

## B-sejtek vizsgálata kevert kötőszöveti betegségben

Hajas Ágota dr. <sup>1</sup>, Baráth Sándor dr. <sup>1</sup>, Szodoray Péter dr. <sup>2</sup>, Britt Nakken dr. <sup>2</sup>, Gogolák Péter dr. <sup>1</sup>, Szekanecz Zoltán dr. <sup>1</sup>, Zeher Margit dr. <sup>1</sup>, Szegedi Gyula dr. <sup>† 1</sup>, Bodolay Edit dr. <sup>1</sup>

1 Debreceni Egyetem, Orvos-és Egészségtudományi Centrum, Debrecen

2 Institute of Immunology, Rikshospitalet, University of Oslo, Norvégia

A kevert kötőszöveti betegség (mixed connective tissue disease – MCTD) sajátos klinikai tünetegyüttesel és autoantitesttel rendelkező szisztémás autoimmun kórkép.

A B-sejtek patogén szerepet játszanak az MCTD kórfolyamatában. Az antigénspecifikus T-sejt-dependens B-sejtválasz eredménye a fokozott antitesttermelés, az anti-U1-RNP-antitest jelenléte a betegek szérumban. A B-sejt alcsoportokat és azok megoszlását MCTD-ben még nem vizsgálták.

A DEOEC Belgyógyászati Intézet Klinikai Immunológiai Tanszékén gondozott 46 MCTD-s beteg perifériás vérének B-sejtjeit áramlási citometriával vizsgálták. Kontrollként 20 egészséges, korban és nemben azonos egyént vizsgáltak. A CD19-, CD27-, IgD- és CD38-markerek alapján 5 különböző B-sejt-alcsoportot különítettek el, melyeknek százalékos megoszlását és abszolút számát elemezték aktív és inaktív szakban lévő MCTD-s betegekben.

MCTD-s betegekben a B-sejt-alcsoportok százalékos megoszlása és abszolút száma eltért a kontrollhoz képest. MCTD-ben magasabb volt a naiv ( $p=0,017$ ), a tranzicionális ( $p=0,001$ ) és a plazmasejtek aránya ( $p=0,001$ ) a kontrollcsoportban kapott eredményekhez képest. Aktív szakban a tranzicionális ( $p=0,009$ ) és naiv B-sejtek ( $p=0,002$ ) aránya további emelkedést mutatott az inaktív szakban lévő betegekhez képest. A plazmasejtek aránya szignifikánsan magasabb volt aktív betegekben ( $p<0,001$ ), és pozitív korrelációt találtak a plazmasejtek aránya és a szérum anti-U1-RNP szintje között ( $p<0,001$ ). A kettős negatív (CD27-IgD-) B-sejtek aránya és ezen sejteken a CD95 sejtfelszíni expressziója is szignifikánsan emelkedett az aktív MCTD-s betegekben ( $p<0,001$ ).

MCTD-ben a betegség aktivitásától függően a B-sejt-alcsoportok megoszlása eltérő. A B-sejt-alcsoportok vizsgálata fontos paraméter lehet az aktivitás megítélésében és monitorozásában MCTD-ben.

**KULCSSZAVAK:** kevert kötőszöveti betegség, anti-U1-RNP, B-sejt

### Bevezetés

A kevert kötőszöveti betegség (mixed connective tissue disease – MCTD) krónikus gyulladással járó szisztémás autoimmun kórkép. Az MCTD-re jellemző klinikai tünetek a polyarthrit, Raynaud-jelenség,

### B CELL ABNORMALITIES IN MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE

Mixed connective tissue disease (MCTD) is a systemic autoimmune disorder, characterized by the presence of antibodies to U1-RNP. B cell abnormalities such as autoantibody formation and polyclonal B cell activation play an important role in the pathogenesis of MCTD. The aim of the present study was to determine phenotypic abnormalities of peripheral B cell subsets in MCTD.

Blood samples were obtained from 46 MCTD patients, and 20 healthy age- and sex-matched controls. Using anti-CD19, anti-CD27, anti-IgD and anti-CD38 monoclonal antibodies, the following B cell subsets were identified by flow cytometry: transitional B cells, naive B cells, non-switched memory B cells, switched memory B cells, double negative (DN) memory B cells and plasma cells. In order to evaluate the clinical relevance of these findings, the frequencies of B cell subsets were correlated with disease activity and autoantibody levels.

The data showed several alterations in the distribution of B cell subsets in patients with MCTD compared to controls. The proportion of naive B cells ( $p=0.017$ ), transitional B cells ( $p=0.001$ ) and plasma cells ( $p=0.001$ ) was higher in patients with MCTD than in the controls. The distribution of plasma cells was significantly higher in the active stage ( $p<0.001$ ) compared to the inactive stage. A close correlation was observed between the frequency of plasma cells and anti-U1RNP concentration in the patients' sera ( $p<0.001$ ). The number of the double negative B cells (CD27-IgD-) increased in MCTD patients, and the percentage was higher in the active stage ( $p<0.001$ ). The frequency of CD95 expression of CD27-IgD-B cells was significantly higher in active MCTD patients than in the controls. The results indicated disturbed homeostasis of peripheral B cells in MCTD. These findings may help to monitor diseases activity and humoral autoimmune processes in patients with MCTD.

**KEYWORDS:** Mixed connective tissue disease, Anti-U1-RNP, B cells

myositis, sclerodactylia, nyelőcsőmotilitás-zavar. A belszervi érintettség elsősorban pulmonális artériás hipertenzió vagy intersticiális légzőszervi betegség formájában nyilvánul meg [1, 2].

