IP₃ receptor

IQR: Interkvartilis terjedelem

ISAC: International Society for Advancement of Cytometry

ITAM: Immunreceptor tirozin-alapú aktivációs mintázat

ITT: Immunglobulin tail tirozin

IVF: *In vitro* fertilizáció

JNK: C-Jun N-terminális kináz

LH: Luteinizáló hormon

LPS: Lipopoliszacharid

MAX: Maximum value

MFI: Medián fluoreszcens intenzitás

MHC: Major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex

mIgG: Membránhoz kötött Immunglobulin G

mIgM: Membránhoz kötött Immunglobulin M

mPC: Érett plazmasejt

NA: Nem aktivált

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells, aktivált T-sejtek nukleáris faktora

NFκ-B: Nukleáris faktor-kappa B

NSw: Non-switched memória B sejt

OR: Odds ratio, esélyhányados

PB: Plazmablast

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells, perifériás vér mononukleáris sejt

PBS: Foszfat pufferelt fiziológiás sóoldat

PC: Plazmasejtek

PE: Phycoerythrin

PE-Cy7: Phycoerythrin-cyanine 7

PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein

PLC γ -2: Foszfolipáz C-gamma 2

PI(4,5)P₂: Foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

PMCA: Plasma membrane Ca²⁺ ATPase

PTPN22: Protein tyrosine phosphatase, non- receptor type 22

SD: Standard deviáció

SSC: Side scatter

TABLET: Multicentrikus, randomizált, kettős-vak, placebo-kontrollos vizsgálat

T_{FH}: Follikuláris helper T sejt

T from 50% to Max: Time from first 50% value to maximum

T from Max to 2nd 50%: Time from maximum to second 50% value

TLR: Toll-like receptor

T_H: Helper T sejt

TM: Transzmembrán

TSH: Pajzsmirigy stimuláló hormon

T to Max: Time to reach maximum value

T to 50%: Time to reach first 50% value

SERCA: Sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase

SH2: Src-homológ 2

SHBG: Sex Hormone Binding Globulin, nemi hormon kötő fehérje

SLE: Szisztémás lupusz eritematózus

SOCE: Sejtraktárok által szabályozott kalcium beáramlás

STIM1: Stroma Interaction Molecule 1

Sw: Switched memória B sejt

WAS: Wiskott-Aldrich szindróma

1. BEVEZETÉS

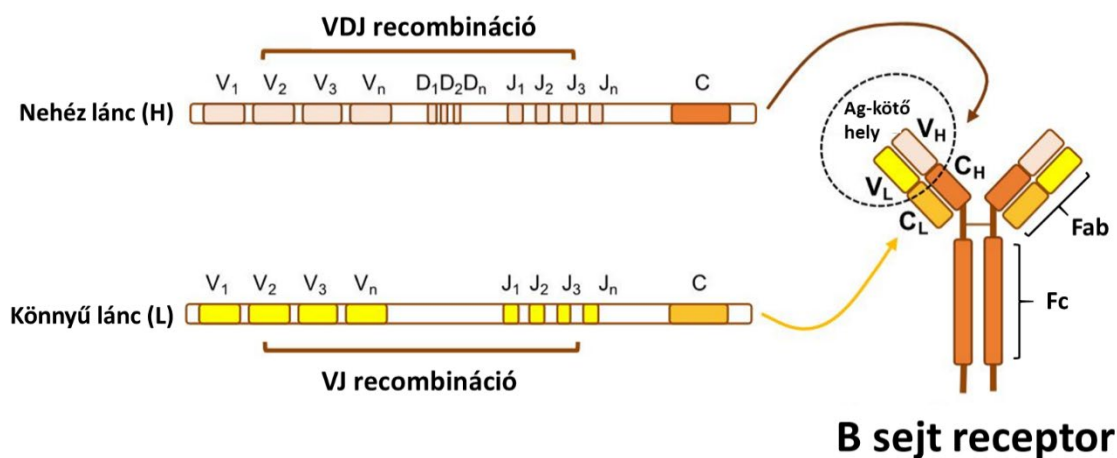
1.1. B limfociták fejlődése

A B limfociták az adaptív immunrendszer nyiroksejtjei, melyek a humorális immunválasz szerves részét képezik. A B sejtek fajlagos antigén felismerésre képes sejt felszíni receptorral rendelkeznek (BCR). Egyetlen B sejt klón csak egy konkrét antigén felismerésére képes. Az adott antigén ellen - plazmasejtté érve - specifikus ellenanyagokat termel. Továbbá a B sejtek fontos szerepet játszanak a T sejtek antigénprezentációjában. A primer immunválasz során egy részük memória B sejté alakul, ezáltal közreműködnek az immunológiai memória fenntartásában is (LeBien & Tedder 2008; Ollila & Vihinen 2005).

A B sejtek a csontvelőben lévő hemopoetikus őssejtekből alakulnak ki, amelyek az embrionális fejlődés során kerülnek a magzati májból a csontvelőbe. A B sejtek fejlődését a csontvelő stromasejtjei által termelt citokinek, kemokinek és egyéb sejt felszíni molekulák szabályozzák (Priehl & LeBien 1996). A B sejtek fejlődésének kezdeti szakaszai antigéntől függetlenek és magukban foglalják számos köztes prekursor sejt képződését. Ezek B limfocita progenitor sejtekből származnak, amelyek éretlen B sejtekké differenciálódnak. A fejlődés ezen szakaszaiban a B sejtek Immunglobulin (Ig) géneket érintő szomatikus génátrendeződésen mennek keresztül, ami egyedi, az adott B sejtre jellemző BCR expresszióját eredményezi, amely képes kötődni az antigénhez (Schatz & Ji 2011).

A BCR két nehéz (H) és két könnyű (L) láncból áll, amelyeket diszulfidkötések kapcsolnak össze. Mindegyik lánc variábilis (V) és konstans (C) régiókat tartalmaz. Az Ig-k a nehézláncok alapján öt osztályba sorolhatók: IgA, IgD, IgE, IgG és IgM. Mindegyik Ig-molekulában két azonos Fab-régió (Fragment antigen binding) található, amelyek megkötik az antigént, és egy Fc-régió (Fragment crystalline), amely az antitestek biológiai aktivitásának és effektor funkcióinak nagy részéért felelős (Jung & Alt 2004). A szomatikus génátrendeződés folyamán elsőként az Ig nehéz láncja rendeződik át. A VDJ rekombináció során a genomban lévő V (variable), D (diversity) és J (joining) gén szegmens véletlenszerűen kiválasztódik és egymás mellé rendeződik és létrejön az Ig nehéz láncának

variábilis régiója, ami az antigén-kötő helyet tartalmazza (Zhang et al. 2004). Ezt követően megkezdődik a könnyű lánc VJ rekombinációja, illetve a konstans régió kappa (κ) vagy lambda (λ) transzlációja (**1. ábra**). A véletlenszerű génátrendeződés eredményeként egy antigént (annak epitópját) felismerni képes BCR jön létre (Tonegawa 1983). Ezt követően azok a B sejtek, amelyek a szervezet saját struktúráival erősen kapcsolódnak, negatív szelekció révén apoptózissal elpusztulnak vagy BCR editing során megváltoztatják az antigénreceptorukat. Viszont azon sejtek, amelyek nem reagálnak erősen a szervezet saját molekuláival, megmaradnak. A szelekciós folyamatot túlélő éretlen B sejtek többsége elhagyja a csontvelőt és a lépbe vándorol, ahol átmeneti ún. tranzicionális B sejtekből immunkompetens, naív érett B sejtekké válnak (Sandel & Monroe 1999).



1. ábra. B sejt receptor szomatikus génátrendeződése (Ten Hacken et al. 2019).

A BCR szignálok különböző információkat közvetítenek attól függően, hogy egy B sejt melyik fejlődési szakaszban van. A naív B sejtek IgD-t és IgM-et expresszálnak, és tranzicionális B sejteket is, amelyek elhagyják a csontvelőt, és pozitív szelekción mennek keresztül a naív, érett B sejt-repertoár kialakításához.

Az antigénkötés hatására a naív IgD⁺ sejtek a perifériás nyirokszervek extrafollikuláris gócaiban szaporodnak, ahol rövid életű, antigén-specifikus, alacsony affinitású IgM-et termelő plazmablasztokká (PB) alakulnak. Az antigén hatására aktiválódott B sejtek egy másik csoportja bevándorol a csíracentrumba és ott osztódáson és T sejt függő osztályváltáson mennek keresztül, ami a B sejtek memória- vagy hosszú életű plazmasejteké (PC) való differenciálódásához vezet. Ezt a folyamatot a csíracentrumokban található számos citokin és kostimulációs faktor segíti (Sze et al. 2000). A hosszú életű, memória típusú PB és PC populációkat az IgD-CD27^{high}CD38^{high} fenotípus jellemzi. Mivel a PB és a PC populációk elkülönítése nem egyértelmű, ezért Sanz et al. javasla alapján keringő antitest-termelő sejtekként (ASC) fogunk hivatkozni rájuk (Sanz et al. 2019).

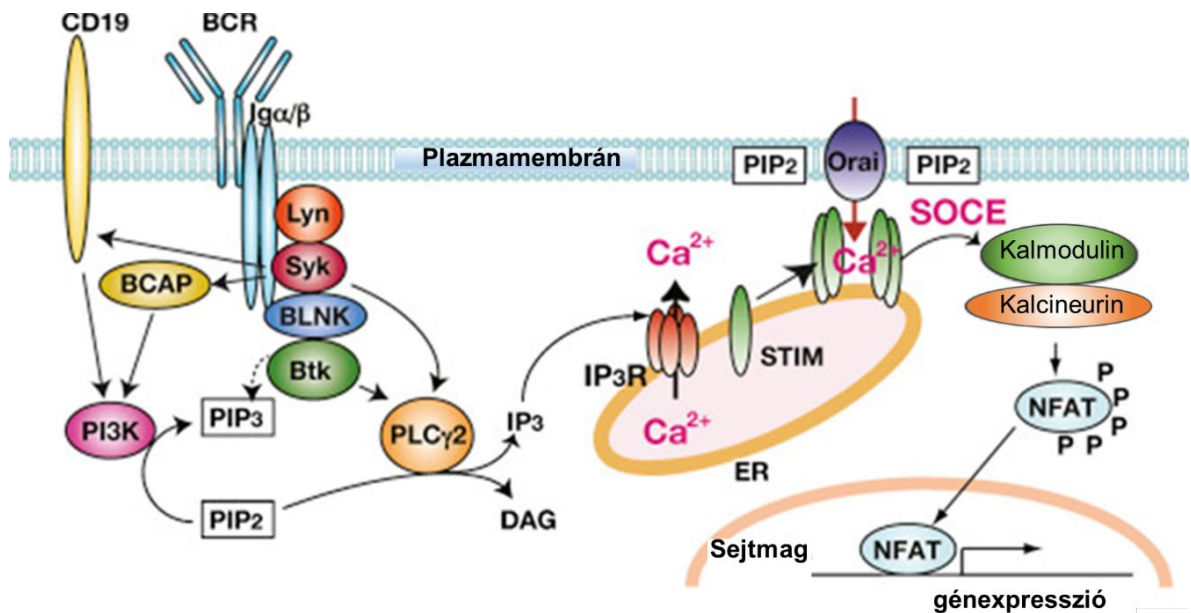
Az antigénspecifikus aktivációt követően egyes B sejtek memória B sejtekké differenciálódnak, CD27-et expresszálnak, és újra belépnek a keringésbe. CD27⁺ B sejtek IgD expressziójuk alapján tovább osztályozhatók. Azokat a perifériás memória B sejteket, amelyek még expresszálnak IgD-t, az izotípusváltás előtti memória B sejteknek (Non switched, NSw), míg azokat, amelyek Ig-izotípusváltáson esnek át, és elkezdnek IgG-t vagy további Ig-altípusokat expresszálni, konvencionális memória B sejteknek (Switched, Sw) nevezik. Ez utóbbiak fokozzák a felszíni Ig-expressziójukat, és elveszítik az antitest termelő képességet (Murphy & Weaver 2017). Végül bizonyos memóriasejtek elveszítik az IgD expressziót, és nem jelenítik meg a sejtfelszíni CD27 molekulát sem, így kettős negatív (Double negative, DN) memória B sejtekké válnak. Ezek nem osztódó, gyulladáscitokintermelő sejtek, amelyek szerepet játszhatnak az autoimmunitásban (Nevalainen et al. 2019; Wei et al. 2007; Wu et al. 2011). Az utóbbi két memória alcsoport olyan sejtfelszíni receptorokat is expresszál, amelyek alkalmasak a T sejtekkel való interakcióra (Taylor et al. 2012). A legújabb tanulmányok azt mutatják, hogy a CD25-öt expresszáló B limfociták a sejtek fenotípusosan és funkcionálisan eltérő alcsoportját képviselhetik, magasabb szintű felületi Ig expresszióval és fokozott antigén-prezentáló képességgel (Brisslert et al. 2006).

1.2. BCR szignalizáció

1.2.1. Ca^{2+} jelátviteli kaszkád B sejt receptor stimulációt követően

A szabad intracelluláris (IC) kalcium egy multifunkcionális másodlagos hírvivő molekula (King & Freedman 2009), amelynek dinamikus koncentráció változásai a B limfociták immunológiai sorsának és működésének legtöbb részét szabályozzák. A migráció, sejtadhézió, apoptózis, proliferáció, sejtciklus, protein kináz jelátvitel, mitokondriális és endoplazmatikus retikulum fiziológiája, fehérjék, transzkripciós faktorok transzlokációja és aktiválása, valamint a génexpresszió egyaránt IC Ca^{2+} által szabályozott folyamat (Berridge 2012; Berridge et al. 2003; Feske 2007). A B sejtek kalciumszintjét dinamikusan szabályozó tényezők közé tartoznak az IC receptorok és csatornák, amelyek a belső raktárakból való Ca^{2+} felszabadulásáért felelősek; a plazmamembrán csatornák, amelyek a Ca^{2+} bejuttatásáért felelősek; a nyugalmi membránpotenciál, amit a feszültségfüggő és kalcium vezérelt K^+ csatornák állítanak be, ami a Ca^{2+} bejutásának elektromos hajtóerejét adja; a feszültségfüggő transzporterek és a nem szelektív kationcsatornák (Freedman 2006; Liu et al. 2005; Liu et al. 2006; Zhu et al. 2005); a szarko/endoplazmás retikulum (SERCA) és plazmamembrán (PMCA) Ca^{2+} ATPáz pumpák, amelyek a Ca^{2+} -t visszajuttatják az IC raktárakba (Fierro & Parekh 2000) valamint a mitokondriumok pufferelése (Parekh 2003). Ezek együttesen formálják azokat a kalciumjeleket, amelyek meghatározzák a B sejtek eltérő funkcionális választ (King & Freedman 2009).

A BCR egy membránhoz kötött Ig molekula, amely egyedi antigén felismeréssel rendelkezik (Packard & Cambier 2013). A BCR-nak önmagában nincs enzimatis aktivitása, viszont antigénkötést követően a citoplazmában a hozzá kapcsolódó jelátvivő molekulák aktiválódnak és különböző fehérjék foszforilációjával szignalizációs útvonalakat indítanak be, ami a sejt aktivációjához vezet (Seda & Mraz 2015). A BCR-hoz való ligandumkötés során az immunglobulinhoz kapcsolódó CD79a (más néven $\text{Ig}\alpha$) és CD79b ($\text{Ig}\beta$) molekulák immunreceptor tirozin-alapú aktivációs mintázat (ITAM) doménjeit a Src-családba tartozó lyn tirozin-kináz foszforilálja (Gold et al. 1991; Johnson et al. 1995; Saijo et al. 2003),



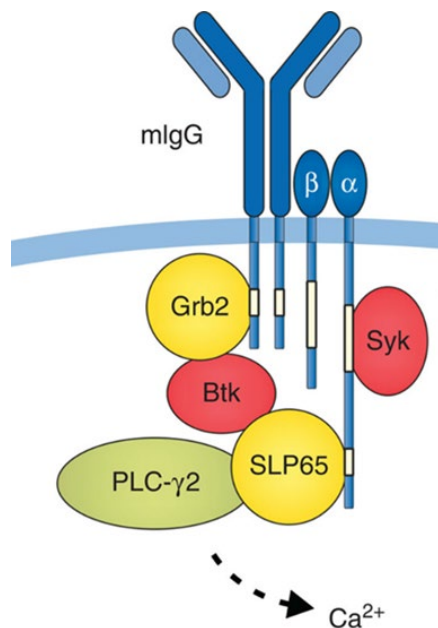
2. ábra. A kalcium (Ca^{2+}) jelátviteli kaszkád B sejt receptor stimulációt követően (Baba et al. 2014).

aminek következtében Src-homológ 2 (SH2) doménekkal rendelkező jelátvivő molekulák tudnak kapcsolódni, mint például a Syk, ami B-cell linker protein (BLNK) foszforilációjához vezet (Rowley et al. 1995). A foszforilált BLNK kötőhelyeket biztosít a Bruton-féle tirozin kináz (Btk) és a foszfolipáz C-gamma 2 (PLC γ -2) számára. Az aktiválódott Btk foszforilálja a PLC γ -2-t, ami a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PI(4,5)P $_2$) hasításához, valamint inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP $_3$) és diacilglicerol (DAG) felszabadulásához vezet (Coggeshall & Cambier 1984). Az IP $_3$ az endoplazmatikus retikulum (ER) IP $_3$ receptorához (IP $_3$ R) kötődve Ca^{2+} felszabadulást vált ki a sejten belüli készletből, ezzel emelve a sejten belüli szabad kalciumionszintet (Hogan et al. 2010; Penna et al. 2008). Ezt követően egy hosszan tartó extracelluláris Ca^{2+} beáramlás történik a sejtraktarak által szabályozott kalcium beáramláson (SOCE, Store operated calcium entry) és a kalcium felszabadulás aktiválta kalcium (CRAC, calcium release activated calcium current) áramon keresztül (Baba & Kurosaki 2016). Az ER Ca^{2+} -szint csökkenését az ER membránban elhelyezkedő Stroma Interaction Molecule 1 (STIM1) N-terminális doménje érzékeli. Miután aktiválódott, a STIM1 oligomerizálódik, és az ER membránon belül a plazmamembránhoz transzlokálódik. Ezt követően kölcsönhatásba lép a plazmamembránban elhelyezkedő pórusképző Orai1 fehérjével. A STIM1 és az Orai1

közötti interakció Ca^{2+} beáramlást indukál (SOCE). A SOCE tartós Ca^{2+} növekedése aktiválja a kalmodulin/kalcineurin útvonalat. A foszfátáz kalcineurin defoszforilálja az Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) útvonalat, ami nukleáris transzlokációhoz és génexpresszió változások elindításához vezet (Baba & Kurosaki 2016; Berlansky et al. 2021; Debant et al. 2015; King & Freedman 2009) (2. ábra).

1.2.2. Grb2 aktiváló szerepe mIgG típusú BCR jelátvitel során

Az elsődleges T sejt függő antitest válasz során az antigén specifikus B sejtek kölcsönhatása T sejtekkel csíráközpontok (germinális centrum, GC) kialakulását eredményezi. A GC-kben az érett, naív B sejtek irreverzibilisen izotípus-váltást követően megváltoztatják sejt felszíni BCR-aikat, hogy túlnyomórészt membránhoz kötött Immunglobulin G (mIgG)-BCR-okat expresszáljanak. Ezek az IgG-BCR-t expresszáló GC B sejtek ezután antigén által szabályozott szelekción és szomatikus hipermutáción esnek át, ami nagy affinitású IgG-BCR-t expresszáló memória B sejteket és hosszú életű plazmasejteket eredményez. Az mIgM és mIgG különböző extracelluláris, transzmembrán (TM) és citoplazmatikus doménekkal rendelkezik (Engels et al. 2014).



3. ábra. Az mIgG-BCR jelátvitel erősítése az ITT/Grb2/Btk szignalizációval (Engels et al. 2014).

A growth factor receptor-bound protein-2 (Grb2) adapterfehérjének többféle szerepe van a B sejtekben. Kezdetben egy gátló szignál komplex részeként ismerték fel, amely korlátozza a BCR által kiváltott Ca^{2+} mobilizációt az mIgM-et expresszáló sejtekben (Engels et al. 2014). Viszont a Grb2 fehérje aktiváló szerepet is betölt az mIgG típusú BCR jelátvitel során, főként memória B sejtekben (**3. ábra**). A Ca^{2+} jelátvitel fokozódik az mIgG típusú BCR keresztkötésekor az mIgM típusú BCR-hoz képest (Waisman et al. 2007), ami a citoplazmatikus farok szegmens tirozin foszforilációjával van összefüggésben (Engels et al. 2009). A Grb2 nem lép kölcsönhatásba az mIgM/Ig α /Ig β komplexszel, viszont az ITAM-hoz kötődő Syk általi foszforiláció során az Ig tail tirozin (ITT)-szegmensek dokkolási helyeket biztosítanak a Grb2 adapterfehérje számára (Engels et al. 2014). Az mIgG-BCR szignáloszómában a Grb2 SH3 doménjének N terminális része interakcióba kerül a Btk prolin gazdag régiójával. A Grb2/Btk beépülése a BCR szignáloszómába stabilizálja a Ca^{2+} iniciációs komplexet, amely a Btk-ból, az SLP65 (B Cell Linker, BLNK) adapterfehérjéből és a foszfolipáz C- γ 2-ből (PLC- γ 2) áll. Ezáltal az aktivált receptoron a Btk csökkenti a PLC- γ 2 aktivációs küszöbét (Baba & Kurosaki 2016; Engels et al. 2014).

1.3. BCR jelátvitel defektusok, autoimmunitás

A B sejt receptoron keresztüli jelátvitel a B sejtek immunológiai sorsának fő szabályozója, ideértve a pozitív és negatív szelekciót, a központi és perifériás toleranciát és az aktivációt (Rawlings et al. 2017). A Ca^{2+} központi szerepet játszik a BCR jelátviteli útvonal szabályozásában, amelyben már egy kis változás is patológiás következményekkel járhat (Baba és Kurosaki, 2016; Berry et al., 2020). Ezt a központi útvonalat számos receptor, például a B sejt aktiváló faktor receptor (BAFFR), a toll-like receptor (TLR) 7 és 9 és a CD40 szignalizációja befolyásolhatja (Jackson et al. 2015). A kutatások azt mutatják, hogy a BCR jelátvitelben már egy kis változtatás is elegendő ahhoz, hogy különböző mechanizmusok révén elősegítse és fenntartsa az autoimmunitást (Rawlings et al. 2017).

Egy módosult BCR szignalizáció a naív BCR készlet torzulásához vezethet, ami az autoreaktív klónok fokozott megjelenését eredményezheti (Habib et al. 2012; Kolhatkar et al. 2015; Lesley et al. 2006; Lesley et al. 2004; Thien et al. 2004). Ez azonban önmagában

nem elegendő egy autoimmun betegség kialakulásához, mivel az újonnan képződött B sejtek akár 40%-a autoreaktivitást mutat egészséges egyénekben is (Giltiay et al. 2019; Meffre & Wardemann 2008). Ezért elengedhetetlen a folyamat további lépéseinek megértése.

A tolerancia elvesztésének következő lépése az autoreaktív B sejt klónok aktiválódása. A kutatások azt bizonyítják, hogy egy autoimmun rendellenesség során az autoantitest termelő B sejtek mind germinális központban, mind extrafollikuláris módon is képződhetnek. Figyelemre méltó, hogy bizonyos körülmények között az újonnan képződött B sejtek képesek megkerülni a GC-t, szomatikus hipermutáción és izotípusváltáson mennek keresztül és a periférián rövid életű plazmablasztokká differenciálódnak (William et al. 2002). Egy fertőzés is fontos kiváltó ok lehet, mivel mind a vírusos, mind a bakteriális fertőzések fokozott B sejt aktiváló faktor (BAFF), I-es típusú Interferon (IFN) termeléshez, valamint a patogén eredetű antigének megjelenéséhez vezetnek, amelyek a TLR-hoz kapcsolódnak, lehetőséget teremtve az újonnan képződött B sejtek számára az aktiválódásra és izotípusváltásra annak érdekében, hogy a kórokozókval szemben reagáljanak (Giltiay et al. 2019).

A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy az autoreaktív B sejtek képesek a spontán GC képződést irányítani és a follikuláris helper T sejtek (T_{FH}) toborzásával gátolják a T sejt tolerancia fenntartását (Rawlings et al. 2017). Ráadásul az extrafollikuláris aktivációs útvonalak mellett, a spontán kialakuló ún. terciar nyiroktüszőkben az autoimmun GC-k - ami a Hashimoto thyreoiditis (HT) betegség egy kulcsfontosságú jellemzője (Armengol et al. 2001; Volpe 2000) – a B sejt aktiváció fontos helyének bizonyulnak (Hardy & Hayakawa 2001; Vinuesa et al. 2009). Azt feltételezik, hogy a B sejtek központi szerepet játszanak a kezdeti antigénprezentációban, biztosítva az autoreaktív T sejt aktivációhoz szükséges jeleket (Rawlings et al., 2017). Ebből a szempontból a CD25+ B sejtek különösen érdekesek lehetnek (Brisslert et al., 2006). Az aktivációt követően további B sejt aktiváció és antigénprezentáció követi egymást, ami az epitóp terjedéséhez és az autoreaktív B és T sejt klónok folyamatos toborzásához vezet (Rawlings et al. 2017).

A teljes genom asszociációs vizsgálatok (genome wide association study, GWAS) számos autoimmunitást elősegítő polimorfizmust azonosítottak, amelyek nagy része a BCR szignalizációs útvonalat érinti (Hom et al. 2008; Lu et al. 2009). A Wiskott-Aldrich

szindróma (WAS) modell a WAS fehérje B sejt-specifikus deléciója során enyhe BCR és TLR hiperaktivitást eredményez. Ez a mérsékelt változás spontán humorális autoimmunitáshoz, magas affinitású IgG autoantitestek termelődéséhez, a T_{FH} expansiójához, spontán GC képződéshez és a végszerv károsodáshoz vezet (Becker-Herman et al. 2011; Recher et al. 2012). Hasonlóképpen a LYN gén B sejt-intrinsic deléciója - amely szintén alapvető gátló jelátvitelt biztosít a BCR-hoz való ligandumkötést követően a B sejt-tolerancia fenntartásához- (Gross et al. 2009) emelkedett BCR mediált kalcium fluxhoz vezet (Xu et al. 2005), ami elegendő a spontán humorális autoimmunitás kialakulásához (Brodie et al. 2018; Hibbs et al. 1995; Lamagna et al. 2014). Továbbá a Protein tyrosine phosphatase, non- receptor type 22 (PTPN22) polimorfizmusai, amelyekről ismert, hogy összefüggésben áll a HT és más autoimmun rendellenességekkel, szintén megváltozott BCR indukált kalcium fluxot okoz és a magas rizikót jelentő variánsok B sejt specifikus expressziója elég az autoimmunitás kialakulásához (Arechiga et al. 2009; Armitage et al. 2021; Dai et al. 2013; Rawlings et al. 2017; Wu et al. 2020; Xiaoheng et al. 2017).

Egyre több bizonyíték hívja fel a figyelmet a megváltozott BCR jelátvitel kulcsfontosságú szerepére az autoimmunitás vonatkozásában, miszerint módosítja a naív BCR repertoárt, elősegíti az autoreaktív B sejt klónok aktivációját T sejt dependens és independens módon, elősegítve a spontán autoreaktív GC-k kialakulását és a T_{FH} sejtek toborzásával a T sejt-tolerancia elvesztését. Ezen felül a B sejtek döntő szerepet játszanak a T sejtek antigén-prezentációjában is a Major Histocompatibilitási Complex (MHC) II. típusú molekulákon keresztül, a kostimulációs molekulákkal és citokinekkal együtt (Rawlings et al. 2017). Habár megfigyeléseket főként szisztémás autoimmun modelleken tettek, a megváltozott BCR jelátvitel a Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladás kialakulásában is fontos szerepet tölthet be, különösen mivel további autoimmun betegségek kialakulásának a kockázata is jelentősen magasabb Hashimoto thyroiditisben (Weetman 2011).

1.4. Hashimoto thyreoiditis

A Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladás a fertilis korú nőket érintő gyakori szerv-specifikus autoimmun betegség. Jellemző az emelkedett pajzsmirigy elleni antitestek - anti-tireo-peroxidáz (anti-TPO) és anti-tireoglobulin (anti-Tg) - jelenléte, valamint a pajzsmirigy mononukleáris sejtes infiltrációja (Pearce et al. 2003). A celluláris és humorális tényezők összetett kölcsönhatása több éven át tartó krónikus gyulladással eredményez. Egy adott szintű pajzsmirigyszövet károsodást követően hipotireózis alakul ki, amit a pajzsmirigy-stimuláló hormon (TSH) szintjének emelkedése jelez (Pearce et al. 2003). Bár az autoantitest pozitívitas előfordulása 10-14,5% a 20 és 40 év közötti nők körében (Hollowell et al. 2002), a hipotireózis kialakulása nem törvényszerű, sőt az éves kockázat mindössze 2,1% (Vanderpump et al. 1995). A betegség prevalenciájának növekvő tendenciája ellenére (Pyzik et al. 2015) a klinikai tünetek hiánya miatt az autoantitest pozitív esetek többsége diagnosztizálatlan marad.

Ez a csendes, lappangó betegség klinikailag irrelevánsnak tűnhet, azonban az autoantitest-pozitívitas önmagában, pajzsmirigy-diszfunkció nélkül is jelentősen megnöveli a meddőség és a vetélés kockázatát. Prospektív vizsgálatok metaanalízise alapján a vetélés esélyhányadosa (odds ratio, OR) 3,9 (Thangaratnam et al. 2011). Az autoantitestek jelenléte negatív hatással lehet az *in vitro* fertilizáció (IVF) sikerességére is, mivel kimutatták, hogy jelentősen csökken a megtermékenyítés, a beültetés és a terhességek aránya, valamint megnő a vetélés kockázata (Zhong et al. 2012). Emellett a terhesség során kialakuló immuntolerancia is károsodhat, amit a koraszülések (OR 2,07) (Thangaratnam et al. 2011) és a terhességi szövődmények magasabb aránya is mutat (Gleicher 2014).

A pajzsmirigy-alulműködés általános kezelésére egy szintetikus pajzsmirigyhormont, a levotiroxin szedését írják elő. A levotiroxin-pótló terápia jótékony hatását IVF és terhesség alatt autoantitest pozitív, eutiroid nőkben randomizált vizsgálatokban korábban kimutatták (Negro et al. 2006; Negro et al. 2005). Azonban egy közelmúltban végzett multicentrikus, randomizált, kettős-vak, placebo-kontrollos (TABLET) vizsgálat során az eredmények nem igazolták a terápia pozitív hatását, a levotiroxin adása eutiroid, anti-TPO pozitív nőknek nem növelte az élve születés arányát a placebohoz képest (Dhillon-Smith et al. 2019).

A HT termékenységgel és terhességi szövődeményekkel való kapcsolatának magyarázatára két hipotézis merült fel (Zhu et al. 2021). Az első szerint a HT-t generalizált immunrendszeri diszfunkció kíséri, amely hatással van a nemi szervekre, és károsítja az anyai-magzati immuntoleranciát (Weetman 2010). Az autoantitestek közvetlen káros hatását is felvetették, mivel meddő nők follicularis folyadékában is kimutathatók ezek az antitestek, ami alacsonyabb oocita fertilizációs arányhoz vezethet (Monteleone et al. 2011). Ezenkívül az anti-TPO antitestek keresztreakcióba léphetnek a zona pellucidával, ronthatják a petesejtek megtermékenyítését (Kelkar et al. 2005), és káros hatással lehetnek a placenta fejlődésére (Ushijima et al. 2019). Az ok-okozati összefüggést az is alátámasztja, hogy az egerek humán Tg elleni immunizálása megnövekedett magzati felszívódást, valamint a magzat és a placenta súlyának csökkenését eredményezi (Matalon et al. 2003).

A második hipotézis azon a megfigyelésen alapul, hogy az emelkedett TSH független kockázati tényező a kedvezőtlen terhességi kimenetekben (Maraka et al. 2016; Negro & Stagnaro-Green 2014; Sheehan et al. 2015). Ez azt jelenti, hogy a gyulladt pajzsmirigy nem képes megfelelően alkalmazkodni a terhesség megnövekedett igényéhez (Korevaar et al. 2017a; Korevaar et al. 2017c), ami „relatív” pajzsmirigy-diszfunkcióhoz vezethet (Chan & Boelaert 2015; Korevaar et al. 2017b; Loh et al. 2016; Zhu et al. 2021). Mivel azonban a levotiroxin-pótlás nem bizonyult hatékonynak a TABLET-vizsgálat során, egyre inkább felhívják a figyelmet a mögöttes immunológiai elváltozások részletesebb megértésének szükségességére.

1.5. Hashimoto thyreoiditis immunológiai háttere

A Graves-kórral ellentétben, amelyet autoantitest-mediált rendellenességként ismerünk, a Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladást általában T sejt-mediált betegségnek tekintik (Pearce et al. 2003). Bár a B sejtek autoantitestek forrásaként betöltött szerepe egyértelmű a HT- ban, kevés ismeretünk van a betegség patogeneziséhez való hozzájárulásukról és a kapcsolódó infertilitásban betöltött szerepükről.

A klasszikus hipotézis szerint az autoreaktív B limfociták a gyulladásos folyamat mellékszereplői, amelyek a megfelelő citokin-környezetben a pajzsmirigy antigének felszabadulása és a T helper (T_H) limfociták jelenléte következtében aktiválódnak. Azt feltételezik, hogy a tolerancia elvesztése a T limfociták szintjén következik be, és ezek az antigén-specifikus, autoreaktív T sejtek serkentik az autoreaktív B sejtek aktiválódását (Volpe 2000; Weetman 1992). Ez a hipotézis azon a tényen alapul, hogy az izotipusváltás és a HT-ra jellemző nagy affinitású IgG autoantitestek termelődése csak akkor jön létre, ha egy germinális központban megtörténik ugyanazon antigén összekapcsolt felismerése az autoreaktív T_{FH} és B sejtek által (Murphy & Weaver 2017). A T sejtek antigénprezentációjából és specifikus receptor-szignalizációjából adódóan még keveset tudunk az aktivált autoreaktív T sejtek megjelenéséhez vezető lépésekről.

De vajon az autoreaktív, nagy affinitású autoantitest-termelő B limfociták megjelenése lehet-e az első lépés a HT során kialakult tolerancia elvesztésében, megelőzve magának a pajzsmirigynek a károsodását? Az autoimmunitás terén elért közelmúltbeli kutatások eredményei megváltoztatták a B sejtek szerepével kapcsolatos nézetünket, mivel a bizonyítékok azt mutatják, hogy a megváltozott BCR szignalizáció lehet a kulcsfontosságú lépés és az elsődleges hajtóerő a tolerancia elvesztésében és az autoimmunitás kialakulásában, és az nemcsak az autoreaktív T_H sejtaktiváció következménye (Rawlings et al. 2017). Longitudinális vizsgálatok kimutatták, hogy a betegséggel összefüggő autoantitestek megjelenése évekkel előre jelzi a betegség kialakulását többszörös autoimmun betegségekben, mint például a szisztémás lupus erythematosusban (SLE) (Arbuckle et al. 2003), a rheumatoid arthritisben (Deane et al. 2010; Sokolove et al. 2012) vagy az 1-es típusú cukorbetegségben (Pihoker et al. 2005).

2. CÉLKITŰZÉS

A B sejt alcsoportok különböző környezeti jelekre való érzékenysége nagymértékben függ a fejlődési stádiumtól, a sejtfelszíni receptor összetételéből és a működő szignalizációs útvonalaitól. A B sejt alcsoportok Ca^{2+} kinetikájának tanulmányozása betekintést nyújt azok funkcionális működésébe, amely a B sejt által közvetített autoimmun állapotok alapvető mozgatórugója lehet.

1. Munkánk első fázisában egy áramlási citometrián alapuló módszert standardizáltunk, amely során az anti-IgG, anti-IgM és anti-IgG+M aktiválószer hatását teszteltük humán perifériás B sejt alcsoportok Ca^{2+} flux paramétereinek jellemzésére.

Az optimalizált Fluo-4-acetoxymethyl (Fluo-4-AM) alapú áramlási citometriás módszernek a segítségével célunk volt valós időben leírni a kiválasztott B limfocita alcsoportok aktivációs válaszában finom változásait. Ez valóság-hű összehasonlítást tesz lehetővé, mivel minden alcsoport pontosan ugyanazt az aktiváló ingert kapja és fontos információt szolgáltat a különböző alcsoportok adott ingerre fellépő eltérő fiziológiai válaszképességéről. Ez a módszer alkalmas limfociták aktivációs jellemzőinek leírására különböző B sejt immunológiai rendellenességekben.

2. Ezt követően az optimalizált Fluo-4-AM alapú áramlási citometriás módszerrel megvizsgáltuk a B sejt alcsoportok funkcionális változásait autoimmun thyreoiditisben és az ehhez társuló infertilitásban.

- A B limfocita alcsoportok prevalenciáját, bazális kalcium jelét és kalcium kinetikáját vizsgáltuk B sejt receptor stimulációt követően,
 - Hashimoto thyreoiditisben szenvedő, hipotiroid betegekben, a levotiroxin kezelés előtt és az eutiroid állapot elérése után.
 - Infertilitásban szenvedő pajzsmirigy autoantitest pozitív, de még eutiroid betegekben.
 - Korban illesztett egészséges kontrollokban.

Arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen szerepet tölt be a megváltozott B sejt receptor szignalizáció Hashimoto thyreoiditisben és az infertilitás kialakulásában, illetve a levotiroxin milyen hatást gyakorol a B sejtek kalcium kinetikájára hipotiroid betegek kezelés előtti és utáni mintáiban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mintagyűjtés és perifériás vér mononukleáris sejtek izolálása

Tanulmányunkat a Helsinki Deklaráció elveinek megfelelően végeztük. A kutatási tervet a helyi etikai testület, a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (RIKEB 5913/2015). Minden vizsgálati eljárás előtt következetesen minden résztvevőtől írásos beleegyezést kaptunk.

Minden résztvevő perifériás vérmintáit 10 ml-es lítium-heparin csövekbe gyűjtöttük. A mintákat foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) hígítottuk 1:3 arányban, ezt követően Ficoll-Paque PLUS (GE HealthCare, Chicago, IL, USA) sűrűség-grádiens centrifugálással mononukleáris sejteket izoláltunk. A sejteket ezután kétszer mostuk (400 x g, 7 perc), majd jelölés céljából 5% főtális borjúsavót (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó RPMI 1640-ben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) szuszpendáltuk.

A B limfociták BCR stimulációt követő kalcium kinetikájának kidolgozása során húsz egészséges felnőtt önkéntest vontunk be a kísérletbe (10 nő és 10 férfi), akik nem kaptak védőoltást 3 hónapon belül, nem szedtek rendszeresen gyógyszert, nem volt betegségük és nem volt fertőzésük sem 1 hónappal a mintavétel előtt.

Az autoimmun thyreoiditisben és az ehhez társuló infertilitásban vizsgált B limfociták BCR stimulációt követő kalcium beáramlásának tanulmányozásához a következő betegcsoportokat vontuk be. Tizenöt, Hashimoto thyreoiditises, hipotiroid állapotban lévő beteget vontunk be a vizsgálat hipotiroid ágába. Minden betegnél emelkedett a TSH szint, 12 betegnél volt anti-TG antitest pozitívitás és 13 betegnél volt anti-TPO antitest pozitívitás. Mindegyiknél autoimmun pajzsmirigygyulladás jelei voltak láthatóak az ultrahangon. Az első mintákat a levotiroxin terápia előtt (H1), a második mintavételre a levotiroxin kezelés közben, az eutiroid állapot elérését követően (H2) került sor. Az első minták egyikét technikai hiba miatt ki kellett zárni. A második mintát három betegből nem sikerült gyűjteni, két esetben egy második autoimmun betegség kialakulása, egy esetben pedig nem tervezett terhesség miatt.

Tizenöt pajzsmirigy-ellenes antitest-pozitív, eutiroid beteget vontunk be a vizsgálat meddő ágába (Hashimoto thyreoiditises, infertilis, eutiroid csoport, HIE). Minden beteg elsődleges meddőségben szenvedett. Tizenkét betegnél volt anti-TG antitest pozitivitás és 10 betegnél volt anti-TPO antitest pozitivitás. Minden beteget egy asszisztált reprodukciós programból (*In vitro* fertilizáció, IVF) irányították hozzánk. A mintákat a termékenységi kezeléseik előtt gyűjtöttük. Az infertilitás átlagos időtartama $3,6 \pm 2,7$ év volt. A partnerek andrológiai vizsgálata normális spermiumszámot, életképességet és morfológiát mutatott. A betegek ösztrogén és progeszteron szintje a ciklus alatt normális volt, az ovulációt az emelkedett progeszteron érték és az ultrahang vizsgálat is igazolta. A petevezeték elzáródását laparoszko-pos kromohidrotubációval zárták ki. Minden betegnél elsődleges meddőség volt; nem számoltak be korábbi terhességről. Két betegnek volt spontán korai vetélése a bevétele előtt. A mintavétel előtt más autoimmun betegséget nem diagnosztizáltak náluk. Technikai hiba miatt egy mintát nem tudtunk értékelni.

Tizenkét, korban illesztett egészséges önkéntes nőt (Egészséges kontroll, EK) vontunk be a vizsgálat kontroll csoportjába, pajzsmirigy elleni antitestek és a TSH szűrést követően. Az egyéb betegségek kizárására rutin laboratóriumi paramétereket is mértünk. Az egészséges kontrollok egyikének sem volt kísérő betegsége, sem menstruációs ciklus rendellenessége, és egyikük sem szedett rendszeresen gyógyszert.

Az összes mintát a menstruációs ciklus 1. és 5. napja között gyűjtöttük, hogy standardizáljuk az ösztrogén és a progeszteron lehetséges immunológiai hatásait. A betegek legalább 3 héttel a mintavétel előtt nem szenvedtek fertőzést, és a C-reaktív protein (CRP) értékeket a vérvétel napján mérték. A betegek a mintavételt megelőző 2 hónapban nem kaptak védőoltást. Általános orvosi és szülészeti anamnézis, egyidejű gyógyszeres kezelés és betegségek, korábbi műtétek kerültek rögzítésre. Az immunológiai mintavétel napján a következő laboratóriumi paramétereket mértük: TSH, anti-TPO, anti-TG, ösztradiol, progeszteron, Folliculus stimuláló hormon (FSH), Luteinizáló hormon (LH), prolaktin, tesztoszteron, Sex Hormone Binding Globulin (SHBG), CRP. Az összes résztvevő klinikai jellemzőit az **1. táblázat** foglalja össze.

	EK (n=12)	H1 (n=15)	H2 (n=12)	HIE (n=14)
Demográfiai adatok (mean + SD)				
Életkor (évek)	30.83 (± 1.364)	31.8 (± 1.391)	32.17 (± 1.429)	33.07 (± 1.517)
BMI (kg/m²)	23.31 (± 1.455)	25.24 (± 1.467)		21.69 (± 0.8137)
Laboratóriumi paraméterek (median + IQR)				
TSH (mU/l)	1.63 (0.92 - 2.40)	6.81 (5.53 - 8.73)*	1.54 (0.60 - 2.27)	2.34 (1.62 - 3.30)
Anti-TPO (IU/ml)	9.85 (8.40 - 13.25)*	248.80 (70.00 - 388.90)	236.10 (102.90 - 374.60)	134.60 (17.00 - 203.10)*
Anti-TG (IU/ml)	12.35 (10.00 - 15.18)*	220.10 (42.90 - 318.80)	274.90 (58.53 - 451.20)	204.00 (16.78 - 355.30)
Ösztadiol (pmol/l)	141.50 (103.00 - 155.30)	120.00 (99.00 - 141.00)	149.00 (103.00 - 218.50)	147.00 (89.00 - 190.30)
Progeszteron (nmol/l)	0.80 (0.50 - 1.28)	0.50 (0.30 - 0.90)	0.80 (0.53 - 2.30)	0.60 (0.48 - 1.00)
FSH (U/l)	6.70 (4.91 - 7.53)	6.40 (5.70 - 7.03)	6.33 (4.85 - 7.72)	6.95 (6.08 - 9.45)
LH (U/l)	4.00 (2.45 - 5.85)	3.65 (3.25 - 4.93)	4.15 (2.50 - 5.75)	3.65 (2.95 - 4.30)
Prolaktin (ng/ml)	12.35 (10.07 - 19.53)	12.90 (10.07 - 17.42)	10.74 (8.15 - 11.85)	10.73 (7.78 - 17.52)
tesztoszteron (nmol/l)	1.00 (0.75 - 1.28)	1.10 (1.00 - 1.20)	1.17 (0.94 - 1.58)	0.95 (0.88 - 1.23)
SHBG (nmol/l)	82.65 (58.68 - 115.30)	62.60 (41.20 - 107.00)	46.85 (34.13 - 129.90)	68.40 (41.20 - 84.78)
CRP (mg/l)	0.60 (0.53 - 1.35)	2.25 (0.50 - 4.28)	2.75 (0.90 - 3.88)	1.20 (0.50 - 3.88)
Pajzsmirigy ultrahang				
Göbök (x/összes)		7/15		1/14
Inhomogenitás (x/összes)		11/15		8/14
Hipoechogén területek (x/összes)		9/15		5/14
Hiper-vaszkularizáció (x/összes)		8/15		6/14
Nőgyógyászati anamnézis felvételkor				
Terhesség (x/összes)	3/12	5/15		2/14
Terhességek száma	7	8		3
Vetélések száma	2 (29%)	3 (37.5%)		3 (100%)
Abortuszok száma	0	2 (25%)		0
Szülések száma	5 (71%)	3 (37.5%)		0
Fogamzásgátló használata korábban (x/összes)	11/12	13/15		9/14
Allergia (x/összes)	4/12	2/15		3/14

1. táblázat. A betegek klinikai jellemzői. A laboratóriumi eredmények a bevonás napjáról származnak. Minden betegmintát a ciklus első és ötödik napja között vettünk le. Az adatok kiértékeléséhez Dunn-féle Kruskal-Wallis többszörös összehasonlító post-hoc tesztet használtuk. EK: egészséges kontrollok (n=12); HT: Hashimoto thyreoiditis, H1: hipotiroid betegek a kezelés előtt (n=14); H2: HT-s, eutiroid betegek, levotiroxin kezelés után (n=12); HIE: HT, infertilis, eutiroid betegek (n=14). BMI: testtömeg-index, TSH: Thyreoidéastimuláló hormon, anti-TG: Tireoglobulin antitest, anti-TPO: Tireoperoxidáz antitest, CRP: C-reaktív protein, FSH: Folliculus stimuláló hormon, LH: Luteinizáló hormon, SHBG: Sex Hormone Binding Globulin, SD: Standard deviáció, IQR: Interkvartilis terjedelem. * p <0,05 vs. többi csoport (Serény-Litvai et al. 2022).

