

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei
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

1. BEVEZETÉS

A B limfociták az adaptív immunrendszer nyiroksejtjei, melyek a humorális immunválasz szerves részét képezik. A B sejtek fajlagos antigén felismerésre képes sejtfelszíni receptorral rendelkeznek (BCR). Egyetlen B sejt klón csak egy konkrét antigén felismerésére képes, amely 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. 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 negatívak CD27-re. A CD19⁺ IgD⁺, CD27⁻ alpopuláció tartalmazza az újonnan képződött, 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 göcaiban 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. A hosszú életű, memória típusú PB és PC populációkat (keringő antitest-termelő sejtek, ASC) az IgD-CD27^{high}CD38^{high} fenotípus jellemzi.

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 képességét. 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.

A szabad intracelluláris (IC) kalcium egy multifunkcionális másodlagos hírvivő molekula, 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. 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; a szarko/endoplazmás retikulum (SERCA) és plazmamembrán (PMCA) Ca^{2+} ATPáz pumpák, amelyek a Ca^{2+} -t visszajuttatják az IC raktárakba valamint a mitokondriumok pufferelése. Együttesen formálják azokat a kalciumjeleket, amelyek meghatározzák a B sejtek eltérő funkcionális válaszát.

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. A Ca^{2+} központi szerepet játszik a BCR jelátviteli útvonal szabályozásában, amelyben már egy kis változás is patológiás következményekkel járhat. 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 kostimulálós molekulákkal és citokinekkal együtt. Habár a megfigyeléseket főként szisztémás autoimmun modelleken tették, a megváltozott BCR jelátvitel a Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladás kialakulásában is fontos szerepet tölthet be, különösen mivel további autoimmun betegségek kialakulásának a kockázata jelentősen magasabb Hashimoto thyreoiditis esetén is.

A Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladás (Hashimoto thyroiditis, HT) 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 sejt infiltrációja. A celluláris és humorális tényezők összetett kölcsönhatása több éven át tartó krónikus gyulladással eredményez. Egy adott szintű pajzsmirigy szövet károsodást követően hipotireózis alakul ki, amit a pajzsmirigy-stimuláló hormon (TSH) szintjének emelkedése jelez. Az autoantitest-pozitivitás önmagában, pajzsmirigy-diszfunkció nélkül is jelentősen megnöveli a meddőség és a vetélés kockázatát. 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 az vetélés kockázata. Emellett a terhesség során kialakuló immuntolerancia is károsodhat, amit a koraszülések (OR 2,07) és a terhességi szövődmények magasabb aránya is mutat. A pajzsmirigy-alulműködés általános kezelésére egy szintetikus pajzsmirigyhormont, a levotiroxin szedését írják elő.

A Graves-kórral ellentétben, amelyet autoantitest-mediált rendellenességként ismerünk, a Hashimoto-féle pajzsmirigygyulladást általában T sejt-mediált betegségnek tekintik. A klasszikus hipotézis szerint az autoreaktív B limfociták a gyulladással járó folyamat mellékszereplői, amelyek a megfelelő citokin-környezetben a pajzsmirigy antigének felszabadulása és a T helper (T_H) limfociták jelenlétében aktiválódnak. 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. Longitudinális vizsgálatok kimutatták, hogy a betegséggel összefüggő autoantitestek megjelenése évekkal előre jelzi a betegség kialakulását többszörös autoimmun betegségekben, mint például a szisztémás lupus erythematosusban (SLE), a rheumatoid arthritisben vagy 1-es típusú cukorbetegségben.

2. CÉLKITŰZÉS

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

Az optimalizált 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 adott 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 a 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. Áramlási citometria

Tanulmányunkat a Helsinki Deklaráció elveinek megfelelően végeztük. A kutatási tervet a helyi etikai testület, a Pécsi Tudományegyetem Egészségügyi Központ Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (RIKEB 5913/2015). Minden vizsgálati eljárás előtt következetesen minden résztvevőtől írásos beleegyezést kaptunk. Minden résztvevőtől perifériás vérmintát vettünk. A perifériás vér mononukleáris sejtjeit Ficoll-Paque PLUS sűrűség-grádiens centrifugálással választottuk el. Ezt követően a mintákon (8×10^6 sejt) sejtfelszíni jelölést végeztünk. A metodika kidolgozása során a B sejt alcsoportok meghatározásához a következő fluorokróm-konjugált anti-humán antitesteket alkalmaztuk: CD3-PerCP, CD19-PE, IgD-APC, CD38-APC-Cy7 és CD27-PE-Cy7. A HT-ben vizsgált B sejt alcsoportok meghatározásához a következő fluorokróm-konjugált anti-humán antitesteket alkalmaztuk: CD5 PerCP, CD19 PE, IgD APC, CD27 PE-Cy7, CD25 BV421. A citoplazmatikus szabad kalciumszint detektálásához a sejteket $5 \mu\text{M}$ Fluo-4-AM (DMSO-ban) 20%-os (w/v) Pluronic F-127-tel kiegészítve töltöttük fel. A metodika kidolgozása során a BD FACS Canto II áramlási citométeren minden mintánál 60 másodperces alapjelet (baseline) rögzítettünk, majd aktiválószerrel adtuk hozzá. A következő koncentrációkat vizsgáltuk: anti-humán IgG+M 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 és 20 $\mu\text{g/ml}$; anti-humán IgG és anti-humán IgM esetében 0,5, 1, 10 és 20 $\mu\text{g/ml}$. 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. Az áramlási citométeres mérések adatait a FlowJo v10.7.1 szoftver segítségével elemeztük ki. A célpopulációkat egyenként exportáltuk, majd a kinetikus mérésekre görbékkel illesztettünk a FacsKin kinetikus elemző program segítségével.