A szisztémás autoimmun kórképek, így az MCTD kialakulásában is az adaptív immunitás mellett a ve-

született (innate) immunitás szerepe is kiemelkedő [3]. A humorális autoimmun folyamatok, a poliklonális B-sejt-aktiváció és hypergammaglobulinaemia központi szerepet játszanak MCTD-ben. Az MCTD-s betegek szérumban az U1-RNP-autoantitest magas koncentrációban van jelen, és a betegség szerológiai kritériumát képezi [4, 5].

Az uridinben gazdag small nuclear ribonukleoproteinek a spliceosoma részei, melyek az elsődleges transzkriptum érési folyamatában játszanak szerepet. Az U1-RNP-t az U1-snRNS, a Smith-proteinek és 3 U1-specifikus fehérje, az U1-70K-, U1-A- és U1-C-proteinek alkotják [6]. A legfőbb antigén-determinánst az U1-70K-fehérje hordozza, az MCTD-s betegek szérumban kimutatható anti-U1-RNP-autoantitest döntően az U1-70K-protein ellen termelődik [7]. MCTD-s betegekben az U1-70K-proteinnel reaktív T-sejtek helper fenotípust hordoznak, és az általuk termelt citokinek a B-sejtek differenciálódását segítik elő [8]. Az MCTD patogenezisében alapvető szerepe van az autoantigén modifikációnak. Az U1-70K oxidatív módon és apoptotikusan hasított formája egyaránt provokálhat antitest-termelődést. A jelenlegi megfigyelések szerint az autoreaktív B-sejtek ellenanyag-termelése a 70 kD peptidfragmentumai ellen kezdődik, majd epitópterjedés révén terjed a teljes 70 kD molekulára [9, 10].

A B-sejteknek az immunrendszerben betöltött funkciója heterogén. Egyik fő szerepük az antigének specifikus felismerése és ezek ellen specifikus ellenanyagok termelése. A B-sejtek memóriasejté differenciálódva biztosítják az immunológiai memóriát és az ismételt immunválasz gyors kialakulását. A B-sejtek fontos antigénprezentáló sejtek, szükségesek az optimális CD4+-T-sejt-aktivációhoz. Kostimulációs jeleket közvetítenek a T-sejteknek, befolyásolják a Th1/Th2-egyensúlyt. Számos citokin/kemokin termelésére képesek. A B-sejtek egyik alcsoportja, az IL-10-et termelő B-sejtek regulatorikus funkciót töltenek be. Továbbá szerepet játszanak a nyirokszövetek szerkezeti átrendeződésében a nagyobb hatékonyságú immunválasz kialakítása érdekében, valamint befolyásolják a dendritikus sejtek funkcióját is.

Az autoreaktív B-sejtek az immunrendszer működésének számos pontján zavart okozhatnak, hozzájárulva ezzel az autoimmunitás kialakulásához.

Az MCTD kórfolyamatában a B-sejtek patogén szerepet játszanak. MCTD-ben az antigén specifikus T-sejt-dependens B-sejt-válasz eredménye a fokozott autoantitest-termelés, az anti-U1-RNP-antitest jelenléte a betegek szérumban.

Szisztémás autoimmun kórképekben a különböző érési fázisban lévő B-sejtek százalékos aránya megváltozik az egészséges egyéneknél talált megoszláshoz képest. MCTD-ben a B-sejt-alcsoportokban észlelt eltérésekről még nincsenek adatok.

Munkánk során felmértük MCTD-ben a B-sejt-alcsoportok megoszlását. Megvizsgáltuk, hogy a

betegség aktivitása hogyan befolyásolhatja a B-sejt-alcsoportok arányát, továbbá, hogy MCTD-ben az anti-U1-RNP-autoantitestek tartósan magas szintje mutat-e összefüggést az egyes B-sejt-alcsoportok megoszlásával.

## Betegek és módszerek

A perifériás vér B-sejt-alcsoportok vizsgálatát 46 MCTD-s nőbetegen végeztük.

Az MCTD-t az *Alarcon-Segovia* és *Villarreal* által leírt klasszifikációs kritériumok alapján diagnosztizáltuk [11].

A betegek átlagéletkora a vizsgálatkor  $53,7 \pm 10,6$  év (r: 37–70 év), az MCTD fennállása  $10,1 \pm 6,2$  év (r: 3–29 év) volt. 20 korban és nemben egyező egészséges egyént vizsgáltunk kontrollcsoportként (életkor:  $53,9 \pm 10,2$ , r: 38–67 év).

Az MCTD aktivitását SLAM (systemic lupus activity measure) score rendszerrel számoltuk ki. 6-nál nagyobb SLAM pontszám esetén tekintettük aktívknak az MCTD-t. A betegek átlagos SLAM score-értéke a vizsgálatkor  $6,56 \pm 3,66$  (r: 2–13) volt [12].

Az anti-U1-RNP autoantitestek szérumkoncentrációját ELISA-módszerrel vizsgáltuk (Pharmacia and Upjohn, Freiburg, Németország).