3.2. Sejtfelszíni jelölés

A metodika kidolgozása során a B sejt alcsoportok meghatározásához a következő fluorokróm-konjugált anti-humán antitesteket alkalmaztuk: CD3-PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein, SK7 klón), CD19-PE (phycoerythrin, SJ25C1 klón), IgD-APC (Allophycocyanin, IA6-2 klón) CD38-APC-Cy7 (Allophycocyanin-cyanine 7, HIT2 klón) (mind Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA) és CD27-PE-Cy7 (Phycoerythrin-cyanine 7, M-T271 klón, BioLegend, San Diego, CA, USA).

A sejtek IgM és IgG sejtfelszíni expressziójának meghatározásához a következő fluorokróm-konjugált anti-humán antitesteket alkalmaztuk: CD19-PE (SJ25C1), CD27-PE-Cy7 (M-T271), IgD-APC (IA6-2), IgM-BV421 (Brilliant Violet 421, MHM-88) (mind Biolegend, San Diego, CA, USA) és IgG-FITC (fluoreszcein-izotiocianát, QA19A42, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). A sejtek életképességének vizsgálatához Zombie NIR (Biolegend, San Diego, CA, USA) festéket használtunk a sejtfelszíni jelölés előtt a gyártó utasításai alapján. Ezekbe a mintákba nem került fluo-4-AM.

A HT-ben vizsgált B sejt alcsoportok meghatározásához a következő fluorokróm-konjugált anti-humán antitesteket alkalmaztuk: CD5 PerCP (UCHT2 klón), CD19 PE (SJ25C1 klón), IgD APC (IA6-2 klón), CD27 PE-Cy7 (M-T271 klón), CD25 BV421 (BC96 klón, Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA).

Az összes antitestet 10^7 PBMC-re titráltuk, hogy meghatározzuk az egyes populációk legjobb elkülönítését, a legkevésbé aspecifikus kötődést és a legalacsonyabb háttérrel (background noise, spread). A sejtfelszíni jelölés okozta preaktiválás hatás miatt minden mintát külön-külön és egymás után jelöltünk, hogy egységesítsük a jelöléstől a mérésig eltelt időt. A jelölés 100 μ l RPMI 1640 médiumban történt, 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten. A jelölést követően a mintákat kétszer mostuk RPMI 1640-ban (400 x g, 7 perc).

3.3. Sejtek Fluo-4 AM festékkel való feltöltése

A Fluo-4-AM észter egy fluoreszcens intracelluláris Ca^{2+} ion indikátor, amelynek fluoreszcenciája Ca^{2+} megkötésekor növekszik. 50 μg Fluo-4 festéket (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 4,56 μl DMSO-ban (dimetil-szulfoxid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldottunk, hogy 10 mM törzsoldatot kapjunk. 1 μl törzsoldatot diszpergáltunk 1 μl 20 %-os (w/v) nemionos detergensben, Pluronic F-127-ben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd 98 μl RPMI médiumban oldottuk fel (100 μM koncentráció eléréséig). Ezt követően a Fluo-4 koncentrációját 10^7 sejtre titráltuk, és az 5 μM -os koncentrációt választottuk ki.

A sejtfelszíni jelölést követően a sejteket 285 μl RPMI-ben szuszpendáltuk fel, és 15 μl Fluo-4-t adtunk hozzá. A PBMC-t 15 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. A sejteket mostuk (400 x g, 7 perc), majd CaCl_2 -dal (1,8 mM Ca^{2+} koncentrációval) kiegészített RPMI 1640 médiumban vettük fel és szobahőmérsékleten, sötétben további 30 percig inkubáltuk, hogy lehetővé tegyük az IC Fluo-4-AM észterek teljes deészterifikálódását. Minden mintát közvetlenül a deészterifikálódási periódus után mértünk.

3.4. Áramlási citometria

A metodika kidolgozása során a BD FACS Canto II áramlási citométeren (3 lézer, 4-2-2 konfiguráció, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) minden mintánál 60 másodperces alapjelet (baseline) rögzítettünk, majd aktiválószerrel adtunk hozzá. A következő koncentrációkat vizsgáltuk: anti-humán IgG+M (F(ab')_2 Fragmens AffiniPure Kecske Anti-Humán IgG+IgM (H+L), poliklonális) 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 és 20 $\mu\text{g/ml}$; anti-humán IgG (kecske anti-humán F(ab')_2 specifikus anti-IgG, poliklonális, teljes IgG) és anti-humán IgM (kecske anti-humán F(ab')_2 Fragmens, F(ab')_2 Fc5 μ specifikus anti-IgM, poliklonális) esetében 0,5, 1, 10 és 20 $\mu\text{g/ml}$ (mind Jackson ImmunoResearch, Franklin Lakes, NJ, USA). Az aktiválást követően 720 másodpercet rögzítettünk egy új fájlban.

A HT-ben vizsgált B sejt alcsoportok tanulmányozásánál minden mintánál 120 másodperces baseline-t rögzítettünk, majd ezt követően 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú anti-humán IgG+IgM

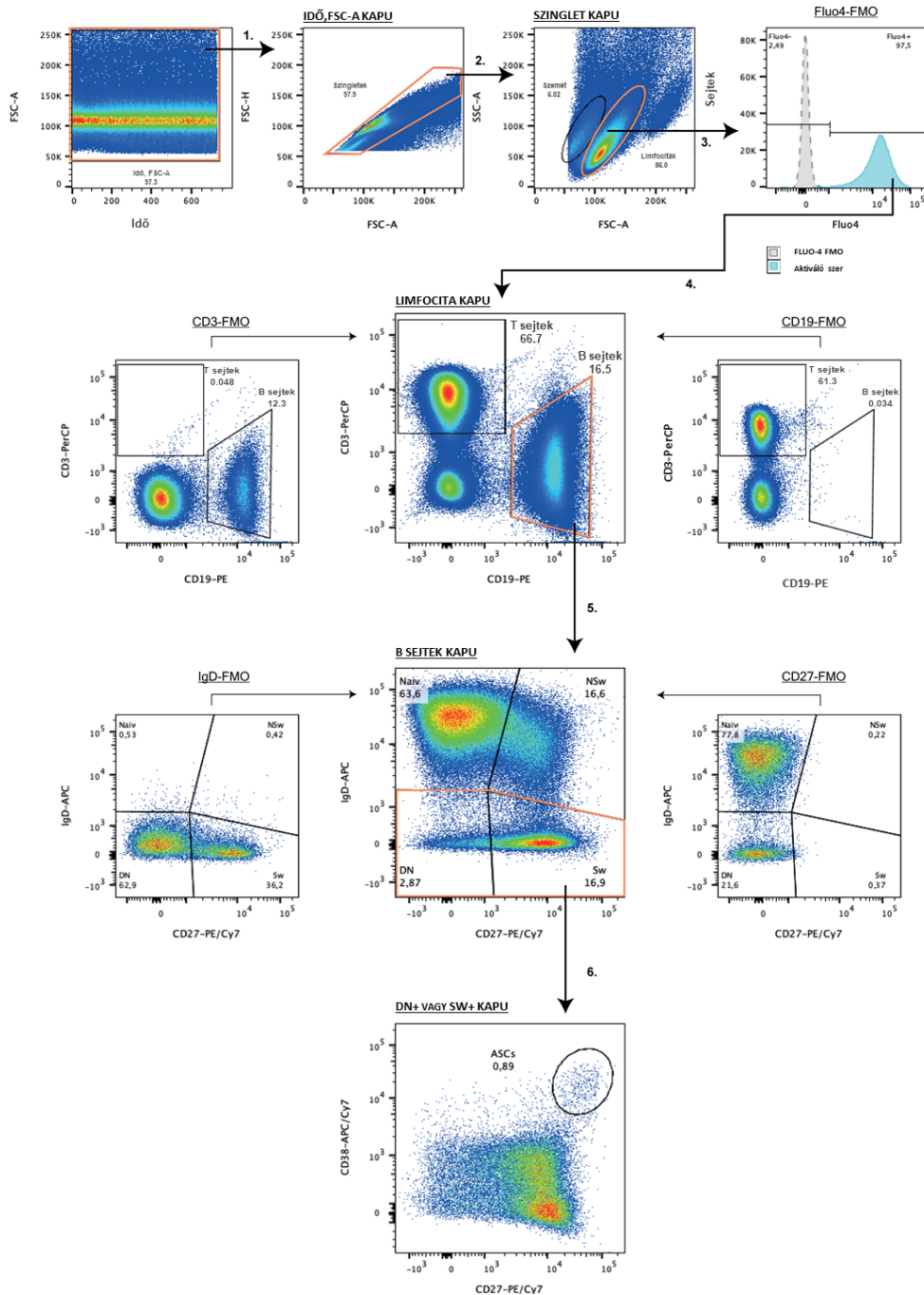
aktiválószerrel aktiváltuk a B limfocitákat és további 900 másodperces kinetikus fázist regisztráltunk.

A Canto II műszer beállításából adódóan az aktiválószer hozzáadásához el kellett távolítani a mintát tartalmazó csövet, ezért az aktiválószer hozzáadásától az aktiválási görbe rögzítésének kezdetéig eltelt időt lemértük, majd később a FacsKin programban (Mészáros et al. 2012) a baselinehoz illesztett aktivált fájl csatolásánál ezen értéket beírtuk.

3.5. Kapuzási stratégia

A kompenzációs mátrixokat minden mérési napra FlowJo v10.7.1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) szoftver segítségével számítottuk ki. Az összes kaput FlowJo-ban állítottuk be, minden mintához Fluorescent Minus One (FMO) kontrollokat használtunk. A metodika kidolgozása során a kinetikus mérések kiértékelésénél először a célcsoportok kapuzását végeztük el. Ehhez első lépésben a forward scatter (FSC, y tengely) és idő (x tengely) mentén kijelöljük a mérés számunkra releváns időtartamát, amely itt a teljes időszáv, kihagyva a FSC szerint a felső határértékre eső értékeket. Ezt követően a FSC-A és FSC-H paraméterek mentén (y:FSC-H/x:FSC-A) kiszűrjük a technikai duplikátumokat és csak a szinglet eseményekkel folytatjuk az értékelést. Ezután a FSC és side scatter (SSC) paraméterek mentén kijelöljük a limfocita populációt. Következő lépésként elkülönítjük a halott sejteket. A Fluo-4 festékkel sikeresen feltöltött sejteket (Fluo-4+) élő sejtekként azonosítjuk. Fluo-4 FMO segítségével meghatározzuk a Fluo-4- populációt és a Fluo4+ sejtekkkel dolgozunk tovább. A limfocitákon belül a CD3+CD19- sejtek a T sejtek populációját jelöli, a CD3-D19+ populáció pedig a B limfocitákat jelöli. Szintén FMO kontroll mellett a B limfociták csoportján belül elkülönítjük a naív és memória B sejteket az alábbiak szerint: a CD19+IgD+CD27- sejtek jelölik a naív B sejteket, a CD19+IgD+CD27+ sejtek adják az izotípusváltás előtti memória B sejtek (Non-switched memória, NSw) csoportját, a CD19+IgD-CD27+ sejtek a konvencionális memória B sejteket (Switched memória, Sw) a CD19+IgD-CD27- sejtek a kettős negatív B sejteket (Double negative, DN), amelyek más néven nem konvencionális memória B sejtek. A keringő antitest termelő sejteket (ASC) az IgD- B sejtpopuláción belül CD19+CD27^{hi}CD38^{hi} sejtekként határozzuk

meg (4. ábra). A HT-ben vizsgált B sejt alcsoportok tanulmányozásánál az egyes alcsoportokon belül vizsgáljuk a CD25 expresszió mértékét is.

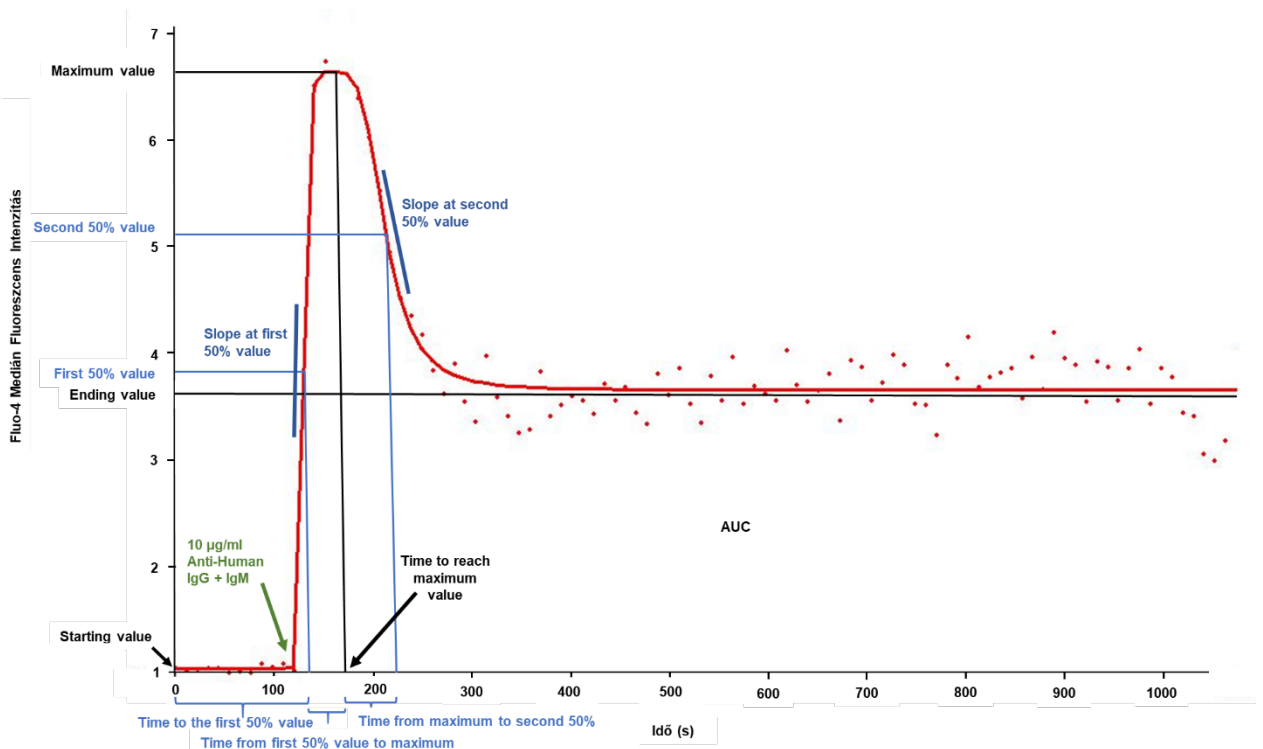


4. ábra. Teljes kapuzási stratégia áramlási citometriával, amelyek 2D pontdiagramként (dotplot) vagy egyparametrikus hisztogramként vannak ábrázolva. A narancssárga színű kapuk jelölik a szülőpopulációt a következő kapuzási lépéshez. A kapuk beállítása mindig FMO alapján történt. Az ábra egy reprezentatív alany mintájának értékeit mutatja (Bajnok et al. 2023).

3.6. Kinetikus függvény létrehozása, paraméterei

A kapuk beállítását követően a célpopulációkat egyenként fcs-fájlként exportáljuk és a FacsKin kinetikus elemző programba importáljuk. A FacsKin esetében az egyes populációk baseline és kinetikus fájljait összeillesztjük az aktiválástól a felvétel kezdetéig eltelt pontos idő hozzáadásával. Ez lehetővé teszi az egyes aktiválási görbék legpontosabb illesztését, ami kulcsfontosságú a standardizáció, a reprodukálhatóság és az összehasonlíthatóság szempontjából.

A FacsKin szoftver egy olyan algoritmuson alapul, amely függvényeket illeszt az egyes aktivált sejtpopulációk medián fluoreszcens értékéhez (MFI), lehetővé téve az áramlási citometriával kapott kinetikai mérések matematikai leírását és statisztikai összehasonlítását.



5. ábra. FacsKin által számított dlogist+ kinetikai függvény paraméterei. Példa egy Ca^{2+} flux kinetika görbére anti-IgG+M aktiválást követően. X tengely: idő, Y tengely: relatív paraméterérték: Fluo4-AM MFI. A kinetikai görbe a kapuzott populáció medián értékei alapján jön létre. A biológiailag releváns paraméterek a következők: Starting value, a függvény határértékeként $-\infty$ (mínusz végtelen) számítva (1-re standardizálva); Time to the first 50% value (s); Slope at first 50% value, mindig pozitív, (mértékegysége: int/s ahol int a függőleges tengely mértékegysége); Time from first 50% to maximum value (s), Time to reach maximum value (s), Maximum value (relatív érték); Time from maximum to second 50% value (s); Slope at second 50% value, mindig negatív (int/s); Ending value, a függvény határértékeként számítva $+\infty$ -nál (pozitív végtelen), AUC: görbe alatti terület 0-tól 1020 s-ig (manuálisan a mérés tényleges idejére állítva) (Serény-Litvai et al. 2022).

A B sejtek kétfázisú aktiválódása a B sejt receptoron keresztül az adaptív immunitás alapvető lépése. A kinetikai függvény különböző paraméterei az aktiválásra adott válaszreakciók különböző aspektusait írják le. A fiziológias folyamat jellege alapján kiválasztható a leginkább illeszkedő függvény. A kalcium kinetika görbéinek többsége kettős logisztikai lefutást mutat (dlogist+ függvény) (**5. ábra**). A *Starting value* paraméter a kiindulási kalcium koncentrációval áll összefüggésben (amely 1-re standardizálható, ami lehetővé teszi a különböző napokon végzett mérések összehasonlítását). A *Maximum value* (MAX) paraméter korrelál az aktiválás során elért maximális citopolazmatikus Ca^{2+} szinttel, amely szelektíven aktiválja a nukleáris faktor-kappa B (NFk-B) és c-Jun N-terminális kináz (JNK) útvonalakat (Dolmetsch et al. 1997). Egy adott alcsoport aktiválószerrel szembeni reakciókészségét ez az érték tükrözi a legpontosabban. Ebben a kísérleti összeállításban az *Ending value* paraméter az aktiválás plató fázisa alatti Ca^{2+} szintet tükrözi, ami a CRAC csatornán keresztüli tartós extracelluláris Ca^{2+} beáramlásának következménye. Ez az alacsonyabb, tartós platófázis szelektíven stimulálja az NFAT szignalizációs útvonalat (Baba & Kurosaki 2016; Dolmetsch et al. 1997). A *Time to reach maximum value* (T to Max), a maximális Fluo-4 MFI érték eléréséhez szükséges időt mutatja. A *Time to reach the 1st 50% value* (T to 50%) a legérzékenyebb paraméter annak meghatározására, hogy egy adott sejttípus milyen gyorsan reagál egy adott aktiválószerre. A *Time from first 50% value to maximum* (T from 50% to Max) és a *Slope at 1st 50% value* paraméterek azt írják le, hogy a fluoreszcencia intenzitás mennyit változik 1 másodperc alatt az aktiválás emelkedő fázisában, jelezve, hogy a sejtek milyen gyorsan reagálnak az adott ingerre. A *Time from maximum to second 50% value* (T from Max to 2nd 50%) és *Slope at 2nd 50% value* paraméterek azt jelzik, hogy milyen gyorsan csökken a Ca^{2+} szint az aktiváció csúcsa után. A görbe alatti terület (AUC) paraméter korrelál a sejtek teljes Ca^{2+} mobilizálási kapacitásával. A statisztikai számításokat ezen paraméterek számszerű adataiból végeztük.

3.7. Az aktiválószeres optimális koncentrációjának kiválasztása

Első körben egy kinetikai mérés sorozatot végeztünk, amihez nem adtunk aktiválószeret. Ez a műszer beállításából eredő változások nyomon követésére volt alkalmas. Az ezekből a mérésekből származó adatokat (n=5) egyesítettük, majd referenciaértékeket hoztunk létre minden egyes B sejt alcsoporthoz. Ezt követően a különböző aktiválószeres hatását vizsgáltuk a B sejtek kalciummobilizációjára: anti-IgG, anti-IgM, anti-IgG+M antitest használatával. Annak megállapítására, hogy az aktiválószeres kiváltják-e a kalciumáramlást, és ha igen, milyen koncentrációban, az általános laboratóriumi gyakorlat, a tudományos szakirodalom és a gyártói ajánlások alapján választottuk ki a koncentrációkat. A következő koncentrációkat vizsgáltuk: anti-IgG+M 0,1, 0,5, 1, 10 és 20 µg/ml; anti-IgG és anti-IgM 0,5, 1, 10 és 20 µg/ml. Mindegyik aktiválószer titrálási sorozatát háromszor megismételtük. A három ismétlésből származó adatokat használtuk fel a statisztikai elemzéshez.

3.8. Az IgD preaktiváló hatásának tesztelése

A B sejt alcsoportok megkülönböztetésére használt anti-IgD jelölés preaktiváló hatásának tesztelésére öt csövet jelöltünk APC konjugált IgD antitesttel, öt csövet konjugátlan IgD antitesttel (IgD-APC klónnal azonos) IgD-APC antitesttel megegyező koncentrációban és öt csövet jelöletlenül hagyunk. A jelölést 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten végeztük. Az összes csövet a fent leírt kinetikai módszerrel mértük. A sejteket anti-IgG, anti-IgM, anti-IgG+M, anti-IgD (mind 10 µg/ml) és ionomicin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) segítségével aktiváltuk. Továbbá kontrollként lemértünk egy nem aktivált mintát is.

3.9. Reprodukálhatóság

A hibátlan mérések és az összehasonlítható kísérletek biztosítása érdekében a legjobb laboratóriumi gyakorlatokat követtük a minta-előkészítés, az áramlási citometriai mérések és az IC Ca²⁺ kinetika követése terén (Cossarizza et al. 2019). Az International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) ajánlása alapján a jelöléseket és a méréseket szobahőmérsékleten végeztük. Minden mérési napon citométer beállítást (CS&T)

végeztünk. A kompenzációs csövek mért mátrixait specifikusan, minden mérési napra kiszámítottuk FlowJo-ban, a fluorokrómmal konjugált antitestekhez kompenzációs gyöngyöket (BD) és a Fluo-4 festékhez a vizsgálati alanyok PBMC-jét használtuk. A mérések standardizálása és a reprodukálhatóság biztosítása érdekében számos validálási lépést és különféle kontrollokat alkalmaztunk. Az autofluoreszcencia és más fluoroforokból származó jelek kizárását, illetve a negatív és pozitív populációk pontos meghatározását FMO kontrollok segítségével határoztuk meg. A nem aktivált mintákat megmértük, és referenciaként használtuk, hogy kizárjuk a műszaki beállításból származó Fluo-4 jelváltozásokat. Minden egyes aktiválószer esetében elvégeztünk egy kinetikai mérést is Fluo-4 jelölés nélkül (Fluo-4 FMO), hogy kizárjuk a háttér fluoreszcenciában az aktiválási folyamatból eredő bármilyen változást. A FacsKin szoftver segítségével az összes baseline mérést 1-re standardizáltuk, ami lehetőséget adott a különböző baseline Fluo-4 MFI értékkel rendelkező sejt populációk méréseinek objektív összehasonlításához.

A sejtek életképességét több lépésben ellenőriztük. Először egy külön csőben viabilitási festéket (Zombie NIR, Biolegend, San Diego, CA, USA) adtunk a sejtfelszíni jelöléshez, hogy ellenőrizzük az preanalitikai folyamatokat, mint például a vérvételt, a mintatárolást és a limfociták szeparálásának a sejt életképességére gyakorolt hatását. Másodszor az egyes csövek mérése után a sejtek életképességének meghatározásához tripánkéék festékkizárásos technikát alkalmaztunk annak ellenőrzésére, hogy az aktiválási folyamat nem vezetett-e gyors sejthalálhoz. Harmadszor a kinetikai minták analízise során csak az életképes, Fluo-4-gyel feltöltött sejteket elemeztük ki. A viabilitás minden egyén esetében 95% fölött volt a mérést követően.

3.10. Statisztika

A B limfociták BCR stimulációt követő kalcium beáramlásának módszerének kidolgozása során az alábbi statisztikákat alkalmaztuk. A prevalencia, a medián fluoreszcens intenzitás és a Fluo-4 baseline adatok statisztikai elemzését GraphPad Prism 9 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) segítségével végeztük. A normalitás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk. A nem normál eloszlású adatoknál az egyszeres összehasonlításokhoz Wilcoxon-féle (páros) előjeles rang tesztet, a többszörös összehasonlításokhoz Friedman-

tesztet alkalmaztunk, kettőnél több adathalmaz összehasonlításánál Benjamini-Hochberg FDR korrekciót alkalmaztunk. Két normál eloszlású adathalmaz összehasonlítására páratlan kétmintás kétoldalas t-próbát alkalmaztunk. Több mint két normál eloszlású adathalmaz összehasonlításához kétutas ANOVA-t és Tukey-féle post hoc-tesztet használtunk.

A B sejt alcsoportok közötti különbségek kimutatásához szükséges ismétlések számát *power* analízissel határoztuk meg az *AUC*, *Maximum value* és *Time to 50% value* paraméterek segítségével. A statisztikai analízist a R szoftvercsomaggal végeztük (Package ‘pwr’) (Champely 2020).

Az anti-IgG+M titrálás során a *Max* és *Ending value* paraméterek kiértékelésénél a dózishatás adatok analíziséhez nem-lineáris regressziót (görbeillesztést) végeztünk GraphPad Prism 9 program segítségével.

Statisztikai analízist a kalcium kinetika paramétereire összpontosítva (*Maximum value*, *Ending value*, *AUC*, *Time to reach maximum*, *Time to 1st 50 %*, *Time from 1st 50 % to maximum value*, *Time from maximum value to 2nd 50 %*, *Slope at 1st 50 %* and *Slope at 2nd 50 %*) R szoftvercsomaggal végeztük (Team 2023). A normalitás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk a R szoftvercsomag *shapiro.test* függvényével. A nem normál eloszlású adathalmazok vizsgálatához Wilcoxon és Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk a R szoftvercsomag *wilcoxon.test* és *kruskal.test* függvényeivel. Több mint két adathalmaz összehasonlításához Dunn-féle Kruskal-Wallis többszörös összehasonlító post-hoc tesztet használtuk a FSA R szoftvercsomag *dunnTest* függvényével (Ogle 2021). A 0,05-nél kisebb *p* értékeket szignifikáns eredménynek tekintettük, a korrigált *p* értékeket a korábban említett *dunnTest* függvény (Benjamini-Hochberg, ”BH” módszer) segítségével számítottuk ki.

Az autoimmun thyreoiditisben és az ehhez társuló infertilitásban vizsgált B limfociták BCR stimulációt követő kalcium beáramlásának tanulmányozásához a következő statisztikákat alkalmaztuk. Az EK-H2, EK-H1, EK-HIE, H2-HIE, H1-HIE betegcsoportok közötti különbségek kimutatására hagyományos kétutas ANOVA és Tukey féle post hoc tesztet alkalmaztunk. A H1 és H2 csoportok közötti különbségeket vegyes hatáselemzéssel és a Sidak-féle többszörös összehasonlító teszttel értékeltük az ismételt mintavétel és a véletlenszerűen hiányzó értékek miatt. Az összehasonlítások szintjei a következők; (1) a

betegcsoportok átlaga közötti összehasonlítás, ha teljesen figyelmen kívül hagyjuk a sejtek csoportosítását, (2) a betegcsoportok átlaga közötti összehasonlítás az alpopulációkon belül, (3) a sejtpopulációk és a betegen belüli alpopulációk átlaga között csoportok összehasonlítása. A statisztikai elemzést Prism 8-ban (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük.

B LIMFOCITÁK BCR STIMULÁCIÓT KÖVETŐ KALCIUM BEÁRAMLÁSÁNAK MÓDSZERTANA

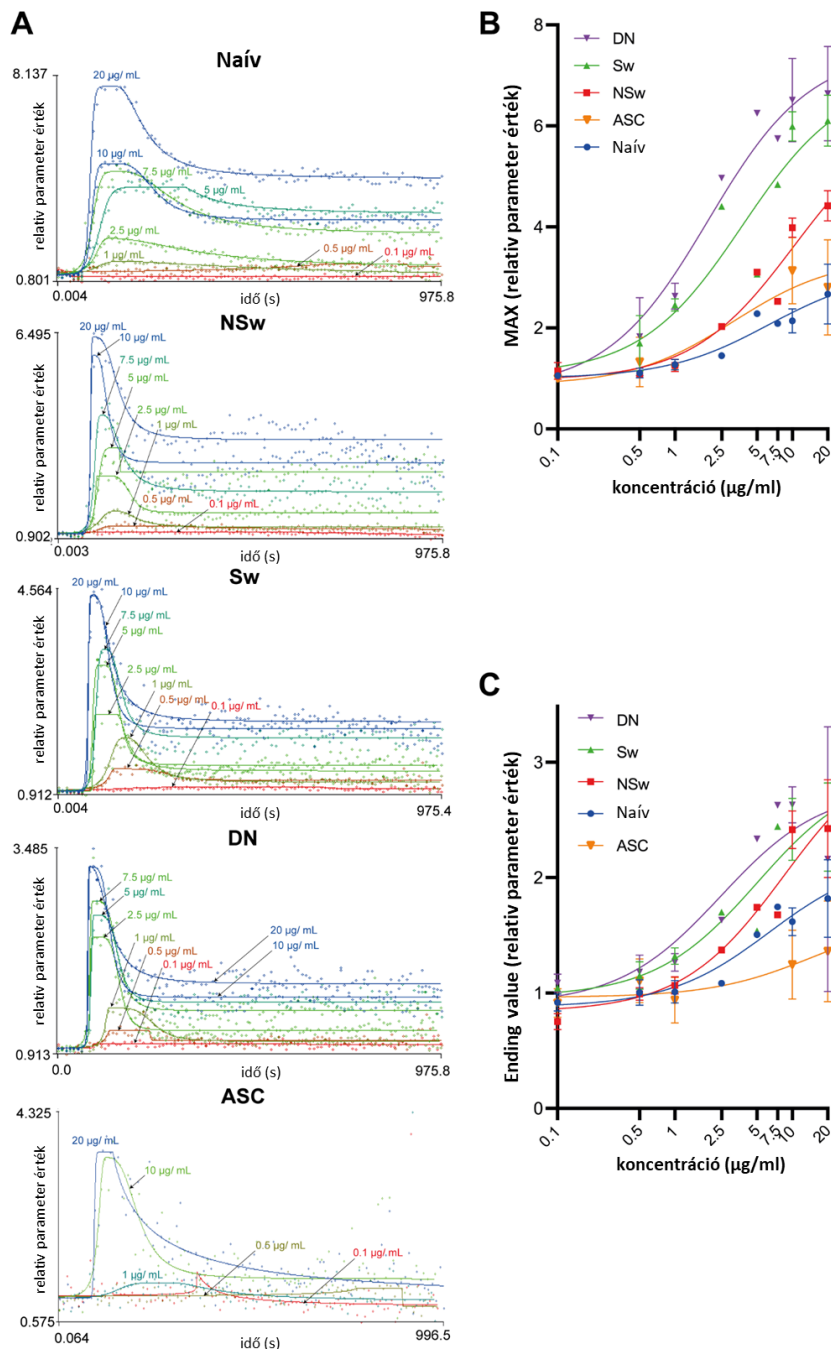
4. EREDMÉNYEK

4.1. Az aktiválószer titrálása, a megfelelő koncentráció kiválasztása

Minden aktiválószer 3 mintán, 3 különböző napon titráltunk. A vizsgált szerek optimális koncentrációit az alábbiak szerint választottuk ki. Először statisztikailag összehasonlítottuk az összes aktiválószer minden koncentrációját ugyanazon alpopuláció nem aktivált (NA) görbéjével, hogy meghatározzuk, mely koncentrációk váltanak ki kalcium fluxot. Összehasonlítás céljából kiválasztottuk az *AUC*, *Maximum* és *Ending value* paramétereket. Ezt követően minden kinetikai paramétert összehasonlítottunk minden egyes B sejt alcsoporton belül az összes vizsgált aktiválószer, azaz anti-IgG, anti-IgM és anti-IgG+M lemért koncentrációjából, hogy meghatározzuk azt a koncentrációt, amely elegendő és statisztikailag szignifikáns kalcium fluxot generál a nem aktivált mintákhoz képest. A numerikus adatokkal együtt a kinetikai mérések vizuális megjelenését is értékeltük.

A B sejt alcsoportok BCR aktivációjának összehasonlításához az anti-IgG+M aktiválószerből a 0,1-20 µg/ml közötti koncentrációkat vizsgáltuk. A Sw, DN memóriasejtek és ASC-k érzékenyebben reagáltak az anti-IgG+M stimulációra, mint a naív és NSw memória B sejtek. A DN és Sw memória B sejtek már 0,5 µg/ml anti-IgG+M aktiválószerre reagáltak, és minden koncentrációnál magasabb *MAX* értékeket értek el (**6. ábra/A**). A *MAX* paraméter tekintetében a NSw memória B sejtek titrálási görbéje az IgG-t expresszáló memória B sejtek és a naív B sejtek között volt (**6. ábra/A, B**). A naív B sejtek adták a legalacsonyabb válaszreakciót anti-IgG+M stimulációra, *MAX* értékük pedig hasonló volt az ASC sejtekével (**6. ábra/B**). Az *Ending value* paraméter az aktiválás platófázisát jelöli, ami a SOCE mechanizmus következménye. Ebben dóziszfüggőséget is észleltünk. A platófázis legkorábban az IgG-t kifejező memória alcsoportokban alakult ki. A DN és Sw memória B sejtek már 0,5 µg/ml anti-IgG+M mellett mutattak plató fázist, míg a NSw és a naív B sejtek

először 2,5 µg/ml és 5 µg/ml körül mutatták (6. ábra/A). Az *Ending value* paraméter csúcsa hasonló volt az összes memória alcsoportban (NSw, Sw és DN). Az ASC sejtek sokkal alacsonyabb platófázist értek el (6. ábra/C).



6. ábra. Az anti-humán IgG+M aktiválószer titrálása B sejt alcsoportokon.

6. ábra. Az anti-humán IgG+M aktiválószer titrálása B sejt alcsoportokon. **(A)** A B sejt alcsoportok reprezentatív kalciumflux kinetikai görbéi az anti-humán IgG+M növekvő koncentrációira adott válaszként. Mindegyik görbét a kiválasztott B sejt alpopuláció fluoreszcens jelének mediánjához illesztettük. X tengely: idő, Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, alapvonal 1-re standardizált). Az első 60 másodpercben stimulálatlan kontrollokat vettünk fel, az aktivált mintákat 15 percig (900 másodpercig) rögzítettük. **(B)** A különböző aktivált B sejt alcsoportokban elért maximális értékek összehasonlítása az anti-humán IgG+M növekvő koncentrációjára. X tengely: az anti-humán IgG+M koncentrációk, Y tengely: a Fluo-4 MFI standardizált maximális értéke. **(C)** Az aktiválás platófázisában észlelt végértékek (*Ending value*) összehasonlítása különböző B sejt alcsoportokban, anti-humán IgG+M koncentrációjának növelésével végzett stimulációt követően. X tengely: anti-humán IgG+M koncentrációk, Y tengely: standardizált *Ending value* Fluo-4 MFI. Az analízishez (B, C) nem-lineáris regressziót (görbeillesztést) végeztünk dózis-hatás görbe modell felhasználásával. Naív: IgD+CD27- B sejt; NSw: IgD+CD27+ B sejt; Sw: IgD-CD27+ B sejt, DN: IgD-CD27- memória B sejt; ASC: CD19+CD27hiCD38hi sejt (Bajnok et al. 2023).

Összeségében az IgG-típusú BCR-t expresszáló B sejt alcsoportok érzékenyebben reagáltak a stimulációkra, mint az IgM-et expresszáló sejtek. Az eredmények alapján az egyes aktiválószeres optimális koncentrációi a következők voltak: 10 µg/ml anti-IgG-ből, anti-IgM-ből és anti-IgG+M-ből. Az optimális koncentrációk kiválasztása után, a B sejt alcsoportok közötti különbségek kimutatásához szükséges ismétlések számát *power* analízissel határoztuk meg *AUC*, *Maximum value* és *Time to 50% value* paraméterek segítségével. A *power* analízis alapján az ismétlések számát 15-ben határoztuk meg.

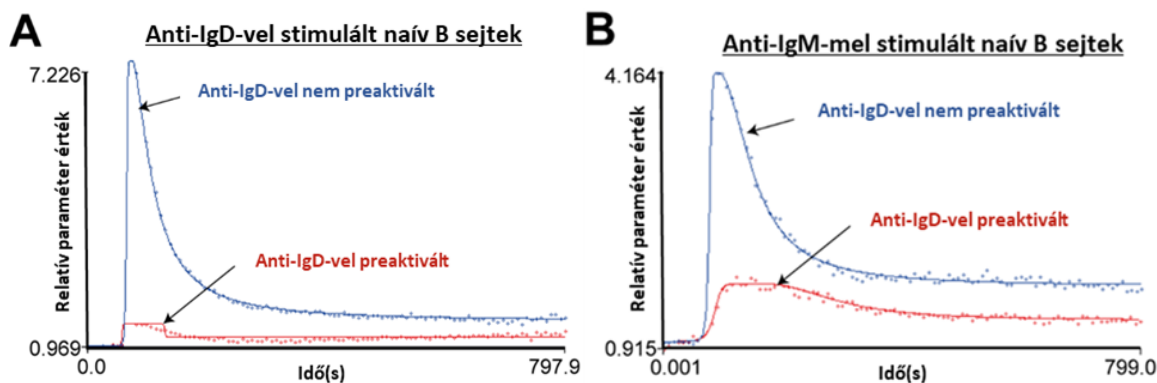
4.2. Az anti-IgD jelölés preaktiváló hatása

A B sejt alcsoportok megkülönböztetéséhez nélkülözhetetlen a sejt felszíni IgD expresszió jelölése. Csak így lehet megkülönböztetni a NSw sejteket a Sw memóriasejtektől, és a naív sejteket a DN memóriasejtektől. Kíváncsiak voltunk, hogy maga a jelölési folyamat hogyan befolyásolja a B sejt alcsoportok reakciókészségét további BCR stimulációt követően. Ezért a festési eljárás során kihagytuk az IgD jelölést, így csak CD27 expressziójuk alapján tudtuk megkülönböztetni a naív és a memóriasejteket. A CD27- populáció tartalmazta a naív és DN memóriasejteket, azonban a naív sejtek prevalenciája 12-szer magasabb volt a DN sejtekhez képest, így feltételeztük, hogy a csoport medián jelére illesztett kinetikai görbék elsősorban a naív populáció válaszát reprezentálták.

A memóriacsoport NSw és Sw memóriasejteket egyaránt tartalmazott, amelyek közül csak a NSw memóriasejtek reagáltak anti-IgD és anti-IgM-re. Mivel a kinetikai görbék egy

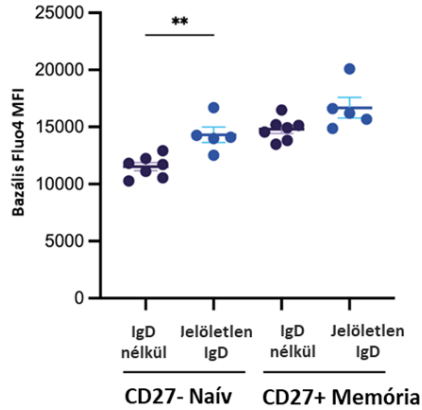
populáció medián fluoreszcens jelének változásához illeszkednek, a NSw sejtek anti-IgD- re és anti-IgM-re adott válasza által generált MFI érték változása elegendő volt az anti- IgD preaktiváló hatásának értékeléséhez.

Az anti-IgD stimuláció során az IgD jelölés miatti preaktiváció szinte teljesen megszüntette a CD27– naív B sejtek anti-IgD-re adott reakcióját (7. ábra/A), és jelentősen csökkentette az anti-IgM stimulációra adott válaszát (7. ábra/B).



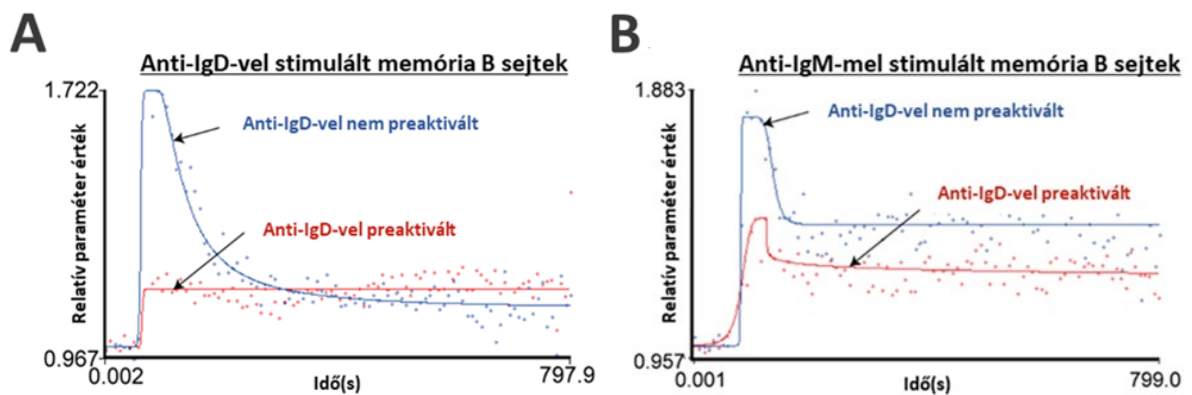
7. ábra. Az anti-IgD jelölés preaktiváló hatása. Reprezentatív kalcium flux kinetika görbék, amelyek bemutatják az anti-IgD jelölés preaktiváló hatását a naív B sejtek anti-IgD (A), anti-IgM (B) stimulációja során. X tengely: idő, Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, alapvonal 1-re standardizált). Az első 60 másodpercben stimulálatlan kontrollokat vettünk alapvonalként, az aktivált mintákat 12 percig (720 másodpercig) rögzítettük (Bajnok et al. 2023).

Továbbá, az anti-IgD preaktiváció jelentősen megváltoztatta az anti-IgM hozzáadásával generált kinetikai görbe alakját, meghosszabbította a reakcióidőt, csökkentette a *MAX* értéket és a plató magasságát (*Ending value*). Érdekes módon a preaktiváció utáni további anti-IgD stimuláció nem hosszabbította meg a reakcióidőt. A jelöletlen anti-IgD szignifikánsan emelte a CD27– naív B sejtek bazális Ca^{2+} szintjét, viszont a CD27+ memóriasejteket nem. A preaktiváció miatti növekedés ellenére a naív sejtek bazális Ca^{2+} szintje alacsonyabb maradt a memória B sejtekhez képest (8. ábra).



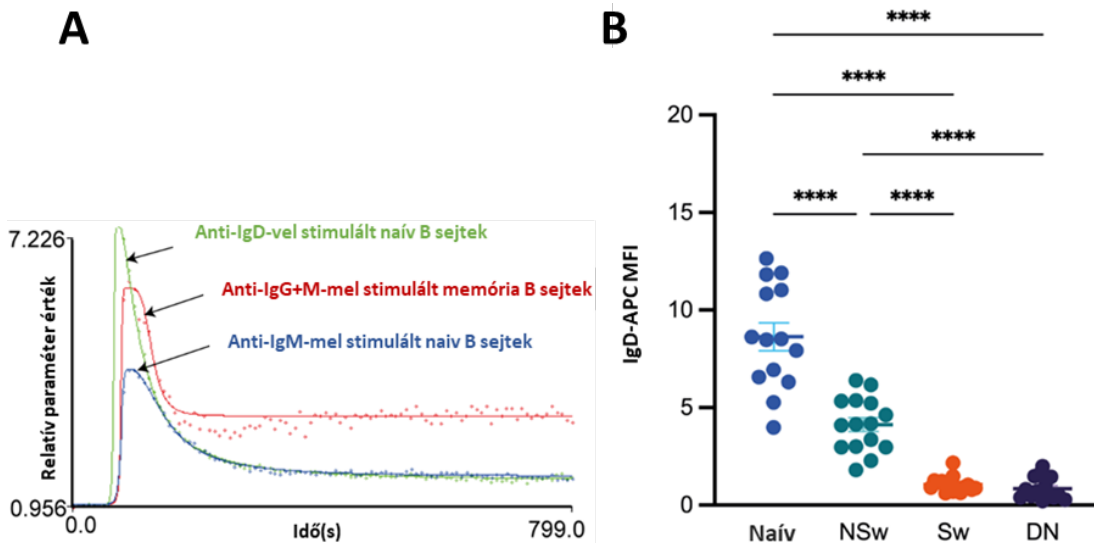
8. ábra. Az anti-IgD jelölés hatása a bazális kalciumszintre (ami a Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitása (MFI) az alapvonal felvétele során). Minden pont egy külön mérést jelent, mindegyik egy egészséges egyéntől származik, a középső vonal az MFI-értékek átlagát jelenti, a whiskerek SE-re vannak állítva. IgD jelölés nélküli n=7, jelöletlen IgD-vel jelölt n = 5. A csoportok statisztikai összehasonlítását kétirányú ANOVA Tukey-féle posthoc teszttel végeztük. ** p < 0.01 (Bajnok et al. 2023).

A CD27+ memória B sejtek – amelyek mind a NSw, mind a Sw memória alosportokat értéket eredményezett, de a platófázis (*Ending value*) nem változott további anti-IgD stimulációt követően sem (**9. ábra/A**). A preaktiváció a memóriasejtek anti-IgM-re adott Ca²⁺ flux válaszában mértékét is csökkentette, de a kinetikai görbe mintázata hasonló maradt a nem preaktivált görbéhez (**9. ábra/B**).



9. ábra. Az anti-IgD jelölés preaktiváló hatása. Reprezentatív kalcium flux kinetika görbék, amelyek bemutatják az anti-IgD jelölés preaktiváló hatását a memória B sejtek anti-IgD (**A**), anti-IgM (**B**) stimulációra. X tengely: idő, Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, alapvonal 1-re standardizált). Az első 60 másodpercben stimulálatlan kontrollokat vettünk az alapvonalként, az aktivált mintákat 12 percig (720 másodpercig) rögzítettük (Bajnok et al. 2023).