3.2. Kinetikus függvény létrehozása, paraméterei

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.

A kinetikai függvény különböző paraméterei az aktiválásra adott válaszreakciók különböző aspektusait írják le. 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. Az *Ending value* paraméter az aktiválás plató fázisa alatti Ca^{2+} szintet tükrözi, ami a CRAC csatornán keresztüli tartós extracelluláris Ca^{2+} beáramlásának következménye. 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.

3.3. 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 Ca^{2+} kinetika követése terén. 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) 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 tripánkék 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.

3.4. 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 konjugálatlan IgD antitesttel (IgD-APC klónnal azonos) IgD-APC antitesttel megegyező koncentrációban és öt csövet jelöletlenül hagyunk. 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) segítségével aktiváltuk. Továbbá kontrollként lemértünk egy nem aktivált mintát is.

3.5. 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 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.

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. 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. 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 végeztük.

B LIMFOCITÁK BCR STIMULÁCIÓT KÖVETŐ KALCIUM BEÁRAMLÁSÁNAK MÓDSZERTANA

4. EREDMÉNYEK

A kísérlet során megnéztük, hogy a gyakran használt B sejt aktiválószerrek (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. 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. Érdekes módon stimulálni tudtuk a perifériás ASC-eket IgG receptorukon keresztül. A bazális Ca^{2+} szintjük hasonló volt az 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 elhúzódó válasz és az alacsonyabb csúcs valószínűleg az 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 különbségeket mutat.

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 az 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 az 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.

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 növekedési faktor receptorhoz kötött protein 2 (Grb2) működéséhez kapcsolódik. Míg a Grb2 szerepet játszik a membránhoz kötött IgM-típusú BCR-ben a gátló szignalszóma összeállításában, stabilizáló hatása révén aktiváló és jelerősítő hatása is van, addig a membránhoz kötött IgG típusú BCR-ban aktiváló és jelerősítő hatással bír a Ca^{2+} jelátviteli út stabilizálásán keresztül. Ez a mechanizmus feltehetően növeli az IgG-típusú

BCR antigénérzékenységét az aktivációs küszöb csökkentésével, és ezt megerősítettük humán perifériás B sejt alcsoportokban is.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

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 megszűnt. 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

6. EREDMÉNYEK

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 sejtei magasabb preaktivációs kalcium szintet és BCR stimulációval szembeni válaszkésztséget 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 sejteinek kalcium kinetikája között. A hipotiroidizmus B sejtek működésére gyakorolt közvetlen hatásának kizárására a levotiroxin pótlást követően is vizsgáltuk a HT-s betegek B sejteinek 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, amelykről feltételezhető, hogy fontos szerepet játszanak a T sejtek perifériás antigén prezentációjában. 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, a CD25+ B sejtek egy funkcionálisan eltérő csoportot képviselnek, 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 kontrollcsoportéhoz 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. Ezek az eltérések a memória alcsoportokban is jelen voltak. Az infertilis betegek NSw memória B sejtei 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 izotipusváltáson. 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, eutiroid, infertilis betegek (HIE) perifériás B sejtjeiben. Az infertilis és hipotiroid betegek valószínűleg a pajzsmirigybetegség eltérő stádiumában vannak, ami hatással lehet az autoimmun válaszreakció jellemzőire. Az autoantitest pozitív, infertilis, eutiroid 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, eutiroid betegeknél (HIE) alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a pajzsmirigy antigénekkal 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, eutiroid, infertilis betegeknél, 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.

7. 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 euthyroid, 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, euthyroid betegek minden B sejtes alcsoportja magasabb bazális kalciumszintet és BCR stimulációval szembeni fokozott válaszkésztséget mutatott a többi csoporthoz képest. A naív és NSw B sejtek kalcium flux jellemzői szintén különböztek az infertilis, euthyroid és hipotiroid betegek között. Csak minimális különbséget találtunk a hipotiroid betegek és az egészséges kontrollok között. A levotiroxinnal kezelt, euthyroid csoportban alacsonyabb volt a CD25⁺ B sejtek előfordulása. A levotiroxin kezelést követően a bazális kalciumszint is csökkent, bár sem a kezelési előtti, sem az utáni értékek nem tértek el az egészséges kontrolloktól. Összefoglalva, úgy tűnik, hogy szisztémás B sejt diszfunkció van jelen euthyroid, autoantitest pozitív, infertilis betegekből, ami a megváltozott BCR jelátvitel lehetséges szerepére utal a pajzsmirigy autoimmunitás és infertilitás korai szakaszában.

8. ÚJ EREDMÉNYEK

Egy áramlási citometrián alapuló módszert standardizáltunk különböző aktiválószerrel felhasználásával, hogy megvizsgáljuk a keringő humán B limfociták Ca²⁺ flux jellemzőit egészséges egyénekből. Megállapítottuk, hogy a különböző aktiváló szerek eltérő Ca²⁺ flux válaszokat váltanak ki, és hogy a B sejt alcsoportok specifikus fejlődési stádiumtól függő Ca²⁺ flux válaszmintákat mutatnak.

- A naív B sejtek jelentősebb Ca²⁺ 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 betegcsoporthoz 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 kontrollokétól.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy szisztémás immunrendszeri diszfunkció van jelen az autoantitest pozitív, eutiroid, infertilis betegekben, ami nem áll fenn a hipotireoid betegeknél. 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.

9. 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 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

10. 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.