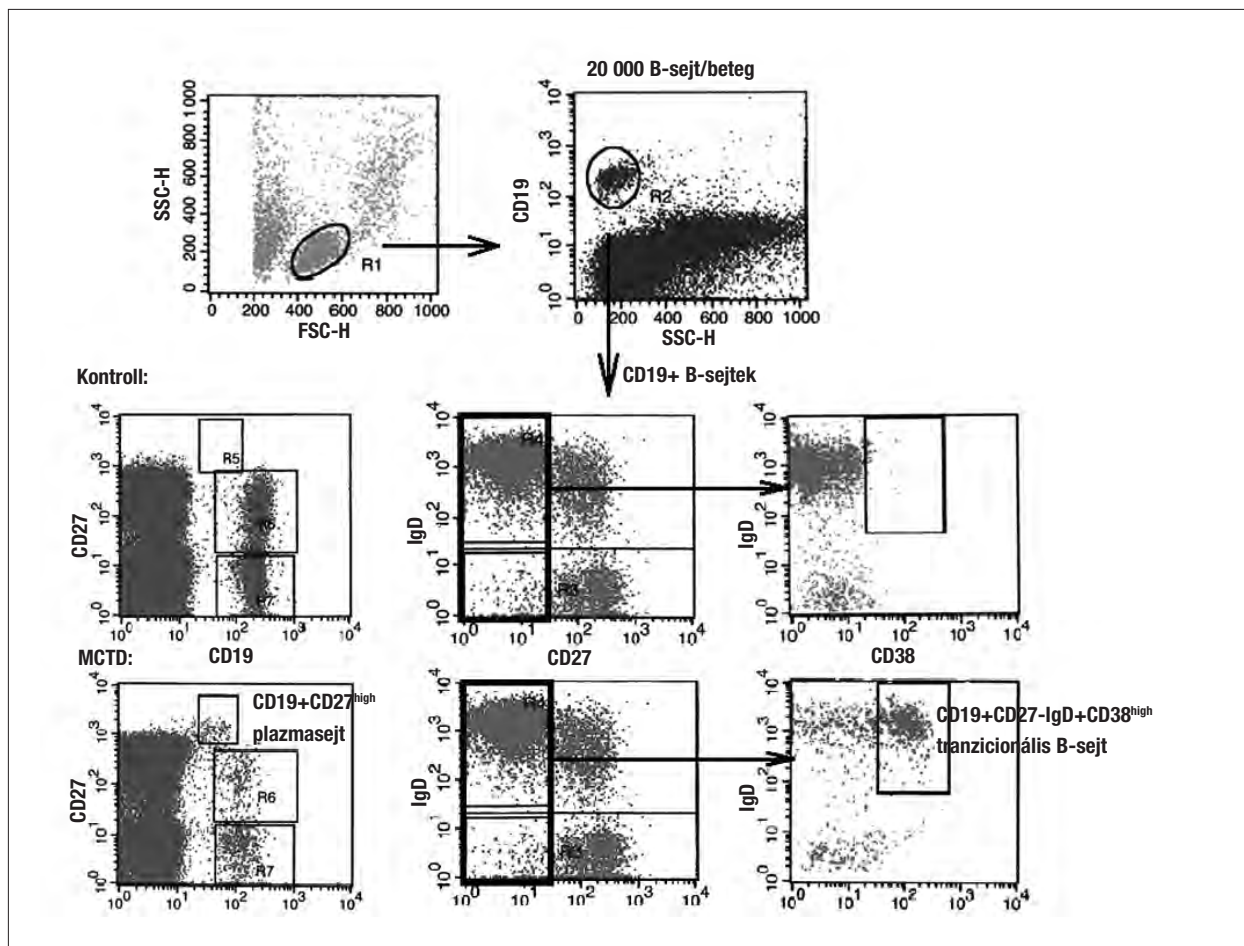
### B-sejt-mérések

A differenciálódás során a B-sejtek az adott fejlődési stádiumnak megfelelő sejtfelszíni markereket hordozzák a felszínükön, ezáltal a különböző stádiumban lévő B-sejt-alcsoportok elkülöníthetők.

B-sejt-alcsoportok vizsgálatához 10-20 ml frissen vett (<2 óra) heparinos, perifériás vért használtunk. Perifériás vérből mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk Ficoll grádiens módszerrel. PBMC-t kétszeri mosást követően  $1 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban PBS-ben reszuszpendáltuk. Immunfluoreszcens jelöléshez a következő monoklonális antitesteket használtuk: peridinin chlorophyll protein-Cy5.5 (PerCP-Cy5.5)-jelölt anti-CD19 (BioLegend, San Diego, Kalifornia, Egyesült Államok); allo-phycoerythrin (APC)-jelölt anti-CD27; phycoerythrin (PE)-jelölt anti-IgD; fluorescein isothiocyanate (FITC)-jelölt anti-CD38; FITC-jelölt anti-CD95 (BD Biosciences, Heidelberg, Németország). A sejteket PBS-ben 30 percig  $4^\circ\text{C}$  fokon inkubáltuk, majd mosást követően a sejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A mérést FACSCalibur áramlási citométeren végeztük, a kiértékelés a CellQuest szoftver segítségével történt.