A korábbi vélekedésekkel ellentétben azt találtuk, hogy az anti-IgD előkezelés elhagyásával a CD27⁻ naív B sejtek anti-IgG+M stimulációt követően magasabb IC Ca²⁺ csúcsot értek el anti-IgD aktivációt követően, mint a CD27⁺ memória B sejtek. A CD27⁻ naív B sejtek IgD válaszkészsége is kétszerese az anti-IgM válaszreakciójukhoz képest, ez utóbbi alacsonyabb marad a memória alcsoportokhoz viszonyítva (**10. ábra/A**). Ez nem meglepő, figyelembe véve a B sejt alcsoportok sejtfelszíni IgD expressziójára vonatkozó megállapításainkat, a naív B sejtek expresszálják a legtöbb sejtfelszíni IgD-t, a NSw memóriasejtek szignifikánsan kevesebbet, míg a Sw és DN memória B sejtek nem expresszálnak IgD-t (**10. ábra/B**).

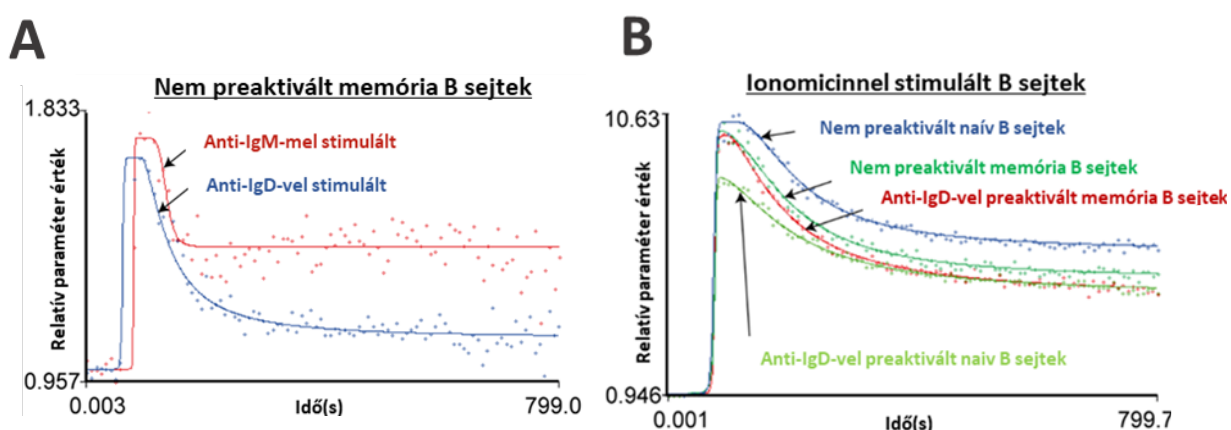


10. ábra. (A) Reprezentatív kalcium flux kinetika görbék, amelyek bemutatják a nem preaktivált naív (CD27⁻) B sejtek anti-IgD-re és anti-IgM-re, valamint a nem preaktivált memória (CD27⁺) B sejtek anti-IgG+M-re adott válaszát. (B) Az IgD expressziója B sejt alcsoportokban. Kiszámítása: APC MFI-jét az egyes alcsoportok fluoreszcens mínusz egy (FMO) kontrolljához (Minta-MFI/FMO-MFI) normalizáltuk. Az adatok átlag ± SE formában vannak megadva, és minden pont az egy egyéntől származó összes mérés mediánértékét jelenti, n = 16. X: B sejt alcsoportok, Y: relatív paraméter érték (IgD-APC MFI). A csoportok statisztikai összehasonlítását kétirányú ANOVA Tukey-féle posthoc teszttel végeztük. Naiv: IgD+CD27⁻ B sejt; NSw: IgD+CD27⁺ B sejt; Sw: IgD-CD27⁺ B sejt, DN: IgD-CD27⁻ memória B sejt; ASC: CD19+CD27^{hi}CD38^{hi} sejt. ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 (Bajnok et al. 2023).

A naív B sejtek eltérő Ca²⁺ flux mintázatot mutatnak a memória alcsoportokhoz képest; magas csúcsot (*MAX*) követően alacsonyabb platóértéket értek el, ami fokozatos, lassú csökkenést mutatott a mérési időszak végéig. Ha összehasonlítottuk a nem preaktivált CD27⁺ memóriasejtek Ca²⁺ kinetikáját anti-IgD és anti-IgM stimulációval, az anti-IgM stimulációt követő Ca²⁺ kinetika görbe memória típusú választ mutatott magas platófázis mellett, míg az anti-IgD stimulációt követő Ca²⁺ flux görbe a naív B sejtek mintázatához

hasonlított, folyamatosan csökkenő, alacsonyabb platófázissal (**11. ábra/A**). Ez a megfigyelés az IgD és IgM típusú BCR különböző hatásmechanizmusára utalhat.

Az ionomicinnel végzett stimuláció a sejtek teljes Ca^{2+} mobilizáló képességét tükrözi. Az anti-IgD-vel végzett preaktiváció csökkentette az ionomicin stimuláció által generált kinetikai görbe *AUC* értékét naív B sejtekben, de a memória B sejtekben nem (**11. ábra/B**). Azonban mind a naív, mind a memória al csoportok erőteljes Ca^{2+} fluxszal reagáltak az ionomicin stimulációra anti-IgD preaktivációt követően, ami azt jelzi, hogy a naív B sejtek megváltozott IgM érzékenysége nem a Ca^{2+} raktárak kimerülésének tudható be.

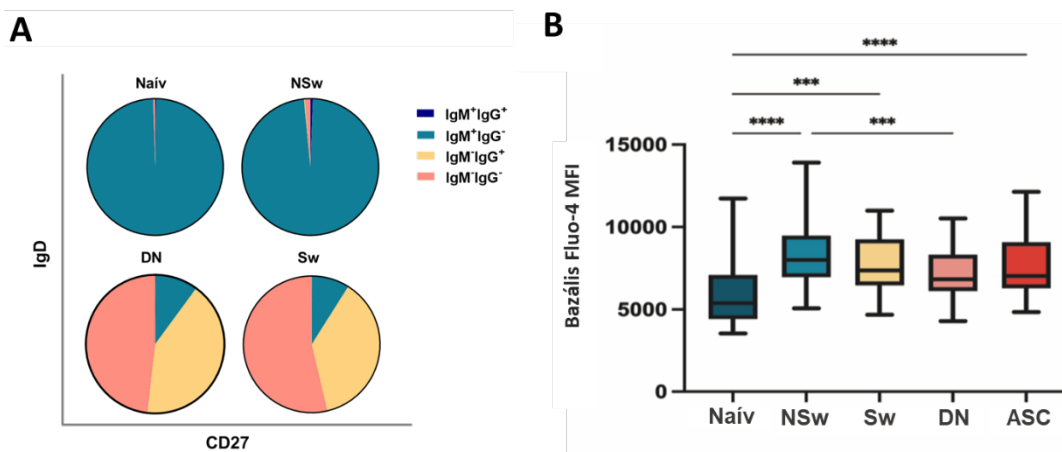


11. ábra. (A) Reprezentatív görbék a CD27⁺ memória B sejtek (nem preaktivált) kalcium flux kinetika mintázatának összehasonlítására anti-IgD és anti-IgM stimulációval. (B) Naív (CD27⁻) és memória (CD27⁺) B sejtek ionomicin stimulációra adott válaszkészségének összehasonlítása anti-IgD preaktivációval és anélkül. X tengely: idő, Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, alapvonal 1-re standardizált). Az első 60 másodpercben a stimulálatlan kontrollokat vettünk alapvonalként, az aktivált mintákat 12 percig (720 másodpercig) rögzítettük (Bajnok et al. 2023).

4.3. A Ca^{2+} flux kinetikai görbék mintázata megfelelt a B sejt alcsoportok differenciálódási stádiumának

A B és T limfociták átlagos prevalenciája illetve a B limfocita alpopulációk eloszlása is a megfelelt az egészséges populációban publikált adatoknak. A naív B sejtek bazális Ca^{2+} szintje alacsonyabb volt az összes többi B sejt alcsoportéhoz képest (NSw, Sw, ASC,) (**12. ábra/B**). A naív B sejtek több mint 98%-a csak IgM-et expresszált (98,94% ± 0,33%) (**12. ábra/A**). A memória alcsoportokon belül a NSw B sejtek rendelkeztek a legmagasabb bazális Ca^{2+} szinttel (**12. ábra/B**), a NSw memóriasejtek több mint 97%-a csak IgM-et

(97,5% ± 0,64%) és a sejtek körülbelül 1%-a expresszált IgG-t az IgM mellett (1,05% ± 0,54%) (12. ábra/A).

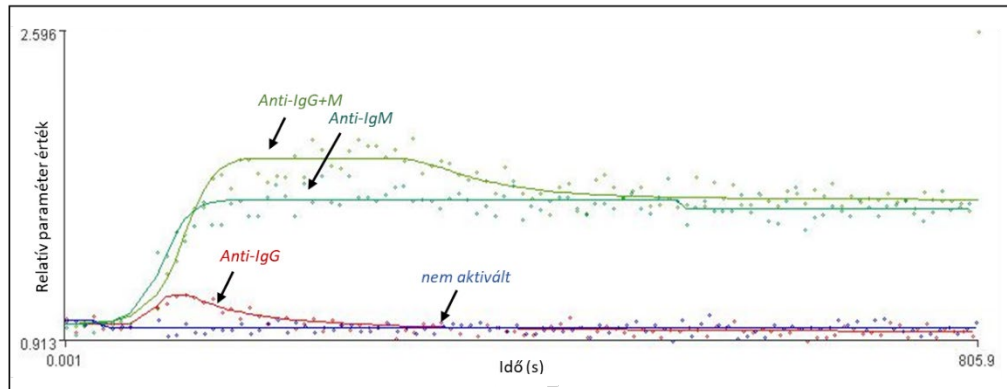


12. ábra. (A) B sejt alcsoportok sejtfelszíni immunglobulin expressziójának prevalenciája (%). X tengely: CD27 expresszió, Y tengely: IgD expresszió. (B) A B limfocita alcsoportok bazális Fluo-4 Medián Fluoreszcens Intenzitása boxplot diagrammban ábrázolva. A középső vonal a mediánt, a whiskerek az 5-től 95-ig percentilist ábrázolják. Az csoportok közötti statisztikai összehasonlítást Friedman teszttel végeztük, a kettőnél több adathalmaz összehasonlításánál Benjamini-Hochberg FDR korrekciót alkalmaztunk. n= 15, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Naív: IgD+CD27- B sejtek; NSw: IgD+CD27+ B sejtek; Sw: IgD-CD27+ B sejtek, DN: IgD-CD27- memória B sejtek; ASC: CD19+CD27hiCD38hi sejtek (Bajnok et al. 2023).

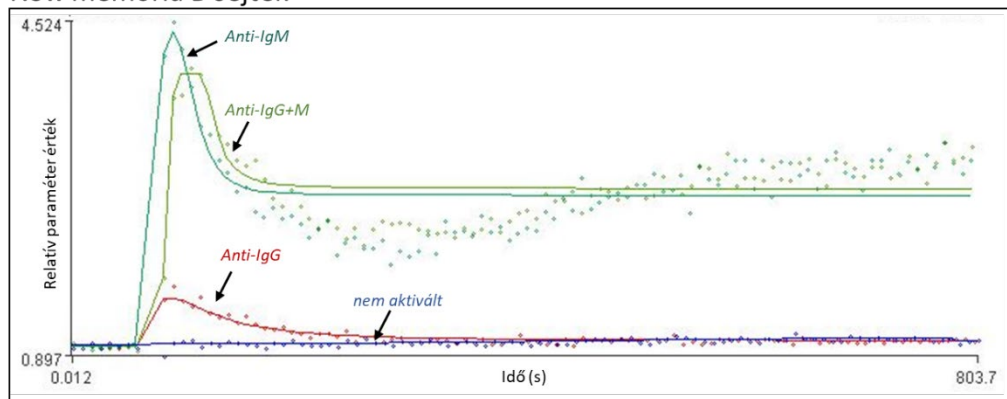
A naív B sejtek nem reagáltak anti-IgG-re, azonban az anti-IgM, anti-IgG+M stimulációra szignifikánsan magasabb *AUC*, *Maximum* és *Ending value* paramétereket értek el a nem aktivált (NA) sejtekhez képest. Az anti-IgM-mel aktivált sejteknek hosszabb időre volt szükségük ahhoz, hogy elérjék a *first 50% to the maximum* és a *Maximum* értéket, mint az anti-IgG+M-mel aktivált sejteknél (13. ábra, 15. ábra).

A NSw B sejtek gyorsan és intenzíven reagáltak anti-IgM-re, ami hasonlít az IgG-t expresszáló memória-alcsoportok (Sw és DN) BCR indukálta Ca²⁺ áramára. Az anti-IgG enyhén megemelte a NSw B sejtek *AUC* és *MAX* paramétereit a NA mintákhoz képest. Mivel azonban a sejtek csak körülbelül 1%-a expresszál IgG-t, ez részben az anti-IgG antitestnek az IgM-típusú BCR-rel szembeni keresztreakciója lehet (13. ábra, 15. ábra).

Naív B sejtek



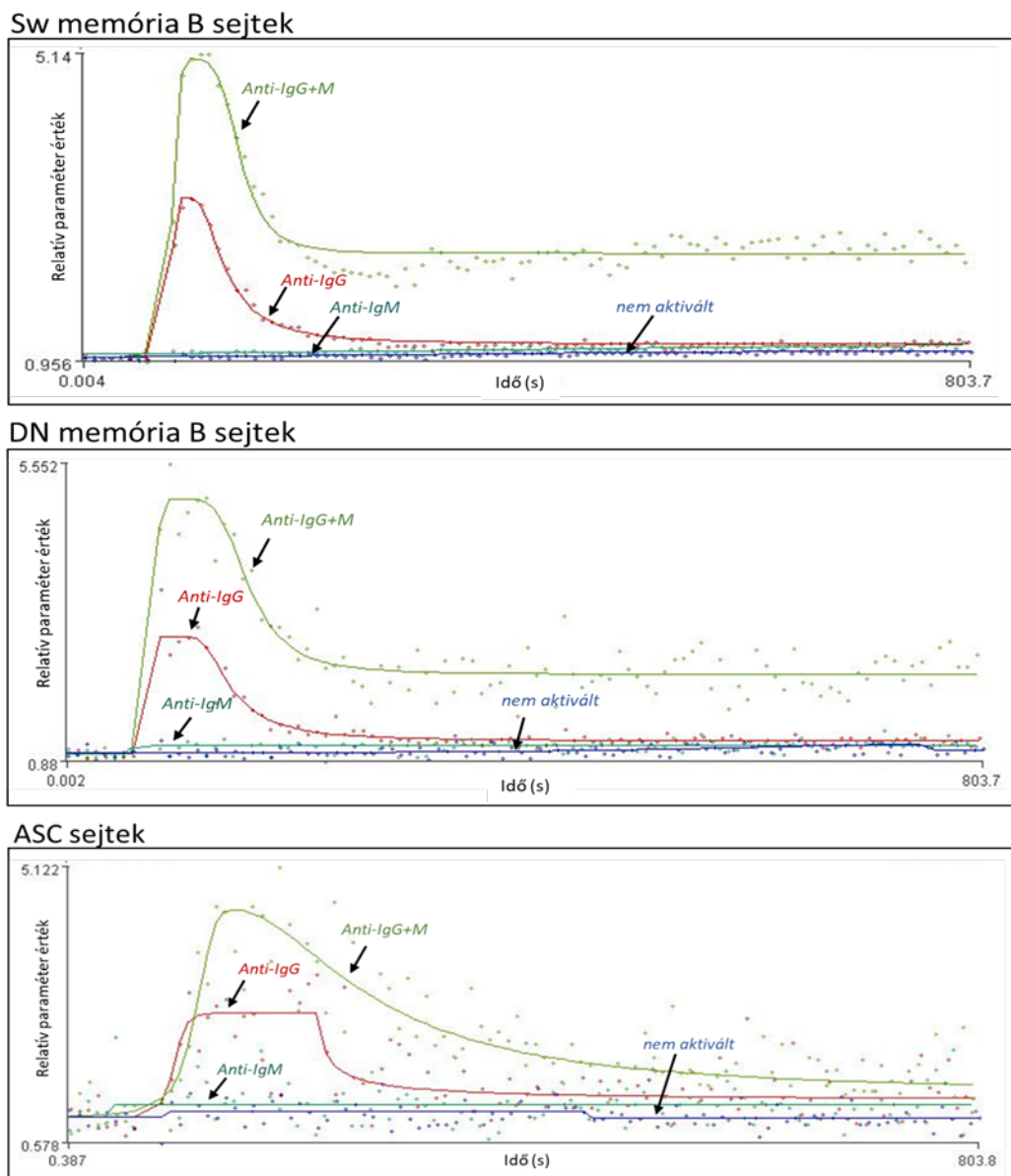
NSw memória B sejtek



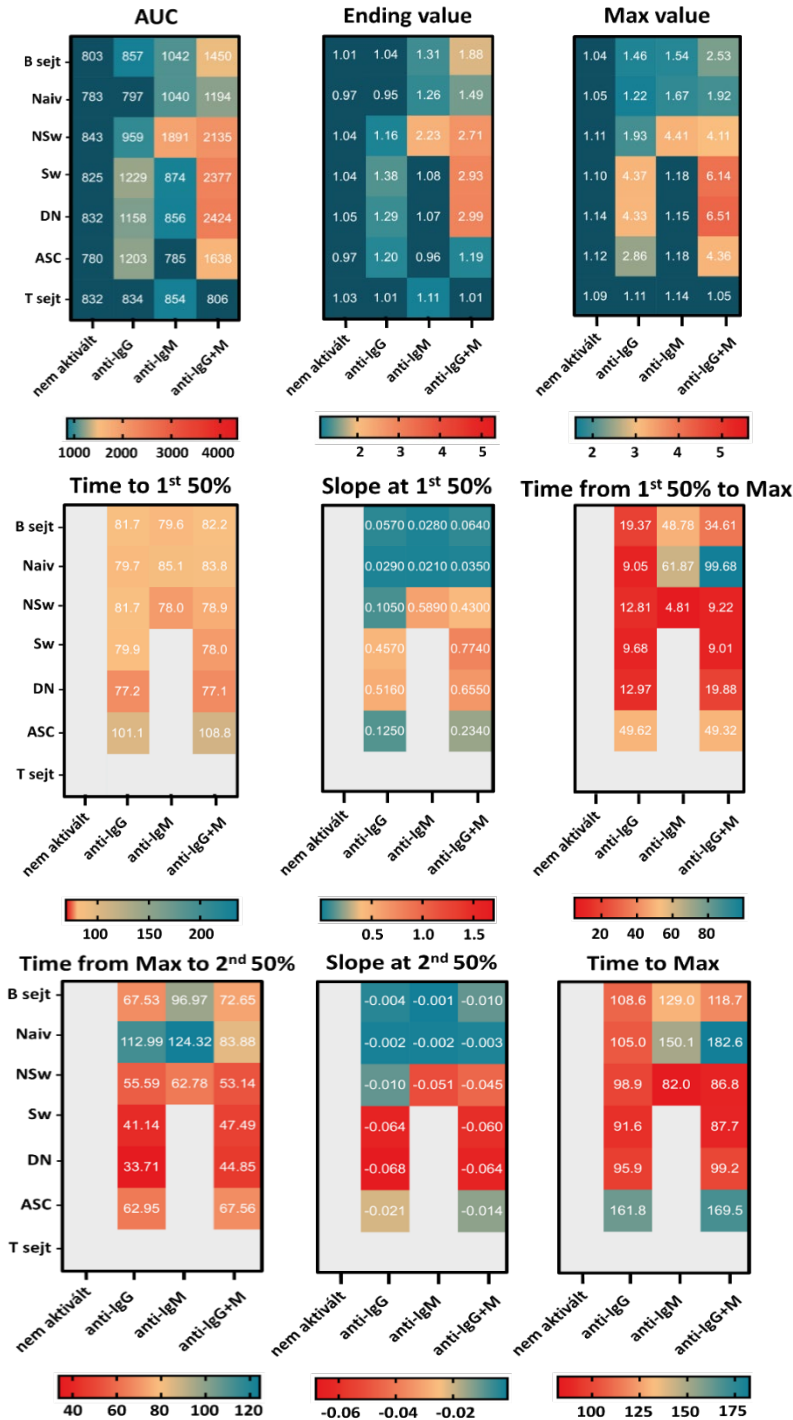
13. ábra. Naív és NSw memória B sejtek Ca^{2+} flux kinetika görbéje. Az IgG-n keresztül stimulációra anti-humán F(ab')_2 specifikus anti-IgG, IgM-en keresztül F(ab')_2 anti-humán $\text{Fc}\mu$ specifikus anti-IgM-mel, IgG+M-en keresztül anti-humán F(ab')_2 IgG+IgM (H+L) aktiválószerrel használtunk. X tengely: idő (s), Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, alapvonal 1-re standardizált). Az ábra 1-1 reprezentatív alany mintájának értékeit mutatják. Naív: $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$ B sejt; NSw: $\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B sejt (Bajnok et al. 2023).

Meglepő módon a Sw memóriasejtek csak körülbelül 1/3-a expresszált IgG-t ($35,2\% \pm 2,48\%$), és körülbelül 9%-a expresszált IgM-et ($10,75\% \pm 2,83\%$), míg a sejtek több mint 50%-a IgM-IgG- volt ($53,9\% \pm 1,45\%$), valószínűleg ezek az IgA-t expresszáló memóriasejtek lehetnek. A DN memóriasejtek Ig expressziós profilja hasonló volt a Sw memóriasejtekéhez ($42,48\% \pm 3,39\%$ IgG+IgM-, $10,08\% \pm 1,95\%$ IgG-IgM+, $47,28\% \pm 3,87\%$ IgG-IgM-) (**12. ábra/A**). Mind a Sw, mind a DN memóriasejteknek hasonló Ca^{2+} kinetikájuk volt anti-IgG és anti-IgG+M stimuláció során. Bár a Sw és DN memóriasejtek csak kb. 10%-a expresszál IgM-et, ezek az al csoportok nem reagáltak az anti-IgM-re (**14. ábra, 15. ábra**).

Keveset tudunk az ASC sejtek Ca^{2+} jelátviteléről. Kísérleteinkben ASC sejtek anti-IgG, anti-IgG+M stimulációt követően aktiválódtak, viszont anti-IgM-re nem reagáltak. Az anti-IgG-vel és anti-IgG+M-mel stimulált sejtek magasabb *AUC* és *MAX* Fluo-4 MFI-vel rendelkeztek az NA sejtekhez képest (14. ábra, 15. ábra).

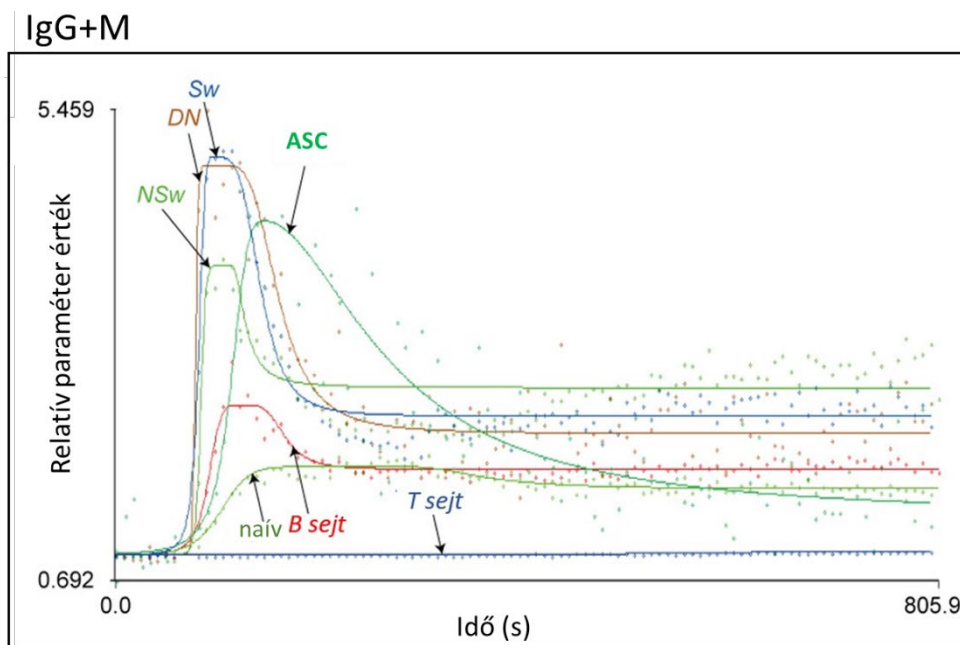


14. ábra. Sw, DN és ASC B sejtek Ca^{2+} flux kinetika görbéje. Az IgG-n keresztül stimulációra anti-humán $F(ab')_2$ specifikus anti-IgG, IgM-en keresztül $F(ab')_2$ anti-humán $Fc\gamma_2$ specifikus anti-IgM-mel, IgG+M-en keresztül anti-humán $F(ab')_2$ IgG+IgM (H+ L) aktiválószerrel használtunk. X tengely: idő (s), Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, alapvonal 1-re standardizált). Az ábra 1-1 reprezentatív alany mintájának értékeit mutatják. Sw: IgD-CD27+ B sejt, DN: IgD-CD27- memória B sejt; ASC: CD19+CD27hiCD38hi sejt (Bajnok et al. 2023).



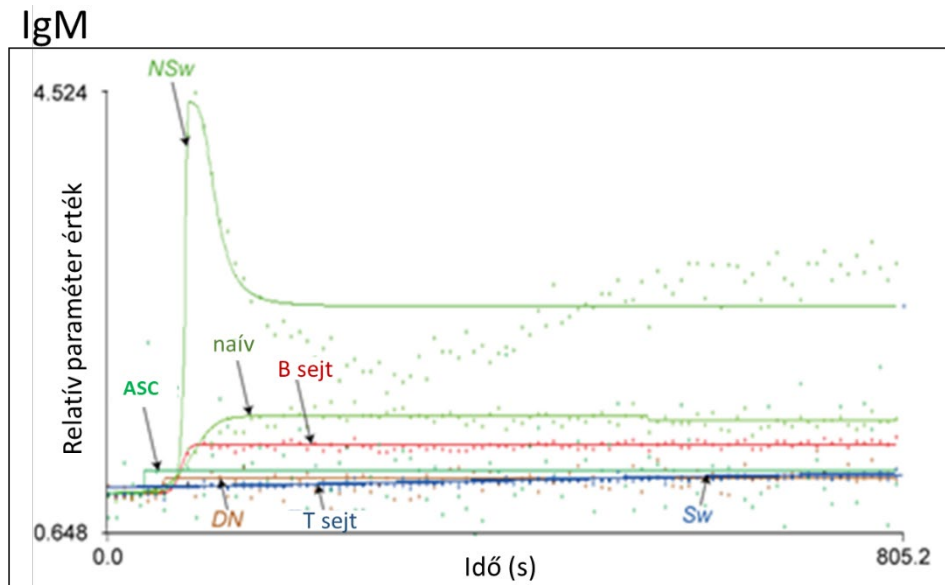
15. ábra. Az összes kinetikai paraméter hőterképe (heat map). A B sejtekben, T sejtekben és a B sejt-alcsoportokban a nem aktivált, valamint anti-IgG, anti-IgM és anti-IgG+M aktiválószerrel stimulált minták kinetikai görbe paramétereinek medián értéke látható. $n=15$. Az idő paramétereit másodpercben, a meredekség paramétereit MFI (medián fluoreszcens intenzitás) változás/másodpercben van megadva. A kiszámíthatatlan vagy biológiailag irreleváns paramétereket (például a T sejtek nem reagálnak az anti-IgG+M-re) szürkén hagytuk. Naív: IgD+CD27- B sejt; NSw: IgD+CD27+ B sejt; Sw: IgD-CD27+ B sejt, DN: IgD-CD27-memória B sejt; ASC: CD19+CD27hiCD38hi sejt (Bajnok et al. 2023).

Az anti-IgG+M stimuláció hatására az összes memória B sejt alcsoport magasabb *AUC*, *MAX* és *Ending* paramétereket ért el a naív B sejtek képest. A NSw memória B sejtek *MAX* értékének Ca^{2+} szintje alacsonyabb volt a Sw és DN memória B sejtekhez képest (**15. ábra**, **16. ábra**). Az ASC sejtekről ismert, hogy leszabályozzák sejtfelszíni Ig-expressziójukat (Sanz et al. 2019). Ezért érdekes, hogy képesek voltak stimulálni a perifériás ASC sejteket IgG-receptorukon keresztül. Azonban ezek eltérő Ca^{2+} flux mintázatot mutattak a memória alcsoportokhoz képest. IgG expressziójuk ellenére a *MAX* értékük alacsonyabb maradt a Sw és DN memória B sejtekhez képest. A csúcsot követően az IC Ca^{2+} szint fokozatosan csökkent, és a mérés végére szinte teljesen visszatért az alapvonalhoz egyértelmű platófázis nélkül (**16. ábra**). Mivel a Ca^{2+} flux platófázisa nélkülözhetetlen a c- Myc expressziójához (Berry et al. 2020), amely a B sejtek ASC sejtekké differenciálódása során represszálódik (Lin et al. 2000), eredményeink összhangban vannak a B sejt differenciálódás során bekövetkező fiziológiai változásokkal.



16. ábra. Limfociták és B limfocita alcsoportok Ca^{2+} flux kinetika görbéje IgG+M-en keresztüli anti-humán F(ab')₂ IgG+IgM (H+L) aktiválószerrel való stimulációt követően. X tengely: idő (s), Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, tetszőleges mértékegység, 1-re szabványosított alapvonal). Naív: IgD+CD27- B sejt; NSw: IgD+CD27+ B sejt; Sw: IgD-CD27+ B sejt; DN: IgD-CD27- memória B sejt; ASC: CD19+CD27hiCD38hi sejt. Az ábra egy reprezentatív alany mintájának értékeit mutatják (Bajnok és mtsai., 2023).

Az alcsoportok IgM stimulációjának összehasonlításakor azt találtuk, hogy a NSw memória B sejtekből erősebb reakciót váltott ki a naív B sejtekhez képest. A NSw memóriasejtek szignifikánsan magasabb *AUC*, *MAX*, *Slope at 1st 50%* és *Ending value* paramétereik voltak, és gyorsabban érték el a *Slope at 1st 50% value* paraméter értékét, mint a naív B sejtek (17. ábra).



17. ábra. Limfociták és B limfocita alcsoportok Ca^{2+} flux kinetika görbéje IgM-en F(ab')_2 anti-humán $\text{Fc}\mu$ -specifikus anti-IgM aktiválószerrel való stimulációt követően. X tengely: idő (s), Y tengely: standardizált Fluo-4 medián fluoreszcens intenzitás (MFI, tetszőleges mértékegység, 1-re szabványosított alapvonal). Naív: $\text{IgD}^+\text{CD}27^-$ B sejt; NSw: $\text{IgD}^+\text{CD}27^+$ B sejt; Sw: $\text{IgD}^-\text{CD}27^+$ B sejt, DN: $\text{IgD}^-\text{CD}27^-$ memória B sejt; ASC: $\text{CD}19^+\text{CD}27^{\text{hi}}\text{CD}38^{\text{hi}}$ sejt. Az ábra egy reprezentatív alany mintájának értékeit mutatják (Bajnok és mtsai., 2023).

5. DISZKUSSZIÓ

Munkánk során optimalizáltunk egy Fluo-4 fluoreszcens kalciumindikátor alapú áramlási citometriás módszert valós idejű kalcium flux monitorozására. Ez a kísérleti megközelítés lehetővé teszi a kiválasztott B sejt alcsoportok Ca^{2+} flux jellemzőinek mérését a klasszikus Ca^{2+} kinetikai mérések sejtfelszíni jelöléssel való kombinálásával, amely specifikus immunológiai kérdésekre szabható. A sejtfelszíni jelölés hozzáadása lehetővé teszi az alcsoportok kapuzásával történő jobb elkülönítést. Ez esetben a részletes paneltervezés és a műszaki beállításból származó Fluo-4 jelváltozások figyelembevétele kulcsfontosságú. Ebben a kísérletben egy széles körben elfogadott kapuzási módszert alkalmaztunk a naív és különböző memória B sejtek azonosítására, a Fluo-4-AM-mel, mint Ca^{2+} indikátorral kombinálva.

A kísérleti tervezési szakaszban figyelembe kell venni a kutatási kérdést, az erőforrások rendelkezésre állását és a műszaki lehetőségeket. A kéznél lévő citométer nagymértékben meghatározza a Ca^{2+} indikátor kiválasztását és a mérés utáni elemzés platformját. A ratiometrikus festékek, mint például a Fura-2 vagy az Indo-1 optimális választásnak bizonyulhat, azonban csak UV-lézerrel felszerelt citométereken használhatók, ami nem széles körben elérhető. Az egyhullámhosszúságú festékek, például a Fluo-4 AM, jó alternatívát jelenthetnek az UV-lézer nélküli citométerekhez. Azonban ezeket nem kvantitatív mérésekre fejlesztették ki, ezért csak relatív összehasonlítás végezhető az ilyen adatokon. Következő lépés a Ca^{2+} festékek fluoreszcens jeleinek normalizálása, ami lehetővé teszi a különböző kísérleti napokon végzett kísérletek összehasonlítását. A Ratiometrikus festékeknel elegendő a Ca^{2+} kötött és mentes állapotok fluoreszcens jeleinek elosztása. Másrészt a fluoreszcens jelet el kell osztani az átlagos nyugalmi fluoreszcenciával az egyhullámú festékeknel, ami szükségessé teszi a bazális Ca^{2+} jelének rögzítését (Paredes et al. 2008). Ez felveti a következő kérdést a citométer felépítésével és a mintacsőhöz való hozzáféréssel kapcsolatban. Mivel sok citométer nem rendelkezik ezzel a lehetőséggel, a csövet a baseline lemérését követően el kell távolítani az aktiválószer hozzáadásához. Függetlenül attól, hogy a mintacső eltávolításra kerül-e, a kinetikai paraméterek pontos generálásához pontosan fel kell jegyezni az aktiválószer hozzáadásának időpontját. Ez a

funkció nem érhető el a gyakran használt adatgyűjtő szoftverekben. Ha a mérési adatokat a mintacső eltávolítása után csatolják, az időparaméter automatikusan rögzítésre kerül, és az elemzés során utólag nem módosítható, ami a kinetikai adatok torzulásához vezet. Más kinetikai elemző platformokhoz képest a FacsKin úgy oldja meg ezt a problémát, hogy lehetőséget kínál az aktiválástól a mérésig eltelt idő pontos bevitelére. A FacsKin beépített normalizációs funkcióval is rendelkezik, amely a mért alapvonal hosszához igazítható, megkönnyítve az adatok elemzését és a különböző alcsoportok, mérési napok és aktiválószeres összehasonlítását. A kinetikus elemzési platformok által általánosan használt simítási módszeren kívül a FacsKin egy algoritmust használ a függvényeknek a Ca^{2+} jel kinetikai változásaihoz való illesztésére, lehetővé téve a Ca^{2+} jel pontos matematikai leírását. A Ca^{2+} jelek specifikus celluláris válaszként való értelmezése magában foglalja a válasz koncentrációjában, amplitúdójában, meredekségében és időtartamában bekövetkezett változások dekódolását (Scharenberg et al. 2007).

A kutatás során meg kell határozni a vizsgálni kívánt aktiválószer típusát. A kísérlet során megnéztük a gyakran használt B sejt aktiválószeres (anti-IgG+IgM, anti-IgG, anti-IgM,) hogyan befolyásolják a keringő B limfocita alcsoportok kalcium flux mintázatát. Kísérletünkben a naív B sejtek sokkal kisebb, lassabb és hosszabb Ca^{2+} flux választ adtak anti-IgM és anti-IgG+M aktiválószerre, a többi memória alcsoporthoz képest. A NSw sejtek bazális Ca^{2+} szintje bizonyult a legmagasabbnak a többi B sejt alcsoporthoz képest. Ezek a sejtek erős és gyors Ca^{2+} kinetikával reagáltak anti-IgM-re, viszont anti-IgG-re nem. Annak ellenére, hogy IgM-et használtak BCR-ként, a NSw B sejtek nem reagáltak úgy, mint a naív B sejtek, hanem olyan Ca^{2+} flux kinetikai mintázatot mutattak, mint az IgG-típusú BCR (Sw és DN) memória alcsoportok. A *MAX* érték azonban alacsony volt a NSw sejtekben, ami összhangban áll az IgM és IgG típusú BCR közötti különbségekkel (Engels és mtsai., 2014; Waisman és mtsai., 2007). A Sw és DN memóriasejtek csak anti-IgG (és anti-IgG+M) aktiválószerre reagáltak, annak ellenére, hogy az IgM-et expresszáló sejtek körülbelül 10%-át tartalmazták. Az IgG-re reagáló Sw és DN memóriasejtek bazális Ca^{2+} szintje hasonló volt és Ca^{2+} kinetikájuk is közel azonos volt. Fontos megjegyezni, hogy mind a Sw, mind a DN alcsoportokban a sejtek körülbelül fele nem expresszált IgM-et vagy IgG-t, ami valószínűleg az IgA típusú memóriasejteknek felel meg. Ezt figyelembe kell venni a memória B sejt alcsoportok Ca^{2+} kinetika elkülönítését célzó kísérleti összeállításban.

Az ASC-kről ismert, hogy csökkentik a sejt felszíni Ig-expressziójukat (Sanz et al. 2019), és az érett PC-k (mPC, érett plazma sejt) túlélésük szempontjából inkább a BAFF és az APRIL (proliferációt indukáló ligandum) jeleitől függenek, mint a BCR jelátviteltől (Benson et al. 2008; O'Connor et al. 2004). A legújabb tanulmányok azonban azt mutatták, hogy a keringésben talált ASC-k jelentős különbségeket mutatnak a csontvelő-rezidens mPC-khez képest, például megtartják a proliferációs képességüket (Sanz et al. 2019). Keveset tudunk az ASC-k Ca^{2+} jelátviteléről. Érdekes módon stimulálni tudtuk a perifériás ASC-eket IgG receptorokon keresztül. A bazális Ca^{2+} szintjük hasonló volt a Sw és DN memória B sejtekhez, ami arra is utal, hogy még nem érték el függetlenséget a Ca^{2+} jelátviteltől. Az ASC-k eltérő Ca^{2+} flux mintázatot mutattak a memória alcsoportokhoz képest. IgG expressziójuk ellenére a *MAX* értékük alacsonyabb maradt a Sw és DN memória alcsoportokhoz képest. Lassabban is érték el a *MAX* értéket. Ez a BCR stimulációra adott elhúzódozó válasz és az alacsonyabb csúcs valószínűleg a csökkent sejt felszíni IgG expresszió és a BCR-hez kapcsolódó gátló jelátvitel következménye. A csúcs után az IC Ca^{2+} szint fokozatosan csökkent, és a mérés végére majdnem visszatért az alapvonalhoz, ami további SOCE és NFAT szignalizációs különbségekre utalhat. Ha az összes nagyobb B sejt alcsoportot párhuzamosan vizsgáljuk, a kísérleti összeállításunkban használt F(ab')₂ fragmens anti-humán IgG+IgM (H+L) ideális választás lehet, mivel keresztreaktivitást mutat az összes humán Ig altípussal, megfelelő aktiváló jelet biztosítva minden B sejt alcsoport számára.

A Ca^{2+} kinetikai mérésekkel kombinált sejt felszíni jelölés számos előnnyel járhat a sejt populációk meghatározásához használt sejt szortolással szemben. Például bizonyos perifériás memória B sejt alcsoportok ritkák, és a sejt szortolás nem adna elegendő sejtet a funkcionális vizsgálatokhoz. Ez különösen fontos a klinikai minták esetében, ahol etikátlan lenne nagy mennyiségű vért venni autoimmunitásban vagy rosszindulatú daganatos betegségben szenvedő betegektől. A sejt felszíni festés azt is lehetővé teszi, hogy tanulmányozzuk a különböző folyamatosan expresszálandó markerek Ca^{2+} kinetikáját (például CD38 vagy CD25), ill. több markeren alapuló kapuzást is. A sejt felszíni markerek számának növelésekor automatizált kapuzási stratégiák és klaszterezési algoritmusok is

használhatók, azonban ezek torzíthatják a sejtek ingerekre adott válaszkésztségét is, amit a naív B sejtek esetében is láthattunk.

A B sejt alcsoportok CD27 és IgD expressziójuk alapján történő meghatározása az egyik leggyakoribb kapuzási stratégia. Kísérleteinkben azonban az anti-IgD-vel jelölt naív B sejtek anti-IgG+M aktiválószerre sokkal kisebb, lassabb és hosszabb ideig tartó Ca^{2+} flux választ adtak az összes memória alcsoporthoz képest. Ez a visszafogott válasz az anti-IgD jelölés által generált robusztus Ca^{2+} szignál következménye lehet, amely nemcsak a naív B sejtek reakcióképességét csökkentette a későbbi IgD-n keresztüli stimulációra, hanem az IgM-et is. Úgy tűnt, hogy az anti-IgD előkezelés csekély hatással volt a NSw memóriasejtekre. Meglepő módon, amikor elhagytuk az anti-IgD jelölést, és csak a CD27-et használtuk a naív és a memória B sejtek megkülönböztetésére, azt találtuk, hogy a naív sejtek nagyobb Ca^{2+} flux választ mutattak a BCR stimulációra, mint a memória alcsoportok. Ez ellentmond annak az általános hipotézisnek, hogy a naív B sejtek kevésbé reagálnak az ingerekre. Mind anti-IgD előkezeléssel, mind anélkül, a naív B sejtek eltérő Ca^{2+} flux mintázatot mutattak a memória B sejtekhez képest. Továbbá ez a naív Ca^{2+} flux mintázat megmaradt a NSw memóriasejtek IgD által kiváltott válaszában, míg az IgM által kiváltott válaszuk a memóriamintázat felé tolódott el, ami magasabb platót eredményezett a SOCE során. Ez alátámasztja az IgD és az IgM elkülönült szerepét a B sejtekben, illetve a naív és a memória alcsoportok között megfigyelt különbségek nem csupán a BCR Ig-típusának a következményei. A kísérleti tervezés során gondosan mérlegelni kell a kutatási célt. Ha az elsődleges cél a naív B sejtek Ca^{2+} flux jellemzőinek megértése, az IgD-t ki kell hagyni a sejt felszíni panelből, és helyette más markerek segítségével (CD27, CD24 és CD38) meghatározni az alcsoportokat. Ezek a jelölések nem képesek elkülöníteni a memória alcsoportokat, de a naív és tranzicionális B sejt populáció jól meghatározható.

Az aktiválószer kiválasztása után a funkcionálisan eltérő B sejt alcsoportok eltérő aktiválási küszöbértékeit is figyelembe kell venni, amit az anti-IgG+M titrálásával mutatunk be. Megmértünk egy pontot, amely felett egy tiszta plató fázis jelenik meg, ami a SOCE-nak tulajdonított „mindent vagy semmit” jelenségre utal. E küszöb felett a plató szint dóziszfüggően tovább emelkedett. Alacsonyabb aktiválási küszöböt figyeltünk meg az IgG-t expresszáló memória B sejt alcsoportokban (Sw és DN), mind az IgM-et expresszáló NSw

memóriasejtekhez, mind a naív sejtekhez képest. Ez a BCR típusban kódolt inherens különbség a Grb2 működéséhez kapcsolódik (Waisman et al. 2007). Míg a Grb2 szerepet játszik a membránhoz kötött IgM-típusú BCR-ben a gátló szignalizáció összeállításában, addig a membránhoz kötött IgG típusú BCR-ban aktiváló és jelerősítő hatással bír a Ca^{2+} jelátviteli út stabilizálásán keresztül (Baba & Kurosaki 2016; Engels et al. 2014). Ez a mechanizmus feltehetően növeli az IgG-típusú BCR antigénérzékenységét az aktivációs küszöb csökkentésével (Engels et al. 2014), és ezt megerősítettük humán perifériás B sejt alcsoportokban is.

Összefoglalva, sikerült megvizsgálnunk a különböző aktiválószerrel eltérő Ca^{2+} kinetikáját, és a Ca^{2+} flux görbék jellemzőit, amik szorosan összefüggenek az egyes B sejt alcsoportok funkcionális jellemzőivel. Kimutattuk, hogy a különböző aktiválószerrel eltérő Ca^{2+} flux válaszokat váltanak ki, és a Ca^{2+} flux görbék jellemzői korrelálnak a B sejt alcsoportok differenciálódási stádiumával. Ezeket az egészséges egyének B sejtjeiből származó eredményeket figyelembe kell venni, amikor olyan kísérleteket tervezünk, amelyek a B sejtek immunpatológias állapotokban történő működését vizsgálják. Azzal, hogy külön is stimuláltuk a B sejteket anti-IgG és anti-IgM aktiválószerrel, egy részletekbe menőbb képet kaptunk a különböző B sejt alcsoportokat érintő, a szignalizációjukat befolyásoló lehetséges tényezőkről. Bár a preaktiváció hatással van a naív B sejtek kalcium flux válaszára, az általunk későbbiekben vizsgálni kívánt egészséges és beteg minták B sejt alpopulációinak kalcium kinetikájának összehasonlítását ez nem befolyásolja. Ezek az eredmények hangsúlyozzák a sejtek funkcionális jellemzésének szükségességét, mivel a Ca^{2+} flux válaszreakciói új információkat tártak fel a sejt felszíni receptor expressziós mintázatokhoz képest. BCR jelátviteli útvonal mutációi, különösen azok, amelyek megváltoztatják a Ca^{2+} mobilizációt, megváltozott B sejt aktivációt, differenciációt, torz humorális immunválaszt, autoimmun rendellenességet és B sejt rosszindulatú daganatokat eredményeznek (Baba & Kurosaki 2016; Berry et al. 2020; Rawlings et al. 2017).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az IC Ca^{2+} koncentráció változása az egyik leggyorsabb válasz az emlőssejtekben (Vines et al. 2010) és ennek dinamikus változásai szabályozzák a limfociták immunológiai sorsának és működésének legtöbb aspektusát (Baumgarth 2000). Az IC Ca^{2+} koncentrációt az aktív transzport és a Ca^{2+} koncentráció gradiens-vezérelt változásának egyensúlya határozza meg, amely többféle receptor és szignalizációs útvonalat is befolyásol (Scharenberg et al. 2007). Az áramlási citométer lehetővé teszi több ezer sejt folyamatos monitorozását fényszórási jellemzőik és specifikus ingerekre adott szelektív reakciói alapján (Bajnok et al. 2013), ami lehetőséget ad ugyanazon mintá különböző B limfocita alcsoportjaiban a Ca^{2+} flux kinetika összehasonlítására.

Munkánk első fázisában egy áramlási citometrián alapuló módszert standardizáltunk különböző aktiválószerrel felhasználásával, hogy megvizsgáljuk a keringő humán B limfociták Ca^{2+} flux jellemzőit egészséges egyéneknél. Megállapítottuk, hogy a különböző aktiválószerrel eltérő Ca^{2+} flux válaszokat váltanak ki, és hogy a B sejt alcsoportok specifikus fejlődési stádiumtól függő Ca^{2+} flux válaszmintákat mutatnak. A naív B sejtek jelentősebb Ca^{2+} fluxszal reagáltak a BCR-stimulációra, mint a memória B sejtek. A NSw memóriasejtek az anti-IgD stimulációra naív Ca^{2+} flux mintázattal reagáltak, míg az anti-IgM válaszuk memóriaszerű volt. Az ASC-k megőrizték IgG-reszponzivitásukat, de aktiválódáskor újra redukált Ca^{2+} válaszokat mutattak, ami azt jelzi, hogy a Ca^{2+} jelátviteltől való függőségük csökkent.

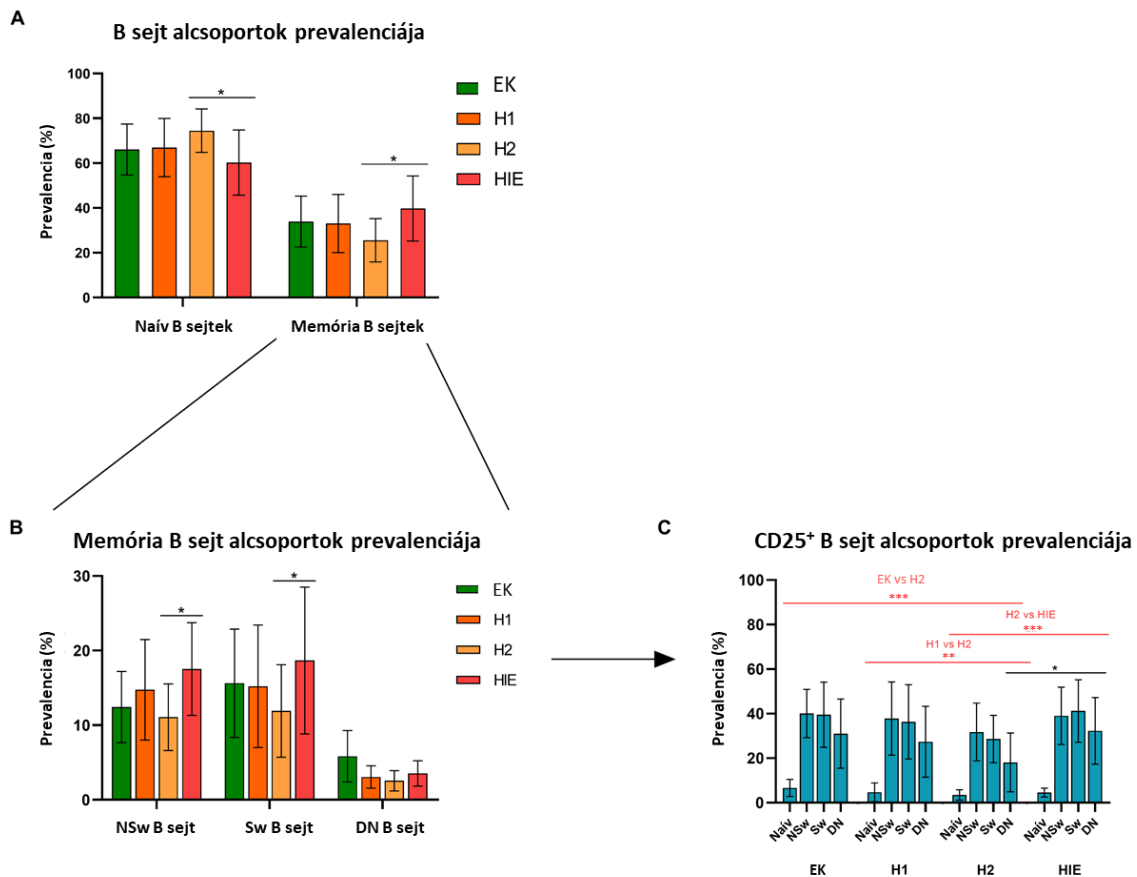
A Ca^{2+} flux egy releváns funkcionális teszt a B sejtek számára, és ennek változásai betekintést nyújthatnak a B sejt aktiváció patológiás fejlődésébe. Ez a módszer felhasználható perifériás B sejt alcsoportok tanulmányozására egészséges és kóros állapotok összehasonlítására, például autoimmun betegségekben vagy B sejt rosszindulatú daganatokban.

BCR STIMULÁCIÓRA ADOTT FOKOZOTT VÁLASZKÉSZSÉG A HASHIMOTO THYREOIDITISHEZ KAPCSOLÓDÓ INFERTILITÁSBAN

7. EREDMÉNYEK

7.1. Prevalencia

A B és T limfociták prevalenciája hasonló volt a különböző betegcsoportokban. A B sejt alpopulációkon belül a naív B sejtek prevalenciája magasabb volt a H2 csoportban, mint a H1E csoportban ($p=0.0230$), míg a H2 csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a memóriasejtek száma, mint a H1E betegeknél ($p=0.0230$) (18. ábra/A).



18. ábra. A naív és memória B sejt alcsoportok (A), a memória B sejt alcsoportok (B) és CD25+ B sejt alcsoportok (C) prevalenciája.

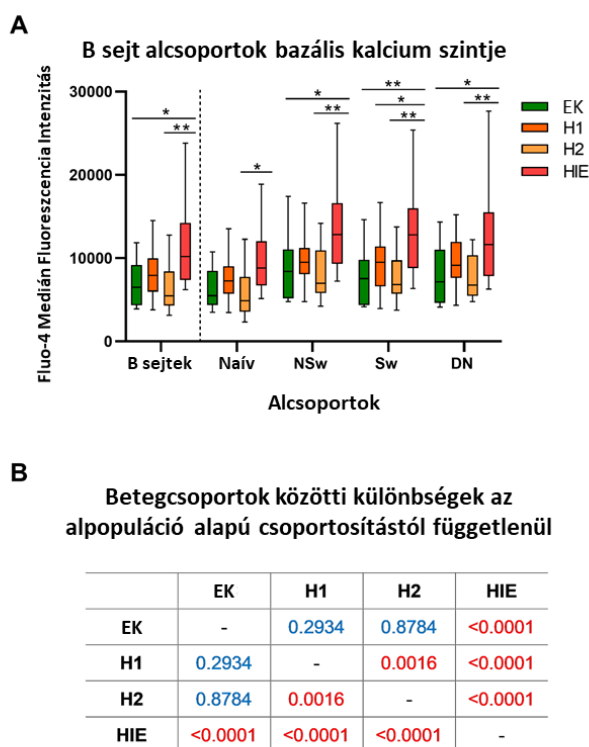
18. ábra. A naív és memória B sejt alcsoportok (**A**), a memória B sejt alcsoportok (**B**) és CD25+ B sejt alcsoportok (**C**) prevalenciája. A piros jelölések a csoportok közötti, a feketék az azonos B sejt populáción belüli összehasonlításokat mutatják. EK: egészséges kontrollok (n=12); HT: Hashimoto thyreoiditis, H1: hipotiroid betegek a kezelés előtt (n=14); H2: HT-s, eutiroid betegek, levotiroxin kezelés után (n=12); HIE: HT, infertilis, eutiroid betegek (n=14); Naív: IgD+CD27- B sejtek; NSw: IgD+CD27+ B sejtek; Sw: IgD-CD27+ B sejtek, DN: IgD-CD27- memória B sejtek. A csoportok közötti és a B sejt alpopulációkon belüli különbségeket kétirányú ANOVA-val és Tukey post hoc teszttel értékeltük. A H1-H2 összehasonlításokat vegyes hatáselemzést és a Sidak- féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk. Az oszlopok a limfocita alpopulációk százalékos arányának átlagát \pm standard deviációját (SD) mutatják az egyes csoportokban. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (Serény-Litvai et al. 2022).

A NSw ($p=0,0289$) és a Sw ($p=0,0196$) B sejtek prevalenciája szignifikánsan magasabb volt a HIE csoportban, mint a H2 betegeknél (**18. ábra/B**). Ha a CD25-öt expresszáló sejtek prevalenciáját vizsgáljuk az összes B sejt alpopuláción belül, nem volt különbség az EK, a H1 és HIE csoportban, viszont szignifikánsan alacsonyabb volt a H2 csoportban (vs EK $p=0,0008$, vs H1 $p=0,0021$, vs HIE $p=0,0003$). A DN memóriasejtek prevalenciája alacsonyabb volt a H2 csoportban, mint a HIE csoportban ($p=0,0121$) (**18. ábra/C**).

7.2. Bazális Fluo-4 Medián Fluoreszcencia Intenzitás

A Fluo-4 kalciumindikátor festék medián fluoreszcencia intenzitása (MFI) korrelál a sejtek bazális kalciumszintjével. A teljes B sejt populáció Fluo-4 MFI értéke szignifikánsan magasabb volt a HIE csoportban az EK ($p=0,0186$) és H2 csoporthoz ($p=0,0053$) képest (**19. ábra/A**). A különböző B sejt alcsoportokat tekintve megnövekedett bazális Fluo-4 intenzitást tapasztaltunk a HIE csoport naív B sejtjeiben a H2 csoporthoz képest ($p=0,0320$). Hasonló, kifejezettebb elváltozásokat láttunk az összes memória B sejt alcsoportban is. A HIE csoport NSw alpopulációja szignifikánsan magasabb bazális kalciumszintet mutatott, mint az EK ($p=0,0168$) és H2 ($p=0,0017$) csoport. Az Sw sejtek bazális kalciumszintje szintén magasabb volt a HIE csoportban, mint EK ($p=0,0067$), H1 ($p=0,0437$) és H2 ($p=0,0022$) csoportban. A HIE DN memória alcsoportja szintén emelkedett bazális Fluo-4 MFI értéket mutatott az EK ($p=0,0201$) és H2 ($p=0,0054$) csoporthoz képest (**19. ábra/A**). A betegcsoportok közötti bazális kalciumszint különbségeinek vizsgálatakor, függetlenül az alpopuláció alapú csoportosítástól, a következő összehasonlításokban találtunk szignifikáns különbségeket: EK < HIE ($p < 0,0001$), H1 < HIE ($p < 0,0001$), H2 < HIE ($p < 0,0001$),

H1 > H2 (p=0,0016) (**19. ábra/B**). Ez a B sejtek bazális kalciumszintjének általános csökkenését jelzi levotiroxin kezelés hatására.



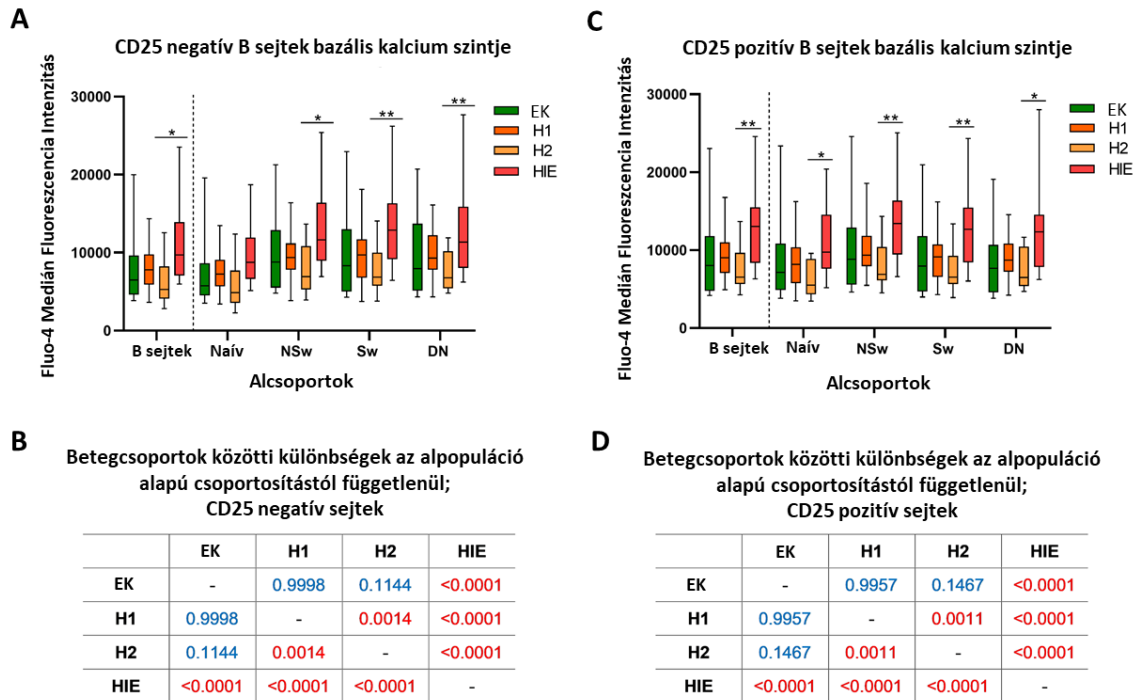
19. ábra. A Fluo4 bazális medián fluoreszcencia intenzitása B sejt alpopulációkban (**A**), p érték a B sejtek alpopuláció alapú csoportosításától független betegcsoportok összehasonlítása (**B**) EK: egészséges kontrollok (n=12); HT: Hashimoto thyroiditis, H1: hipotiroid betegek a kezelés előtt (n=14); H2: HT-s, eutiroid betegek, levotiroxin kezelés után (n=12); HIE: HT, infertilis, eutiroid betegek (n=14); Naív: IgD+CD27- B sejtek; NSw: IgD+CD27+ B sejtek; Sw: IgD-CD27+ B sejtek, DN: IgD-CD27- memória B sejtek. A csoportok közötti és a B sejt alpopulációkon belüli különbségeket kétirányú ANOVA-val és Tukey post hoc teszttel értékeltük. Az egyes betegcsoportok közötti összehasonlítások során vegyes hatáselemzést és a Sidak- féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (Serény-Litvai et al. 2022).

A B sejtek CD25 expressziója alapján történő csoportosítása során hasonló eltérések voltak jelen mind a CD25-, mind a CD25+ B sejt alcsoportokban. A HIE csoport CD25- B sejtjei magasabb bazális kalciumszintet mutattak, mint a H2 csoport (p=0,0207). Ez a különbség a két csoport között minden CD25- B sejt memória alcsoportban jelen volt (NSw, p=0,0123; SW, p=0,0045; DN, p=0,0066) (**20. ábra/A**).

A különböző betegcsoportok CD25- B sejtek bazális kalciumszintjének összehasonlítása során, függetlenül a sejtek alpopuláció alapú csoportosításától, a HIE betegek bazális

kalciumszintje szignifikánsan magasabb volt az összes többi csoporthoz képest (vs EK $p < 0,0001$, vs H1 $p < 0,0001$, vs H2 $p < 0,0001$), és a H1 és H2 csoport közötti különbség is szignifikáns volt ($p = 0,0014$) (20. ábra/B).

A HIE betegek magasabb bazális Fluo-4 MFI-t mutattak a H2 betegekhez képest a teljes CD25+ B sejt populációban ($p = 0,009$) és az összes alcsoportban (naív $p = 0,0178$, NSw $p = 0,0070$, Sw $p = 0,0093$, DN $p = 0,0162$) (20. ábra/C).



20. ábra. CD25- (A) és CD25+ (B) B sejtek Fluo-4 bazális medián fluoreszcencia intenzitása. A betegcsoportok CD25- (C) és CD25+ (D) B sejt p értékeinek alpopuláció alapú csoportosításától független összehasonlítása. EK: egészséges kontrollok ($n = 12$); HT: Hashimoto thyreoiditis, H1: hipotiroid betegek a kezelés előtt ($n = 14$); H2: HT-s, eutiroid betegek, levotiroxin kezelés után ($n = 12$); HIE: HT, infertilis, eutiroid betegek ($n = 14$); Naív: IgD+CD27- B sejtek; NSw: IgD+CD27+ B sejtek; Sw: IgD-CD27+ B sejtek, DN: IgD-CD27- memória B sejtek. A csoportok közötti és a B sejt alpopulációkon belüli különbségeket kétirányú ANOVA-val és Tukey post hoc teszttel értékeltük. Az egyes betegcsoportok közötti összehasonlítások során vegyes hatáselemzést és a Sidak-féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (Serény-Litvai et al. 2022).

A CD25+ B sejt populáció bazális Fluo-4 intenzitásának összehasonlításakor, függetlenül az alpopuláció alapú csoportosítástól, a HIE betegek bazális Fluo-4 MFI értéke szignifikánsan magasabb volt az összes többi csoporthoz képest (vs EK $p < 0,0001$, vs H1 $p < 0,0001$, vs

H2 $p < 0,0001$), és a H1 és H2 csoport közötti különbség is szignifikáns volt ($p = 0,0011$) **(20. ábra/D)**. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az infertilis, eutiroid betegek B sejtjeinek bazális kalciumszintje magasabb a többi csoporthoz képest. Továbbá, úgy tűnik, hogy a levotiroxin kezelés csökkenti a B sejtek bazális kalciumszintjét, bár egyik sem különbözött az egészséges kontroll csoporttól. Ez a különbség mind a CD25-, mind a CD25+ B sejt populációkban jelen volt.

7.3. B limfocita alcsoportok Fluo-4 MFI változása BCR stimulációt követően

7.3.1. A naív B sejtek Fluo-4 MFI változása BCR stimulációt követően

Összehasonlítottuk a BCR stimuláció által kiváltott Ca^{2+} flux tulajdonságait a különböző betegcsoportok CD25+ és CD25- naív B sejtjeiben. A Fluo-4 MFI maximális értéke (*Maximum value, MAX*) korrelál az aktiválás során elért maximális citoplazmatikus Ca^{2+} szintjével. A naív CD25+ sejtek *MAX* Fluo-4 MFI értéke minden betegcsoporton belül szignifikánsan magasabb volt a teljes naív populációhoz és a naív CD25- sejtekhez képest. A betegcsoportok között szignifikáns különbséget nem mutattunk ki **(21. ábra/A)**.

Az *Ending value* a mérési periódus végén lévő Fluo-4 MFI-t mutatja, ami jelen esetben az aktiváció platófázisában van, tehát ez az érték reprezentálja a platófázis IC szabad kalcium koncentrációját. A *MAX* értékkel ellentétben a CD25+ naív sejtek *Ending value* paraméter értéke csak az EK csoportban emelkedett; a H1, H2 és H1E betegek nem mutatták ezt a különbséget a CD25+ és CD25- sejtek között. Az H1E csoport azonban magasabb Fluo-4 intenzitást mutatott, mint a H1 ($p = 0,0269$) és a H2 ($p = 0,0050$) csoport **(21. ábra/B)**.

A H1 csoport CD25+ naív sejtjei szignifikánsan több időt igényeltek az aktiválás maximális Fluo-4 MFI értékének eléréséhez (*Time to reach maximum value*), mint az EK csoportban ($p = 0,0028$) **(21. ábra/C)**.

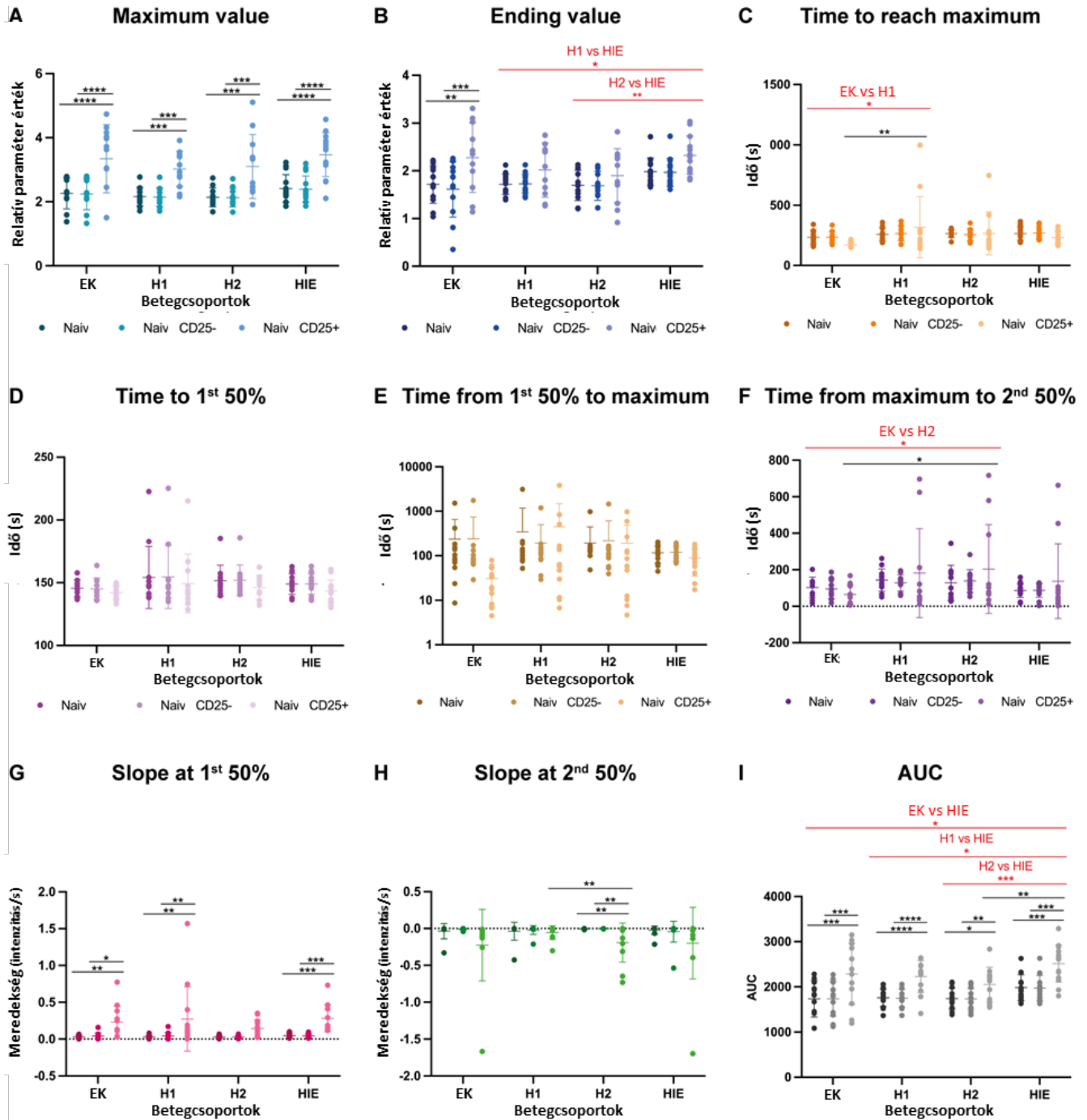
Az aktiválás leszálló fázisában a H2 csoport CD25+ sejtjeinek több időre volt szükségük a görbe második 50%-os értékének eléréséhez (*Time from maximum to second 50% value*),

ami azt jelzi, hogy több időre volt szükségük az IC szabad kalcium koncentráció csökkentésére, mint az EK csoportban ($p=0,0451$) **(21. ábra/F)**.

Az aktiválás felszálló fázisának meredeksége (*Slope at first 50% value*) szignifikánsan meredekebb a CD25+ sejtekben az EK, H1 és HIE csoportokban a CD25- sejtekhez és a teljes naív populációhoz képest **(21. ábra/G)**.

Az aktiválás leszálló szakaszának meredeksége (*Slope at second 50% value*) a H2 csoport CD25+ sejtjeinél szignifikánsan meredekebb volt, mint a CD25- sejteknél ($p=0,0024$) és a teljes naív B sejt populációnál ($p=0,0024$). Továbbá a H2 naív CD25+ sejtjei szignifikánsan meredekebb leszálló fázist mutattak a második 50%-os értéknél, összehasonlítva H1 csoport naív CD25+ sejtjeivel ($p=0,0475$) **(21. ábra/H)**.

A görbe alatti terület (*AUC*) korrelál a naív B sejtek teljes kapacitásával, azaz a BCR stimuláció által kiváltott válasz nagyságával. A korábbi eredményeknek megfelelően a CD25+ naív B sejtek *AUC* értéke minden betegcsoportban magasabb volt, mint a CD25- és a teljes naív B sejt populációban. A HIE csoport teljes naív B sejtjeinek *AUC* értéke magasabb volt az EK ($p=0,0200$), a H1 ($p=0,0130$) és a H2 ($p=0,0009$) csoporthoz képest. Továbbá a HIE csoport CD25+ naív B sejtjei magasabb *AUC* értékkel rendelkeztek, mint a H2 csoport ($p=0,0070$) **(21. ábra/I)**.



21. ábra. Teljes naív, naív CD25- és naív CD25+ B sejtek kalcium flux kinetika adatai. **(A)** Maximum value, **(B)** Ending value, **(C)** Time to reach maximum, **(D)** Time to first 50% value, **(E)** Time from first 50% to maximum, **(F)** Time from maximum to second 50% value, **(G)** Slope at the first 50% value, **(H)** Slope at second 50% value, **(I)** Area under curve (AUC). EK: egészséges kontrollok (n=12); HT: Hashimoto thyroiditis, H1: hipotiroid betegek a kezelés előtt (n=14); H2: HT-s, euthiroid betegek, levotiroxin kezelés után (n=12); HIE: HT, infertilis, euthiroid betegek (n=14); Naív: IgD+CD27- B sejtek; NSw: IgD+CD27+ B sejtek; Sw: IgD-CD27+ B sejtek, DN: IgD-CD27- memória B sejtek. A csoportok közötti különbségeket kétirányú ANOVA-val és Tukey post hoc teszttel értékeltük. Az egyes betegcsoportok közötti összehasonlítások során vegyes hatáselemzést és a Sidak- féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk. Az adatok egyedi értékeként vannak ábrázolva, a középső vonal az átlagot jelöli. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (Serény-Litvai et al. 2022).

7.3.2. A memória B sejtek Fluo-4 MFI változása BCR stimulációt követően

A NSw memória B sejtek kalcium kinetikájának vizsgálatakor azt találtuk, hogy a naív B sejtekhez hasonlóan a CD25+ B sejtek is magasabb *MAX* értékkel rendelkeztek, mint a teljes NSw alcsoport és a CD25- B sejtek. A betegcsoportok összehasonlításakor a CD25 alapú csoportosítástól függetlenül azt találtuk, hogy a *MAX* Fluo-4 MFI magasabb volt a H2 csoportban, mint a H1 csoport ($p=0,0385$) **(22. ábra/A)**.

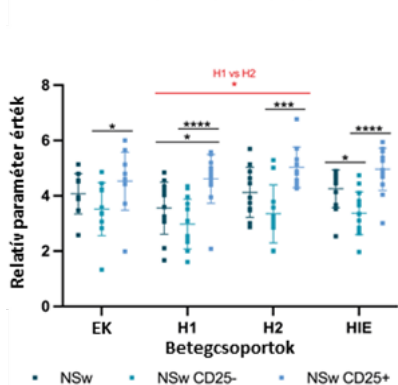
A NSw CD25+ sejtek *Ending value* Fluo-4 MFI-je is magasabb volt a H1, H2, HIE csoportokban, mint a teljes NSw alpopulációban vagy a CD25- B sejtekben. Továbbá a HIE csoport CD25+ sejtjeinek *Ending value* Fluo-4 MFI-je szignifikánsan magasabb volt az EK csoporthoz képest ($p=0,0357$). A betegcsoportok összehasonlításánál, függetlenül a CD25 alapú csoportosítástól, a HIE csoport szintén magasabb Fluo-4 MFI-vel rendelkezett az EK csoporthoz képest ($p=0,0308$) **(22. ábra/B)**.

A NSw CD25+ B sejtek *AUC* értékei mindhárom (H1, H2, HIE) betegcsoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a CD25- NSw B sejté, és hasonló tendencia mutatkozott az EK csoportban is. A HIE betegek CD25+ B sejtjei kiemelkedően magas *AUC* értékkel rendelkeztek, az EK csoport NSw CD25+ B sejtjeihez képest. Ha a betegcsoportokat vizsgáljuk, függetlenül a CD25 expresszió alapú csoportosítástól, a HIE betegek NSw B sejtjeinek *AUC* értéke magasabb volt az EK ($p=0,0097$) és H1 ($p=0,0121$) csoportokhoz képest **(22. ábra/C)**.

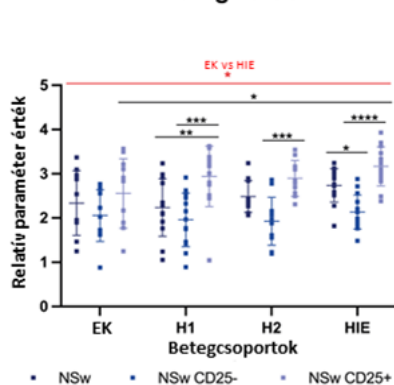
A HIE csoport Sw memória B sejtjei magasabb *MAX*, *Ending value* és *AUC* értékeket mutattak az EK csoporthoz képest ($p=0,0487$, $p=0,0282$ és $p=0,0015$) **(22. ábra/D, E és F)**. Az Sw CD25+ B sejtek is magasabb *Ending value* Fluo-4 MFI-t értek el a HIE betegek CD25- sejtjeihez képest ($p=0,0479$) **(22. ábra/E)**.

Nsw memória B sejtek

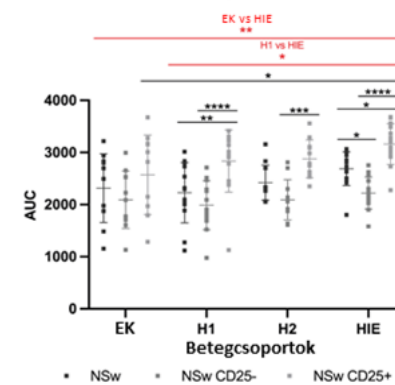
A Maximum value



B Ending value

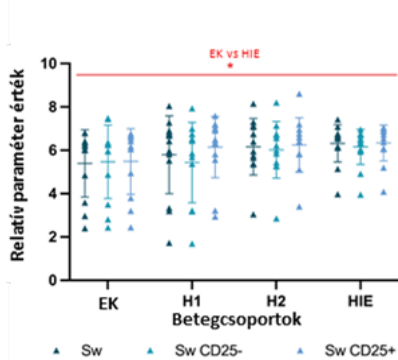


C AUC

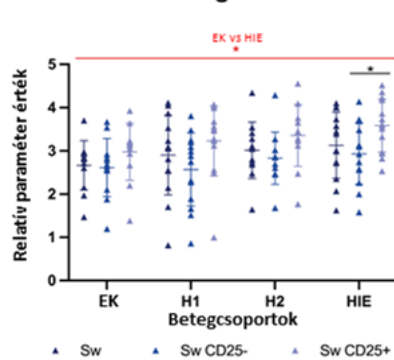


Sw memória B sejtek

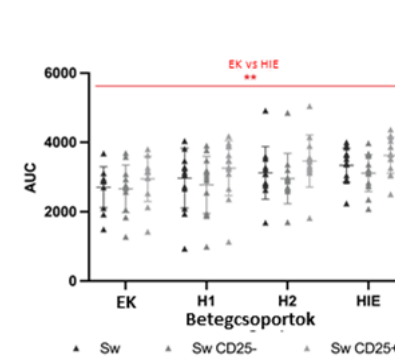
D Maximum value



E Ending value

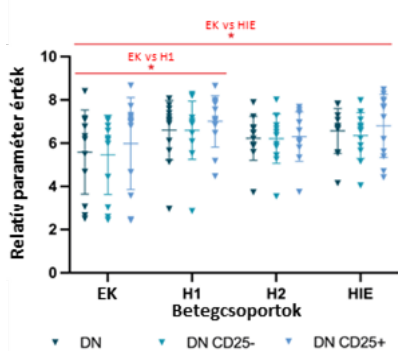


F AUC

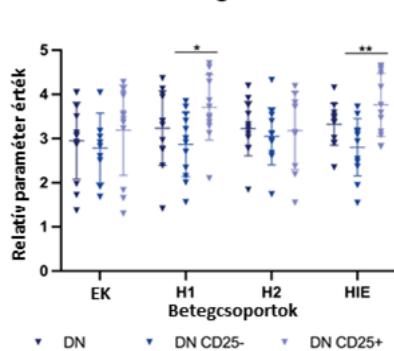


DN memória B sejtek

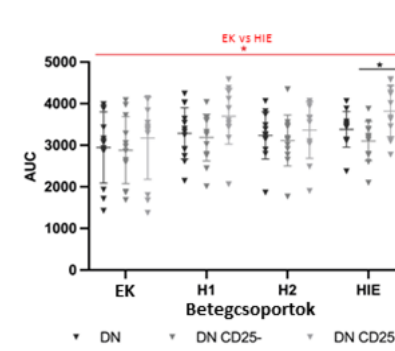
G Maximum value



H Ending value



I AUC



22. ábra. Memória B sejt alcsoportok kalcium flux kinetikai adatai.

22. ábra. Memória B sejt alcsoportok kalcium flux kinetikai adatai. Teljes NSw, CD25- és CD25+ memória B sejtek: **(A)** Maximum value, **(B)** Ending value, **(C)** AUC. Teljes Sw, CD25- és CD25+ Sw memória B sejtek: **(D)** Maximum value, **(E)** Ending value, **(F)** AUC. Teljes DN, CD25- és CD25+ memória B sejtek: **(G)** Maximum value, **(H)** Ending value, **(I)** AUC. EK: egészséges kontrollok (n=12); HT: Hashimoto thyroiditis, H1: hipotiroid betegek a kezelés előtt (n=14); H2: HT-s, eutiroid betegek, levotiroxin kezelés után (n=12); HIE: HT, infertilis, eutiroid betegek (n=14); Naív: IgD+CD27- B sejtek; NSw: IgD+CD27+ B sejtek; Sw: IgD-CD27+ B sejtek, DN: IgD-CD27- memória B sejtek. A csoportok közötti különbségeket kétirányú ANOVA-val és Tukey post hoc teszttel értékeltük. Az egyes betegcsoportok közötti összehasonlítások során vegyes hatáselemzést és a Sidak- féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk. Az adatok egyedi értékeként vannak ábrázolva. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (Serény-Litvai et al. 2022).

Mind a H1, mind a HIE betegek DN memória B sejtjei magasabb *MAX*Fluo-4 MFI értékeket értek el az EK csoporthoz képest (p=0,0102 és p=0,0449) **(22. ábra/G)**. A DN CD25+ B sejtek magasabb *Ending value* értéket értek el, mint a CD25- sejtek a H1 (p=0,0202) és a HIE (p=0,0067) csoportban **(22. ábra/H)**. A HIE csoportban a DN CD25+ B sejtek *AUC* értéke magasabb volt a DN CD25- sejteknél. A HIE betegek DN memória B sejtjeinek *AUC* értéke összességében magasabb volt az EK csoporthoz képest (p=0,0359) **(22. ábra/I)**.

8. DISZKUSSZIÓ

Ebben a vizsgálatban a B sejtek kalcium kinetikáját vizsgáltuk BCR stimulációt követően autoantitest pozitív, eutiroid, infertilis, nőkben; autoantitest pozitív, hipotiroid, betegekben levotiroxin kezelés előtt és után, valamint az életkornak megfelelő egészséges kontrollokban. A B limfociták funkcionális változásait korábban soha nem vizsgálták Hashimoto féle pajzsmirigygyulladásban vagy az ehhez kapcsolódó infertilitásban. Az eutiroid, infertilis betegek B sejtjei magasabb preaktivációs kalcium szintet és BCR stimulációval szembeni válaszkészséget mutattak, amit a megváltozott kalcium flux kinetikai paraméterek is jeleznek az egészséges kontrollhoz és a hipotiroid betegcsoporthoz képest. Meglepő módon csak minimális különbséget találtunk a hipotiroid betegek és az egészséges kontrollok B sejtjeinek kalcium kinetikája között. A hipotiroidizmus B sejtek működésére gyakorolt közvetlen hatásának kizárására a levotiroxin pótlást követően is vizsgáltuk a HT-s betegek B sejtjeinek kinetikáját. A TSH szintek normalizálódása után ezeknél a betegeknél a bazális kalciumszint csökkent a kezelés előttihez képest, bár sem a kezelés előtti, sem az utáni értékek nem tértek el az egészséges kontrolloktól. Még érdekesebb, hogy a levotiroxin kezelés csökkentette a CD25+ B sejtek prevalenciáját, amelyről feltételezhető, hogy fontos szerepet játszanak a T sejtek perifériás antigén prezentációjában (Brisslert et al. 2006). Ez a pajzsmirigy sejtek metabolikus aktivitásának csökkenéséből is adódhat és ennek következtében alacsonyabb autoantigén felszabadulást eredményezhet, vagy a levotiroxin közvetlen hatása is lehet.

Összhangban korábbi eredményekkel, miszerint a CD25+ B sejtek egy funkcionálisan eltérő csoportot képviselnek (Brisslert et al. 2006), mi is azonos következtetésre jutottunk a vizsgálatunk során. A CD25+ B sejtekben a BCR stimulációval szembeni fokozott érzékenységet találtunk a naív és NSw alcsoportokban a CD25- sejtekhez képest az EK, valamint minden betegcsoportban. Fontos megjegyezni, hogy a Sw és DN memóriasejtekben a CD25+ és CD25- populációk közötti BCR stimulációval szembeni fokozott érzékenység csak a H1 és HIE betegcsoportokban volt kimutatható, és kevésbé volt kifejezett, mint a naív és NSw alcsoportokban. A CD25+ B sejtek megváltozott Ca²⁺ flux természetének megértése további kísérleteket igényel.

Meglepő módon kevés különbséget találtunk a hipotiroid HT (H1) betegek és az egészséges kontrollok között a perifériás B sejtek Ca^{2+} flux válaszában. Ugyanakkor emelkedett bazális kalciumszintet és fokozott BCR választ tapasztaltunk a perifériás B sejt alcsoportokban autoantitest pozitív, infertilis, eutiroid (HIE) betegekben. A bazális kalciumszint szignifikánsan magasabb volt az infertilis betegekben (HIE) az összes B sejt populációban és minden memória alcsoportban az egészséges kontrollhoz képest. Érdekes módon az emelkedett bazális Ca^{2+} szint nemcsak a CD25+ B sejt alcsoportokban, hanem a CD25-memória alcsoportokban is jelent volt. Továbbá sikerült kimutatnunk az eutiroid, infertilis betegek (HIE) B sejtjeinek BCR stimulációval szembeni fokozott érzékenységét. Ezt a kalcium kinetika paramétereiben talált finom különbségek is tükrözik. Az infertilis betegek (HIE) naív B sejtjei fokozott kalcium választ mutattak az egészséges kontrollcsoporthoz képest, amit az emelkedett *AUC* érték jelez. Az éretlen B sejt klónok BCR stimulációra adott mérsékelten fokozott válaszreakciója előnyt jelenthet a pozitív szelekció során. A BCR jelerősségének enyhe emelkedése már elegendő lehet a B sejteken belüli autoimmunitás kialakulásához (Rawlings et al. 2017). Ezek az eltérések a memória alcsoportokban is jelen voltak. Az infertilis betegek NSw memória B sejtjei és azon belül is főként a CD25-t expresszáló sejtek magasabb kalciumszintet mutattak az *Ending value* és *AUC* értékekben. A Sw és DN memória B sejtek BCR stimulációra szintén fokozott érzékenységet mutattak az infertilis betegekben (HIE) az egészséges kontrollhoz képest.

További különbségeket figyeltünk meg a hipotiroid (H1) és az autoantitest pozitív, eutiroid infertilis (HIE) betegcsoportok között is. Az infertilis betegek (HIE) B sejtjeinek összesített bazális kalciumszintje magasabb volt az összes többi csoporthoz képest, beleértve a hipotiroid betegeket (H1) is. Azonban különbségek az eutiroid, infertilis (HIE) és a hipotiroid csoport (H1) kalcium kinetikája között csak a naív és a NSw memória alcsoportokban voltak jelen. Az infertilis csoport (HIE) naív B sejtjei magasabb *Ending value*, a NSw B sejtekben magasabb *Ending value* és *AUC* értékeket mutattak a hipotiroid csoporthoz (H1) képest. Ez különbséget jelez az újonnan képződött, naív és memória B sejtek funkciójában, amelyek még nem estek át izotípusváltáson. A Sw és a DN memória alcsoportok viszont hasonló kalcium kinetika jellemzőket mutattak ebben a két betegcsoportban. A DN memóriasejtek például hasonlóan emelkedett *MAX* értékekkel rendelkeztek mind a hipotiroid (H1), mind az eutiroid, infertilis csoportban (HIE) az

egészséges kontrollhoz képest. Ezek az eredmények fokozott Ca^{2+} flux választ mutatnak az autoantitest pozitív, euthiroid, infertilis betegek (HIE) perifériás B sejteiben. Az infertilis és hipotiroid betegek valószínűleg a pajzsmirigybetegség eltérő stádiumában vannak, ami hatással lehet az autoimmun válaszreakció jellemzőire. Az autoantitest pozitív, infertilis, euthiroid betegek (HIE) pajzsmirigyfunkciója továbbra is fenntartott, így a megfigyelt eltérések a pajzsmirigy betegség korábbi stádiumának sajátosságai lehetnek. A hipotiroid csoportban (H1) a pajzsmirigy szövetkárosodásának jelei a pajzsmirigy ultrahang és a csökkent pajzsmirigyfunkció alapján nyilvánvalóak, ami évek óta fennálló autoimmun gyulladásra utal. Ezek a perifériás B sejt diszfunkcióra vonatkozó megfigyelések autoantitest pozitív, infertilis, euthiroid betegeknél (HIE) alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a pajzsmirigy antigénnel szembeni tolerancia elvesztése inkább a periférián kezdődik, mint magában a pajzsmirigyben. Másrészt, a B sejtek fokozott Ca^{2+} flux válasza egy szisztémás autoimmun diszfunkció része lehet, amely mind az infertilitás, mind a HT gyakori oka lehet.

Összefoglalva, úgy tűnik, hogy szisztémás immunrendszeri diszfunkció van jelen az autoantitest pozitív, euthiroid, infertilis betegekben, ami nem áll fenn a hipotiroid betegeknél. Adataink alátámasztják a BCR stimulációval szembeni fokozott válaszkészség szerepét a pajzsmirigy autoimmunitás és az infertilitás korai szakaszában. Ez azt jelentheti, hogy a pajzsmirigy csak az egyik célpontja az autoreaktív B sejteknek, azonban további vizsgálatok szükségesek a Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladás és az infertilitás összefüggésének megértéséhez.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az Hashimoto thyreoiditis első fázisában az pajzsmirigy ellenes autoantitest termelés a központi jellemző, amely felveti a B limfociták és a T-B limfocita interakciók szerepét is a patogenezisben. Bár a Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladást klasszikusan T sejtek által közvetített rendellenességnek tekintik, sok nyitott kérdés maradt az autoreaktív sejtek megjelenésével kapcsolatban. Az újabb bizonyítékok azt mutatják, hogy a B sejt receptor (BCR) által indukált kalcium-jelátvitel változásai kulcsfontosságúak lehetnek az autoimmunitás kialakulásában.

Ezért munkánk második fázisában arra törekedtünk, hogy megvizsgáljuk a B limfociták kalciumáram válaszát a BCR stimulációra Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladásban és a hozzá társuló infertilitásban. Perifériás vérmintát gyűjtöttünk autoantitest pozitív eutiroid, infertilis betegektől; hipotiroid, autoantitest pozitív betegekből levotiroxin kezelés előtt és után, valamint életkorban megfelelő egészséges kontrollokból. Kiértékeljük a BCR stimulációt követő kalcium flux választ naív, NSw, Sw és DN memória B limfocitákban. A kalcium flux kinetikai görbéit a FacsKin algoritmusával elemeztük.

Az infertilis, autoantitest pozitív, eutiroid betegek minden B sejt al csoportja magasabb bazális kalciumszintet és BCR stimulációval szembeni fokozott válaszkészséget mutatott a többi csoporthoz képest. A naív és NSw B sejtek kalcium flux jellemzői szintén különböztek az infertilis, eutiroid és hipotiroid betegek között. Csak minimális különbséget találtunk a hipotiroid betegek és az egészséges kontrollok között. A levotiroxinnal kezelt, eutiroid csoportban alacsonyabb volt a CD25+ B sejtek előfordulása. A levotiroxin kezelést követően a bazális kalciumszint is csökkent, bár sem a kezelés előtti, sem az utáni értékek nem tértek el az egészséges kontrollokétól.

Összefoglalva, úgy tűnik, hogy szisztémás B sejt diszfunkció van jelen eutiroid, autoantitest pozitív, infertilis betegeken, ami a megváltozott BCR jelátvitel lehetséges szerepére utal a pajzsmirigy autoimmunitás és infertilitás korai szakaszában.

10. ÚJ EREDMÉNYEK

Egy áramlási citometrián alapuló módszert standardizáltunk különböző aktiválószerrel felhasználásával, hogy megvizsgáljuk a keringő humán B limfociták Ca^{2+} flux jellemzőit egészséges egyéneknél. Megállapítottuk, hogy a különböző aktiválószerrel eltérő Ca^{2+} flux válaszokat váltanak ki, és hogy a B sejt alcsoportok specifikus fejlődési stádiumtól függő Ca^{2+} flux válaszmintákat mutatnak.

- A naív B sejtek jelentősebb Ca^{2+} fluxszal reagáltak a BCR stimulációra, mint a memória B sejtek.
- A NSw memóriasejtek az anti-IgD stimulációra naív Ca^{2+} flux mintázattal reagáltak, míg az anti-IgM válaszuk memóriaszerű volt.
- Az ASC-k megőrizték IgG-reszponzivitásukat, de aktiválódáskor újra redukált Ca^{2+} válaszokat mutattak, ami azt jelzi, hogy a Ca^{2+} jelátviteltől való függőségük csökkent.

A B limfociták funkcionális változásait korábban soha nem vizsgálták Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladásában vagy az ehhez kapcsolódó infertilitásban,

- Az eutiroid, infertilis betegek B sejtjei magasabb preaktivációs kalcium szintet és BCR stimulációval szembeni válaszkészséget mutattak az egészséges kontrollokhoz és a hipotireoid betegcsoportéhoz képest, amit a megváltozott kalcium flux kinetikai paraméterek is jeleznek.
- Autoimmun pajzsmirigygyulladás következtében hipotireoid betegeknél a levotiroxin kezelés során, a TSH szintek normalizálódást követően a bazális kalciumszint csökkent a kezelés előttihez képest, bár sem a kezelés előtti, sem az utáni értékek nem tértek el az egészséges kontrolloktól.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy szisztémás immunrendszeri diszfunkció van jelen az autoantitest pozitív, eutiroid, infertilis betegekben, ami nem áll fenn a hipotiroid betegeknel. Ez a jelenség a megváltozott BCR jelátvitel lehetséges szerepére utal a pajzsmirigy autoimmunitás és infertilitás korai szakaszában.