Az 1. ábra a perifériás B-sejtek kapuzási stratégiáját foglalja össze. A sejtek oldalirányú (SSC paraméter) és előre irányuló (FSC paraméter) szórása alapján első lépésben kikapuztuk a limfocitákat. Az így kijelölt sejteken belül a CD19-et expresszáló B-sejteket vizsgáltuk tovább. A B-sejteket az anti-CD27, anti-IgD és anti-CD38 monoklonális antitestek expressziója alapján a következő alcsoportokra bontottuk: 1. tranzicionális B-sejt (CD19+CD27-IgD+CD38<sup>high</sup>), 2. naiv B-sejt (CD19+CD27-IgD+CD38<sup>low</sup>), 3. izotipusváltás előtti memória B-sejt (CD19+CD27+IgD+), 4. konvencionális memória B-sejt (CD19+CD27+IgD-), 5. kettős negatív B-sejt (CD19+CD27-IgD-) és 6. plazmasejt (CD19+CD27<sup>high</sup>IgD-). A kettős negatív B-sejteket a sejtfelszíni CD95 expresszió alapján két további csoportra osztottuk (CD95+ és CD95-).

Minden egyes méréshez legalább 20 000 CD19+ limfocita került kapuzásra.



1. ábra. B-sejt-mérésekhez alkalmazott kapuzási stratégia

#### Az abszolút sejtszámok meghatározása

A különböző B-sejt-alcsoportok abszolút számának meghatározása az áramlási citometriás adatok és a hematológiai automatán (Advia 120, Bayer Diagnostics) mért abszolút limfocitaszám alapján történt, az áramlási citometriás mérések alapján kapott százalékos értékeket felhasználva állapítottuk meg az abszolút sejtszámokat.

#### Statisztika

A csoportokat Kruskal-Wallis-próbával és Holm-tesztel hasonlítottuk össze. Normál eloszlás esetén Student t-tesztet, nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. Korrelációvizsgálathoz Spearman-rank-analízist használtunk. Értékeket átlag $\pm$ SD vagy medián formában adtuk meg. Az eltérést statisztikailag szignifikánsnak P érték  $\leq 0,05$  esetén tekintettük.

#### Eredmények

A perifériás vérben a B-sejteket CD19-pozitivitás alapján azonosítottuk. A CD19+limfociták százalékos aránya és abszolút sejtszáma szignifikánsan alacsonyabb volt MCTD-s betegekben, mint a kontrollcsoportban, valamint aktív szakban a B-sejtek aránya további csökkenést mutatott (CD19+ B-sejt %: MCTD és kontroll: 6,7% (5,6–8,9) vs. 8,9% (7,9–10,16),  $p < 0,001$ ; abszolút sejtszám: MCTD és kontroll:

152 (113–197) sejt/ $\mu$ l vs. 215 (150–197) sejt/ $\mu$ l,  $p < 0,015$ ).

A CD19+limfocitákat a CD27, IgD, CD38 és CD95 sejtfelszíni markerek alapján alcsoportokra bontottuk. A 2. ábra az MCTD-s betegek és kontrollok perifériás vérében a B-sejt alcsoportok megoszlását mutatja. MCTD-s betegekben a kontrollcsoportéhoz képest több eltérést figyeltünk meg: szignifikánsan nőtt a naív (CD27-IgD+CD38<sup>low</sup>) és a korai, azaz tranzicionális (CD19+CD27-IgD+CD38<sup>high</sup>) B-sejtek aránya, továbbá a kettős negatív (CD27-IgD-) B-sejtek és a CD27<sup>high</sup> plazmasejtek aránya is emelkedett volt a kontrollhoz képest.

#### B-sejt-alcsoportok megoszlása aktív és inaktív MCTD-ben

##### Tranzicionális és naív B-sejtek MCTD-ben

A tranzicionális B-sejt a legelső B-sejt-alcsoport, ami az érés során a perifériás vérben már kimutatható. Ezekre a sejtekre a CD38 sejtfelszíni marker erős expressziója és a CD27 marker hiánya jellemző.

Aktív, kezelés előtti betegekben a tranzicionális B-sejtek százalékos aránya és abszolút száma is magasabb volt az inaktív betegekhez és kontrollcsoportéhoz képest (aktív és inaktív MCTD: 6,1%

(4,2–11,3) vs. 3,2% (2,4–5,4),  $p < 0,009$ ; abszolút sejtszám: 13,9 (8–30) sejt/ $\mu$ l vs. 9 (3–14) sejt/ $\mu$ l,  $p < 0,045$ ) (3 a. ábra).

A naiv B-sejtek relatív és abszolút száma is magasabb volt az aktív, mint az inaktív betegekben (aktív és inaktív MCTD: 72,0% (62,1–88,3) vs. 55,3% (45,3–70,2)  $p < 0,002$ ; 116 (98–145) sejt/ $\mu$ l vs. 45 (29–86) sejt/ $\mu$ l,  $p < 0,001$ ) (3 b. ábra).