A B sejtek BCR stimulációra adott fokozott válaszkészsége szerepet játszhat szisztémás autoimmun reakciók elindításában és az eltérés felismerése lehetőséget ad azon jelátviteli útvonalak részletesebb vizsgálatára, amelyek meghatározzák a B sejtek válaszkészségét, ezáltal potenciális terápiás célpontot is szolgáltathatnak ezen útvonalak befolyásolására. A B sejtek infertilitásban játszott szerepének feltárása alapvetően hozzájárulhat a háttérben álló okok feltárásához.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Arbuckle M.R., McClain M.T., Rubertone M.V., Scofield R.H., Dennis G.J., et al. (2003) Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 349, 1526-33.
2. Arechiga A.F., Habib T., He Y., Zhang X., Zhang Z.Y., et al. (2009) Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs B cell signaling. *J Immunol* 182, 3343-7.
3. Armengol M.P., Juan M., Lucas-Martin A., Fernandez-Figueras M.T., Jaraquemada D., et al. (2001) Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol* 159, 861-73.
4. Armitage L.H., Wallet M.A. & Mathews C.E. (2021) Influence of PTPN22 Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease. *Front Immunol* 12, 636618.
5. Baba Y. & Kurosaki T. (2016) Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 393, 143-74.
6. Baba Y., Matsumoto M. & Kurosaki T. (2014) Calcium signaling in B cells: regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol Immunol* 62, 339-43.
7. Bajnok A., Kaposi A., Kovács L., Vásárhelyi B., Balog A., et al. (2013) Analysis by flow cytometry of calcium influx kinetics in peripheral lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Cytometry A* 83, 287-93.
8. Bajnok A., Sereny-Litvai T., Temesfoi V., Norenberg J., Herczeg R., et al. (2023) An Optimized Flow Cytometric Method to Demonstrate the Differentiation Stage-Dependent Ca(2+) Flux Responses of Peripheral Human B Cells. *Int J Mol Sci* 24.
9. Baumgarth N. (2000) A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev* 176, 171-80.
10. Becker-Herman S., Meyer-Bahlburg A., Schwartz M.A., Jackson S.W., Hudkins K.L., et al. (2011) WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. *J Exp Med* 208, 2033-42.
11. Benson M.J., Dillon S.R., Castigli E., Geha R.S., Xu S., et al. (2008) Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 180, 3655-9.

12. Berlansky S., Humer C., Sallinger M. & Frischauf I. (2021) More Than Just Simple Interaction between STIM and Orai Proteins: CRAC Channel Function Enabled by a Network of Interactions with Regulatory Proteins. *Int J Mol Sci* 22.
13. Berridge M.J. (2012) Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans* 40, 297-309.
14. Berridge M.J., Bootman M.D. & Roderick H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-29.
15. Berry C.T., Liu X., Myles A., Nandi S., Chen Y.H., et al. (2020) BCR-Induced Ca²⁺ Signals Dynamically Tune Survival, Metabolic Reprogramming, and Proliferation of Naive B Cells. *Cell Reports* 31, 107474.
16. Brisslert M., Bokarewa M., Larsson P., Wing K., Collins L.V., et al. (2006) Phenotypic and functional characterization of human CD25⁺ B cells. *Immunology* 117, 548-57.
17. Brodie E.J., Infantino S., Low M.S.Y. & Tarlinton D.M. (2018) Lyn, Lupus, and (B) Lymphocytes, a Lesson on the Critical Balance of Kinase Signaling in Immunity. *Front Immunol* 9, 401.
18. Champely S. (2020) Basic Functions for Power Analysis. Version 1.3-0. URL <https://github.com/heliosdrm/pwr>.
19. Chan S. & Boelaert K. (2015) Optimal management of hypothyroidism, hypothyroxinaemia and euthyroid TPO antibody positivity preconception and in pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 82, 313-26.
20. Coggeshall K.M. & Cambier J.C. (1984) B cell activation. VIII. Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J Immunol* 133, 3382-6.
21. Cossarizza A., Chang H.D., Radbruch A., Acs A., Adam D., et al. (2019) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 49, 1457-973.
22. Dai X., James R.G., Habib T., Singh S., Jackson S., et al. (2013) A disease-associated PTPN22 variant promotes systemic autoimmunity in murine models. *J Clin Invest* 123, 2024-36.
23. Deane K.D., Norris J.M. & Holers V.M. (2010) Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation. *Rheum Dis Clin North Am* 36, 213-41.
24. Debant M., Hemon P., Brigaudeau C., Renaudineau Y. & Mignen O. (2015) Calcium signaling and cell fate: how can Ca²⁺ signals contribute to wrong

- decisions for Chronic Lymphocytic Leukemic B lymphocyte outcome? *Int J Dev Biol* 59, 379-89.
25. Dhillon-Smith R.K., Middleton L.J., Sunner K.K., Cheed V., Baker K., et al. (2019) Levothyroxine in Women with Thyroid Peroxidase Antibodies before Conception. *N Engl J Med* 380, 1316-25.
 26. Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C. & Healy J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-8.
 27. Engels N., Konig L.M., Heemann C., Lutz J., Tsubata T., et al. (2009) Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol* 10, 1018-25.
 28. Engels N., Konig L.M., Schulze W., Radtke D., Vanshylla K., et al. (2014) The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. *Nat Commun* 5, 5456.
 29. Feske S. (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7, 690-702.
 30. Fierro L. & Parekh A.B. (2000) Substantial depletion of the intracellular Ca²⁺ stores is required for macroscopic activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol* 522 Pt 2, 247-57.
 31. Freedman B.D. (2006) Mechanisms of calcium signaling and function in lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 26, 97-111.
 32. Giltiay N.V., Giordano D. & Clark E.A. (2019) The Plasticity of Newly Formed B Cells. *J Immunol* 203, 3095-104.
 33. Gleicher N. (2014) Maternal autoimmunity and adverse pregnancy outcomes. *J Autoimmun* 50, 83-6.
 34. Gold M.R., Matsuuchi L., Kelly R.B. & DeFranco A.L. (1991) Tyrosine phosphorylation of components of the B-cell antigen receptors following receptor crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3436-40.
 35. Gross A.J., Lyandres J.R., Panigrahi A.K., Prak E.T. & DeFranco A.L. (2009) Developmental acquisition of the Lyn-CD22-SHP-1 inhibitory pathway promotes B cell tolerance. *J Immunol* 182, 5382-92.
 36. Habib T., Funk A., Rieck M., Brahmandam A., Dai X., et al. (2012) Altered B cell homeostasis is associated with type I diabetes and carriers of the PTPN22 allelic variant. *J Immunol* 188, 487-96.

37. Hardy R.R. & Hayakawa K. (2001) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19, 595-621.
38. Hibbs M.L., Tarlinton D.M., Armes J., Grail D., Hodgson G., et al. (1995) Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83, 301-11.
39. Hogan P.G., Lewis R.S. & Rao A. (2010) Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28, 491-533.
40. Hollowell J.G., Staehling N.W., Flanders W.D., Hannon W.H., Gunter E.W., et al. (2002) Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 87, 489-99.
41. Hom G., Graham R.R., Modrek B., Taylor K.E., Ortmann W., et al. (2008) Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 358, 900-9.
42. Jackson S.W., Kolhatkar N.S. & Rawlings D.J. (2015) B cells take the front seat: dysregulated B cell signals orchestrate loss of tolerance and autoantibody production. *Curr Opin Immunol* 33, 70-7.
43. Johnson S.A., Pleiman C.M., Pao L., Schneringer J., Hippen K., et al. (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* 155, 4596-603.
44. Jung D. & Alt F.W. (2004) Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299-311.
45. Kelkar R.L., Meherji P.K., Kadam S.S., Gupta S.K. & Nandedkar T.D. (2005) Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. *J Reprod Immunol* 66, 53-67.
46. King L.B. & Freedman B.D. (2009) B-lymphocyte calcium influx. *Immunol Rev* 231, 265-77.
47. Kolhatkar N.S., Brahmandam A., Thouvenel C.D., Becker-Herman S., Jacobs H.M., et al. (2015) Altered BCR and TLR signals promote enhanced positive selection of autoreactive transitional B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 212, 1663-77.
48. Korevaar T.I., de Rijke Y.B., Chaker L., Medici M., Jaddoe V.W., et al. (2017a) Stimulation of Thyroid Function by Human Chorionic Gonadotropin During Pregnancy: A Risk Factor for Thyroid Disease and a Mechanism for Known Risk Factors. *Thyroid* 27, 440-50.

49. Korevaar T.I., Steegers E.A., Pop V.J., Broeren M.A., Chaker L., et al. (2017b) Thyroid Autoimmunity Impairs the Thyroidal Response to Human Chorionic Gonadotropin: Two Population-Based Prospective Cohort Studies. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 69-77.
50. Korevaar T.I.M., Medici M., Visser T.J. & Peeters R.P. (2017c) Thyroid disease in pregnancy: new insights in diagnosis and clinical management. *Nat Rev Endocrinol* 13, 610-22.
51. Lamagna C., Hu Y., DeFranco A.L. & Lowell C.A. (2014) B cell-specific loss of Lyn kinase leads to autoimmunity. *J Immunol* 192, 919-28.
52. LeBien T.W. & Tedder T.F. (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-80.
53. Lesley R., Kelly L.M., Xu Y. & Cyster J.G. (2006) Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10717-22.
54. Lesley R., Xu Y., Kalled S.L., Hess D.M., Schwab S.R., et al. (2004) Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 20, 441-53.
55. Lin K.I., Lin Y. & Calame K. (2000) Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol Cell Biol* 20, 8684-95.
56. Liu Q.H., Liu X., Wen Z., Hondowicz B., King L., et al. (2005) Distinct calcium channels regulate responses of primary B lymphocytes to B cell receptor engagement and mechanical stimuli. *J Immunol* 174, 68-79.
57. Liu X., Zhu P. & Freedman B.D. (2006) Multiple eicosanoid-activated nonselective cation channels regulate B-lymphocyte adhesion to integrin ligands. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C873-82.
58. Loh T.P., Tee J.C., Tee N.W., Cheng W.L., Thevarajah M., et al. (2016) Association between thyroid function tests and anti-thyroid peroxidase (TPO) antibodies in pregnancy. *Endocrine* 53, 865-7.
59. Lu R., Vidal G.S., Kelly J.A., Delgado-Vega A.M., Howard X.K., et al. (2009) Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 10, 397-403.
60. Maraka S., Ospina N.M., O'Keeffe D.T., Espinosa De Ycaza A.E., Gionfriddo M.R., et al. (2016) Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid* 26, 580-90.

61. Matalon S.T., Blank M., Levy Y., Carp H.J., Arad A., et al. (2003) The pathogenic role of anti-thyroglobulin antibody on pregnancy: evidence from an active immunization model in mice. *Hum Reprod* 18, 1094-9.
62. Meffre E. & Wardemann H. (2008) B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 20, 632-8.
63. Mészáros G., Szalay B., Toldi G., Kaposi A., Vásárhelyi B., et al. (2012) Kinetic measurements using flow cytometry: new methods for monitoring intracellular processes. *Assay Drug Dev Technol* 10, 97-104.
64. Monteleone P., Parrini D., Faviana P., Carletti E., Casarosa E., et al. (2011) Female infertility related to thyroid autoimmunity: the ovarian follicle hypothesis. *Am J Reprod Immunol* 66, 108-14.
65. Murphy K. & Weaver C. (2017) Janeway's Immunobiology. In: *Janeway's Immunobiology* (pp. 399-445. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, NY.
66. Negro R., Formoso G., Mangieri T., Pezzarossa A., Dazzi D., et al. (2006) Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2587-91.
67. Negro R., Mangieri T., Coppola L., Presicce G., Casavola E.C., et al. (2005) Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. *Hum Reprod* 20, 1529-33.
68. Negro R. & Stagnaro-Green A. (2014) Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *BMJ* 349, g4929.
69. Nevalainen T., Autio A., Kummola L., Salomaa T., Junttila I., et al. (2019) CD27-IgD- B cell memory subset associates with inflammation and frailty in elderly individuals but only in males. *Immun Ageing* 16, 19.
70. O'Connor B.P., Raman V.S., Erickson L.D., Cook W.J., Weaver L.K., et al. (2004) BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-8.
71. Ogle D.D., J.; Wheeler, P.; Dinno, A. (2021) FSA: Fisheries Stock Analysis. R Package Version 0.9.1. URL <https://github.com/droglenc/FSA>.
72. Ollila J. & Vihinen M. (2005) B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 518-23.
73. Packard T.A. & Cambier J.C. (2013) B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep* 5, 40.

74. Paredes R.M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W. & Lechleiter J.D. (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143-51.
75. Parekh A.B. (2003) Mitochondrial regulation of intracellular Ca²⁺ signaling: more than just simple Ca²⁺ buffers. *News Physiol Sci* 18, 252-6.
76. Pearce E.N., Farwell A.P. & Braverman L.E. (2003) Thyroiditis. *N Engl J Med* 348, 2646-55.
77. Penna A., Demuro A., Yeromin A.V., Zhang S.L., Safrina O., et al. (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456, 116-20.
78. Pihoker C., Gilliam L.K., Hampe C.S. & Lernmark A. (2005) Autoantibodies in diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S52-61.
79. Prieyl J.A. & LeBien T.W. (1996) Interleukin 7 independent development of human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10348-53.
80. Pyzik A., Grywalska E., Matyjaszek-Matuszek B. & Rolinski J. (2015) Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res* 2015, 979167.
81. Rawlings D.J., Metzler G., Wray-Dutra M. & Jackson S.W. (2017) Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 17, 421-36.
82. Recher M., Burns S.O., de la Fuente M.A., Volpi S., Dahlberg C., et al. (2012) B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood* 119, 2819-28.
83. Rowley R.B., Burkhardt A.L., Chao H.G., Matsueda G.R. & Bolen J.B. (1995) Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* 270, 11590-4.
84. Saijo K., Schmedt C., Su I.H., Karasuyama H., Lowell C.A., et al. (2003) Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol* 4, 274-9.
85. Sandel P.C. & Monroe J.G. (1999) Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289-99.
86. Sanz I., Wei C., Jenks S.A., Cashman K.S., Tipton C., et al. (2019) Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol* 10, 2458.

87. Scharenberg A.M., Humphries L.A. & Rawlings D.J. (2007) Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* 7, 778-89.
88. Schatz D.G. & Ji Y. (2011) Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 11, 251-63.
89. Seda V. & Mraz M. (2015) B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol* 94, 193-205.
90. Serény-Litvai T., Bajnok A., Temesfoi V., Nörenberg J., Pham-Dobor G., et al. (2022) B cells from anti-thyroid antibody positive, infertile women show hyper-reactivity to BCR stimulation. *Frontiers in Immunology* 13.
91. Sheehan P.M., Nankervis A., Araujo Junior E. & Da Silva Costa F. (2015) Maternal Thyroid Disease and Preterm Birth: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 4325-31.
92. Sokolove J., Bromberg R., Deane K.D., Lahey L.J., Derber L.A., et al. (2012) Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* 7, e35296.
93. Sze D.M., Toellner K.M., García de Vinuesa C., Taylor D.R. & MacLennan I.C. (2000) Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 192, 813-21.
94. Taylor J.J., Jenkins M.K. & Pape K.A. (2012) Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. *Trends Immunol* 33, 590-7.
95. Team R.C. (2023) A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>.
96. Ten Hacken E., Gounari M., Ghia P. & Burger J.A. (2019) The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 33, 287-98.
97. Thangaratinam S., Tan A., Knox E., Kilby M.D., Franklyn J., et al. (2011) Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ* 342, d2616.
98. Thien M., Phan T.G., Gardam S., Amesbury M., Basten A., et al. (2004) Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20, 785-98.
99. Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-81.

100. Ushijima J., Furukawa S. & Sameshima H. (2019) The Presence of Thyroid Peroxidase Antibody Is Associated with Lower Placental Weight in Maternal Thyroid Dysfunction. *Tohoku J Exp Med* 249, 231-6.
101. Vanderpump M.P., Tunbridge W.M., French J.M., Appleton D., Bates D., et al. (1995) The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43, 55-68.
102. Vines A., McBean G.J. & Blanco-Fernández A. (2010) A flow-cytometric method for continuous measurement of intracellular Ca²⁺ concentration. *Cytometry A* 77, 1091-7.
103. Vinuesa C.G., Sanz I. & Cook M.C. (2009) Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 9, 845-57.
104. Volpe R. (2000) B-lymphocytes in autoimmune thyroid diseases (AITD). *Rev Endocr Metab Disord* 1, 79-86.
105. Waisman A., Kraus M., Seagal J., Ghosh S., Melamed D., et al. (2007) IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *J Exp Med* 204, 747-58.
106. Weetman A.P. (1992) Autoimmune thyroiditis: predisposition and pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 36, 307-23.
107. Weetman A.P. (2010) Immunity, thyroid function and pregnancy: molecular mechanisms. *Nat Rev Endocrinol* 6, 311-8.
108. Weetman A.P. (2011) Diseases associated with thyroid autoimmunity: explanations for the expanding spectrum. *Clin Endocrinol (Oxf)* 74, 411-8.
109. Wei C., Anolik J., Cappione A., Zheng B., Pugh-Bernard A., et al. (2007) A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178, 6624-33.
110. William J., Euler C., Christensen S. & Shlomchik M.J. (2002) Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066-70.
111. Wu H., Wan S., Qu M., Ren B., Liu L., et al. (2020) The Relationship between PTPN22 R620W Polymorphisms and the Susceptibility to Autoimmune Thyroid Diseases: An Updated Meta-analysis. *Immunol Invest*, 1-14.
112. Wu Y.C., Kipling D. & Dunn-Walters D.K. (2011) The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol* 2, 81.

113. Xiaoheng C., Yizhou M., Bei H., Huilong L., Xin W., et al. (2017) General and Specific Genetic Polymorphism of Cytokines-Related Gene in AITD. *Mediators Inflamm* 2017, 3916395.
114. Xu Y., Harder K.W., Huntington N.D., Hibbs M.L. & Tarlinton D.M. (2005) Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 22, 9-18.
115. Zhang M., Srivastava G. & Lu L. (2004) The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol* 1, 89-94.
116. Zhong Y.P., Ying Y., Wu H.T., Zhou C.Q., Xu Y.W., et al. (2012) Relationship between antithyroid antibody and pregnancy outcome following in vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Med Sci* 9, 121-5.
117. Zhu P., Liu X., Labelle E.F. & Freedman B.D. (2005) Mechanisms of hypotonicity-induced calcium signaling and integrin activation by arachidonic acid-derived inflammatory mediators in B cells. *J Immunol* 175, 4981-9.
118. Zhu Q., Xu Q.H., Xie T., Wang L.L., Liu H., et al. (2021) Recent insights into the impact of immune dysfunction on reproduction in autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol* 224, 108663.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat alapjául szolgáló tudományos közlemények listája

Bajnok, A., **Serény-Litvai, T.**, Temesfoi, V., Nörenberg, J., Herczeg, R., Kaposi, A., Berki, T., and Mezosi, E. (2023). An Optimized Flow Cytometric Method to Demonstrate the Differentiation Stage-Dependent Ca(2+) Flux Responses of Peripheral Human B Cells. *Int J Mol Sci* 24. 10.3390/ijms24109107. *Független idézetek száma: 0, IF: 5,6*

Serény-Litvai, T., Bajnok, A., Temesfoi, V., Nörenberg, J., Pham-Dobor, G., Kaposi, A., Varnagy, A., Kovacs, K., Pentek, S., Koszegi, T., et al. (2022). B cells from anti-thyroid antibody positive, infertile women show hyper-reactivity to BCR stimulation. *Frontiers in Immunology* 13. 10.3389/fimmu.2022.1039166. *Független idézetek száma: 0, IF: 7,3*

Egyéb, a témában megjelent tudományos közlemény

Erdő-Bonyár, Sz., Simon, D., Bajnok, A., Nörenberg, J., **Serény-Litvai, T.**, Várnagy, Á., Kovács, K., Hantosi, E., Mezősi, E., and Berki, T. (2023). Physiological Changes in the Levels of Anti-Cytokine Autoantibodies in Early Pregnancy Are Missing in Pregnant Women with Hashimoto's Thyroiditis. *Journal of Immunology Research* 2023(2):1-7. 10.1155/2023/5221658. *Független idézetek száma: 0, IF: 4,1*

Egyéb megjelent tudományos közlemény

Prenek, L., **Litvai, T.**, Balazs, N., Kugyelka, R., Boldizsar, F., Najbauer, J., Berki, T. (2020). Regulatory T cells are less sensitive to glucocorticoid hormone induced apoptosis than CD4(+) T cells. *Apoptosis*, 25(9-10), 715-729. *Független idézetek száma: 15, IF: 4,677*

Pap, R., Ugor, E., **Litvai, T.**, Prenek, L., Najbauer, J., Nemeth, P., & Berki, T. (2019). Glucocorticoid hormone differentially modulates the in vitro expansion and cytokine profile of thymic and splenic Treg cells. *Immunobiology*, 224(2), 285-295. *Független idézetek száma: 8, IF: 2,788*

Összes független idézet száma: 23. Összesített IF: 24,465

Poszter prezentációk listája

Litvai T., Pap R., Berki T. Optimization of *in vitro* condition for regulatory T cell differentiation and expansion. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference, Pécs, 2019.

Litvai T., Pap R., Németh P., Boldizsár F., Berki T. Glukokortikoid hormon hatása a Ca^{2+} jelátviteli út aktivációjára T-sejt alcsoportokban. 49. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2019.

Litvai T., Pap R., Németh P., Boldizsár F., Berki T. Glucocorticoid hormone-induced Ca^{2+} signal changes in T cell subgroups. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 2019.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik az elmúlt években segítségükkel hozzájárultak dolgozatom elkészüléséhez.

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy lehetővé tette a kutatómunkába való bekapcsolódásomat az Immunológia és Biotechnológiai Intézetben, és támogatta munkám megvalósulását.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Mezősi Emesének, aki kezdetektől fogva támogatott és kiemelkedő szakmai tudásával és tapasztalatával hozzásegített munkám elkészüléséhez.

Hálásan köszönöm Dr. Bajnok Annának és Temesfői Viktóriának nélkülözhetetlen javaslataikat és a közösen végzett munkákat, amelyek alapvetően hozzájárultak a dolgozat, illetve a tudományos közlemények születéséhez. Hálás vagyok azért, hogy olyan csapatban dolgozhatok, ahol a közös munka során baráti kapcsolatok is kialakultak.

Köszönöm az Immunológia és Biotechnológiai Intézet minden volt és jelenlegi dolgozójának a segítségét, legfőképpen Soós Mónikának és Orbán Dánielnek, akikkel együtt dolgozhattam, és az ott töltött éveim során mindig biztosították számomra a szakmai tudást és háttérrel, illetve a jó munka hangulatát.

Köszönettel tartozom a Szentágothai Kutatóközpont valamennyi munkatársának a munkám során nyújtott segítségükért, és a pozitív munkahelyi légkörért, ami megkönnyítette feladataim elvégzését.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni családomnak, hogy mindig, minden pillanatban számíthattam támogatásukra.

Munkám a RRF-2.3.1-21-2022-00012 Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium projekt segítségével valósult meg.



Article

An Optimized Flow Cytometric Method to Demonstrate the Differentiation Stage-Dependent Ca²⁺ Flux Responses of Peripheral Human B Cells

Anna Bajnok^{1,2,3} , Tímea Serény-Litvai^{2,3,4} , Viktória Temesfői^{2,3,5} , Jasper Nörenberg^{1,2,6} , Róbert Herczeg^{2,3,7}, Ambrus Kaposi^{2,8}, Tímea Berki^{2,4} and Emese Mezosi^{2,9,*}

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; bajnok.anna@pte.hu (A.B.); jasper.norenberg@pte.hu (J.N.)

² National Laboratory on Human Reproduction, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

³ Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁴ Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁵ Department of Laboratory Medicine, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁶ Department of Medical Microbiology and Immunology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁷ Bioinformatics Research Group, Genomics and Bioinformatics Core Facility, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁸ Department of Programming Languages and Compilers, Faculty of Informatics, Eötvös Loránd University, 1053 Budapest, Hungary

⁹ First Department of Internal Medicine, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: mezosi.emese@pte.hu



Citation: Bajnok, A.; Serény-Litvai, T.; Temesfői, V.; Nörenberg, J.; Herczeg, R.; Kaposi, A.; Berki, T.; Mezosi, E. An Optimized Flow Cytometric Method to Demonstrate the Differentiation Stage-Dependent Ca²⁺ Flux Responses of Peripheral Human B Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9107. <https://doi.org/10.3390/ijms24109107>

Academic Editor: Marcella Reale

Received: 31 March 2023

Revised: 15 May 2023

Accepted: 16 May 2023

Published: 22 May 2023



Copyright: © 2023 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/>).

Abstract: Calcium (Ca²⁺) flux acts as a central signaling pathway in B cells, and its alterations are associated with autoimmune dysregulation and B-cell malignancies. We standardized a flow-cytometry-based method using various stimuli to investigate the Ca²⁺ flux characteristics of circulating human B lymphocytes from healthy individuals. We found that different activating agents trigger distinct Ca²⁺ flux responses and that B-cell subsets show specific developmental-stage dependent Ca²⁺ flux response patterns. Naive B cells responded with a more substantial Ca²⁺ flux to B cell receptor (BCR) stimulation than memory B cells. Non-switched memory cells responded to anti-IgD stimulation with a naive-like Ca²⁺ flux pattern, whereas their anti-IgM response was memory-like. Peripheral antibody-secreting cells retained their IgG responsivity but showed reduced Ca²⁺ responses upon activation, indicating their loss of dependence on Ca²⁺ signaling. Ca²⁺ flux is a relevant functional test for B cells, and its alterations could provide insight into pathological B-cell activation development.

Keywords: B-cell activation; calcium flux response; BCR responsivity; B-lymphocyte subsets

1. Introduction

Alteration in the Ca²⁺ flux response of B cells is associated with B-cell dysfunction, skewed humoral immune responses, autoimmune disorders, and B-cell malignancies [1–3]. Investigating the Ca²⁺ flux characteristics of peripheral human B cells to various stimuli may provide valuable insight into the activation process of B lymphocytes in health and disease. The intracellular Ca²⁺ concentration of lymphocytes results from carefully balanced active transport and gradient-driven changes influenced by multiple receptors and environment-sensing pathways [4]. The dynamic changes in the Ca²⁺ concentration act as a central signaling pathway capable of encoding and transducing a wide range of information, from apoptosis through tolerance to activation [2,5]. The distinct subsets of B cells have specific differences in how they react to signals and how the generated Ca²⁺ flux is decoded.

The diversity in responsiveness is directed by the surface receptor repertoire and the structure and intracellular environment of the BCR. The maturity of the cells fundamentally determines their ability to react, respond, differentiate, and survive [6,7].

In B lymphocytes, different essential surface receptors may initiate Ca^{2+} mobilization. The BCR is a membrane-bound Ig associated with other transmembrane proteins, and the genes encoding the immunoglobulin heavy-chain and light-chain proteins undergo constant recombination and maturation during B-cell development [8]. Upon BCR ligation, the associated CD79a and b are phosphorylated by the Src-family kinase (SFK) Lyn [9–11], leading to spleen tyrosine kinase (Syk) binding and phosphorylation [12]. Bruton's tyrosine kinase (Btk) is activated, which phosphorylates phospholipase C-gamma 2 (PLC γ 2), leading to the cleavage of phosphoinositide PI(4,5)P2 and the release of inositol-1,4,5,-triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) [13,14]. IP3 binds to its receptor on the endoplasmic reticulum (ER), leading to an initial release of Ca^{2+} from the intracellular stores that triggers the calcium-release-activated (CRAC) channels. The opening of the CRAC channels generates a prolonged Ca^{2+} influx from the extracellular space, constituting the plateau phase of the activation curve [15,16]. B lymphocytes can also be activated in a polyclonal, BCR-independent manner through highly mitogenic pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or other innate non-mitogenic stimuli [17].

Immature B cells in the bone marrow express an IgM-type BCR on their cell surface [18]. Transitional B cells that leave the bone marrow begin co-expressing an IgD-type BCR along the IgM with identical specificity [19]. IgD expression gradually increases throughout the transitional stages and reaches high levels in mature naive cells [20]. The dual expression of IgD and IgM BCR on B cells has been a long-standing riddle, and the function of IgD is still not completely clear [21]. Following antigen encounter, Ig class-switching and differentiation into memory cells or plasma cells (PCs) are induced [22]. CD27⁺ B cells can be further classified based on their IgD expression into IgD⁺ non-switched (NSw) and IgD⁻ Ig class-switched (Sw) memory cells. Sw memory cells originate from the germinal center response and express IgG, IgA, or IgE. Despite the similarities to IgG-expressing Sw memory cells, there is also substantial evidence to indicate that NSw memory cells could be the human equivalent of murine circulating marginal zone B cells [23]. Another distinction between CD27⁺ IgD⁻ Sw and CD27⁻ IgD⁻ double-negative (DN) cells can be made. Sw and DN memory subsets can differentiate into IgD⁻ CD27^{high} CD38^{high} plasmablasts (PBs) and PCs. The distinction between PBs and PCs is not obvious, not even when using CD138, which is considered to be a mature PC marker. Therefore, following the recommendation of Sanz et al., this population will be referred to as circulating antibody-secreting cells (ASCs) [24].

The Ca^{2+} signal can be considered the “master regulator” of most aspects of fate and function in B cells [1,3]. Emerging evidence indicates that modest alterations in BCR signaling are sufficient to promote autoimmunity in a B cell-intrinsic manner [3,25–29]. These observations have mainly been made in animal models of systemic autoimmunity. Several options are available for tracking the changes in the intracellular Ca^{2+} concentration of cells. Patch clamp methods allow for the precise characterization of Ca^{2+} flux on a single cell level [30] but do not provide the option to describe entire populations simultaneously. With the development of flow cytometric Ca^{2+} -responsive probes, real-time monitoring of the Ca^{2+} flux response of selected cell populations became possible. For instance, Fluo-3 and Fluo-4 are both widely used fluorescent Ca^{2+} indicators that are excited by the 488 nm laser with an emission spectrum in the low 500 nm range, but Fluo-4 is brighter, permeates the cell membrane better, and has a large dynamic range for reporting Ca^{2+} [31]. Therefore, we aimed to optimize a Fluo4-AM-based flow cytometric method to monitor the real-time changes in intracellular Ca^{2+} flux in the first 12 min of the activation of peripheral human B cells (Figure 1). Although flow cytometric Ca^{2+} flux measurements are commonly used to describe the functional characteristics of cells [32–34], we combined Ca^{2+} flux measurements with a B-cell-specific surface staining panel that can be expanded and adapted to specific immunopathological questions. Using an algorithm developed previously by our collaborators and adapted to support this study [Facskin [35,36]], functions were fitted to the activation dynamics. We investigated how commonly used B cell-activating agents influence the Ca^{2+} flux pattern of circulating B lymphocyte subsets in

healthy individuals. We tested the effect of anti-human IgG, IgM, IgG+M, ionomycin, CpG, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), IL-4, anti-CD40, and lipopolysaccharide (LPS) on the Ca^{2+} mobilization of B-cell subsets. Our goal was to optimize a method that can be utilized to study human peripheral B-cell subsets in pathological conditions such as autoimmune disorders or B-cell malignancies and the effects of treatments.

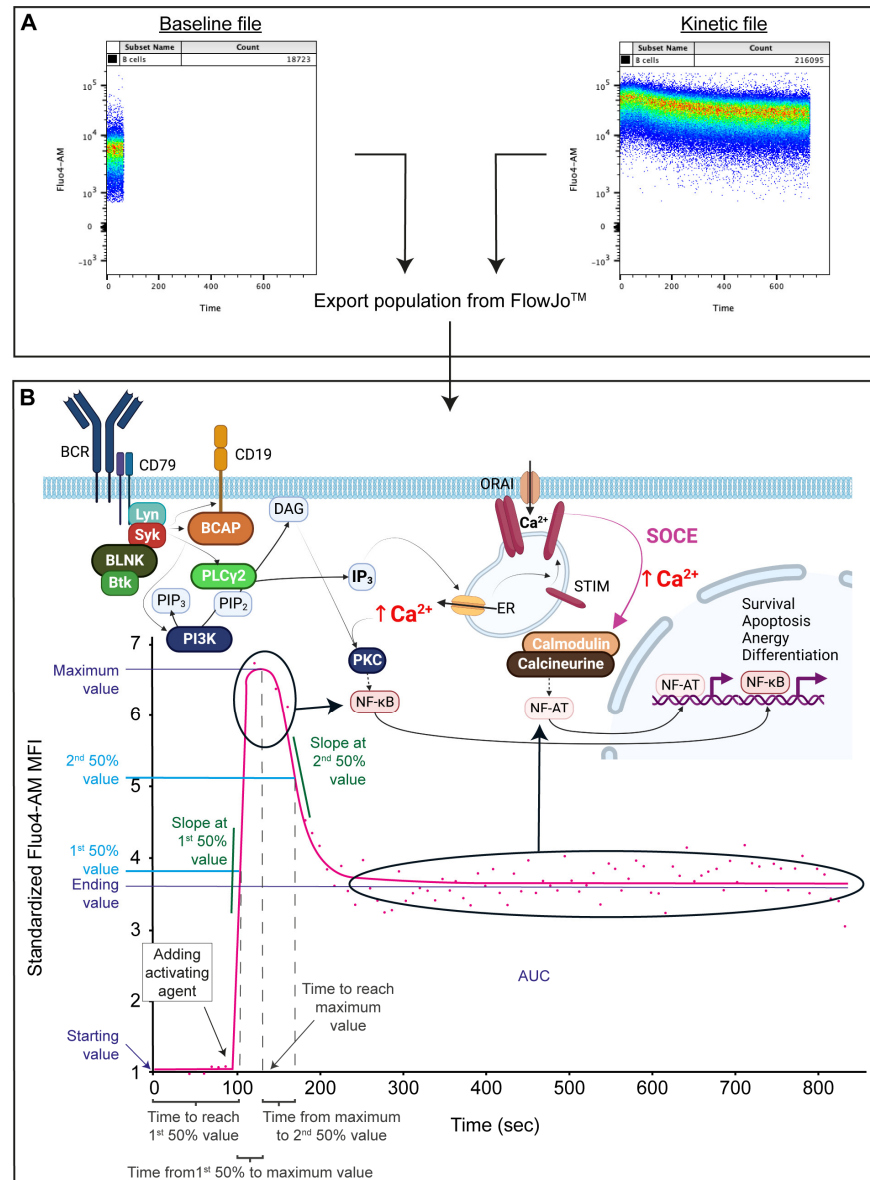


Figure 1. Calcium flux kinetics. **(A)** Export of gated B cell populations from baseline- and kinetic-file in FlowJo. **(B)** Simplified Ca^{2+} signaling pathway in B cells (upper panel) and schematic data output, visualizing the descriptive parameters generated by FacsKin. The tinted arrows indicate the relationship between specific parts of the activation curve and transcription factors. BCR: B-cell receptor, Lyn: Lck tyrosine kinase, Syk: spleen tyrosine kinase, BLNK: B-cell linker, Btk: Bruton’s tyrosine kinase, BCAP: B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase, PLC γ 2: phospholipase C γ 2, PIP $_2$: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, PIP $_3$: phosphatidylinositol-4,5-triphosphate, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, DAG: diacylglycerol, IP $_3$: inositol-1,4,5-triphosphate, PKC: protein kinase C, NF κ B: nuclear factor κ B, ER: endoplasmic reticulum, STIM: stromal interaction molecule, NFAT: nuclear factor of activated T cells, SOCE: store-operated Ca^{2+} entry, AUC: area under the curve. Standardized Fluor-4 AM MFI: standardized Fluor-4-AM median fluorescence intensity, where the baseline absolute MFI value of Fluor-4 AM is standardized to 1 and relative parameter alterations are shown on the Y axis.

2. Results

2.1. The Pattern of the Ca²⁺ Flux Kinetic Curves Corresponded with the Differentiation Stage of B Cell Subsets

Naive B cells showed lower levels of Ca²⁺ prior to activation compared to post-antigen-experienced subsets (NSw, Sw, ASC, Figure 2A). Over 98% of naive B cells expressed only IgM; consequently, anti-IgM, anti-IgG+M, and ionomycin evoked a Ca²⁺ flux response. Ionomycin induced a higher and prompter Ca²⁺ response than IgM (higher AUC, Max, and Ending values and lower time to reach the 50% value, Figure 2B,C and Figure 3, Supplementary Table S1).

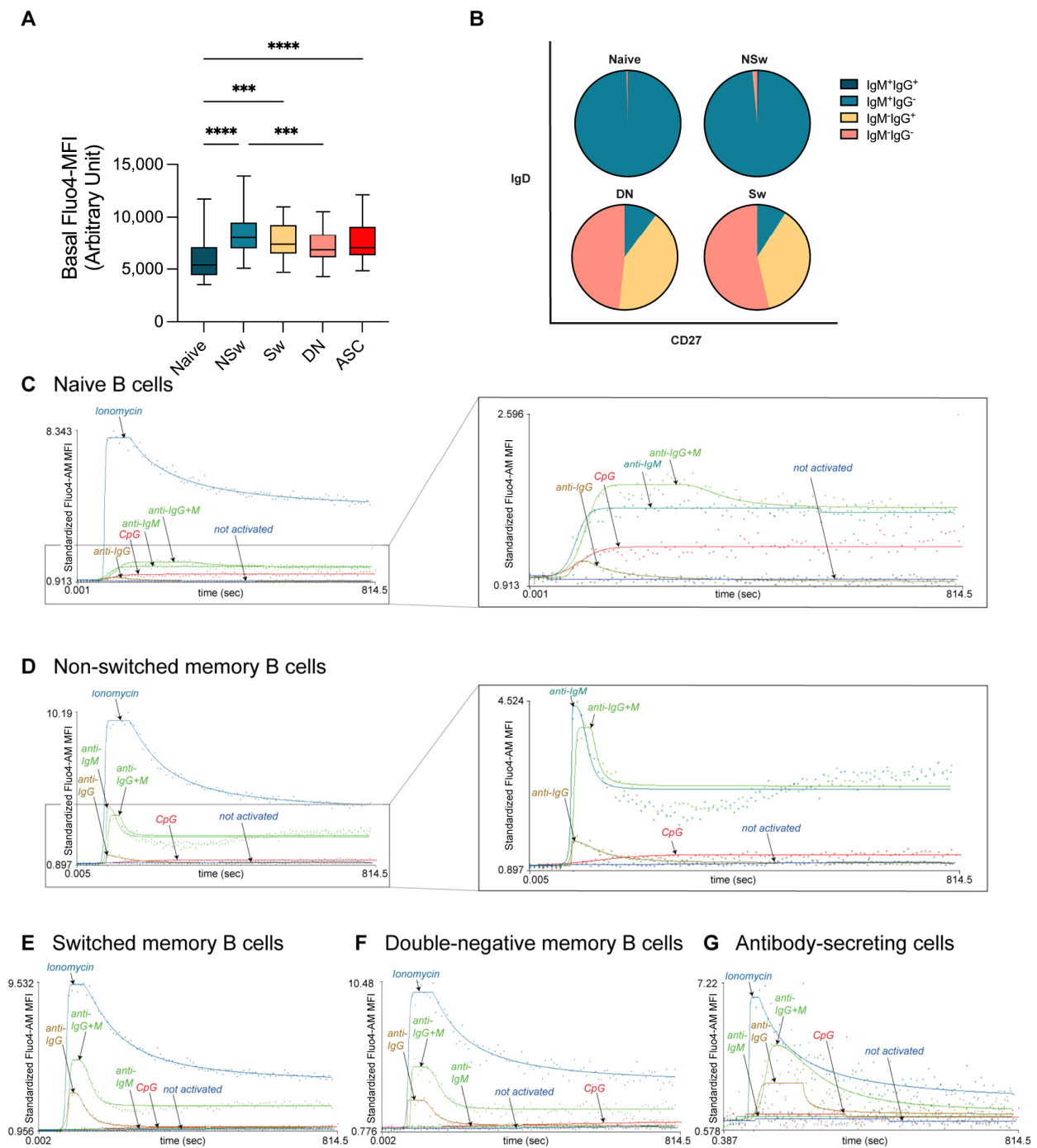


Figure 2. Immunoglobulin expression profile, baseline calcium level, and responsivity of B-cell subsets to various activating agents. (A) Baseline median fluorescence intensity (arbitrary unit) of

Fluo-4 in B-cell subsets ($n = 15$) depicted as boxplots. The middle line shows the median and the whiskers represent the 5th to 95th percentile. Statistical comparison between the groups was performed by Friedman test and multiple comparisons FDR-corrected after Benjamini and Hochberg. (B) Prevalence (%) of surface-immunoglobulin expression in B-cell subsets. X-axis: CD27 expression, Y-axis: IgD expression. Representative calcium flux kinetic curves of the responsivity of naive (C), non-switched memory (D), switched memory (E), double-negative memory (F), antibody-secreting cells (G) to stimulation via IgG with anti-human F(ab')₂ specific anti-IgG, via IgM with F(ab')₂ anti-human Fc5 μ specific anti-IgM, via IgG+M with anti-human F(ab')₂ IgG + IgM (H+L), CpG-B DNA, and ionomycin. X-axis: time (s), Y-axis: standardized Fluo-4-AM median fluorescence intensity, where the baseline absolute MFI value of Fluo-4 AM is standardized to 1 and relative parameter alterations are shown. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, NSw: non-switched; Sw: switched, DN: double negative memory B cells, ASC: antibody-secreting cells.

Within the memory subsets, NSw memory cells had the highest baseline Ca²⁺ level (Figure 2A). Over 97% of NSw memory cells expressed only IgM, and 1% expressed IgG along with IgM (Figure 2B). The NSw subset reacted to anti-IgM with a fast and intense response, which resembled the BCR-induced Ca²⁺ flux of IgG-expressing memory subsets (Sw and DN). Anti-IgG also slightly elevated the AUC and Max parameters in NSw cells compared to NA samples. However, as only around 1% of cells were shown to express IgG, this could be in part due to the cross-reactivity of the anti-IgG antibody to the IgM-type BCR. Ionomycin activation resulted in a higher and prompter Ca²⁺ response than IgM (higher AUC, Max, Ending values, 1st Slope, and lower time to reach 50%, Figure 2D, Supplementary Table S1).

Among Sw and DN memory cells, around 1/3 of cells expressed IgG, and around 9% expressed IgM, while over 50% had an IgM⁻ IgG⁻ phenotype, likely representing IgA-expressing memory cells (Figure 2B). Sw and DN memory cells responded to anti-IgG, anti-IgG+M, and ionomycin activation with similar Ca²⁺ flux curves. Ionomycin evoked a more robust and quicker Ca²⁺ flux compared to anti-IgG. Interestingly, the Ca²⁺ response produced by ionomycin resulted in a higher plateau phase, while the Ca²⁺ level after IgG binding declined quicker. Although about 10% of Sw and DN memory cells expressed only IgM, these subsets showed no response to anti-IgM stimulation (Figure 2E,F and Figure 3, Supplementary Table S1).

Little is known about the Ca²⁺ signaling of circulating antibody-secreting cells. In our experiments, ASCs reacted to anti-IgG, anti-IgG+M, and ionomycin activation but did not respond to anti-IgM. Anti-IgG and anti-IgG+M evoked elevated AUC and Max values compared to NA. Ionomycin activation resulted in higher AUC, Max, 1st Slope, and Ending and lower time to reach the 1st 50% values compared to NA and anti-IgG (Figures 2G and 3, Supplementary Table S1).

Upon anti-IgG+M stimulation, all memory B-cell subsets reached higher AUC, Max, and Ending values than naive B cells. The Max Ca²⁺ level of NSw memory B cells remained lower compared to Sw and DN memory B cells (Figures 3 and 4A, Supplementary Table S2).

ASCs are known to down-regulate their cell surface Ig expression [24]. Therefore, it is intriguing that we were able to stimulate peripheral ASCs via their IgG receptor. However, they did show a distinct Ca²⁺ flux pattern compared to memory subsets. Despite their IgG expression, their Max value remained lower than Sw and DN memory subsets, and they had a prolonged response to BCR stimulation. After the peak, the intracellular Ca²⁺ level decreased gradually and almost returned to the baseline by the end of the measurement without a clear plateau phase (Figure 4A). As the plateau phase of the Ca²⁺ flux is indispensable for *c-Myc* expression [2], which is repressed when B cells differentiate into ASCs [37], our findings align with physiological changes during B-cell differentiation.

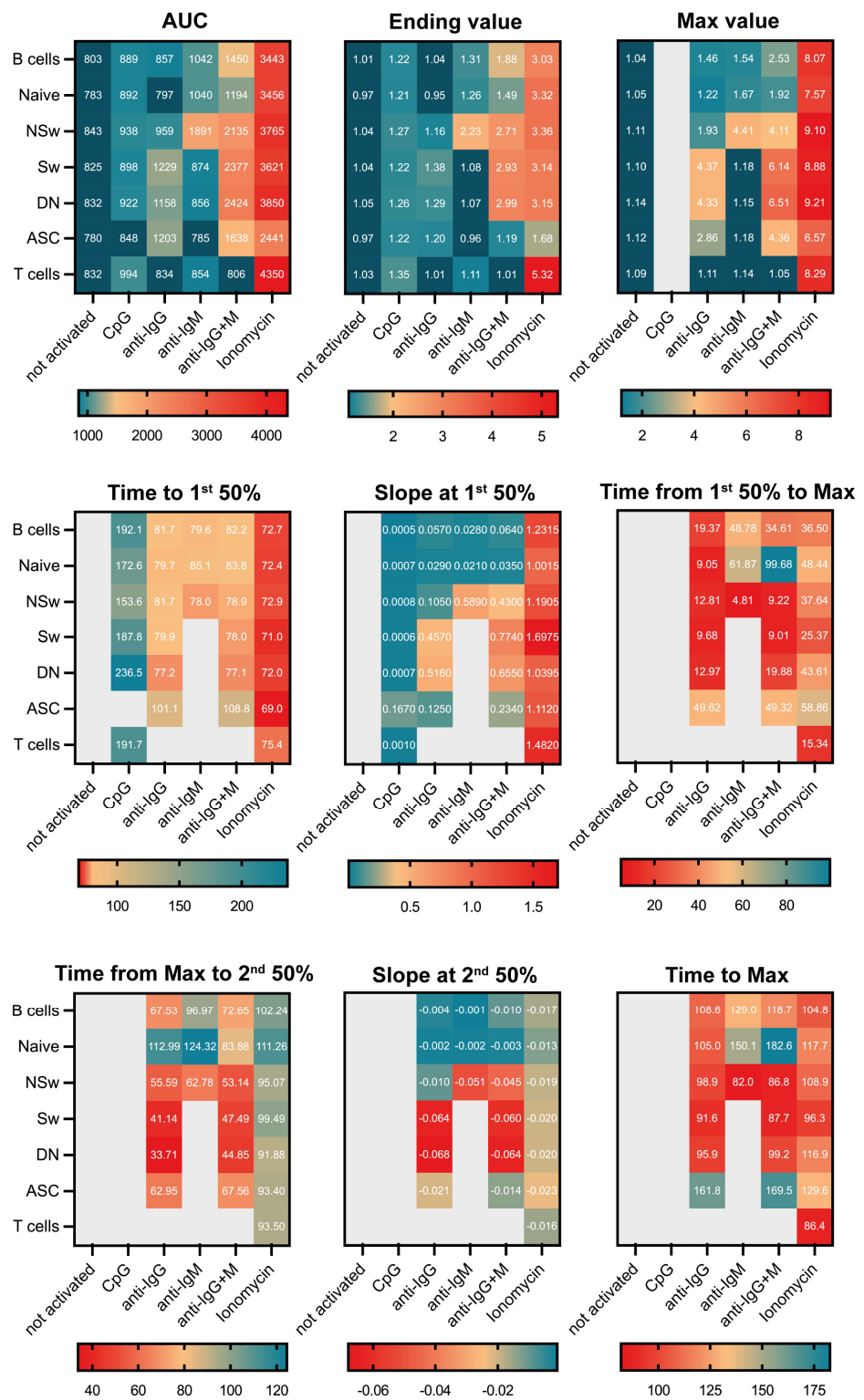


Figure 3. Heat map of all kinetics parameters. Heat map from the median values of kinetic curve parameters in B cells, T cells, and B-cell subsets in non-activated samples and response to CpG, anti-IgG, anti-IgM, anti-IgG+M, and ionomycin stimulation collected from 15 healthy individuals. The AUC: area under the curve, Ending, and Max parameters were expressed in arbitrary units, time parameters in seconds, and the slope parameters in MFI (median fluorescent intensity) change/second. Those parameters that cannot be calculated or are biologically irrelevant (i.e., T cells do not respond to anti-IgG+M) were left grey.