#### CD27 expresszió B-sejteken

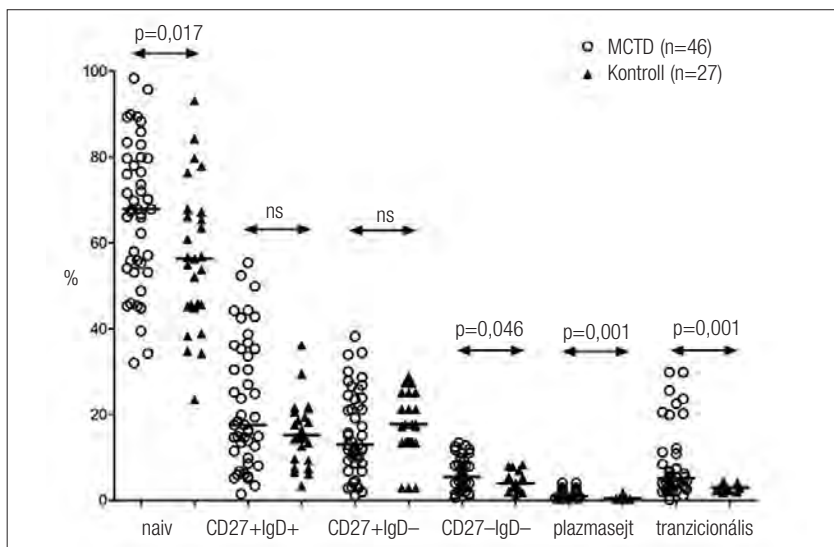
A CD27 sejt felszíni markert expresszáló B-sejteket az expresszió mértéke alapján 2 alcsoportra bontottuk, ezáltal a plazmasejtek és memória B-sejtek elkülönítését végeztük: a plazmasejtek CD27-et erősen expresszálják (CD27<sup>high</sup>), míg a memória B-sejtre közepes mértékű CD27 pozitívítás jellemző.

#### Memória B-sejtek MCTD-ben

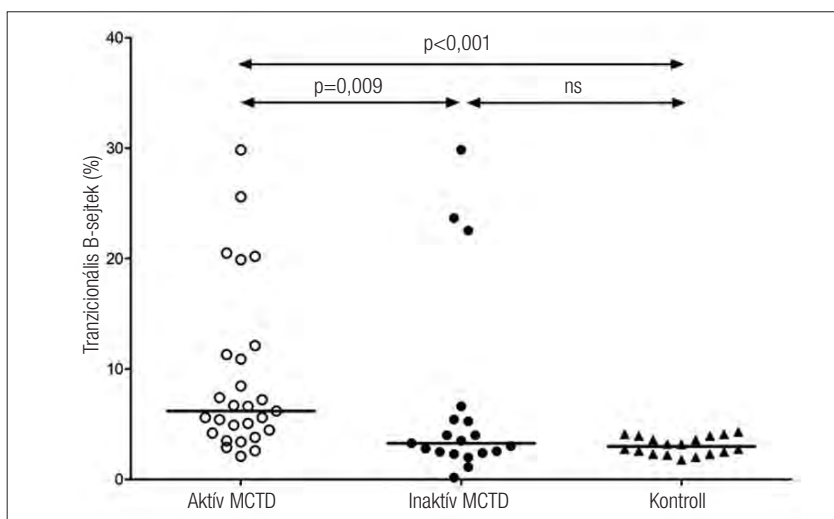
A CD27 és IgD sejt felszíni markerek alapján különböző típusú memória B-sejteket azonosítottunk. Az Ig izotípusváltás előtti memória B-sejtek CD27+IgD+, az izotípusváltás utáni memória B-sejtek CD27-IgD- fenotípusúak. A CD19+CD27+B-sejtek megoszlása MCTD-ben a kontrollcsoportéhoz hasonló volt: MCTD és kontroll: 30,83% (16,36–43,47) vs. 31,63% (23,0–39,5),  $p = 0,504$ .

A memória B-sejtek százalékos megoszlása nem különbözött az aktív és inaktív betegek között. Aktív szakban alacsonyabb memória B-sejt-számot észleltünk az inaktív szakhoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns (aktív és inaktív MCTD: 17,56% (9,9–30,45) vs. 16,0% (11,5–36,18),  $p = 0,885$ ; abszolút sejtszám: 15 (8–20) sejt/ $\mu$ l vs. 18 (8–30) sejt/ $\mu$ l,  $p = 0,929$ ).

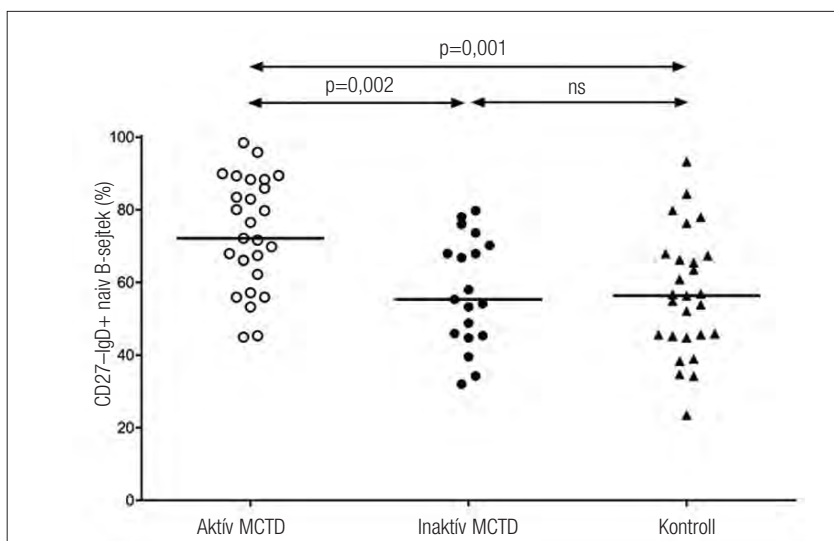
Az Ig izotípusváltás utáni memória B-sejtek (CD27-IgD-) százalékos aránya és abszolút száma is hasonló volt aktív és inaktív szakban (aktív és inaktív MCTD: 11,18% (6,80–15,70) vs. 21,2% (9,22–26,63), ns; abszo-



2. ábra. A B-sejt-alcsoportok százalékos megoszlása MCTD-ben és a kontrollcsoportban



3 a. ábra. Tranzicionális (CD19+CD27-IgD+CD38high) B-sejtek százalékos megoszlása aktív és inaktív MCTD-s betegekben



3 b. ábra. Naiv (CD27-IgD+) B-sejtek százalékos megoszlása aktív és inaktív MCTD-s betegekben

lút sejtszám: 12 (6–38) sejt/ $\mu$ l vs. 14 (11–38) sejt/ $\mu$ l, ns).

#### CD27<sup>high</sup> plazmasejtek MCTD-ben

A plazmasejtek aránya szignifikánsan magasabb volt MCTD-s betegekben, mint a kontrollcsoportban, valamint aktív szakban a plazmasejtek aránya további emelkedést mutatott az inaktív betegekhez képest (aktív és inaktív MCTD: 1,66% (0,850–2,44) vs. 0,67% (0,49–0,96),  $p < 0,001$ ) (4 a. ábra).

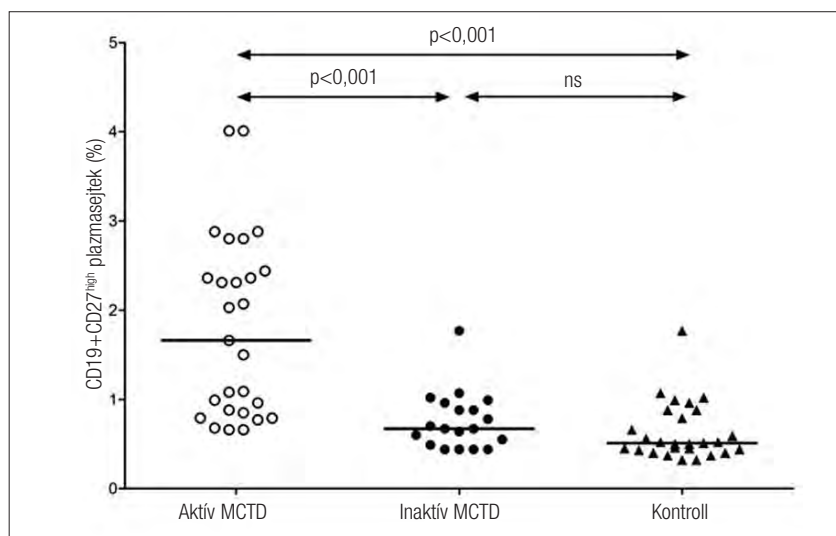
Szoros pozitív összefüggést találtunk a CD27<sup>high</sup> plazmasejtek aránya és az anti-U1-RNP-antitest szérumszintje között ( $p < 0,001$ ) (4 b. ábra).

#### Kettős negatív (CD27-IgD-) B-sejtek MCTD-ben

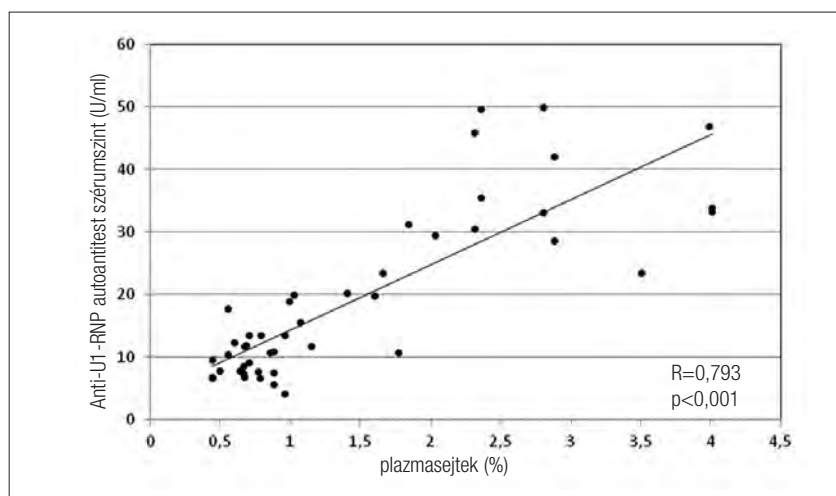
Az elmúlt években azonosították a memória B-sejtek egy csoportját, melyek a CD27-markert nem expresszálják (CD27-IgD-) [13]. Jacobi és mtsai kimutatták, hogy a kettős negatív memória B-sejtek CD95 felszíni markert expresszálhatnak [14]. A CD27-IgD-CD95+ B-sejtek létrejötte kóros B-sejt-aktiváció következménye lehet. Ezek a CD27-IgD-CD95+ B-sejtek összefüggést mutattak SLE-ban a betegség-aktivitással [14].

Az általunk vizsgált MCTD-s betegpopulációban a kettős negatív (CD27-IgD-) B-sejtek aránya magasabb volt, mint a kontrollcsoportban (2. ábra), és aktív betegekben az arányuk további emelkedést mutatott (CD27-IgD-B-sejt: aktív és inaktív MCTD: 7,8% (4,14–10,9) % vs. 3,6% (1,88–5,43),  $p < 0,001$ ) (5 a. ábra).