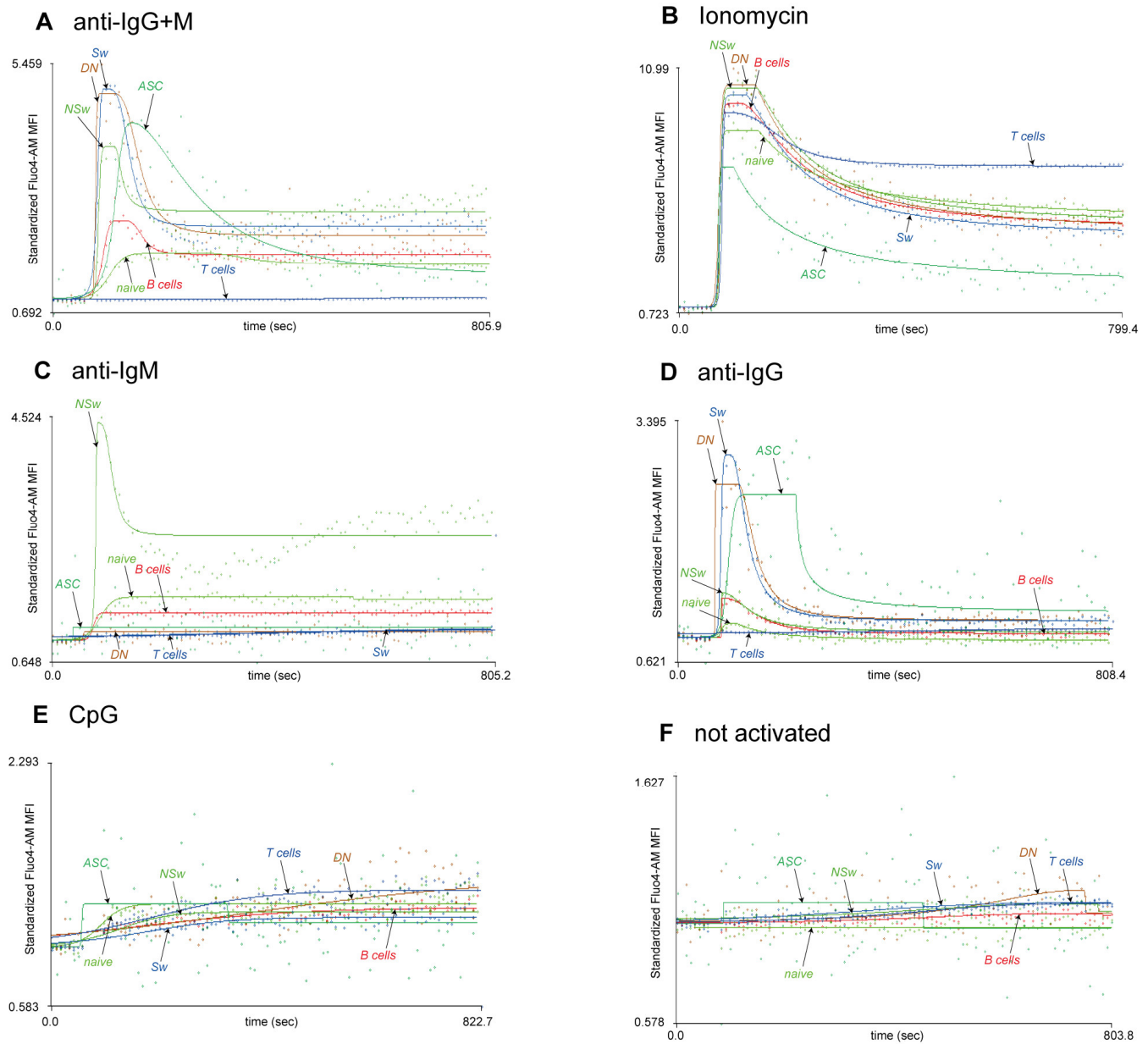


Figure 4. Comparison of the responsivity of B-cell subsets to each activating agent. Representative calcium flux kinetic curves of the responsivity of naive, NSw: non-switched memory, Sw: switched memory, DN: double-negative memory, and ASC: antibody-secreting cells to stimulation with anti-human F(ab')₂ IgG + IgM (H+L) (A), ionomycin (B), F(ab')₂ anti-human Fc5μ-specific anti-IgM (C), anti-human F(ab')₂ specific anti-IgG (D), and CpG-B DNA (E). The kinetic curves of samples where no activating agent was added are also presented for comparison (F). X-axis: time (s), Y-axis: standardized Fluo-4-AM median fluorescence intensity, where the baseline absolute MFI value of Fluo-4 AM is standardized to 1 and relative parameter alterations are shown.

The ionomycin-induced Ca²⁺ mobilizing capacity of circulating antibody-secreting cells was lower compared to the other subsets (lower AUC, Max, and Ending values). No differences were found in the activation speed between the subsets after ionomycin stimulation. The max value of naive B cells was lower, and their 1st Slope was less steep than DN and Sw memory B cells (Figures 3 and 4B, Supplementary Table S2).

When comparing the IgM responsivity of subsets, we found that non-switched memory cells responded stronger to anti-IgM activation than naive B cells. NSw memory cells had

significantly higher AUC, Max, 1st Slope, and Ending and lower time to reach the 1st 50% values in response to anti-IgM stimulation than naive cells (Figure 4C, Supplementary Table S2).

CpG led to a moderate, gradual increase in the intracellular Ca^{2+} level of B-cell subsets. We found a gradual increase in the MFI of Fluo-4 during the observation period after adding 10 μM of CpG to the samples. Lower concentrations of CpG did not induce any Ca^{2+} signal. Understandably, the Ending value was the most sensitive parameter regarding responsivity to CpG, and ending values were significantly higher compared to not-activated samples in all subsets except for ASCs (Figures 3 and 4E, Supplementary Table S2).

2.2. B Cell Subsets Expressing IgG-Type BCR Were More Sensitive to Stimuli Than IgM-Expressing Cells

To compare the BCR-reactivity of B-cell subsets, we used a titration series of anti-IgG+M from 0.1 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sw, DN memory cells, and ASCs were more sensitive to anti-IgG+M stimulation than naive and NSw memory cells. DN and Sw memory cells responded to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-IgG+M and reached higher Max values at every concentration (Figure 5A). Their EC50 value was lower compared to other subsets (Figure 5B). Regarding the Max value, the titration curve of the NSw memory subset was between IgG-expressing memory B cells and naive B cells, and this subset reached the EC50 value at the highest concentration (Figure 5A,B). Naive cells gave the lowest response to anti-IgG+M stimulation, and their Max values were comparable to those of ASCs (Figure 5B).

The Ending value represents the plateau phase of the activation, which is the consequence of the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) mechanism. The plateau phase developed earlier in IgG-expressing memory subsets. DN and Sw memory cells already exhibited a plateau phase at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-IgG+M, while NSw and Naive cells first showed a plateau phase at around 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Figure 5A). The peak of the Ending value was similar in all memory subsets (NSw, Sw, and DN). However, the EC50 value was the lowest in the DN population, higher in Sw cells, and the highest in NSw memory cells. ASCs showed a much lower plateau phase than memory subsets (Figure 5C).

2.3. $\text{CD}27^-$ Naive Cells Gave a Robust Calcium Flux Response to Stimulation via Their IgD Receptor That Curbed Their Responsivity to Subsequent Anti-IgD and Anti-IgM Stimulation

The cell surface IgD expression is essential to distinguish B-cell subpopulations, as it is the only way of differentiating NSw from Sw memory cells and naive cells from DN memory cells. We wanted to characterize how this labeling process impacts the responsivity of B-cell subsets to further stimulation via the BCR. IgD had to be left out of the staining to answer this question, and we could only differentiate naive and memory cells based on their CD27 expression. Technically, the $\text{CD}27^-$ compartment also contains the DN memory cells. However, the average prevalence of naive cells is 12 times higher. Thus, we assumed that the kinetic curves fitted to the group's median signal mainly represented the naive population's response. The memory compartment contained both NSw and Sw memory cells, of which only the NSw memory cells responded to anti-IgD and anti-IgM. However, as the kinetic curves are fitted to the alteration of the median fluorescent signal of a population, the change in the MFI value generated by the response of NSw cells to anti-IgD and anti-IgM was sufficient to evaluate the effect of anti-IgD pre-treatment.

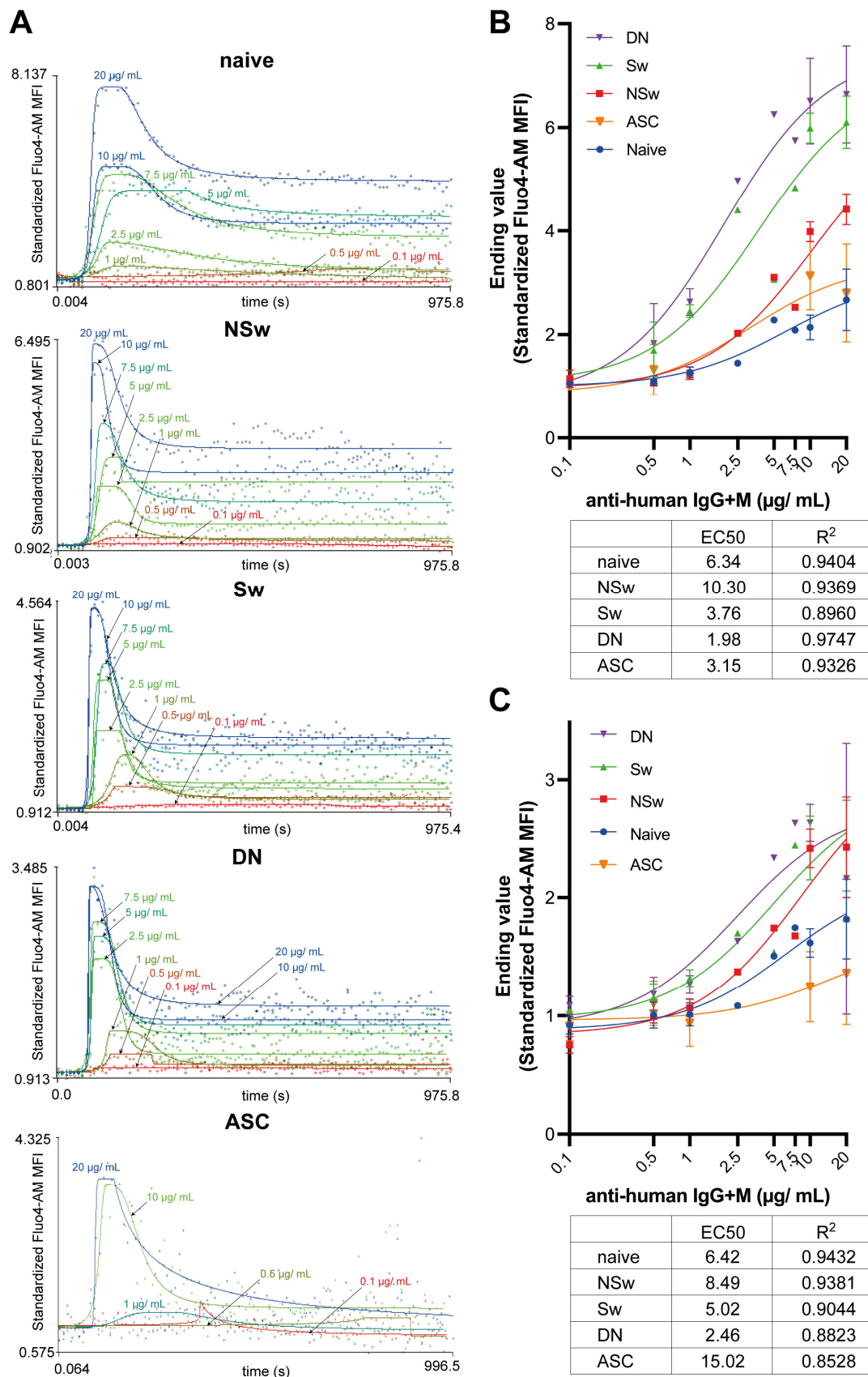


Figure 5. Titration of anti-human IgG+M on B-cell subsets. (A) Representative calcium flux kinetic curves of B-cell subsets in response to increasing concentrations of F(ab')₂ anti-human IgG+M. Each

curve was fitted to the median of the fluorescent signal of the selected B-cell subpopulation. X-axis: time, Y-axis: standardized Fluo-4-AM median fluorescence intensity, where the baseline absolute MFI value of Fluo-4 AM is standardized to 1 and relative parameter alterations are shown. Unstimulated controls were acquired for the first 60 s; activated samples were recorded for 15 min (900 s). (B) Comparison of Max values reached in different B-cell subsets in response to increasing concentrations of F(ab')₂ anti-human IgG+M. X-axis: concentrations of anti-human IgG+M in logarithmic scale, Y-axis: standardized maximum value of Fluo-4 MFI. (C) Comparison of Ending values detected during the plateau phase of activation in different B-cell subsets following stimulation by increasing concentrations of F(ab')₂ anti-human IgG+M. X-axis: concentrations of anti-human IgG+M in logarithmic scale, Y-axis: standardized Ending value of Fluo-4 MFI. Nonlinear curve fitting was performed as a dose–response stimulation/[agonist] vs. response model in GraphPad Prism 9. R squared for goodness-of-fit of each curve and calculated EC50 values are shown in the respective table.

The anti-IgD pre-treatment almost wholly abolished the responsivity of CD27[−] naive cells to anti-IgD (Figure 6A) and markedly decreased their response to anti-IgM stimulation (Figure 6B). The anti-IgD pre-treatment also significantly changed the shape of the subsequent kinetic curve of naive B cells generated by anti-IgM addition, prolonging the response time, curbing the max value, and decreasing the height of the plateau. Interestingly, the response time was not extended by the consequent IgD stimulation on naive cells, suggesting a different mechanism of action in inhibiting the two Ig receptors.

CD27⁺ memory B cells—containing both the NSw and Sw memory compartment—could also be activated by anti-IgD antibodies. The pre-treatment with anti-IgD resulted in a curbed max value but no alteration in the plateau phase (ending value) in the consequent anti-IgD stimulation in memory cells (Figure 6C). The anti-IgD pre-treatment decreased the Ca²⁺ flux response of memory cells to anti-IgM, but the pattern of the kinetic curve remained similar to the not-preactivated curve (Figure 6D).

When comparing the Ca²⁺ flux response of not-preactivated CD27⁺ memory cells to anti-IgD and anti-IgM stimulation, the Ca²⁺ flux curve after anti-IgM stimulation showed a memory-type response with a higher plateau phase. At the same time, the Ca²⁺ flux curve generated by anti-IgD stimulation resembled the pattern of naive cells with a continuously decreasing, lower plateau phase (Figure 6E). This observation further supports the different roles of IgD- and IgM-type BCR.

Unlabeled anti-IgD caused an elevation in the baseline Ca²⁺ level of CD27[−] naive B cells but not in CD27⁺ memory cells. Despite this increase due to pre-treatment, the basal Ca²⁺ level of naive cells remained lower compared to memory B cells (Figure 6F).

Naive B cells expressed more cell surface IgD than NSw memory cells (Figure 6G). Contrary to previous beliefs, we found that when omitting anti-IgD pre-treatment, CD27[−] naive B cells were more responsive to BCR stimulation than CD27⁺ memory B cells. CD27[−] naive cells showed higher peak intracellular Ca²⁺ levels following anti-IgD activation than CD27⁺ memory B cells after anti-IgG+M stimulation. CD27[−] naive cells' IgD responsivity was two-fold higher than their IgM responsivity, and the latter remained lower compared to memory subsets (Figure 6H). The naive cells showed a different Ca²⁺ flux kinetic pattern than memory subsets; after a high peak (max value), they reached a lower plateau, showing a gradual, slow decrease until the end of the measurement period.

Stimulation with ionomycin reflects the total Ca²⁺ mobilizing capacity of the cells. Pre-treatment with anti-IgD decreased the AUC of the subsequent kinetic curve generated by ionomycin stimulation in naive cells but not memory B cells (Figure 6I). However, both naive and memory subsets responded with an intense Ca²⁺ flux to subsequent ionomycin stimulation after anti-IgD pre-treatment, indicating that the altered IgM responsivity of naive B cells was not due to the exhaustion of the Ca²⁺ stores.

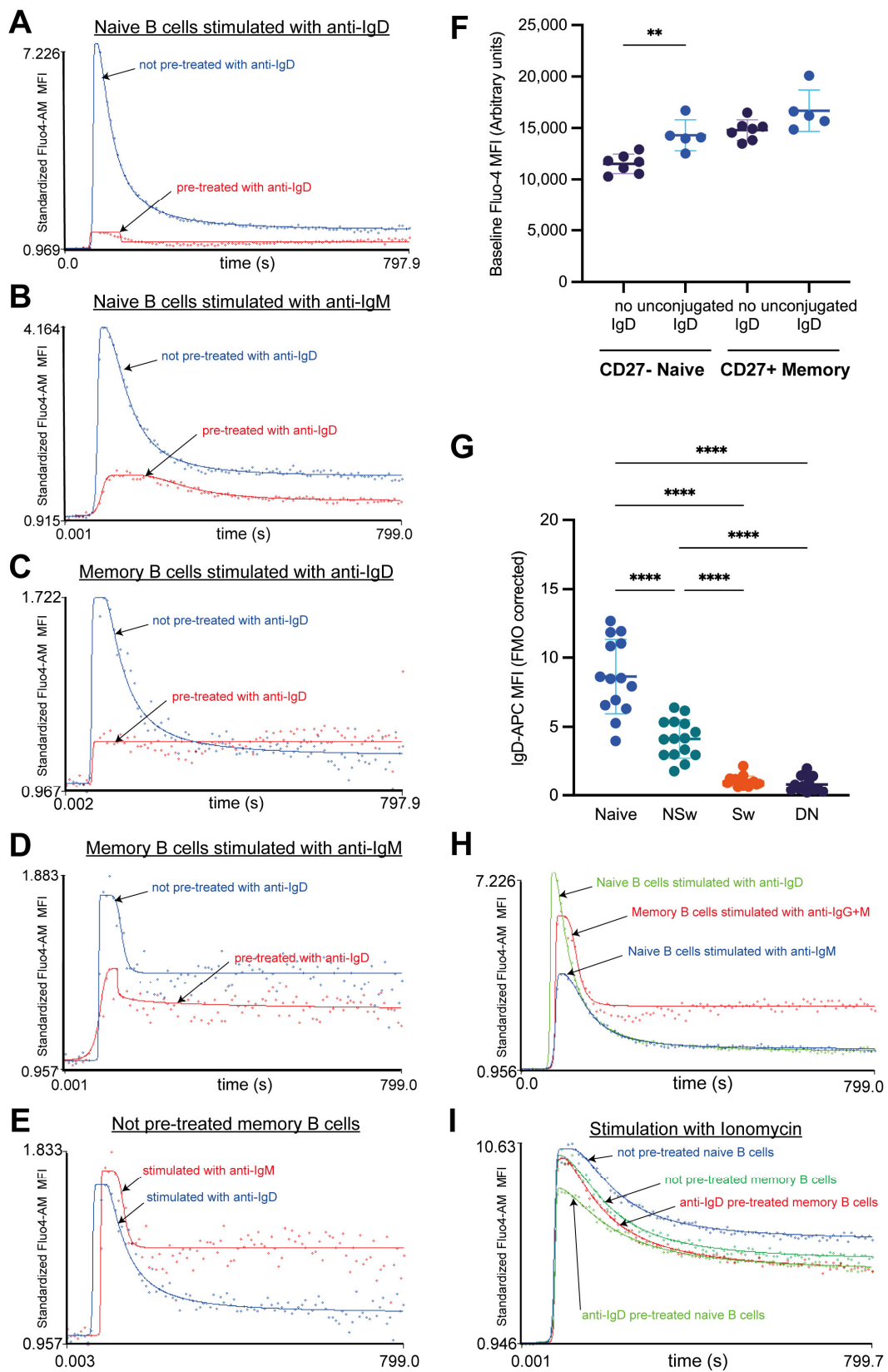


Figure 6. The pre-activating effect of anti-IgD labeling. Representative calcium flux kinetic curves to demonstrate the pre-activating effect of anti-IgD labeling on the (A) anti-IgD⁻, (B) anti-IgM responsivity of naive B cells; (C) anti-IgD⁻, (D) anti-IgM responsivity of CD27⁺ memory B cells. (E) Representative curves to compare the calcium flux kinetic pattern of CD27⁺ memory B cells (not

pre-activated) to anti-IgD and anti-IgM stimulation. X-axis: time, Y-axis: standardized Fluo-4-AM median fluorescence intensity, where the baseline absolute MFI value of Fluo-4 AM is standardized to 1 and relative parameter alterations are shown. Unstimulated controls were acquired for the first 60 s for baseline, and activated samples were recorded for 12 min (720 s). (F) The effect of anti-IgD labeling on the baseline calcium level (represented by the median fluorescent intensity (MFI) of Fluo-4 during baseline acquisition). Each dot represents a separate measurement, all from one healthy individual, the middle line represents the mean of MFI values, and whiskers are set to the SD. (n = 7 no IgD labeling, n = 5 treated with unconjugated anti-IgD, all from one individual). Statistical comparison between the groups was performed by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (G) The expression of IgD in B-cell subsets was calculated by normalizing the MFI of APC to the fluorescent minus one (FMO) control (Sample-MFI/FMO-MFI) of each subset. Data are presented as mean \pm SD; each dot represents the median value of all measurements from one individual, n = 16. X: B-cell subsets, Y: relative parameter value. Statistical comparison between the groups was performed by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (H) Representative calcium flux kinetic curves to demonstrate the responsiveness of not-preactivated naive (CD27⁻) B cells to anti-IgD and anti-IgM and of not-preactivated memory (CD27⁺) B cells to anti-IgG+M. (I) Comparison of the responsiveness of naive (CD27⁻) and memory (CD27⁺) B cells to ionomycin stimulation with and without anti-IgD pre-treatment. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, NSw: non-switched; Sw: switched, DN: double negative memory B cells, ASC: antibody-secreting cells.

3. Discussion

Intracellular Ca²⁺ flux acts as a central signaling pathway capable of encoding and transducing distinct BCR signaling with compelling biological and pathological consequences [2]. It is modulated by a complex interplay between various receptors and mechanisms [1,4], all contributing to a distinct Ca²⁺ flux pattern characteristic of the developmental stage and the functional status of B cells. This makes Ca²⁺ flux an ideal functional assessment for B cells. As mutations in the BCR signaling pathway, notably those that alter Ca²⁺ mobilization, are associated with autoimmune disorders and B-cell malignancies [1–3], Ca²⁺ flux measurements could provide further insights into disease-associated B-cell dysfunction. However, experimental design on clinical samples often necessitates tailoring protocols to match the resources available in clinical settings.

Here we present a practical approach that allows measuring the Ca²⁺ flux characteristics of selected B-cell subpopulations by combining classical Ca²⁺ flux measurements with cell-surface staining that can be tailored to specific immunological questions. Adding cell-surface staining allows a better definition of subpopulations by gating; however, detailed panel design and considering technical artifacts are pivotal. In this publication, we used a widely accepted gating method to identify naive and various subsets of memory B cells in combination with Fluo-4-AM as a Ca²⁺ indicator. To the best of our knowledge, this is the first study where a comparative analysis of the commonly used B cell-activating agents was performed and the Ca²⁺ flux responses of circulating human B-cell subpopulations were assessed.

Regarding experimental design, no “one size fits all” approach is available in Ca²⁺ flux measurements, as the research question, resource availability, and technical possibilities must be considered during the planning phase. The cytometer at hand largely determines the choice of Ca²⁺ indicator and the platform of post-measurement analysis. While ratiometric dyes such as Fura-2 or Indo-1 are an optimal first choice, they can only be used on cytometers equipped with a UV laser, which is not widely available. Single-wavelength dyes such as Fluo-4 AM can be a good alternative for cytometers without a UV laser; however, as they are not developed for quantitative measurements, only relative comparisons should be made on such data. As a next step, the fluorescence signals of Ca²⁺ dyes have to be normalized to allow the comparison of the fluorescent signal changes between subsets and experiment days. With ratiometric dyes, dividing the fluorescent signals of the Ca²⁺-bound and -free states is enough.

On the other hand, the fluorescent signal should be divided by the average resting fluorescence for single-wavelength dyes, making the acquisition of a baseline Ca^{2+} signal necessary [38]. This raises the following question regarding the build of the cytometer and whether the sample tube can be accessed during the acquisition. As many cytometers do not have this option, the tube must be removed after the baseline measurement to add the activating agent. Regardless of whether the sample tube is removed, the time point when the activating agent was added has to be recorded precisely for the accurate generation of kinetic parameters. This function is not available in the commonly used acquisition software. When measurement data are appended after the removal of the sample tube, the time parameter is recorded automatically and cannot be modified afterward during the analysis, leading to a distortion of the kinetic data. Compared to other kinetic analysis platforms, Facskin solves this problem by offering the option to input the precise time from activation to measurement manually. Facskin also has a built-in normalization function that can be adjusted to the measured baseline's length, facilitating the data analysis and comparability of different subpopulations, measurement days, and activating agents.

Other than the smoothing method commonly used by kinetic analysis platforms, Facskin uses an algorithm to fit functions to the kinetic changes of the Ca^{2+} signal, making a precise mathematical description of the Ca^{2+} signal possible. The way Ca^{2+} signals are interpreted as specific cellular responses involves decoding the changes in the concentration, amplitude, steepness, and duration of the response [4]. Facskin generates parameters to describe each distinct aspect of the activation. The Max value reflects the peak of the Ca^{2+} signal, which selectively activates the nuclear factor kappa B and the c-Jun N-terminal kinase pathways [39]. The Max value is also the parameter that shows the reactivity of a given subset to an activating agent the most precisely. The Ending value in this experimental setup (12 min of observation) reflects the Ca^{2+} level during the plateau phase of the activation curve, which is a consequence of sustained extracellular Ca^{2+} entry via the CRAC channels. This lower, sustained plateau selectively stimulates the nuclear factor of the activated T cell (NFAT) pathway [1,39]. The time to reach the 1st 50% value is the most sensitive parameter to determine how fast a cell type reacts to a given activating reagent. The slope parameter at the 1st 50% closely relates to the distinct activating agent. The AUC value shows the total Ca^{2+} mobilizing ability of the given subset in response to a specific activating stimulus.

The research question should determine the choice of activating agent, as we demonstrate here the differences in the responsivity of B-cell subsets to various activating agents. In our experiment, naive B cells responded to anti-IgM and anti-IgG+M with a smaller, slower, and more prolonged Ca^{2+} flux response than all memory subsets. NSw cells had the highest baseline Ca^{2+} level; it was higher both compared to naive and other memory B subsets. These cells gave a strong and fast Ca^{2+} flux response to anti-IgM but not anti-IgG. Despite using IgM as a BCR, NSw cells did not respond like naive cells but showed a Ca^{2+} flux kinetic pattern like the IgG-type BCR (Sw and DN) memory subsets. However, their Max value remained lower, consistent with the differences between IgM- and IgG-type BCR [40,41]. Sw and DN memory cells only responded to anti-IgG (and anti-IgG+M) despite containing approximately 10% of IgM-expressing cells. IgG-responding Sw and DN memory cells had similar basal Ca^{2+} levels, and their Ca^{2+} flux response curve pattern was almost identical. It is important to note that in both Sw and DN compartments, about half of the cells do not express IgM or IgG, likely corresponding to IgA memory cells, which should be considered in an experimental setup aiming to dissect the Ca^{2+} flux responses of B-cell memory subsets. On the other hand, when seeking to assess all large B-cell subsets parallelly, the F(ab')_2 fragment anti-human IgG + IgM (H+L) used in our experimental setup, can be an ideal choice, as it shows cross-reactivity to all human Ig subtypes, providing an adequate activating signal to all B-cell subsets.

Ionomycin causes rapid Ca^{2+} mobilization from the intracellular stores, followed by SOCE, and can be an ideal choice for monitoring the total Ca^{2+} mobilizing capacity of different B-cell subsets. However, the Ca^{2+} flux curve pattern after ionomycin activation

differs from activation via the BCR. In our experiments, ionomycin caused a faster and several times higher peak Ca^{2+} flux and plateau in all subsets compared to anti-IgM or anti-IgG. This sustained, increased Ca^{2+} flux could be connected to the strong NFAT-activating effect of ionomycin [42]. Overall, using 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ionomycin leads to a markedly stronger activation response than the BCR-induced Ca^{2+} flux and may result in more robust NFAT activation than anti-IgG+M.

Cell-surface labeling combined with Ca^{2+} flux measurements can have many advantages compared to defining cell populations by methods such as cell sorting. For instance, certain peripheral memory B-cell subsets are rare, and cell sorting would not yield enough cells for functional studies. This is especially important with clinical samples, where taking large volumes of blood from patients with autoimmunity or malignancies would be unethical. Cell surface staining also allows us to study the effect of various continuously expressed markers on Ca^{2+} flux (such as CD38 or CD25) or gate based on the expression of multiple markers. Automated gating strategies and clustering algorithms can also be utilized when increasing the number of cell-surface markers. However, cell-surface labeling can also distort the cells' responsiveness to stimuli, as demonstrated here in the case of naive B cells.

Defining B-cell subpopulations based on their CD27 and IgD expression is the most common approach; however, in our experiments, anti-IgD-labeled naive B cells gave a much smaller, slower, and more prolonged Ca^{2+} flux response to anti-IgG+M compared to all memory subsets. This curbed response could be the consequence of the robust Ca^{2+} signal generated by the anti-IgD labeling, which not only decreased the responsiveness of naive B cells to subsequent stimulation via IgD but also IgM. This anti-IgD pre-treatment seemed to have a minor effect on NSw memory cells. Surprisingly, when leaving the anti-IgD labeling out and only using CD27 to differentiate between naive and memory B cells, we found that naive cells showed a higher Ca^{2+} flux response to BCR stimulation than memory subsets. This contradicts the common hypothesis that naive B cells are less responsive to stimuli. Both with and without anti-IgD pre-treatment, naive B cells showed a distinct Ca^{2+} flux pattern compared to memory B cells. Furthermore, this naive Ca^{2+} flux pattern was conserved in the IgD-induced response of NSw memory cells, whereas their IgM-evoked response shifted to the memory pattern, resulting in a higher plateau during the SOCE. This further supports the separate role of IgD and IgM engagement in B cells and substantiates that the observed differences between naive and memory subsets are not just the consequence of the Ig-type of the BCR.

These findings underline the need to consider the research objective carefully during experimental design. If understanding the Ca^{2+} flux characteristics of naive B cells is the primary aim, we recommend leaving IgD out of the cell-surface panel and instead using CD27, CD24, and CD38 to define subsets and anti-IgM and anti-IgD as activating agents. Such labeling cannot separate memory subsets, but naive and transitional B-cell compartments can be well defined. On the other hand, when aiming to dissect the responsiveness of various B-cell memory subsets, IgD, CD27, and CD38 are appropriate markers for population definition, while anti-IgM, anti-IgG, and anti-IgA could be used as activating agents [24].

After selecting the activating agent, the distinct activation thresholds of functionally different B-cell subsets should also be considered, as demonstrated here with the titration of anti-IgG+M. We measured a point above which a clear plateau phase appears, indicative of the "all or nothing" phenomenon attributed to the SOCE. Above this threshold, the plateau level continued to increase dose-dependently. We observed a lower threshold for activation in IgG-expressing memory B-cell subsets (Sw and DN memory cells) compared to both IgM-expressing NSw memory cells and naive cells. This inherent difference encoded in the BCR type is connected to the function of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) [41]. While Grb2 plays a role in the assembly of the inhibitory signalosome in the membrane-bound IgM-type BCR, it also has an activating and signal-amplifying effect by stabilizing the Ca^{2+} signaling scaffold in the membrane-bound IgG-type BCR [1,40]. This mechanism is

presumed to increase the antigen sensitivity of the IgG-type BCR by lowering the activation threshold [40], and we confirmed this in human peripheral B-cell subsets.

Studying the Ca^{2+} flux of B-cell subsets provides insight into their functional status, which could be an essential driving mechanism for B-cell-mediated autoimmune conditions. Here we present an optimized flow cytometric approach to characterize the Ca^{2+} flux characteristics of human peripheral B-cell subsets. Combining a gating strategy based on cell-surface staining and kinetic Ca^{2+} flux measurements within a single tube can reduce work time, necessary sample volume, and associated costs. These are critical considerations in creating the opportunity to conduct Ca^{2+} flux studies on patient samples. Standardization methods and simplifying resources increase the availability of clinical research and multi-centric studies, facilitating the investigation of rare conditions. We demonstrate that different activating agents trigger distinct Ca^{2+} flux responses, and the features of the Ca^{2+} flux curves correlate with the differentiation stage of B-cell subsets. These findings from healthy individuals' B cells should be considered when designing experiments to investigate B-cell function in immunopathological conditions.

4. Materials and Methods

4.1. Human Subjects

Our study was approved by the Regional Research Ethics Committee of the Medical Center, University of Pécs (RIKEB 5913/2015), and written informed consent was obtained from all participants. The study adhered to the tenets of the most recent revision of the Declaration of Helsinki. Twenty healthy adult volunteers were enrolled after signing the informed consent form (10 women and ten men). Subjects took no regular medications, had no history of illness, received no vaccines three months before enrollment, and had no infections one month before sampling. Peripheral venous blood samples were collected in six 10 mL lithium heparin tubes (for step-by-step sample preparation instructions, see protocol in Supplementary Materials).

4.2. Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Peripheral human blood samples were collected in lithium-heparin-treated tubes. Samples were diluted with phosphate-buffered saline (PBS) in a ratio of 1:3, and mononuclear cells were isolated using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) gradient centrifugation. Cells were then washed twice and resuspended in RPMI 1640 containing 5% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for labeling.

4.3. Cell Surface Labeling

Freshly isolated human PBMCs were directly labeled. Acquisition and labeling times were standardized throughout the protocol. All of the used materials are summarized in Supplementary Table S1. B-cell subsets were defined as follows: CD3-PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein, Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA) was used for T cell exclusion, CD19-PE (Phycoerythrin, Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA) as the B-cell lineage marker, CD27-PE-Cy7 (Phycoerythrin-cyanine 7, Biolegend, San Diego, CA, USA) as the memory B-cell marker, IgD-APC (Allophycocyanin, Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA) to define class-switching and CD38-APC-Cy7 (Allophycocyanin-cyanine 7, Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA) to define ASCs. All fluorochrome-conjugated anti-human antibodies were titrated for 10^7 PBMCs, and staining indices were calculated to determine the best separation of each population, most negligible unspecific binding, spread, and lowest background. Due to the pre-activating effect caused by cell surface labeling (shown in the results), all samples were labeled individually and sequentially to standardize the time passed from labeling to measuring. Samples were incubated with the antibodies for 30 min at room temperature in the dark, then washed twice in RPMI (400 g, 7 min).

For determining the cell surface expression of IgM and IgG, 10^7 PBMCs were labeled with the following fluorochrome-conjugated anti-human antibodies: CD19-PE, CD27-PE-

Cy7, IgD-APC, IgM-BV421 (Brilliant Violet 421, Biolegend, San Diego, CA, USA), and IgG-FITC (Fluorescein isothiocyanate, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Zombie NIR (Biolegend, San Diego, CA, USA) was added as a viability dye before cell-surface labeling per the protocol. No Fluo-4 was added to these samples.

4.4. Loading PBMCs with Fluo-4 AM

The cell-permeable Fluo-4 acetoxymethyl ester is a Ca^{2+} indicator dye that exhibits increased fluorescence upon binding Ca^{2+} . Briefly, 50 μg of Fluo-4 dye (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was dissolved in 4.56 μL of DMSO (dimethyl sulfoxide) to reach a 10 mM stock solution. Then, 1 μL of stock was dispersed with 1 μL 20% (*w/v*) non-ionic detergent, Pluronic F-127, and then dissolved in 98 μL RPMI (to reach 100 μM concentration). Fluo-4 concentrations were then titrated for 107 cells, and a 5 μM loading concentration was selected.

After washing, cells were resuspended in 285 μL RPMI, and 15 μL Fluo-4 was added. PBMCs were incubated for 15 min at room temperature in the dark. After washing, PBMCs were resuspended in RPMI medium supplemented with CaCl_2 to a Ca^{2+} concentration of 1.8 mM. Samples were then kept at room temperature in the dark for 30 min to allow complete de-esterification of intracellular AM esters. Each sample was labeled individually and measured directly after the de-esterification period.

4.5. Flow Cytometry Measurements and the Generation of the Calcium Kinetic Curves

Flow cytometry measurements were performed using a BD FACS Canto II (3 lasers, 4-2-2 configuration, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). For each sample, 60 s of baseline Ca^{2+} signal were recorded, an activating agent was added, and 720 s were recorded following activation in a new file. Due to the setup of the Canto II, the tube had to be removed to add the activating agent; therefore, the time from adding the activating agent until the beginning of recording the activation curve was measured and later entered when appending the activated file to the baseline file in the FacsKin program (Figure 1A).

Compensation matrices were calculated for each measurement day using FlowJo (V10.7.1., BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). All gates were set in FlowJo using Fluorescent Minus One (FMO) controls for each sample. Flow stability was checked by plotting the FSC (y-axis) vs. measurement time (x-axis). In the second step, singlets (y:FSC-H/x: FSC-A) and lymphocytes (y:FSC/x: SSC) were gated, and then live cells were identified as those that were successfully loaded with Fluo-4 dye (as Fluo-4⁺), using the Fluo-4 FMO to determine where the Fluo-4 negative population would be. Viability was above 95% in all measurements. B cells were defined as $\text{CD}3^- \text{CD}19^+$ cells, and T cells as $\text{CD}3^+, \text{CD}19^-$ cells. Within the $\text{CD}19^+$ population, naive B cells were defined as $\text{IgD}^+ \text{CD}27^-$, non-switched memory cells (NSw) as $\text{IgD}^+ \text{CD}27^+$, immunoglobulin class-switched memory cells (Sw) as $\text{IgD}^- \text{CD}27^+$, $\text{CD}27^-$ class-switched or double-negative (DN) memory cells as $\text{IgD}^- \text{CD}27^-$ and circulating antibody-secreting cells (ASCs) as $\text{CD}19^+ \text{IgD}^- \text{CD}27^{\text{high}} \text{CD}38^{\text{high}}$ cells. (Supplementary Figure S1).

After setting the gates, data from the populations of interest were exported as separate FCS files and imported into FacsKin. FacsKin performs an algorithm-based curve fitting to the median fluorescent values of each gated population, enabling the mathematical description and statistical comparison of flow cytometry acquired kinetic measurements. The most fitting function can be selected based on the physiological process's nature, i.e., most Ca^{2+} flux curves show a double logistic course (dlogist + function). FacsKin generates an activation curve (Figure 1B) and uses the following parameters to describe each curve: Starting value, standardized to 1 to allow comparison of subsets with different baseline Ca^{2+} levels and measurements from other days and is calculated as the limit of the function at $-\infty$ (minus infinity); maximum value (Max), which correlates with the maximum cytoplasmic level of Ca^{2+} reached during the activation, Ending value, which is the cytoplasmic Ca^{2+} level at the end of the observation period and is calculated as the limit of the function at $+\infty$ (positive infinity); time to reach maximum value (T to Max, s),

time to reach 1st 50% value (T to 50%, s), and time from 1st 50% value to maximum value (T from 50% to Max, s); Slope at 1st 50%, which is always positive, describes how much the fluorescence intensity changes in 1 s in the ascending phase of the activation (unit: int/s, where int is the unit of the vertical axis); time from maximum value to 2nd 50% value (T from Max to 2nd 50%); and Slope at 2nd 50% value, which indicates how quickly the Ca^{2+} level decreases after the peak of the activation and is always negative (unit: int/s); and the area under the curve (AUC) value, which correlates with the total capacity of cells to mobilize Ca^{2+} via a specific activation pathway. All curves were standardized to end at 780 s. These numerical data were exported and used for statistical analysis.

4.6. Choosing an Optimal Concentration of the Activating Agents

First, we measured a series of kinetic measurements, where no activating agent was added to monitor any changes originating from the instrumental setup. Data from these measurements ($n = 5$) were pooled to create reference values for each B-cell subset. Then we tested the effect of the following activating stimuli on the Ca^{2+} mobilization of B cells: anti-human IgG, anti-human IgM, anti-human IgG+M (all from Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridge, UK), ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), CpG (Hycult Biotech Inc, Uden, The Netherlands), PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), IL-4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-human CD40 (Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA, USA), and LPS (O83, contribution of Dr. Béla Kovács from the Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs). To determine if activating agents evoke Ca^{2+} flux and, if yes, at what concentrations, we selected the concentrations based on standard laboratory practice, scientific literature, and company recommendations. The following concentrations were tested: for anti-human IgG+M 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; for anti-human IgG and anti-human IgM 0.5, 1, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; for ionomycin 0.01, 0.1, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; from CpG 0.05, 1, 3, and 10 μM ; for PMA 5, 10, 100, and 1000 ng/mL ; for IL-4 1, 5, 10, and 100 ng/mL ; from anti-human CD40 0.1, 1, 10, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; for LPS 0.1, 1, 10, 100, and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Every activating agent was titrated on 3 individual samples on 3 different days. The optimal concentrations of the tested agents were selected based on the AUC, max, and ending values. Stimulatory reagents without stimulating effects on rapid Ca^{2+} mobilization in B cells, i.e., PMA, IL-4, anti-CD40, and LPS (O83) alone, were left out of further investigations (Supplementary Figure S2). The optimal working concentrations from each activating reagent were 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from anti-IgG, anti-IgM, and anti-IgG+M, 10 μM from CpG, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from ionomycin.

4.7. Sample Size

The number of replicates (samples) necessary to show the differences between B-cell subsets was defined by power analysis using the AUC, Max, and Time to 50% parameters of the kinetic data and was determined to be 15. On each measurement day, the sample was collected from one individual. On every measurement day, six samples were measured in a kinetic manner: one not-activated sample as a control and five samples activated with (1) anti-IgG, (2) anti-IgM, (3) anti-IgG+M; (4) CpG, and (5) ionomycin. The cell prevalence values were checked across samples and analyzed by drawing the mean of the 6 samples of each measurement day. The sample size did not need to be altered during the study. The values were excluded if the event number in any group was too low for adequate kinetic curve fitting. Outliers were not excluded.

4.8. Testing the Pre-Activating Effect of IgD

We tested the pre-activating effect of the IgD labeling used for the distinction of B-cell subsets by “labeling” five tubes with unconjugated anti-human IgD (same clone as IgD-APC) at the same concentration as the APC-conjugated anti-human IgD, five tubes with APC-conjugated anti-human IgD, and five tubes left unlabeled. All tubes were measured in the above-described kinetic manner, activated with anti-IgG, anti-IgM, anti-IgG+M, anti-

IgD (10 µg/mL was added to all), and ionomycin (1 µg/mL). An additional not-activated sample was measured as a control.

4.9. Controls and Reproducibility

The best laboratory practices for sample preparation, flow cytometry measurements, and intracellular Ca²⁺ mobilization tracking were followed. According to the recommendations of the International Society for Advancement of Cytometry (ISAC), the labeling and measuring steps were all performed at room temperature [43]. Regarding the timeline of IgD pre-treatment, anti-IgD was added during the cell-surface labeling step. PBMCs were then incubated at room temperature for 30 min in the dark, followed by 7 min of washing. Cells were labeled with Fluo-4 AM for 15 min in the dark, at room temperature, followed by 7 min of washing. Samples were set aside for 30 min to allow complete de-esterification of intracellular Fluo-4 AM esters. Each sample was labeled individually and measured directly after the de-esterification period. After measuring 1 min of baseline, further activating agents were added, making the total time from anti-IgD pre-treatment to subsequent activation 90 min.

Cytometer setup and tracking (CS&T) were performed every day. Compensation matrices were specifically calculated for each measurement day in FlowJo, using compensation beads (BD) for fluorochrome-conjugated antibodies and the test subjects' PBMCs for Fluo-4. The flow rate was kept at a standard low speed. We applied several validation steps and various controls to standardize our measurements and ensure reproducibility. Populations and marker positivity were defined using FMO controls. Not-activated samples were measured and used as a reference to exclude any Fluo-4 signal alterations originating from the technical setup. For each activating agent, a sample without loading the cells with Fluo-4 (Fluo-4 FMO) was measured in a kinetic manner to exclude any alterations in the background fluorescence due to the activation process, which could resemble a Fluo-4 signal but would be an artifact. FacsKin also allows standardizing all baseline measurements to 1, and all changes can be assessed compared to this. This way, the activation of different cell subsets or individuals with differing basal Fluo-4 signal (Ca²⁺ level) can be objectively compared.

The viability of the cells was checked in several steps. In a separate tube, a viability dye (Zombie NIR) was added at the time of cell surface labeling to check the influence of the pre-analytical processes. Viability was verified by analyzing only those intact cells that could be loaded with Fluo-4. After measuring each tube, trypan blue was used to check that the activation process did not lead to rapid cell death.