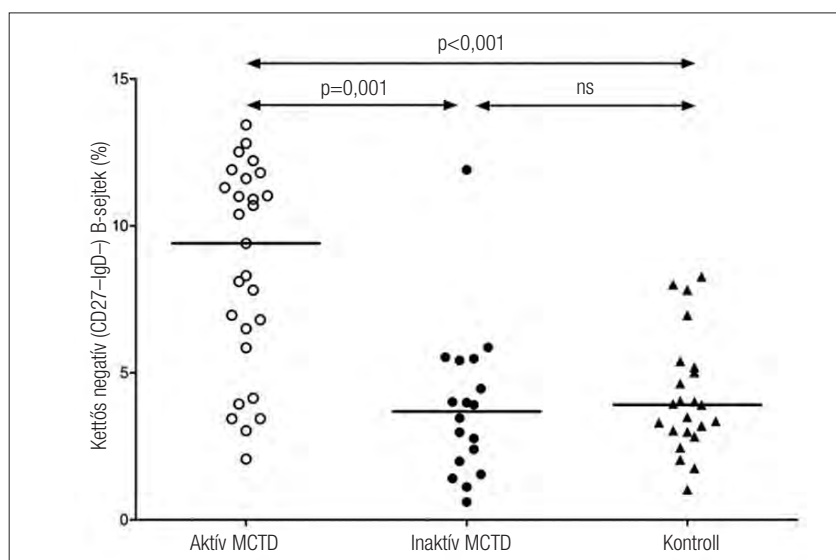
A CD27-IgD-B-sejtek CD95 expressziója szignifikánsan magasabb volt az aktív betegekben, mint az inaktív betegekben és a kontrollcsoportban (5 b. ábra). Szoros összefüggést találtunk a CD27-IgD-CD95+ B-sejtek és a betegség-aktivitása között MCTD-ben ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,001$ ).



4 a. ábra. CD27<sup>high</sup>-plazmasejtek százalékos megoszlása aktív és inaktív MCTD-s betegekben



4 b. ábra. A CD27<sup>high</sup>-plazmasejtek aránya és az anti-U1-RNP-antitest szérumszintje közötti összefüggés MCTD-ben



5 a. ábra. Kettős negatív B-sejtek százalékos megoszlása aktív és inaktív MCTD-ben

## Megbeszélés

Munkánkban elsőként vizsgáltuk a perifériás B-sejt-alcsoportok megoszlását MCTD-ben. Eredményeink károsodott B-sejt-homeosztázist igazoltak.

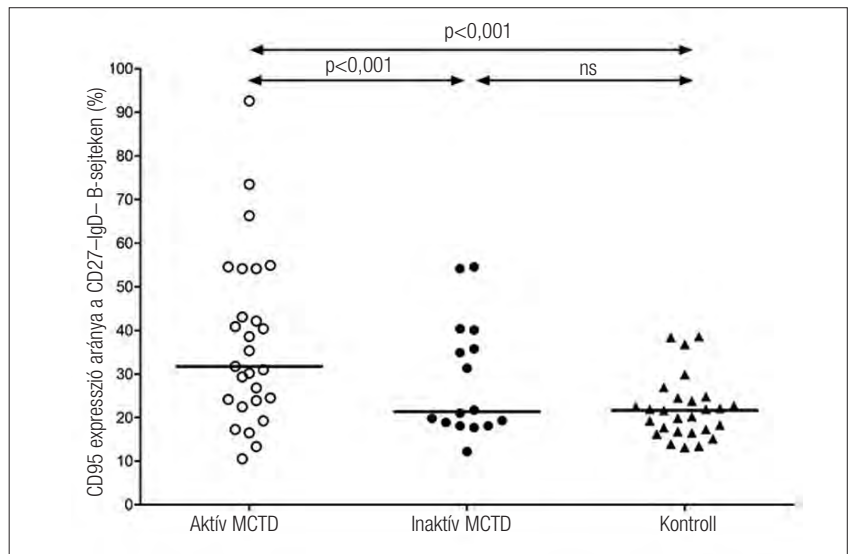
A közelmúltban a B-sejt-homeosztázis eltérését figyelték meg szisztémás autoimmun kórképekben, így SLE-ban [15, 16], Sjögren-szindrómában [17], rheumatoid arthritisben [18] és szisztémás sclerosisban [19].

A haemopoetikus őssejtek közül az érett B-sejtek kifejlődése többlépcsős folyamat: a pro-B-sejtekből pre-B-sejtek és éretlen B-sejtek alakulnak ki, amelyek szelektációs folyamaton mennek át, és a saját antigén felismerésére képes B-sejtek kiszelektálódnak. A T-sejt-függő antigénekkal való kölcsönhatás eredményeképpen a naiv B-sejtekből magas affinitású effektor B-sejtek, memória B-sejtek, immunglobulint szekretáló sejtek differenciálódnak. A B-sejt-válasz kifejlődését szignál mechanizmusok szabályozzák a B-sejt antigén receptor (BCR) komplexen keresztül. Az idegen és saját antigének elleni B-sejt-válasz a pozitív és negatív szabályozó rendszerek egyensúlyától függ, a molekulák megváltozott funkciója és expressziója autoimmunitást eredményezhet.

Az MCTD-s betegek perifériás vérében százalékos arányban és abszolút sejtszámban is kevesebb CD19+ sejtet mértünk, mint az egészséges kontrollcsoportban. Inaktív szakban lévő MCTD-s betegek és a kontrollcsoport között nem volt szignifikáns különbség a CD19+ sejt arányában, amiből arra következtetünk, hogy a B-limfopenia az aktivitással függ össze.

Arce és mtsai B-lymphopeniát észleltek SLE-ban, aminek oka lehet a csontvelői prekurzorok csökkent száma, vagy fokozott aktiváció és differenciálódás memória és plazmasejteké, amelyek homing folyamata révén a limfoid szövetbe vándorolnak [20].