4.10. Statistics

Statistical analysis of prevalence data, median fluorescence intensity, and Fluo-4 baseline data was performed using GraphPad Prism 9 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). For normality testing, Shapiro–Wilk tests were used. Non-normally distributed datasets were analyzed using Wilcoxon matched-pairs signed-rank tests for single comparisons and Friedman test with multiple comparisons FDR-corrected after Benjamini and Hochberg to compare more than two datasets. Unpaired two-tailed t-tests were used for evaluating two normally distributed datasets, and a two-way ANOVA with Tukey's post hoc test was used to compare more than two normally distributed datasets.

To obtain the Max and Ending values from the anti-IgG+M titration series, nonlinear curve fitting was performed as a dose–response stimulation/[agonist] vs. response model in GraphPad Prism 9. Goodness-of-fit for each curve is shown in the respective table as R squared, and EC50 values were calculated.

Statistical analysis focusing on the parameters of the Ca²⁺ flux (maximum value, ending value, AUC, time to reach maximum, time to 1st 50 %, time from 1st 50% to maximum value, time from maximum value to 2nd 50%, Slope at 1st 50%, and Slope at 2nd 50%) was performed with an R software package (x64 3.5.1) [44]. For normality testing, Shapiro–Wilk tests were used with the shapiro.test function from the stats R package. Due

to the non-normally distributed datasets, the `wilcoxon.test` and `kruskal.test` commands from the `stats` package, when appropriate, were applied. Dunn's Kruskal–Wallis multiple comparisons were used (`dunnTest` function from the `FSA` R package [45]) to perform post hoc tests. *P* values lower than 0.05 were considered significant, and the previously mentioned `dunnTest` was used to calculate the adjusted *p*-values. From `dunnTest`, the “bh” adjustment method was used.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24109107/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.B., T.S.-L., V.T. and E.M.; methodology, A.B., T.S.-L. and V.T.; software, A.K.; validation, A.B., T.S.-L. and J.N.; formal analysis, A.B., R.H. and J.N.; investigation, A.B. and T.S.-L.; resources, E.M. and T.B.; writing—original draft, A.B.; writing—review and editing, E.M., V.T., J.N. and T.B.; visualization, J.N.; supervision, E.M.; funding acquisition E.M. and T.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the RRF-2.3.1-21-2022-00012 “National Laboratory on Human Reproduction”, the PTE ÁOK-KA grant (No: KA-2019-28), and the Thematic Excellence Program 2020-Institutional Excellence Sub-program of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the second thematic program of the University of Pécs and the European Union and co-financed by the European Social Fund: Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs (EFOP-3.6.1.-16-2016-00004).

Institutional Review Board Statement: Our study was approved by the Regional Research Ethics Committee of the Medical Center, University of Pécs (RIKEB 5913/2015), and written informed consent was obtained from all participants. The study adhered to the tenets of the most recent revision of the Declaration of Helsinki.

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

Data Availability Statement: Flow cytometry fcs data are available at: <http://flowrepository.org/>. Kinetic files can be sent upon request by the following contact: Anna Bajnok (bajnok.panni@gmail.com).

Acknowledgments: The present scientific work is supported by and part of the Hungarian National Laboratory on Reproduction. The research was performed in collaboration with the Flow Cytometry Core Facility at the Szentágotthai Research Centre of the University of Pécs. Data analysis services were performed by the Genomics and Bioinformatics Core Facility of the Szentágotthai Research Centre at the University of Pécs.

Conflicts of Interest: The authors declare there is no conflict of interest.

References

1. Baba, Y.; Kurosaki, T. Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **2016**, *393*, 143–174. [[PubMed](#)]
2. Berry, C.T.; Liu, X.; Myles, A.; Nandi, S.; Chen, Y.H.; Hershberg, U.; Brodsky, I.E.; Cancro, M.P.; Lengner, C.J.; May, M.J.; et al. BCR-Induced Ca²⁺ Signals Dynamically Tune Survival, Metabolic Reprogramming, and Proliferation of Naive B Cells. *Cell Rep.* **2020**, *31*, 107474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rawlings, D.J.; Metzler, G.; Wray-Dutra, M.; Jackson, S.W. Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 421–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Scharenberg, A.M.; Humphries, L.A.; Rawlings, D.J. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 778–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Baumgarth, N. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol. Rev.* **2000**, *176*, 171–180.
6. DeFranco, A.L. The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 296–308. [[CrossRef](#)]
7. Harwood, N.E.; Batista, F.D. New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* **2008**, *28*, 609–619. [[CrossRef](#)]
8. Übelhart, R.; Hug, E.; Bach, M.P.; Wossning, T.; Dühren-von Minden, M.; Horn, A.H.C.; Tsiantoulas, D.; Kometani, K.; Kurosaki, T.; Binder, C.J.; et al. Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 534–543. [[CrossRef](#)]
9. Johnson, S.A.; Pleiman, C.M.; Pao, L.; Schneringer, J.; Hippen, K.; Cambier, J.C. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4596–4603. [[CrossRef](#)]

10. Saijo, K.; Schmedt, C.; Su, I.H.; Karasuyama, H.; Lowell, C.A.; Reth, M.; Adachi, T.; Patke, A.; Santana, A.; Tarakhovsky, A. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 274–279. [[CrossRef](#)]
11. Gold, M.R.; Matsuuchi, L.; Kelly, R.B.; DeFranco, A.L. Tyrosine phosphorylation of components of the B-cell antigen receptors following receptor crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 3436–3440. [[CrossRef](#)]
12. Rowley, R.B.; Burkhardt, A.L.; Chao, H.G.; Matsueda, G.R.; Bolen, J.B. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11590–11594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Coggeshall, K.M.; Cambier, J.C. B cell activation. VIII. Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J. Immunol.* **1984**, *133*, 3382–3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ransom, J.T.; Harris, L.K.; Cambier, J.C. Anti-Ig induces release of inositol 1,4,5-trisphosphate, which mediates mobilization of intracellular Ca⁺⁺ stores in B lymphocytes. *J. Immunol.* **1986**, *137*, 708–714. [[CrossRef](#)]
15. Hogan, P.G.; Lewis, R.S.; Rao, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 491–533. [[CrossRef](#)]
16. Penna, A.; Demuro, A.; Yeromin, A.V.; Zhang, S.L.; Safrina, O.; Parker, I.; Cahalan, M.D. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **2008**, *456*, 116–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. King, L.B.; Freedman, B.D. B-lymphocyte calcium influx. *Immunol. Rev.* **2009**, *231*, 265–277. [[CrossRef](#)]
18. Schatz, D.G.; Oettinger, M.A.; Schlissel, M.S. V(D)J recombination: Molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 359–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Tisch, R.; Roifman, C.M.; Hozumi, N. Functional differences between immunoglobulins M and D expressed on the surface of an immature B-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6914–6918. [[CrossRef](#)]
20. Avrameas, S.; Hösli, P.; Stanislawski, M.; Rodrigot, M.; Vogt, E. A quantitative study at the single cell level of immunoglobulin antigenic determinants present on the surface of murine B and T lymphocytes. *J. Immunol.* **1979**, *122*, 648–659. [[CrossRef](#)]
21. Geisberger, R.; Lamers, M.; Achatz, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* **2006**, *118*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Slifka, M.K.; Ahmed, R. Long-lived plasma cells: A mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 252–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Weill, J.C.; Weller, S.; Reynaud, C.A. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 267–285. [[CrossRef](#)]
24. Sanz, I.; Wei, C.; Jenks, S.A.; Cashman, K.S.; Tipton, C.; Woodruff, M.C.; Hom, J.; Lee, F.E. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Jackson, S.W.; Kolhatkar, N.S.; Rawlings, D.J. B cells take the front seat: Dysregulated B cell signals orchestrate loss of tolerance and autoantibody production. *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, *33*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hwangbo, Y.; Park, Y.J. Genome-Wide Association Studies of Autoimmune Thyroid Diseases, Thyroid Function, and Thyroid Cancer. *Endocrinol. Metab.* **2018**, *33*, 175–184. [[CrossRef](#)]
27. Hom, G.; Graham, R.R.; Modrek, B.; Taylor, K.E.; Ortmann, W.; Garnier, S.; Lee, A.T.; Chung, S.A.; Ferreira, R.C.; Pant, P.V.; et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 900–909. [[CrossRef](#)]
28. Lu, R.; Vidal, G.S.; Kelly, J.A.; Delgado-Vega, A.M.; Howard, X.K.; Macwana, S.R.; Dominguez, N.; Klein, W.; Burrell, C.; Harley, I.T.; et al. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* **2009**, *10*, 397–403. [[CrossRef](#)]
29. Harley, J.B.; Alarcón-Riquelme, M.E.; Criswell, L.A.; Jacob, C.O.; Kimberly, R.P.; Moser, K.L.; Tsao, B.P.; Vyse, T.J.; Langefeld, C.D.; Nath, S.K.; et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 204–210. [[CrossRef](#)]
30. Li, Z.; Boesmans, W.; Kazwiny, Y.; Hao, M.M.; Vanden Berghe, P. Simultaneous whole-cell patch-clamp and calcium imaging on myenteric neurons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2022**, *323*, G341–G347. [[CrossRef](#)]
31. Gee, K.R.; Brown, K.A.; Chen, W.N.U.; Bishop-Stewart, J.; Gray, D.; Johnson, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* **2000**, *27*, 97–106. [[CrossRef](#)]
32. Quách, T.D.; Manjarrez-Orduño, N.; Adlowitz, D.G.; Silver, L.; Yang, H.; Wei, C.; Milner, E.C.; Sanz, I. Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 4640–4648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Smith, M.J.; Ford, B.R.; Rihaneck, M.; Coleman, B.M.; Getahun, A.; Sarapura, V.D.; Gottlieb, P.A.; Cambier, J.C. Elevated PTEN expression maintains anergy in human B cells and reveals unexpectedly high repertoire autoreactivity. *JCI Insight* **2019**, *4*, e123384. [[CrossRef](#)]
34. Duty, J.A.; Szodoray, P.; Zheng, N.Y.; Koelsch, K.A.; Zhang, Q.; Swiatkowski, M.; Mathias, M.; Garman, L.; Helms, C.; Nakken, B.; et al. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 139–151. [[CrossRef](#)]
35. Bajnok, A.; Kaposi, A.; Kovács, L.; Vászárhelyi, B.; Balog, A.; Toldi, G. Analysis by flow cytometry of calcium influx kinetics in peripheral lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Cytom. A* **2013**, *83*, 287–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kaposi, A.; Toldi, G.; Mészáros, G.; Szalay, B.; Veress, G.E.; Vászárhelyi, B. *Experimental Conditions and Mathematical Analysis of Kinetic Measurements Using Flow Cytometry—The FacsKin Method*; IntechOpen: London, UK, 2012.

37. Lin, K.I.; Lin, Y.; Calame, K. Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8684–8695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Paredes, R.M.; Etzler, J.C.; Watts, L.T.; Zheng, W.; Lechleiter, J.D. Chemical calcium indicators. *Methods* **2008**, *46*, 143–151. [[CrossRef](#)]
39. Dolmetsch, R.E.; Lewis, R.S.; Goodnow, C.C.; Healy, J.I. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **1997**, *386*, 855–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Engels, N.; König, L.M.; Schulze, W.; Radtke, D.; Vanshylla, K.; Lutz, J.; Winkler, T.H.; Nitschke, L.; Wienands, J. The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5456. [[CrossRef](#)]
41. Waisman, A.; Kraus, M.; Seagal, J.; Ghosh, S.; Melamed, D.; Song, J.; Sasaki, Y.; Classen, S.; Lutz, C.; Brombacher, F.; et al. IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 747–758. [[CrossRef](#)]
42. Albrecht, B.; D'Souza, C.D.; Ding, W.; Tridandapani, S.; Coggeshall, K.M.; Lairmore, M.D. Activation of nuclear factor of activated T cells by human T-lymphotropic virus type 1 accessory protein p12(I). *J. Virol.* **2002**, *76*, 3493–3501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cossarizza, A.; Chang, H.D.; Radbruch, A.; Acs, A.; Adam, D.; Adam-Klages, S.; Agace, W.W.; Aghaeepour, N.; Akdis, M.; Allez, M.; et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* **2019**, *49*, 1457–1973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. R Core Team. *A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021.
45. Ogle, D.; Doll, J.; Wheeler, P.; Dinno, A. FSA: Fisheries Stock Analysis. R Package Version 0.9.1. Available online: <https://github.com/droglenc/FSA> (accessed on 1 January 2021).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Maria Sole Chimenti,
Rheumatology, Allergology and
Clinical Immunology University of
Rome Tor Vergata, Italy

REVIEWED BY

Xiaofan Jia,
University of Colorado Anschutz
Medical Campus, United States
Sun Jung Kim,
Northwell Health, United States

*CORRESPONDENCE

Timea Berki
berki.timea@pte.hu

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders: Autoimmune Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 07 September 2022

ACCEPTED 10 October 2022

PUBLISHED 25 October 2022

CITATION

Serény-Litvai T, Bajnok A, Temesfoi V,
Nörenberg J, Pham-Dobor G,
Kaposi A, Varnagy A, Kovacs K,
Pentek S, Koszegi T, Mezosi E and
Berki T (2022) B cells from anti-thyroid
antibody positive, infertile
women show hyper-reactivity
to BCR stimulation.
Front. Immunol. 13:1039166.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1039166

COPYRIGHT

© 2022 Serény-Litvai, Bajnok, Temesfoi,
Nörenberg, Pham-Dobor, Kaposi,
Varnagy, Kovacs, Pentek, Koszegi,
Mezosi and Berki. This is an open-
access article distributed under the
terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

B cells from anti-thyroid antibody positive, infertile women show hyper-reactivity to BCR stimulation

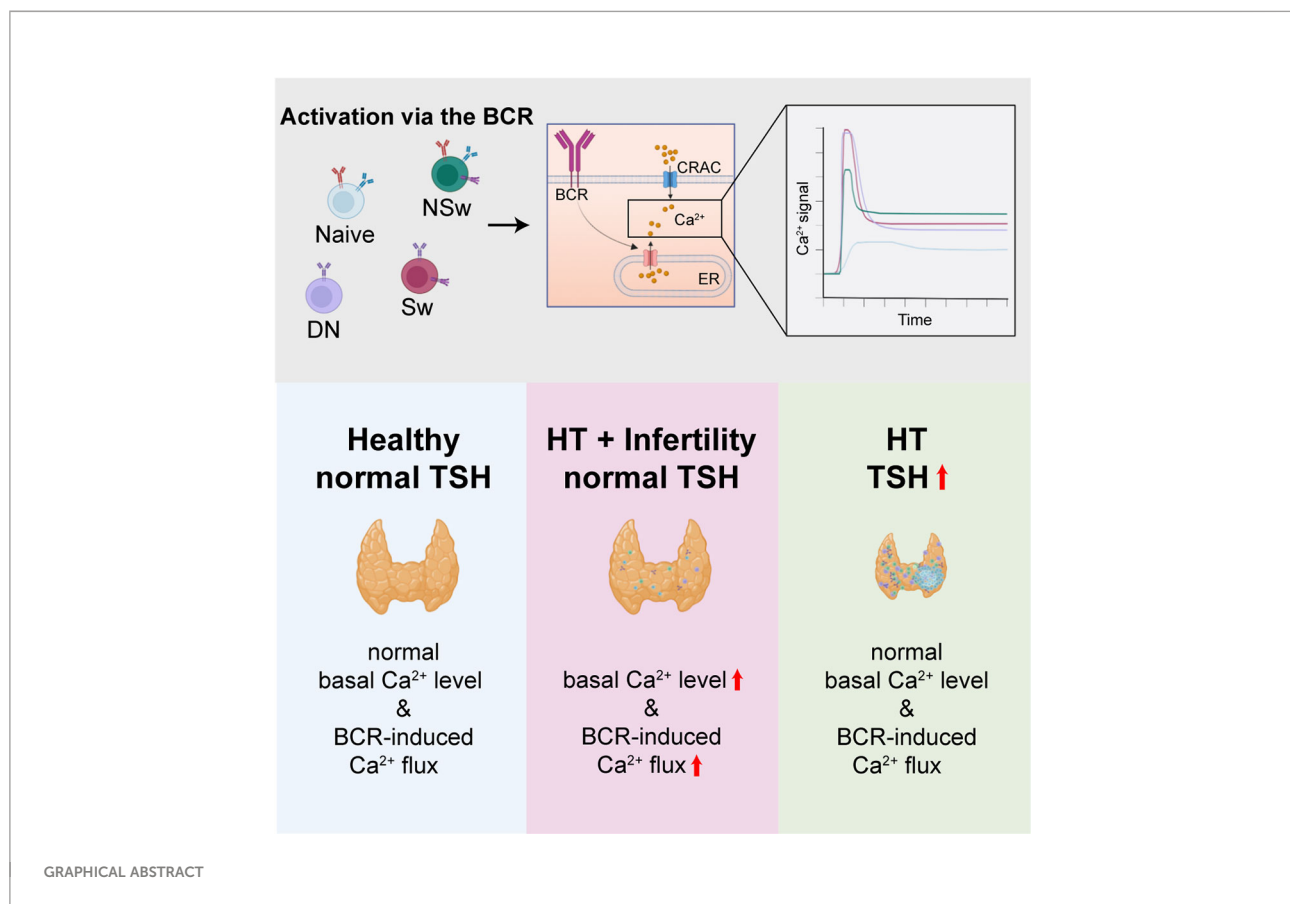
Timea Serény-Litvai^{1,2,3}, Anna Bajnok^{1,2}, Viktoria Temesfoi^{2,4,5},
Jasper Nörenberg^{2,6}, Greta Pham-Dobor⁷, Ambrus Kaposi⁸,
Akos Varnagy^{2,9}, Kalman Kovacs^{2,9}, Sandor Pentek^{2,9},
Tamas Koszegi^{2,4,5}, Emese Mezosi^{2,7} and Timea Berki^{2,3*}

¹Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary, ²Hungarian National Laboratory on Reproduction, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁴Lab-on-a-Chip Research Group, Szentágotthai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁵Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁶Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁷First Department of Internal Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁸Department of Programming Languages and Compilers, Faculty of Informatics, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary, ⁹Department of Obstetrics and Gynecology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

Anti-thyroid antibody (ATA) positivity affects 1 out of 9 women in childbearing age and presents a significant risk for infertility. Emerging evidence indicates that alterations in the B cell receptor induced calcium (Ca²⁺) signaling could be key in the development of autoimmunity. We aimed to investigate the Ca²⁺ flux response of B lymphocyte subsets to BCR stimulation in Hashimoto's thyroiditis and related infertility. We collected peripheral blood samples from ATA+, infertile, euthyroid patients (HIE), hypothyroid, ATA+ patients before (H1) and after levothyroxine treatment (H2), and age-matched healthy controls (HC). All B cell subsets of ATA+, infertile, euthyroid patients showed elevated basal Ca²⁺ level and hyper-responsivity to BCR ligation compared to the other groups, which could reflect altered systemic immune function. The Ca²⁺ flux of hypothyroid patients was similar to healthy controls. The levothyroxine-treated patients had decreased prevalence of CD25⁺ B cells and lower basal Ca²⁺ level compared to pre-treatment. Our results support the role of altered Ca²⁺ flux of B cells in the early phase of thyroid autoimmunity and infertility.

KEYWORDS

B cell receptor-hyperresponsivity, anti-thyroid antibodies, infertility, B lymphocytes, Hashimoto's autoimmune thyroiditis, levothyroxine



Introduction

Hashimoto's thyroiditis (HT) is a common organ-specific autoimmune disorder in women of childbearing age. It is characterized by the presence of anti-thyroid antibodies (ATAs), such as anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) and anti-thyroglobulin (anti-Tg), and the infiltration of the thyroid gland by mononuclear cells (1). The complex interplay of cellular and humoral factors results in a chronic inflammatory process over several years. At a certain level of functional thyroid tissue loss hypothyroidism develops, indicated by the rising of thyroid-stimulating hormone (TSH) (1). Although the incidence of ATA positivity is between 10–14.5% in women between 20 and 40 years of age (2), the development of hypothyroidism is not obligatory, in fact the annual risk is only 2.1% (3). Therefore, despite the growing prevalence (4), the majority of ATA+ cases remain undiagnosed due to the lack of clinical signs.

This silent disease could be considered clinically irrelevant; however, ATA positivity presents a significant risk for infertility and pregnancy loss, the odds ratio (OR) of miscarriage is 3.9 even without thyroid dysfunction (5). The presence of ATAs may also have a negative impact on the success rate of *in vitro* fertilization (IVF) (6). Additionally, the immune tolerance during pregnancy

also appears to be disturbed, indicated by the higher rate of preterm birth (OR 2,07 (5),) and pregnancy complications (7). The beneficial effect of levothyroxine replacement therapy during IVF and pregnancy in ATA positive, euthyroid women had earlier been shown in randomized trials, leading to great expectations (8, 9). However, a recent multi-centric, randomized, double-blind, placebo-controlled trial (TABLET) showed no positive effect of levothyroxine compared to placebo on the live-birth rate in euthyroid women with anti-TPO antibody positivity (10).

To explain these adverse outcomes regarding fertility and pregnancy in Hashimoto's thyroiditis, two popular hypotheses have been proposed (11). First, that HT is accompanied by generalized immune dysfunction that affects the reproductive organs and impairs the maternal-fetal tolerance (12). The direct detrimental effect of ATAs has also been suggested, as they can be detected in the ovarian follicular fluid of infertile women and may lead to lower rates of oocyte fertilization (13, 14). The causal relation was demonstrated in mice immunized against human Tg that had increased fetal absorption rates and decreased weights of the fetuses and the placenta (15). Second, as elevated TSH is an independent risk factor for adverse pregnancy outcomes (16–18), that the adaptation of the inflamed thyroid gland could be inadequate to the increased demand of pregnancy (19, 20) leading to 'relative'

thyroid dysfunction (11, 21–23). However, as levothyroxine replacement was inefficient in the TABLET trial, our attention is increasingly drawn towards the understanding of the underlying immunological alterations.

In contrast to Graves' disease, which is widely recognized as an autoantibody-mediated disorder, Hashimoto's thyroiditis is generally considered to be a T cell-mediated disease (1). Although the role of B cells as the source of autoantibodies in HT is clear, we have little knowledge about their contribution to the pathogenesis and their role in infertility. There is some indirect evidence of the systemic dysfunction of B cells in ATA positive women, as the prevalence of anti-ovarian and non-organ-specific autoantibodies (NOSAs) can be increased (24–26). Nevertheless, according to the classical hypothesis, auto-reactive B lymphocytes are bystanders in the inflammatory process, activated by the release of thyroid antigens in the appropriate cytokine milieu and in the presence of T helper (T_H) lymphocytes. It is postulated, that the break in self-tolerance occurs at the level of T lymphocytes and that these antigen-specific, autoreactive T cells in turn support the activation of autoreactive B cells (27, 28). However, to date little is known about the steps leading up to the appearance of activated autoreactive T cells, specifically because T cells require antigen presentation and specific receptor co-signaling.

The question is whether the appearance of auto-reactive, high-affinity autoantibody-producing B cells could be the first step in the pathogenesis of HT, preceding any damage to the thyroid itself. Recent advances in the field of autoimmunity have revealed that dysregulated B cell signaling *via* the B cell receptor (BCR) could be the key step and the primary driver of the loss of self-tolerance and the development of autoimmunity, and not just the downstream consequence of autoreactive T_H cell activation (29). Strikingly, longitudinal studies have shown that disease-associated autoantibodies anticipate disease onset by years in multiple autoimmune disorders (30–33).

The BCR is basically a membrane-bound immunoglobulin (34). Upon ligation, the associated CD79a and b are phosphorylated by the Src-family kinase (SFK) Lyn (35–37) leading to Syk binding and phosphorylation (38). Bruton's tyrosine kinase (Btk) is activated, which phosphorylates phospholipase C-gamma 2 (PLC γ 2), leading to the cleavage of phosphoinositide PI (4, 5)P2, and the release of IP3 and DAG (39, 40), leading to Ca^{2+} -release from the endoplasmic reticulum into the cytoplasm. This initial calcium release triggers the activation of calcium-release-activated (CRAC) channels, which allow the further influx of extracellular Ca^{2+} and prolonged Ca^{2+} flux constituting the plateau phase of the activation curve (41, 42). The Ca^{2+} flux response is a central activation pathway and its alterations have been linked to autoimmune disorders and B cell malignancies (43, 44).

Genome-wide association studies (GWAS) have identified a large number of autoimmunity promoting polymorphisms, many of which affect the signaling pathway of the BCR (43–49). Enhanced Ca^{2+} flux in B cells has been shown to promote

autoimmunity (44). For example, polymorphisms in PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) which are known to be associated with HT and other autoimmune disorders cause altered Ca^{2+} flux upon BCR ligation and B cell-restricted expression of risk variants is enough to initiate autoimmunity (29, 50–54).

There is a growing body of evidence directing our attention to the pivotal role of altered BCR signaling in driving autoimmunity by skewing the naive BCR repertoire, promoting the activation of autoreactive B cell clones both in a T cell- dependent and independent fashion, facilitating the formation of spontaneous autoreactive germinal centers and initiating the break in T cell tolerance. Evidence indicates, that B cells also play the crucial role of antigen presentation to T cells (29).

There is a considerable diversity in the Ca^{2+} flux patterns of B cells, suggesting that this mechanism is capable of encoding and transducing differences in the BCR signaling to distinct B cell subsets. Naive B cells express IgD and IgM and are negative for CD27. The CD19⁺ IgD⁺, CD27⁻ subpopulation also contains the newly formed, transitional B cells. Following activation, some B cells differentiate into memory B cells, express CD27 and re-enter the circulation. Peripheral memory B cells which still express IgD and IgM are termed 'non-switched memory cells', whereas those that undergo Ig-class switching and express IgG and further Ig subtypes are known as 'switched memory' cells. Certain memory cells lose their CD27 expression and become IgD⁻, CD27⁻ 'double-negative' memory B cells, which are non-dividing, inflammatory cytokine-producing cells that could play a role in autoimmunity (55–57). Recent studies suggest that B lymphocytes that express CD25 might represent a functionally distinct subset of cells, with higher levels of surface Ig expression and enhanced antigen-presenting ability (58).

The functional alterations of B cell subsets have never been investigated in HT before. We hypothesized that altered BCR signaling could play a role in thyroid autoimmunity and related infertility. Therefore, we have developed a flow cytometry method which enables the monitoring of the BCR ligation induced Ca^{2+} flux in the selected peripheral blood B lymphocyte subsets simultaneously. We also aimed to assess the effect of levothyroxine on the Ca^{2+} flux kinetics of B cells by sampling hypothyroid patients before and after treatment.

Materials and methods

Study design

Our pre-defined hypothesis was that altered BCR signaling could play a role in thyroid autoimmunity and related infertility. We designed a controlled laboratory experiment and enrolled ATA+, infertile, euthyroid patients; hypothyroid, ATA+ patients; and healthy volunteers. We developed a flow cytometry method which enables the monitoring of the BCR

ligation induced Ca^{2+} flux in the selected peripheral blood B lymphocyte subsets simultaneously. The objective of the research was to compare the Ca^{2+} flux response of circulating B lymphocyte subsets in ATA+, infertile, euthyroid patients (1), hypothyroid, ATA+ patients before (2) and after levothyroxine treatment (3), and age-matched healthy controls (4). The secondary objective was to assess the effect of levothyroxine on the Ca^{2+} flux kinetics of B cells.

Sample size

The number of replicates necessary to show the differences between study groups were defined by power analysis using the AUC parameter of the kinetic data from the first 3 samples of each group. The number of replicates necessary was determined as 12. On each measurement day one sample was collected. The number of participants in patient groups is higher, because all eligible patients were enrolled during the enrollment period (from March of 2019 to March of 2021). Extra patients were included to compensate for the potential samples lost due to unforeseeable circumstances such as technical error, secondary autoimmune disorder, COVID-19 infection, unplanned pregnancy. Data were only excluded if the kinetic curves could not be correctly fitted due to too low event number. Outliers were identified using the two-sided Grubbs' test, but only extreme outliers were removed from the analysis.

Human subjects

Our study was approved by the Regional Research Ethics Committee of the Medical Center, University of Pécs (RIKEB 5913/2015), and written informed consent was obtained from all participants. The study adhered to the tenets of the most recent revision of the Declaration of Helsinki.

Patients

Fifteen patients with hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis were enrolled in the hypothyroid arm of the study. Clinical inclusion and exclusion criteria are summarized in [Table 1](#). The TSH value of all patients was above the upper limit of the normal range (> 4.2 mU/l). Twelve patients had anti-TG antibody positivity (defined as anti-TG antibody level above the upper limit of the normal range, > 40 IU/ml), 13 had anti-TPO antibody positivity (defined as anti-TPO antibody level above the upper limit of the normal range, > 35 IU/ml), and all patients had signs of autoimmune thyroiditis on the ultrasound (see [Table 2](#)). The first samples were collected prior to any thyroid replacement therapy (H1), and the second sampling

was done after the normalization of TSH, defined as TSH within the normal range, 0.270 - 4.2 mU/l (H2). One of the first samples had to be excluded due to a technical error. The second sample could not be collected from three patients, in two cases due to the development of a second autoimmune disease over time and in one case due to an unplanned pregnancy.

Fifteen anti-thyroid antibody positive, euthyroid patients were enrolled in the infertile arm of the study in whom immunological infertility could be assumed (Hashimoto's thyroiditis, infertile, euthyroid group, HIE). Infertility was defined as inability to conceive after 1 year of regular unprotected intercourse. Twelve patients had anti-TG antibody positivity and 10 had anti-TPO antibody positivity. All patients were referred from an assisted reproduction program and samples were collected prior to any fertility treatments. The average time of infertility was 3.6 ± 2.7 years. The partners' andrological examination showed normal sperm cell count, viability, and morphology. Estrogen and progesterone levels were normal throughout the cycle, and ovulation was confirmed by the elevated progesterone value and ultrasound examination. Tubal infertility was excluded by laparoscopic chromohydrotubation. All patients had primary infertility; no previous pregnancies (carried to term) were reported. Two patients had spontaneous early miscarriages prior to enrollment, but both met the inclusion criteria and conceived after over one year's time. No other autoimmune disease had been diagnosed prior to the sample collection. Due to a technical error one sample could not be evaluated and therefore this patient was excluded from the analysis.

Twelve healthy age-matched controls (HC) were selected after screening for anti-thyroid antibodies and TSH. Routine laboratory parameters were also measured to exclude concomitant diseases. None of the healthy controls had any concomitant illnesses, any disorders in their menstrual cycle and none of them took any medication regularly.

All samples were collected between the 1st and the 5th day of the menstrual cycle to standardize the potential immunological effects of estrogen and progesterone. Patients had no infection at least 3 weeks prior to sampling, and CRP values were measured on the day of the blood draw. The patients had not been vaccinated in the 2 months before the sample collection. General medical and obstetric anamnesis, concomitant medication and illnesses, previous surgeries were recorded. The following laboratory parameters were measured on the day of the immunological sampling: TSH, anti-TPO, anti-TG, estradiol, progesterone, FSH, LH, prolactin, testosterone, sex-hormone binding globulin, CRP. The clinical characteristics of all participants are summarized in [Table 1](#).

Our study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The research plan was approved by the local ethical board, the Regional Research Ethics Committee of the Medical Center, University of Pécs (number of approval:

TABLE 1 Clinical inclusion and exclusion criteria for patient groups.

HC	Inclusion criteria	Exclusion criteria
Healthy control group	Healthy women Age 20-40 years Normal cycle Samples were collected between the 1 st and 5 th day of the cycle	History of autoimmune disease Abnormal TSH Anti-thyroid antibody positivity History of infertility History of any chronic disease, genetic abnormality
H1 Hashimoto hypothyroid group	Women Age 20-40 years Normal cycle TSH > 4.2 mU/l Anti-thyroid antibody positivity (at least 1) Not treated with Levothyroxine Samples were collected between the 1 st and 5 th day of the cycle	History of second autoimmune disease (autoimmune polyglandular syndrome) History of infertility Other known cause of hypothyroidism Thyroid nodule requiring surgery or radioiodine therapy History of other chronic disease, genetic abnormality
H2 Follow-up sample from the same patients (H1) after the normalization of TSH due to levothyroxine therapy	TSH < 4.2 mU/l Samples were collected between the 1 st and 5 th day of the cycle Levothyroxine therapy required to maintain normal value of TSH	Second autoimmune disease during follow-up (autoimmune polyglandular syndrome) Unplanned pregnancy before the 2 nd sample could be collected
HIE Hashimoto infertile, euthyroid patients	Women Age 20-40 years Normal cycle Normal ovulation confirmed by ultrasound and elevated progesterone (> 10 nmol/l) on cycle day 21. Samples were collected between the 1 st and 5 th day of the cycle prior to assisted reproductive treatments Primary infertility in anamnesis: inability to conceive after at least 1 year of regular unprotected intercourse Applied for assisted reproductive care TSH < 4.2 mU/l Anti-thyroid antibody positivity (at least 1) No previous levothyroxine treatment	History of other autoimmune, chronic disease or genetic abnormality Andrological abnormalities in the partner History of endometriosis prior to enrollment Tubal infertility Anovulatory cycles Other known cause of infertility Significant obesity (BMI > 35 kg/m ²) Previous pregnancy (except first trimester miscarriage) History of hypothyroidism

TSH, Thyroid-stimulating hormone; BMI, body mass index.

RIKEB 5913/2015). Consistently, written informed consent was obtained from all participants before any study procedures.

Cell surface staining

Peripheral blood samples were collected from each participant (6x10 ml in lithium-heparin tubes, 3x6 ml in serum tubes). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

were separated by Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) gradient centrifugation. The cell suspension was washed twice in PBS and resuspended in RPMI 1640 containing 5% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich).

All measurements were performed on freshly prepared PBMCs. The times from sample acquisition to measurement were standardized throughout the entire protocol. PBMCs (8×10^6 cells) were stained with the appropriate combination of fluorochrome-conjugated anti-human antibodies in 100 μ l of

TABLE 2 Clinical characteristics of patients.

	Healthy control (HC) (n = 12)	Hypothyroid before treatment (H1) (n = 15)	Hypothyroid after treatment (H2) (n = 12)	Euthyroid, ATA+, infertile (HIE) (n = 14)
Demographic data (mean + SD)				
Age (years)	29.7 (± 4.5)	31.6 (± 5.9)	31.9 (± 5.2)	31.2 (± 5.2)
BMI (kg/m ²)	23.1 (± 5.1)	25.2 (± 5.7)		21.7 (± 2.8)
Laboratory parameters (median + IQR)				
TSH (mU/l)	1.63 (0.92 - 2.40)	6.81 (5.53 - 8.73)*	1.54 (0.60 - 2.27)	2.34 (1.62 - 3.30)
Anti-TPO (IU/ml)	9.85 (8.40 - 13.25)*	248.80 (70.00 - 388.90)	236.10 (102.90 - 374.60)	134.60 (17.00 - 203.10)*
Anti-TG (IU/ml)	12.35 (10.00 - 15.18)*	220.10 (42.90 - 318.80)	274.90 (58.53 - 451.20)	204.00 (16.78 - 355.30)
Estradiol (pmol/l)	141.50 (103.00 - 155.30)	120.00 (99.00 - 141.00)	149.00 (103.00 - 218.50)	147.00 (89.00 - 190.30)
Progesterone (nmol/l)	0.80 (0.50 - 1.28)	0.50 (0.30 - 0.90)	0.80 (0.53 - 2.30)	0.60 (0.48 - 1.00)
FSH (U/l)	6.70 (4.91 - 7.53)	6.40 (5.70 - 7.03)	6.33 (4.85 - 7.72)	6.95 (6.08 - 9.45)
LH (U/l)	4.00 (2.45 - 5.85)	3.65 (3.25 - 4.93)	4.15 (2.50 - 5.75)	3.65 (2.95 - 4.30)
Prolactin (ng/ml)	12.35 (10.07 - 19.53)	12.90 (10.07 - 17.42)	10.74 (8.15 - 11.85)	10.73 (7.78 - 17.52)
Testosterone (nmol/l)	1.00 (0.75 - 1.28)	1.10 (1.00 - 1.20)	1.17 (0.94 - 1.58)	0.95 (0.88 - 1.23)
Sex-hormone binding globulin (nmol/l)	82.65 (58.68 - 115.30)	62.60 (41.20 - 107.00)	46.85 (34.13 - 129.90)	68.40 (41.20 - 84.78)
CRP (mg/l)	0.60 (0.53 - 1.35)	2.25 (0.50 - 4.28)	2.75 (0.90 - 3.88)	1.20 (0.50 - 3.88)
Thyroid ultrasound findings				
Nodules (x/all)		7/15		1/14
Inhomogeneity (x/all)		11/15		8/14
Hypoechoic areas (x/all)		9/15		5/14
Hyper-vascularization (x/all)		8/15		6/14
Gynecological history				
Pregnancy (x/all)	3/12	5/15		2/14
Total number of pregnancies	7	8		3
Total number of miscarriages	2 (29%)	3 (37.5%)		3 (100%)
Total number of elective abortions	0	2 (25%)		0
Total number of term deliveries	5 (71%)	3 (37.5%)		0
Oral contraceptive in history (x/all)	11/12	13/15		9/14
Oral contraceptive at enrollment (x/all)	2/12	3/15		0/14
Allergy in history (x/all)	4/12	2/15		3/14

The laboratory results are from the day of enrollment. All patients were between the first and fifth day of the cycle. *p < 0.05 vs all other groups.

TSH, Thyroid-stimulating hormone; Anti-TPO, Thyroid Peroxidase Antigen; Anti-TG, Antithyroglobulin; FSH, Follicle stimulating hormone; LH, Luteinizing hormone; CRP, C-reactive protein; SD, Standard deviation; IQR, Interquartile range.

media in order to differentiate B lymphocyte subsets: CD5 PerCP (clone UCHT2), CD19 PE (clone SJ25C1), IgD APC (clone IA6-2), CD25 BV421 (clone BC96) (all from Sony Biotechnology), CD27 PE-Cy7 (clone M-T271, BioLegend). The cells were

incubated with the antibodies for 30 minutes in the dark at room temperature (RT), according to the manufacturer's instructions. Following labeling, samples were washed twice in RPMI.

Loading with calcium indicator dye

Cytoplasmic free, ionized calcium level was detected by loading the cells with 5 μ M Fluo-4- acetoxymethyl (AM) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific in DMSO, Sigma-Aldrich) supplemented with 20% (w/v) Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) for 15 minutes in the dark at RT. Cells were washed and then kept in RPMI medium supplemented with CaCl_2 to a Ca^{2+} concentration of 1.8 mM. Cells were incubated in RT in the dark for a further 30 minutes to allow complete de-esterification of intracellular Fluo-4-AM esters. Each sample was measured directly after the de-esterification period.

Flow cytometry measurements

Fluorescence data from each sample were measured and recorded for 17 minutes in a kinetic manner. Unstimulated controls were measured for the first 2 minutes for baseline acquisition, then B lymphocytes were activated by crosslinking the B cell receptor (BCR) with 10 μ g/ml F(ab')_2 Fragment AffiniPure Goat Anti-Human IgG + IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch) and samples were measured for another 15 minutes. Flow cytometry measurements were performed using FACS Canto II (BD Biosciences).

Analysis, controls, and reproducibility

In order to ensure flawless measurements and comparable experiments, cytometer setup and tracking (CS&T) measurement was carried out on every measurement day. Compensation controls were measured, and matrices were calculated specifically for each measurement day in FlowJo (V10.7.1.), using compensation beads (BD) for fluorochrome-conjugated antibodies and the test subject's PBMCs for Fluo-4. Data were analyzed using FlowJo v10.7.1 (BD Biosciences). All gates were set in FlowJo, using Fluorescent Minus One (FMO) controls for each sample (Supplementary Figure 1).

Following gating, the compensated FCS data of each subpopulation were separately exported. Kinetic curves were calculated by FacsKin (<https://facskin.bitbucket.io/>) using an algorithm that fits a function to the median fluorescence intensities of the calcium indicator dye, Fluo-4. This allows the mathematical description and statistical comparison of flow cytometry acquired kinetic measurements. The calcium flux of B cells can be described by a double-logistic function, as the intracellular calcium level first increases, reaches a maximum level, then decreases and reaches a plateau. Each curve is described by the following parameters: starting value; time to reach the first 50% value, slope at first 50% value (ascending phase), time from first 50% to maximum, time to reach the maximum value, maximum value, time from maximum to

second 50%, slope at second 50% value (descending phase), ending value, and area under the curve (AUC).

The starting value is determined by the baseline calcium level of each sample and subset and every curve is standardized to start at 1. Therefore, measurements from different subsets, patients and days can be compared objectively. The maximum value of the Fluo-4 MFI correlates with the peak Ca^{2+} level following an activating stimulus. The ending value shows the MFI of the Fluo-4 at the end of the measurement period, which in a 15-minute measurement corresponds with the plateau phase of the activation curve. The time and slope parameters indicate how quickly the given cells are able to mobilize Ca^{2+} upon BCR stimulation. The area under the curve (AUC) value is the most sensitive, as it indicates the total capacity of cells to mobilize free Ca^{2+} into the cytoplasm. (Figure 1).

Various viability tests were performed. In a separate tube, a viability dye (Zombie NIR, from Biolegend) was added at the time of cell surface labeling to check viability of the cells prior to loading with Fluo-4. was also checked during gating, as Fluo-4+ cells were gated. As only live cells with intact membrane can be loaded with Fluo-4 we used this method to exclude cells that might have been damaged during labeling. All samples had over 95% viability within the lymphocyte gate with both methods. After measuring each tube, trypan blue was used to check that the activation process did not lead to rapid cell death.

Statistics

In order to detect the differences between the HC-H2, HC-H1, HC-HIE, H2-HIE, H1-HIE patient groups we used ordinary two-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test. Differences between the H1 and H2 groups were assessed by a mixed-effects analysis and the Sidak's multiple comparisons test due to repeated sampling and randomly missing values. Levels of comparisons are the follows; (1) between the mean of the patient groups when completely ignoring the grouping of the cells, (2) between the mean of the patient groups within the cell populations and subpopulations, (3) between the mean of cell populations and subpopulations within the patient groups. Statistical analysis was carried out in Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Different naive and memory B cell ratio in levothyroxine treated and ATA+, euthyroid, infertile patients

The prevalence of B and T lymphocytes was comparable in the different patient groups. Within the B cell subpopulations,

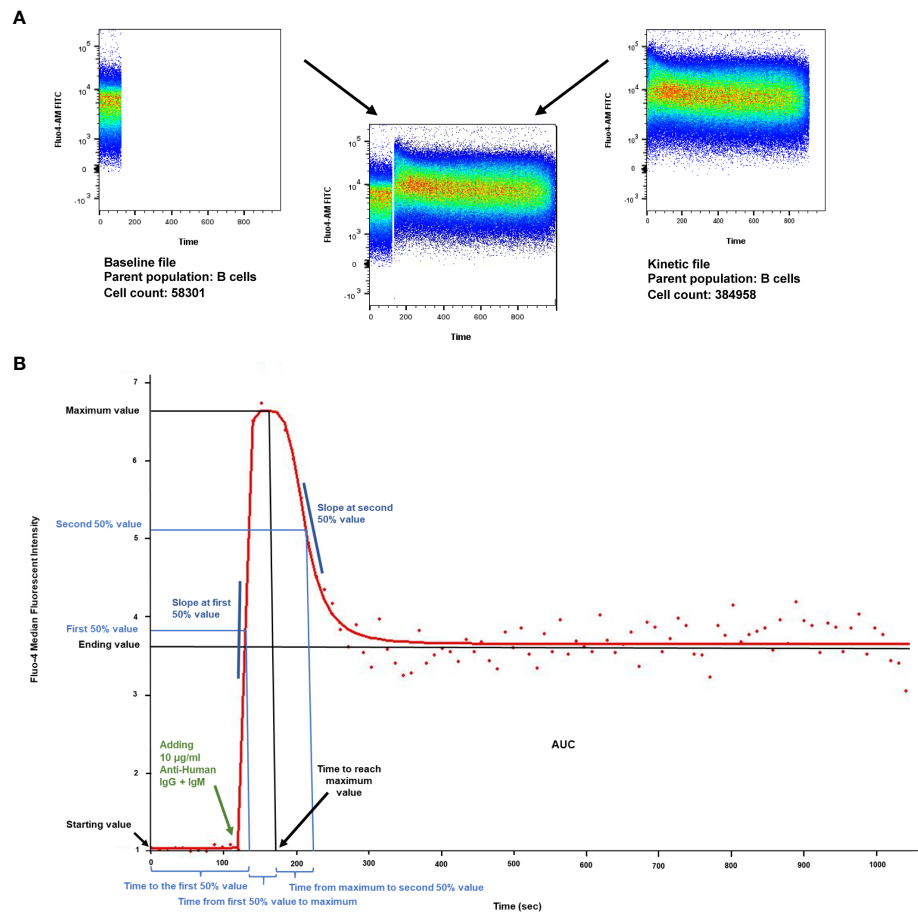


FIGURE 1

Calcium flux kinetic parameters. (A) Density plot of intracellular Ca^{2+} mobilization in human B cells in response to anti-IgG+M antibody stimulation after labeling with Fluor4-AM (analyzed by FlowJo v10.7.1). X axis: time, Y axis: Fluor4-AM (FITC). Unstimulated controls were acquired for the first 120 seconds for baseline, then B lymphocytes were activated by crosslinking the B cell receptor with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F(ab)₂ Fragment AffiniPure Goat Anti-Human IgG + IgM (H+L). Activated samples were recorded for 15 minutes (900 s) in a kinetic manner. (B) Parameters of the dlogist+ (Double-logistic) kinetic function calculated by FacsKin. Example of a Ca^{2+} flux kinetic curve after anti-IgG+M activation. X axis: time, Y axis: relative parameter value: standardized based on the Fluor4-AM MFI (median fluorescent intensity). The kinetic curve is created based on the median values of the gated population. The biologically relevant parameters are the following: starting value, calculated as the limit of the function at $-\infty$ (minus infinity) (standardized to 1); time to the first 50% value (s); slope at first 50% value, which is always positive and defines how much the intensity changes during 1 second (unit: int/s where int is the unit of the vertical axis); time from first 50% to maximum value (s), time to reach maximum value (s), maximum value (relative value); time from maximum to second 50% value (s); slope at second 50% value, always negative (unit: int/s); ending value, calculated as the limit of the function at $+\infty$ (positive infinity), AUC: the area under curve from time point 0 to 1020 s (manually set to actual time of measurement).

the prevalence of naive B cells was higher in the euthyroid, levothyroxine treated Hashimoto (H2) group compared to the ATA+, infertile, euthyroid (HIE) group ($p=0.0230$), while H2 patients had significantly lower number of memory cells compared to HIE patients ($p=0.0230$). **Figure 2A**).

The prevalence of the non-switched memory (NSw) ($p=0.0289$) and the class-switched memory (Sw, $p=0.0196$) B cells was significantly higher in the HIE group compared to the H2 patients (**Figure 2B**).

The CD25-expressing B lymphocyte compartment is smaller in levothyroxine treated patients

The prevalence of CD25 expressing cells within all B cell subpopulations did not differ among the healthy control (HC), the hypothyroid, untreated (H1) and HIE patients, but was significantly lower in the H2 group (vs HC $p=0.0008$, vs H1 $p=0.0021$, vs HIE $p=0.0003$). The prevalence of CD25⁺ CD27⁻

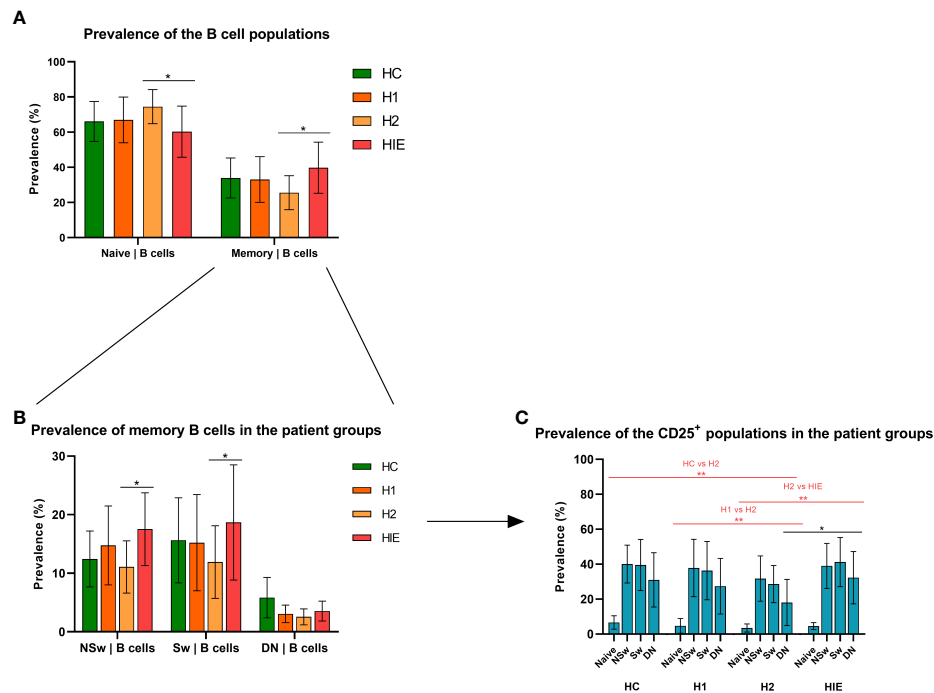


FIGURE 2

Different naive and memory B cell ratio in levothyroxine treated and ATA+, euthyroid, infertile patients. Prevalence of naive and memory B cell subsets (A), B cell memory subpopulations (B) and CD25⁺ B cell subpopulations (C). HC: healthy controls (n=12); HT: Hashimoto's thyroiditis, H1: hypothyroid patients with HT before treatment (n=14); H2: euthyroid patients with HT, after levothyroxine-treatment, (n=12); HIE: HT, infertile, euthyroid patients (n=14); NSw: non-switched; Sw: switched, DN: double negative memory B cells. Differences between the groups and within the B cell subpopulations were assessed with two-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test except H1-H2 comparisons where a mixed-effects analysis and the Sidak's multiple comparisons tests were used because these groups represent the same individuals in a repeated sampling before and during treatment. Bars represent the mean \pm standard deviation (SD) of percentages of lymphocyte subpopulation in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

IgD⁻, double negative (DN) memory cells was lower in the H2 group compared to the HIE group ($p=0.0121$) (Figure 2C).

Basal calcium level is elevated in B cells from ATA+, euthyroid, infertile patients

The baseline Ca²⁺ level (indicated by the median fluorescence intensity (MFI) of Fluo-4) of total B cells from ATA+, infertile, euthyroid patients (HIE) was higher compared to the other groups [vs HC ($p=0.0186$), vs H2 ($p=0.0053$)] (Figure 3A).

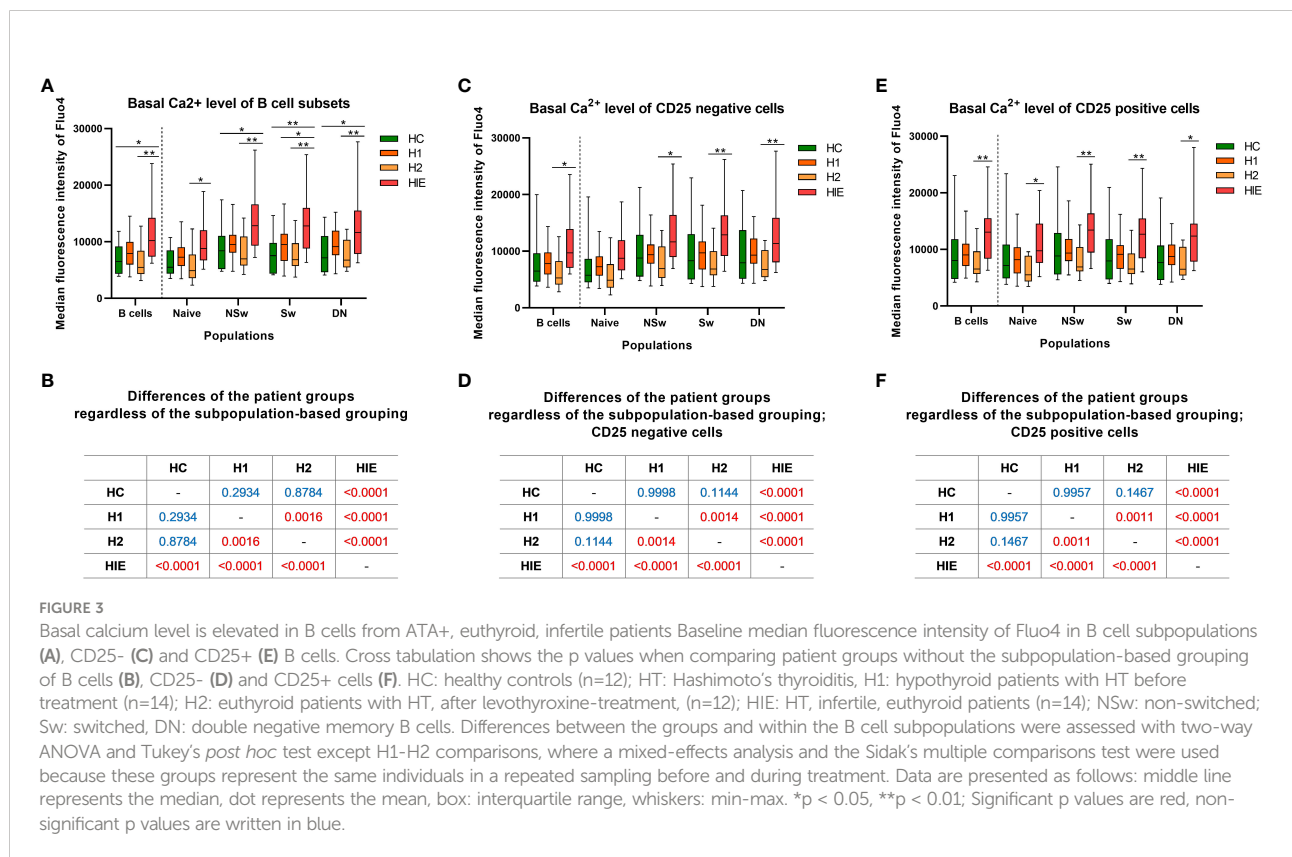
The baseline Fluo-4 MFI of naive B cells from HIE patients was higher compared to the H2 group ($p=0.0320$). Similar, more pronounced alterations were present in memory B cell subsets. The NSw memory cells of HIE patients showed significantly higher baseline Fluo-4 MFI compared to the HC ($p=0.0168$) and H2 ($p=0.0017$) groups. The baseline Fluo-4 MFI of Sw memory cells was higher in the HIE group in comparison with the HC ($p=0.0067$), the H1 ($p=0.0437$) and the H2 ($p=0.0022$) groups. The DN memory

subset of the HIE group also showed elevated basal Fluo-4 MFI compared to the HC ($p=0.0201$) and the H2 ($p=0.0054$) groups. (Figure 3A).

When investigating the differences in the basal Fluo-4 level between the patient groups, regardless of the subpopulation-based grouping, significant differences were found in the following comparisons: HC<HIE ($p<0.0001$), H1<HIE ($p<0.0001$), H2<HIE ($p<0.0001$), H1>H2 ($p=0.0016$). (Figure 3B).

When dividing B cells and subsets based on their CD25 expression, similar alterations were present in both CD25 negative (CD25⁻) and CD25 positive (CD25⁺) B cell subsets. In the case of CD25⁻ B cells, only the memory subsets showed higher baseline Fluo-4 MFI in the HIE group compared to the H2 group (NSw $p=0.0123$, Sw $p=0.0045$, DN $p=0.0066$). (Figures 3C-F).

Levothyroxine treatment decreased the baseline Ca²⁺ level, although neither pre- nor post-treatment values differed from the healthy control group ($p=0.0011$). This alteration is not only present in the CD25⁺ cells, but also in the CD25⁻ fraction of B cells. (Figures 3B, D, F).



Naive B cells show higher Ca²⁺ signal upon BCR stimulation in ATA+ euthyroid, infertile patients

Then we compared the BCR stimulation induced Ca²⁺ flux properties in CD25⁺ and CD25⁻ naive B cells of the different patient groups. The maximum Fluo-4 MFI (peak of the Ca²⁺ signal) of CD25⁺ naive B cells was significantly higher compared to the total (B) and CD25⁻ naive B cell populations within all patient groups. No significant differences were present between the patient groups. (Figure 4A).

In contrast to the Max value, the ending Fluo-4 MFI was only higher in the CD25⁺ naive cells compared to the CD25⁻ cells in the HC group. HIE patients had higher Ending Fluo-4 MFI values compared to H1 (p=0.0269) and H2 (p=0.0050) groups. (Figure 4B).

The CD25⁺ naive cells of the untreated H1 patients required significantly more time to reach the maximum Fluo-4 MFI value of the activation compared to the HC group (p=0.0028). (Figure 4C). Time to 1st 50% and Time from 1st 50% to maximum parameters were comparable between the groups (Figures D, E).

In the descending phase of the activation, the CD25⁺ cells of the H2 patients required more time to reach the second 50% value of the curve, indicating that they need more time to reduce the intracellular free Ca²⁺ concentration than those of the HC group (p=0.0451). (Figure 4F).

The ascending (1st) slope was significantly steeper in CD25⁺ cells in the HC, H1 and HIE groups compared to CD25⁻ cells and to the whole naive population. (Figure 4G).

In the H2 group, the slope of the descending phase of the activation was significantly steeper in CD25⁺ cells compared to CD25⁻ cells (p=0.0024) and to the whole naive population (p=0.0024). Furthermore, naive CD25⁺ cells from H2 patients showed significantly steeper 2nd slope values compared to naive CD25⁺ cells from the H1 group (p=0.0475). (Figure 4H).

The AUC of CD25⁺ naive B cells was higher in every patient group compared to the CD25⁻ and total naive cells. The AUC value of the naive B cell population of HIE patients was higher compared to the HC (p=0.0200), to the H1 (p=0.0130) and to the H2 (p=0.0009) groups. The CD25⁺ naive B cells of HIE patients had higher AUC values than those of the H2 group (p=0.0070). (Figure 4I).

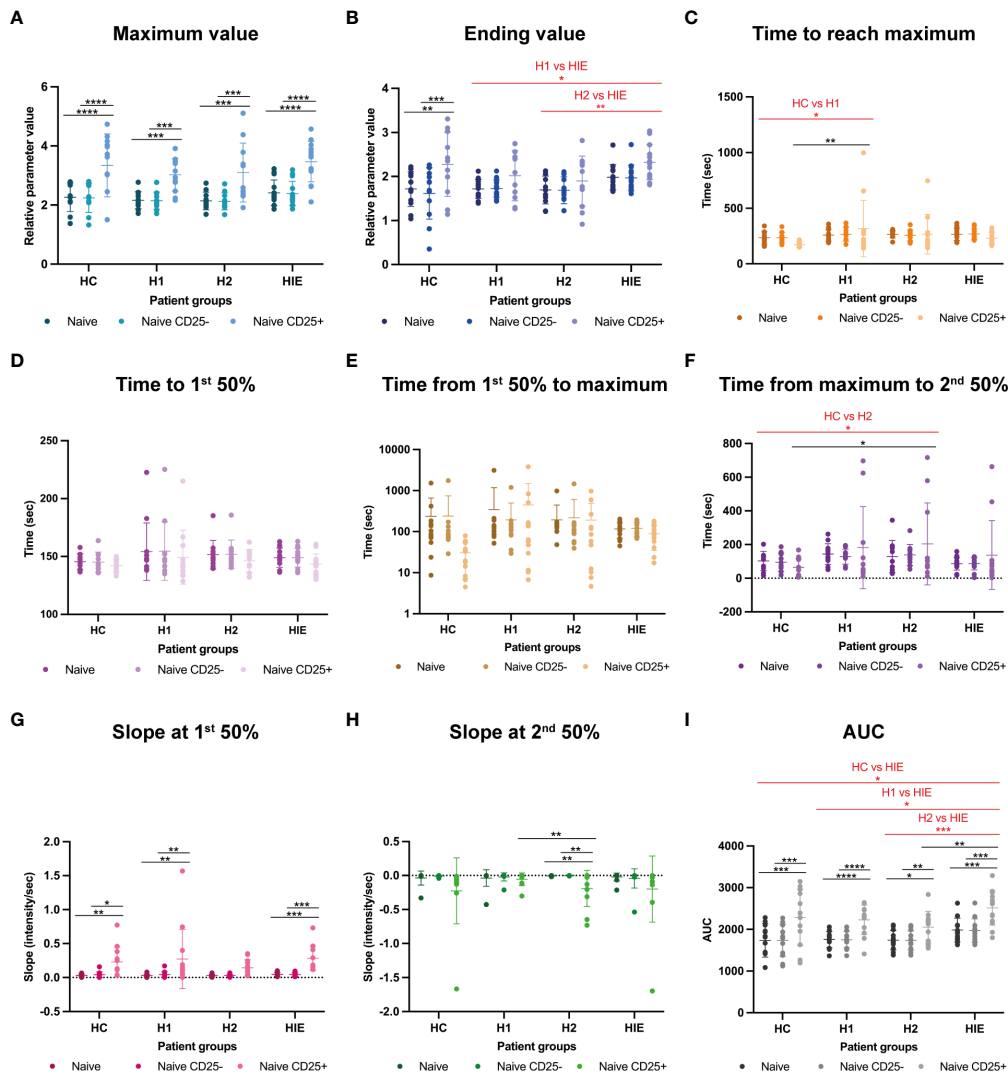


FIGURE 4

Naive B cells show higher Ca^{2+} signal upon BCR stimulation in ATA+ euthyroid, infertile patients Calcium flux kinetic data of naive B, naive CD25- and naive CD25+ B cells (A) maximum value, (B) ending value, (C) time to reach maximum, (D) time to first 50% value, (E) time from first 50% to maximum, (F) time from maximum to second 50% value, (G) slope at the first 50% value, (H) slope at second 50% value, (I) area under curve (AUC) value. HC: healthy controls (n=12); HT: Hashimoto's thyroiditis, H1: hypothyroid patients with HT before treatment (n=14); H2: euthyroid patients with HT, after levothyroxine-treatment, (n=12); HIE: HT, infertile, euthyroid patients (n=14); NSw: non-switched; Sw: switched, DN: double negative memory B cells. The kinetic data were analyzed by the FACSKin software. Differences between the groups were assessed with two-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test except H1-H2 comparisons where a mixed-effects analysis and the Tukey's multiple comparisons test were used because these groups represent the same individuals in a repeated sampling before and during treatment. Data are depicted as individual values, middle line represents the mean, whiskers are set to standard deviation (SD) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Memory B cells of ATA+, euthyroid, infertile patients have enhanced Ca^{2+} flux upon BCR activation

Similarly, to the naive B cells, CD25⁺ NSw memory B cells had higher Max values compared to the whole NSw subpopulation and CD25⁻ NSw cells. When comparing the patient groups, regardless of the CD25-based grouping, we found that the maximum Fluo4 MFI was higher after

levothyroxine treatment (H2) compared to before treatment values (H1, $p=0.0385$). (Figure 5A).

The ending Fluo-4 MFI of CD25⁺ NSw memory cells was also higher in all patient groups (H1, H2, HIE) compared to the total NSw population and the CD25⁻ NSw cells. The HIE group had a higher ending values than the HC group ($p=0.0308$) and CD25⁺ NSw cells of HIE patients had higher ending values than CD25⁺ NSw cells of HC ($p=0.0357$). (Figure 5B) The AUC values of the CD25⁺ NSw memory cells were significantly higher

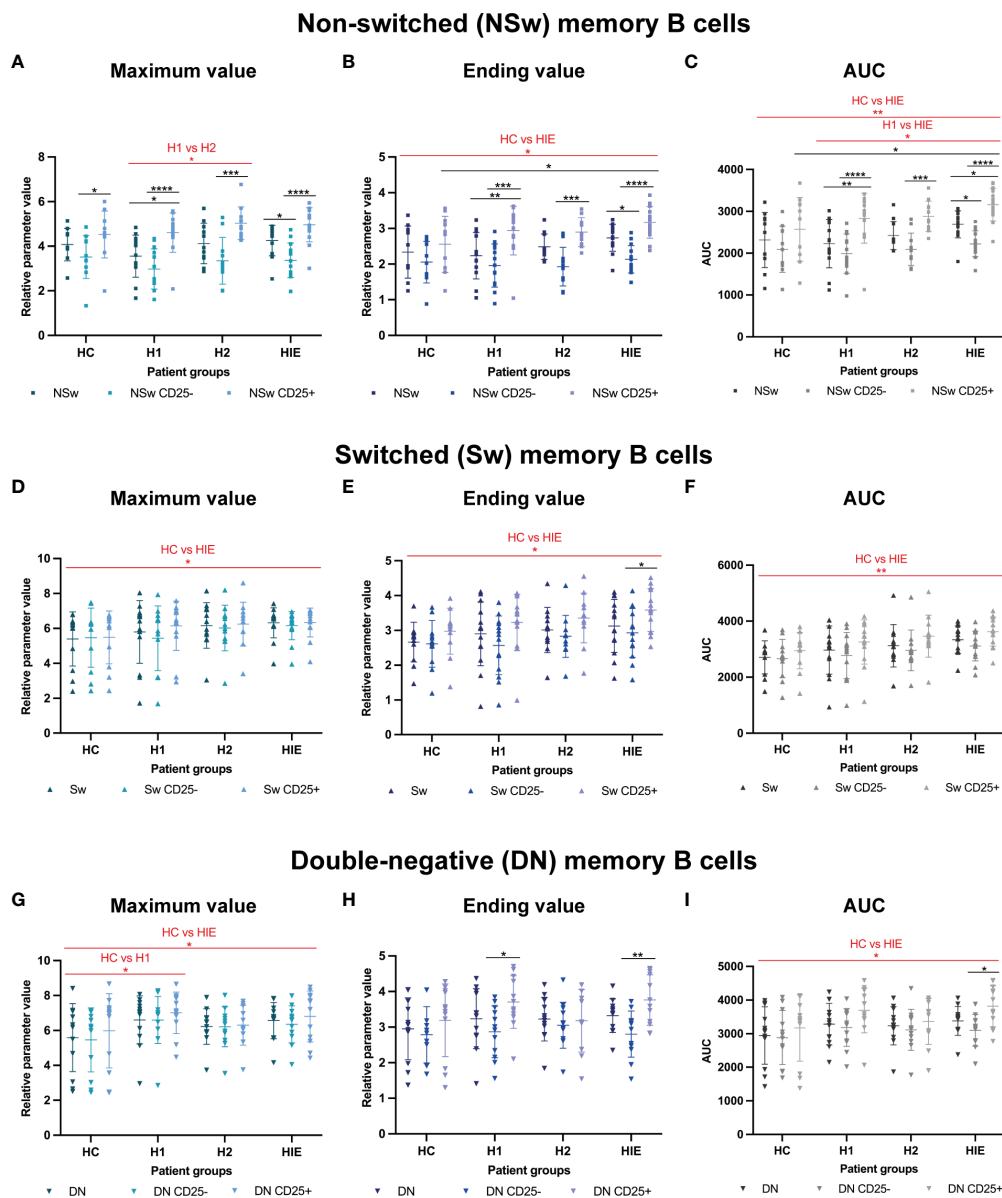


FIGURE 5

Memory B cells of ATA+, euthyroid, infertile patients have increased calcium flux upon BCR activation. Selected calcium flux kinetic data of memory B cell subsets: Non-switched (NSw) memory B cells, CD25⁻ and CD25⁺ NSw cells: (A) maximum value, (B) ending value, (C) area under curve (AUC) value. Immunoglobulin class-switched (Sw) memory B cells, CD25⁻ and CD25⁺ Sw cells: (D) maximum value, (E) ending value, (F) area under curve (AUC) value. CD27⁻, IgD⁻ double-negative (DN) memory B cells, CD25⁻ and CD25⁺ DN cells: (G) maximum value, (H) ending value, (I) area under curve (AUC) value. HC: healthy controls (n=12); HT: Hashimoto's thyroiditis, H1: hypothyroid patients with HT before treatment (n=14); H2: euthyroid patients with HT, after levothyroxine-treatment, (n=12); HIE: HT, infertile, euthyroid patients (n=14). The kinetic data were analyzed by the FACSkin software. Differences between the groups were assessed with two-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test except H1-H2 comparisons where a mixed-effects analysis and the Tukey's multiple comparisons test were used because these groups represent the same individuals in a repeated sampling before and during treatment. Data are depicted as individual values, middle line represents the mean, whiskers are set to standard deviation (SD). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

than those of CD25⁻ NSw cells in all three (H1, H2, HIE) patient groups. The CD25⁺ NSw cells of HIE patients had exceptionally high AUC values, significantly higher compared to the CD25⁺ NSw cells of healthy controls. When looking at patient groups regardless of the CD25 expression-based grouping, the

difference between the AUC values of NSw cells from HIE patients was not only higher compared to healthy controls (HC, p=0.0097), but also compared to hypothyroid patients (H1, p=0.0121). (Figure 5C) The CD25⁺ NSw cells also reacted faster than CD25⁻ NSw cells in all groups. Significant differences

could be detected in pattern of activation between the HC and H1; and the HC and HIE groups. Further time and slope parameters of NSw memory cells are presented in [Supplementary Figure 2](#).

The Sw memory cells of HIE patients showed higher Maximum, Ending and AUC values compared to the HC group ($p=0.0487$, $p=0.0282$ and $p=0.0015$ respectively). ([Figures 5D-F](#)) The CD25⁺ compartment of the Sw memory cells also had higher Ending value compared to the CD25⁻ cells in HIE patients ($p=0.0479$). ([Figure 5E](#)) The Sw cells of H1 patients required more time to reach the maximum value compared to HC ($p=0.0044$), whereas the Sw cells from the same patients after treatment (H2) needed less time compared H1 ($p=0.0309$). ([Supplementary Figure 3](#)).

The DN memory cells of both H1 and HIE patients showed higher maximum Fluo-4 MFI values compared to the healthy controls ($p=0.0102$ and $p=0.0449$, respectively). ([Figure 5G](#)) CD25⁺ DN memory cells showed higher ending Fluo4 MFI compared to CD25⁻ cells in the H1 ($p=0.0202$) and in the HIE ($p=0.0067$) groups. ([Figure 5H](#)) CD25⁺ DN cells had higher AUC values compared to CD25⁻ DN cells in the infertile (HIE) group. DN memory B cells from HIE patients had an overall higher AUC compared to healthy controls (HC, $p=0.0359$). ([Figure 5I](#)) DN memory cells of HIE patients reacted slightly faster (higher 1st slope) to BCR stimulation compared to controls (HC, $p=0.0467$). ([Supplementary Figure 4](#))

Discussion

In this study we investigated the Ca²⁺ flux of B cell subsets in response to BCR ligation in infertile, euthyroid, ATA+ women; hypothyroid, ATA+ patients before and after levothyroxine treatment and age-matched healthy controls. The functional alterations of B lymphocytes have never been investigated in Hashimoto's thyroiditis and infertility before. Signaling *via* the BCR is the 'master regulator' of most aspects of immunological fate in B cells including positive and negative selection, central and peripheral tolerance, activation and function (29). Ca²⁺ flux serves as a central pathway for encoding and transducing differences in BCR signaling with significant biological and pathological consequences (43, 44). The BCR signaling is modified by synergizing signals from several receptors, such as the B cell-activating factor receptor (BAFFR), toll-like receptors (TLR) 7 and 9 and CD40 (45). Emerging evidence indicates that even modest alterations in BCR signaling are sufficient to facilitate and maintain autoimmunity in a B cell-intrinsic manner *via* several distinct mechanisms (29).

Altered signaling downstream of the BCR and synergizing receptors can lead to the skewing of the naive BCR repertoire resulting in an increased prevalence of autoreactive clones (59–63). However, this alone is not enough for the development of an autoimmune disease, as up to 40% of newly formed B cells

exhibit autoreactivity in healthy individuals as well (64, 65). The critical step in the loss of tolerance is the activation of autoreactive B cell clones. Evidence indicates that during an autoimmune disorder autoantibody-producing B cells can be formed both in the germinal center and *via* the extra-follicular pathway. Remarkably, under specific circumstances newly formed B cells are able to by-pass the germinal center yet still go through somatic-hypermutation and antibody class-switching and differentiate into short lived plasmablasts in the periphery (66). An infection could be an important permissive circumstance, as increased BAFF and type I IFN production along with the presence of pathogen-derived antigens, which connect to the TLRs can create the opportunity for newly formed B cells to activate and go through class switching. Among these activated B cells a higher prevalence of self-reactive clones may initiate autoantibody production (64).

Recent studies have demonstrated that activated autoreactive B cells are able to direct the formation of spontaneous GCs and facilitate the break in T cell tolerance by recruiting cognate T_{FH} cells (29). It is intriguing to assume that B cells may be the ones that play the initial role of antigen presentation, providing the crucial activating signals for autoreactive T cells (29). In this regard, the CD25⁺ B cells may be especially interesting (58). In line with previous findings, suggesting that CD25⁺ B cells represent a functionally different group (58), we found enhanced responsiveness to BCR stimulation in CD25⁺ B cells compared to CD25⁻ cells within the naive and non-switched subsets in healthy controls as well as all patient populations.

The B cells of infertile, ATA+ euthyroid patients showed higher basal level of Ca²⁺ and hyperresponsivity to BCR ligation, indicated by the altered Ca²⁺ flux kinetic parameters compared to healthy controls and hypothyroid patients. Interestingly, the elevated basal Ca²⁺ level was not only present in the CD25⁺ compartment of B cell subsets, but also the CD25⁻ compartment. The naive B cells of infertile patients had enhanced Ca²⁺ flux response compared to the healthy control group, which is especially interesting knowing that immature B cell clones that have enhanced response to BCR stimulation have an advantage during the positive selection. In experimental settings a slight increase in the BCR signaling strength was sufficient to promote autoimmunity in a B cell intrinsic manner (29). Memory subsets of infertile, ATA+ patients also showed BCR-hyperreactivity compared to healthy controls.

Surprisingly, we only found minimal differences between hypothyroid patients and healthy controls. However, we observed differences between the hypothyroid and the ATA+, infertile, euthyroid patient groups. The overall basal Ca²⁺ level of B cells of infertile patients was higher than that of hypothyroid patients. However, the differences in the Ca²⁺ flux kinetics between the euthyroid infertile and the hypothyroid group were only present in the naive and non-switched memory subsets. The naive subset had higher Ca²⁺ levels at the end of the measurement and both the naive and the non-switched

memory cells had higher AUC in the infertile group compared to the hypothyroid group. The switched and double-negative memory subsets on the other hand showed similar Ca^{2+} flux characteristics in these two patient populations. The double-negative memory cells for example had a similarly elevated Max value in both the hypothyroid and the euthyroid, infertile group compared to healthy controls.

These findings indicate elevated basal Ca^{2+} levels and enhanced Ca^{2+} flux response in ATA+, euthyroid, infertile patients but not in hypothyroid patients. Two hypotheses could explain these findings, first, that these two patient populations represent different stages of thyroid disease, which could impact the characteristics of the autoimmune response. The ATA+, infertile, euthyroid patients still have maintained thyroid function, thus the observed alterations could be characteristics of an earlier stage of thyroid autoimmunity. In the hypothyroid group, the signs of thyroid tissue damage are evident on the thyroid ultrasound, and they have decreased thyroid function, indicating years of ongoing autoimmune inflammation. This would support the notion that the loss of tolerance for thyroid antigens is initiated in the periphery rather than in the thyroid gland itself. Second, the key difference between the H1 and HIE groups is the presence of infertility. In this context, the enhanced Ca^{2+} flux response of B cells may be a result of systemic immune dysfunction, which could be the common underlying cause of both infertility and HT. Overall, these data support the role of enhanced BCR-induced Ca^{2+} flux in the early phase of thyroid autoimmunity and infertility and lead us to believe that further investigating of this population is key to understanding the connection between Hashimoto's thyroiditis and infertility.

To investigate the direct effect of hypothyroidism on B cell function, we evaluated the hypothyroid patients following levothyroxine replacement. After the normalization of TSH levels, the basal Ca^{2+} levels of these patients decreased compared to pre-treatment, although neither the pre- nor post-treatment values differed from the healthy controls. More interestingly, levothyroxine treatment decreased the prevalence of $\text{CD}25^+$ B cells, which are presumed to play an important role in peripheral antigen presentation to T cells (58). One reason for this could be a lower autoantigen release due to decreased metabolic activity of thyroid follicles or it may be a direct effect of levothyroxine. This is a potential mechanism how the levothyroxine treatment of hypothyroidism could decrease the progression rate of autoimmune thyroid destruction.

Interestingly, we found differences between the two euthyroid patient groups (H2 and HIE) as well. The prevalence of naive B cells was lower, while the prevalence of memory B cells was higher in ATA+, infertile, euthyroid patients compared to levothyroxine-treated, euthyroid patients. The prevalence of $\text{CD}25^+$ B cells was lower in the levothyroxine

treated group, specifically in the double-negative memory subset. The basal Ca^{2+} level was higher in infertile patients in all B cells and subsets. The naive cells of infertile patients had higher intracellular Ca^{2+} level at the end of the measurement and the whole naive population and the $\text{CD}25^+$ naive cells had higher overall Ca^{2+} flux (AUC) compared to the levothyroxine treated group. As both groups were in a euthyroid state, it seems that thyroid function on its own does not determine the Ca^{2+} flux response of peripheral B cells.

The greatest strength of this work is that utilizing this novel flow cytometry method enables us to describe the subtle alterations of the activation response of selected B lymphocyte subsets in real time. This gives us information about the function of B cell subsets and allows the objective comparison of subsets, as each receives the exact same activating stimulus. The alterations of slope and time parameters did not appear relevant in thyroid autoimmunity, however, to adhere to the rules of accurate scientific reporting we decided to present these parameters as well. The most important limitation of this study is that due to the very strict inclusion criteria, the highly specialized measurement method and the COVID-19 pandemic, the number of patients is limited. Therefore, these results have to be verified on larger patient populations as well. Although the autoimmune thyroid inflammation takes place in the thyroid gland itself and therefore investigating peripheral B cells has limitations, the thyroid-specific memory B lymphocytes can re-enter the circulation and reflect the ongoing autoimmune process. More importantly, as infertility suggests a systemic immune disorder, investigating peripheral B cell subsets is highly relevant in the question of how HT and infertility are related.

In conclusion, we were able to show systemic BCR-hyperresponsivity in ATA+, infertile, euthyroid patients, which was not present in hypothyroid patients. This supports the role of altered Ca^{2+} flux of B cells in the early phase of thyroid autoimmunity and infertility. We therefore suggest a paradigm shift, where B cells could play a role in the development of thyroid autoimmunity and infertility rather than being just by-standers in the inflammatory response. This could also mean that the thyroid gland is just one of the targets of autoreactive B cells and autoimmune thyroiditis might not be the underlying cause of infertility. However, further investigations are necessary to understand the association of Hashimoto's thyroiditis and infertility. Levothyroxine treatment led to a subtle decrease in the prevalence of $\text{CD}25^+$ B cells and lower basal Ca^{2+} levels compared to pre-treatment, which indicate that levothyroxine may have a slight effect on the progression of autoimmune inflammation. However, as differences were present between the two euthyroid groups, thyroid function alone is unlikely to determine the function of B cells.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Materials](#). Further inquiries can be directed to AB at bajnok.panni@gmail.com.

Ethics statement

This study was reviewed and approved by Regional Research Ethics Committee of the Medical Center, University of Pécs (RIKEB 5913/2015). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

Conceptualization and experiment design TS-L, AB, VT, TB, and EM. Calcium-flux methodology AB, TS-L and VT. FacsKin Software development AK. Formal Analysis VT and JN. Investigation TS-L, AB and JN. Resources EM, TB and TK. Patient enrollment AB, EM, AV, KK and SP. Patient data acquisition GP-D. Writing – original draft, AB, TS-L, VT and EM. Writing – Review and Editing TB, TK and EM. Visualization, TS-L, VT, JN and GP-D. Supervision, EM and TB. Funding Acquisition, EM, TB and TK. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the PTE ÁOK-KA grant (No: KA-2019-28), the Thematic Excellence Program 2020 - Institutional Excellence Sub-program of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the second thematic program of the University of Pécs and the European Union and co-financed by the European Social Fund: Comprehensive Development for Implementing Smart

References

- Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *New Engl J Med* (2003) 348(26):2646–55. doi: 10.1056/NEJMra021194
- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. T(4), and thyroid antibodies in the united states population (1988 to 1994): National health and nutrition examination survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87(2):489–99. doi: 10.1210/jcem.87.2.8182
- Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1995) 43(1):55–68. doi: 10.1111/j.1365-2265.1995.tb01894.x
- Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune disorders in hashimoto's thyroiditis: What do we know so far? *J Immunol Res* (2015) 2015:979167. doi: 10.1155/2015/979167
- Thangaratnam S, Tan A, Knox E, Kilby MD, Franklyn J, Coomarasamy A. Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ (Clinical Res ed)* (2011) 342:d2616. doi: 10.1136/bmj.d2616
- Zhong YP, Ying Y, Wu HT, Zhou CQ, Xu YW, Wang Q, et al. Relationship between antithyroid antibody and pregnancy outcome following *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Int J Med Sci* (2012) 9(2):121–5. doi: 10.7150/ijms.3467
- Gleicher N. Maternal autoimmunity and adverse pregnancy outcomes. *J Autoimmunity* (2014) 50:83–6. doi: 10.1016/j.jaut.2013.12.009
- Negro R, Mangieri T, Coppola L, Presicce G, Casavola EC, Gismondi R, et al. Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. *Hum Reprod* (2005) 20(6):1529–33. doi: 10.1093/humrep/deh843

Specialization Strategies at the University of Pécs (EFOP-3.6.1.-16-2016-00004). This work was supported by the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the TKP-2021-EGA-10 funding scheme.

Acknowledgments

The research was performed in collaboration with the Flow Cytometry Core Facility at the Szentágotthai Research Centre of the University of Pécs. The present scientific publication is part of the Hungarian National Laboratory on Reproduction. The authors would like to thank Diána Simon for her contribution to the initial study concept.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1039166/full#supplementary-material>

9. Negro R, Formoso G, Mangieri T, Pezzarossa A, Dazzi D, Hassan H. Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91(7):2587–91. doi: 10.1210/jc.2005-1603
10. Dhillon-Smith RK, Middleton LJ, Sunner KK, Cheed V, Baker K, Farrell-Carver S, et al. Levothyroxine in women with thyroid peroxidase antibodies before conception. *New Engl J Med* (2019) 380(14):1316–25. doi: 10.1056/NEJMoa1812537
11. Zhu Q, Xu QH, Xie T, Wang LL, Liu H, Muyayalo KP, et al. Recent insights into the impact of immune dysfunction on reproduction in autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol* (2021) 224:108663. doi: 10.1016/j.clim.2020.108663
12. Weetman AP. Immunity, thyroid function and pregnancy: molecular mechanisms. *Nat Rev Endocrinol* (2010) 6(6):311–8. doi: 10.1038/nrendo.2010.46
13. Monteleone P, Parrini D, Faviana P, Carletti E, Casarosa E, Uccelli A, et al. Female infertility related to thyroid autoimmunity: The ovarian follicle hypothesis. *Am J Reprod Immunol* (2011) 66(2):108–14. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00961.x
14. Kelkar RL, Meherji PK, Kadam SS, Gupta SK, Nandedkar TD. Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. *J Reprod Immunol* (2005) 66(1):53–67. doi: 10.1016/j.jri.2005.02.003
15. Matalon ST, Blank M, Levy Y, Carp HJA, Arad A, Burek L, et al. The pathogenic role of anti-thyroglobulin antibody on pregnancy: Evidence from an active immunization model in mice. *Hum Reproduction* (2003) 18(5):1094–9. doi: 10.1093/humrep/deg210
16. Negro R, Stagnaro-Green A. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *BMJ (Clinical Res ed)* (2014) 349:g4929. doi: 10.1136/bmj.g4929
17. Sheehan PM, Nankervis A, Araujo Júnior E, Da Silva Costa F. Maternal thyroid disease and preterm birth: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100(11):4325–31. doi: 10.1210/jc.2015-3074
18. Maraka S, Ospina NM, O'Keefe DT, Espinosa De Ycaza AE, Gionfriddo MR, Erwin PJ, et al. Subclinical hypothyroidism in pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Thyroid* (2016) 26(4):580–90. doi: 10.1089/thy.2015.0418
19. Korevaar TI, de Rijke YB, Chaker L, Medici M, Jaddoe VW, Steegers EA, et al. Stimulation of thyroid function by human chorionic gonadotropin during pregnancy: A risk factor for thyroid disease and a mechanism for known risk factors. *Thyroid* (2017) 27(3):440–50. doi: 10.1089/thy.2016.0527
20. Korevaar TI, Steegers EA, Pop VJ, Broeren MA, Chaker L, de Rijke YB, et al. Thyroid autoimmunity impairs the thyroidal response to human chorionic gonadotropin: Two population-based prospective cohort studies. *J Clin Endocrinol Metab* (2017) 102(1):69–77. doi: 10.1210/jc.2016-2942
21. Loh TP, Tee JC, Tee NW, Cheng WL, Thevarajah M, Sabir N, et al. Association between thyroid function tests and anti-thyroid peroxidase (TPO) antibodies in pregnancy. *Endocrine* (2016) 53(3):865–7. doi: 10.1007/s12020-015-0844-y
22. Chan S, Boelaert K. Optimal management of hypothyroidism, hypothyroxinaemia and euthyroid TPO antibody positivity preconception and in pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2015) 82(3):313–26. doi: 10.1111/cen.12605
23. Korevaar TIM, Medici M, Visser TJ, Peeters RP. Thyroid disease in pregnancy: new insights in diagnosis and clinical management. *Nat Rev Endocrinol* (2017) 13(10):610–22. doi: 10.1038/nrendo.2017.93
24. Kim NY, Cho HJ, Kim HY, Yang KM, Ahn HK, Thornton S, et al. Thyroid autoimmunity and its association with cellular and humoral immunity in women with reproductive failures. *Am J Reprod Immunol* (2011) 65(1):78–87. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00911.x
25. Cellini M, Santaguida MG, Stramazzo I, Capriello S, Brusca N, Antonelli A, et al. Recurrent pregnancy loss in women with hashimoto's thyroiditis with concurrent non-endocrine autoimmune disorders. *Thyroid* (2020) 30(3):457–62. doi: 10.1089/thy.2019.0456
26. Caccavo D, Pellegrino NM, Nardelli C, Vergine S, Leone L, Marolla A, et al. Anti-laminin-1 antibodies in serum and follicular fluid of women with hashimoto's thyroiditis undergoing *in vitro* fertilization. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2016) 29(2):280–7. doi: 10.1177/0394632015627281
27. Volpé R. B-lymphocytes in autoimmune thyroid diseases (AITD). *Rev Endocr Metab Disord* (2000) 1(1-2):79–86. doi: 10.1023/A:1010068504848
28. Weetman AP. Autoimmune thyroiditis: predisposition and pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1992) 36(4):307–23. doi: 10.1111/j.1365-2265.1992.tb01453.x
29. Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, Jackson SW. Altered b cell signalling in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* (2017) 17(7):421–36. doi: 10.1038/nri.2017.24
30. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* (2003) 349(16):1526–33. doi: 10.1056/NEJMoa021933
31. Deane KD, Norris JM, Holers VM. Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation. *Rheum Dis Clin North Am* (2010) 36(2):213–41. doi: 10.1016/j.rdc.2010.02.001
32. Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, et al. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* (2012) 7(5):e35296. doi: 10.1371/journal.pone.0035296
33. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes* (2005) 54 Suppl 2:S52–61. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl_2.S52
34. Packard TA, Cambier JC. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep* (2013) 5:40. doi: 10.12703/P5-40
35. Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K, Cambier JC. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and syk tyrosine kinases. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (1995) 155(10):4596–603.
36. Saijo K, Schmedt C, Su IH, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, et al. Essential role of src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during b cell development. *Nat Immunol* (2003) 4(3):274–9. doi: 10.1038/ni893
37. Gold MR, Matsuuchi L, Kelly RB, DeFranco AL. Tyrosine phosphorylation of components of the b-cell antigen receptors following receptor crosslinking. *Proc Natl Acad Sci United States America* (1991) 88(8):3436–40. doi: 10.1073/pnas.88.8.3436
38. Rowley RB, Burkhardt AL, Chao HG, Matsueda GR, Bolen JB. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* (1995) 270(19):11590–4. doi: 10.1074/jbc.270.19.11590
39. Coggeshall KM, Cambier JC. B cell activation. VIII. membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (1984) 133(6):3382–6.
40. Ransom JT, Harris LK, Cambier JC. Anti-ig induces release of inositol 1,4,5-trisphosphate, which mediates mobilization of intracellular ca++ stores in b lymphocytes. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (1986) 137(2):708–14.
41. Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* (2010) 28:491–533. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132550
42. Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, et al. The CRAC channel consists of a tetramer formed by stim-induced dimerization of orai dimers. *Nature* (2008) 456(7218):116–20. doi: 10.1038/nature07338
43. Berry CT, Liu X, Myles A, Nandi S, Chen YH, Hershberg U, et al. BCR-induced Ca2+ signals dynamically tune survival, metabolic reprogramming, and proliferation of naive b cells. *Cell Rep* (2020) 31(2):107474. doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.038
44. Baba Y, Kurosaki T. Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr Top Microbiol Immunol* (2016) 393:143–74. doi: 10.1007/82_2015_477
45. Jackson SW, Kolhatkar NS, Rawlings DJ. B cells take the front seat: dysregulated b cell signals orchestrate loss of tolerance and autoantibody production. *Curr Opin Immunol* (2015) 33:70–7. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.018
46. Hwangbo Y, Park YJ. Genome-wide association studies of autoimmune thyroid diseases, thyroid function, and thyroid cancer. *Endocrinol Metab (Seoul)* (2018) 33(2):175–84. doi: 10.3803/EnM.2018.33.2.175
47. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *New Engl J Med* (2008) 358(9):900–9. doi: 10.1056/NEJMoa0707865
48. Lu R, Vidal GS, Kelly JA, Delgado-Vega AM, Howard XK, Macwana SR, et al. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* (2009) 10(5):397–403. doi: 10.1038/gene.2009.19
49. Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* (2008) 40(2):204–10. doi: 10.1038/ng.81
50. Armitage LH, Walleit MA, Mathews CE. Influence of PTPN22 allotypes on innate and adaptive immune function in health and disease. *Front Immunol* (2021) 12(189). doi: 10.3389/fimmu.2021.636618
51. Wu H, Wan S, Qu M, Ren B, Liu L, Shen H. The relationship between PTPN22 R620W polymorphisms and the susceptibility to autoimmune thyroid diseases: An updated meta-analysis. *Immunol Investigations* (2020) 51(2):438–451. doi: 10.1080/08820139.2020.1837154
52. Xiaoheng C, Yizhou M, Bei H, Huilong L, Xin W, Rui H, et al. General and specific genetic polymorphism of cytokines-related gene in AITD. *Mediators Inflamm* (2017) 2017:3916395–. doi: 10.1155/2017/3916395
53. Arechiga AF, Habib T, He Y, Zhang X, Zhang Z-Y, Funk A, et al. Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs b cell

signaling. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (2009) 182(6):3343–7. doi: 10.4049/jimmunol.0713370

54. Dai X, James RG, Habib T, Singh S, Jackson S, Khim S, et al. A disease-associated PTPN22 variant promotes systemic autoimmunity in murine models. *J Clin Invest* (2013) 123(5):2024–36. doi: 10.1172/JCI66963

55. Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK. The relationship between CD27 negative and positive b cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol* (2011) 2:81. doi: 10.3389/fimmu.2011.00081

56. Nevalainen T, Autio A, Kummola L, Salomaa T, Junttila I, Jylhä M, et al. CD27- IgD- b cell memory subset associates with inflammation and frailty in elderly individuals but only in males. *Immun Ageing* (2019) 16:19. doi: 10.1186/s12979-019-0159-6

57. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the b cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (2007) 178(10):6624–33. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6624

58. Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins LV, Tarkowski A. Phenotypic and functional characterization of human CD25+ b cells. *Immunology* (2006) 117(4):548–57. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02331.x

59. Habib T, Funk A, Rieck M, Brahmandam A, Dai X, Panigrahi AK, et al. Altered b cell homeostasis is associated with type I diabetes and carriers of the PTPN22 allelic variant. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (2012) 188(1):487–96. doi: 10.4049/jimmunol.1102176

60. Kolhatkar NS, Brahmandam A, Thouvenel CD, Becker-Herman S, Jacobs HM, Schwartz MA, et al. Altered BCR and TLR signals promote enhanced positive selection of autoreactive transitional b cells in wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* (2015) 212(10):1663–77. doi: 10.1084/jem.20150585

61. Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, et al. Excess BAFF rescues self-reactive b cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* (2004) 20(6):785–98. doi: 10.1016/j.immuni.2004.05.010

62. Lesley R, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive b cell survival. *Proc Natl Acad Sci United States America* (2006) 103(28):10717–22. doi: 10.1073/pnas.0601539103

63. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged b cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* (2004) 20(4):441–53. doi: 10.1016/S1074-7613(04)00079-2

64. Giltiay NV, Giordano D, Clark EA. The plasticity of newly formed b cells. *J Immunol* (2019) 203(12):3095–104. doi: 10.4049/jimmunol.1900928

65. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* (2008) 20(6):632–8. doi: 10.1016/j.coi.2008.09.001

66. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Sci (New York NY)* (2002) 297(5589):2066–70. doi: 10.1126/science.1073924