Munkánk során az MCTD-s betegekben megnövekedett tranzicionális, naiv B-sejt- és plazmasejt-arányt észleltünk. A perifériás vérben megtalálható legértelenebb B-sejt-alcsoport a tranzicionális B-sejt. A CD38 az egyik olyan marker, amivel elkülöníthető az éretlen B-sejt a naiv B-sejttől. Dörner és mtsai 2011-ben a CD19+CD27-IgD+ sejtet 3 alcsoportra osztotta a CD38 felszíni expresszió alapján [21]. A CD19+CD27-IgD+CD38<sup>low</sup> naiv B-sejt aránya csökkent, míg a CD19+CD27-IgD+CD38<sup>int</sup> pre-naiv B-sejt és a CD19+CD27-IgD+CD38<sup>high</sup> tranzicionális B-sejt aránya a kontrollhoz viszonyítva nőtt SLE-ban [22].



5 b. ábra. CD95 sejt felszíni expresszió aránya a kettős negatív (CD27-IgD-) B-sejteken MCTD-ben

A CD27 a TNFR szuperfamília tagja, ami az aktivált T-helper-sejt felszínén lévő CD70-molekulával interakcióban elősegíti a B-sejt plazmasejtté differenciálódását [22]. Jelenleg a humán memória B-sejteket a felszíni CD27-marker alapján azonosítják. A CD27 a germinális centrumban jelenik meg azokon a memória B-sejteken, amelyek szomatikusan hipermutált V-gén-átrendeződést mutatnak az IgD-expresszió után. A CD27/CD70-interakció a B-sejt-differenciálódás késői szakában kulcsszignált jelent a memória B-sejtek immunglobulin szekretáló sejté alakulásában. A CD27 memória B-sejtek a köldökzsinórvérben még nincsenek jelen, a CD27+ sejt száma a korral nő. CD27 expresszálódik a T-limfocitákon is, mint kostimulátor molekula. A CD27 nem mutatható ki a progenitor B-sejteken, a sIgM-preB-sejten vagy a naiv B-sejten. Az antigénnel való találkozás után a B-sejt-aktiváció késői fázisában a memória B-sejteknek magas a CD27-expressziója (CD27+ sejt), és a plazmasejteken tovább emelkedik a CD27-expresszió (CD27<sup>high</sup>).

Az izotípusváltás előtti (CD27+IgD+) és a konvencionális memória (CD27+IgD-) B-sejt aránya nem különbözött MCTD-ben a kontrollhoz képest. Mivel a B-sejt az érés során memória B-sejtté vagy plazmasejtté differenciálódnak, elképzelhető, hogy a normális memória B-sejt-arány a differenciálódás plazmasejt irányába való eltolódásából adódhat.

Szignifikáns eltérés volt a CD27<sup>high</sup>-plazmasejt arányának növekedése MCTD-ben. Továbbá szoros összefüggést találtunk a CD27<sup>high</sup>-plazmasejt száma és az anti-U1-RNP autoantitest szérumszintje között.

2000-ben Odendahl aktív SLE-ban a CD19+CD27+ memória B-sejt százalékos arányának növekedését észlelte, míg a naiv CD19+CD27-B-sejt aránya csökkent a kontrollhoz képest [23]. A CD19+CD27<sup>high</sup>-plazmasejt a betegség aktivitá-

sával párhuzamosan mind százalékosan, mind abszolút számban emelkedtek SLE-ban.

Más szerzők is szoros összefüggést találtak SLE-ban a keringő CD27<sup>high</sup>-plazmasejtek és a betegség aktivitása között [13, 22]. A CD27<sup>high</sup>-plazmasejtszám-korrelációt mutatott a betegség aktivitásával, és immunszuppresszív terápia hatására arányuk normalizálódott [22].

2007-ben *Wei és mtsai* a memória B-sejtek új csoportjának expanzióját írta le SLE-ban egészséges kontrollhoz képest. Ezen memória B-sejtek CD27- és IgD-negatívak, és jelenlétük SLE-ban szignifikánsan összefüggött az aktivitással, a veseérintettséggel és a betegségspecifikus autoantitestekkel [13]. *Jacobi* 2008-ban leírta, hogy a CD27-IgD-B-sejtcsoport valójában heterogén, a sejtcsoporton belül a CD27-IgD-CD95+B-sejtek aktivált állapotú memória sejtpopulációt képeznek SLE-ban, számuk emelkedett volt aktív betegekben, míg egészséges kontrollban egyáltalán nem voltak jelen [14]. A CD27-IgD-B-sejtek aránya azonban nem mutatott szignifikáns összefüggést az aktivitással, és számuk bakteriális infekciókban is emelkedett volt. A CD27-IgD-CD95+B-sejt-populáció egy jól elkülöníthető csoport SLE-ban, ami aktivált memória B-sejteket reprezentál.

MCTD-s betegekben a CD27-IgD-kettős negatív B-sejtek aránya 6%-ot is elérte, és arányuk tovább emelkedett aktív betegekben. A kettős negatív B-sejteken CD95-expresszió volt kimutatható, jelenlétük a betegség aktivitásával függött össze.

Összefoglalva eredményeinket, MCTD-ben a betegség aktivitásától egészségesekhez képest megváltozik a B-sejt alcsoportok aránya. A B-sejt-alcsoportok vizsgálata fontos paraméter lehet az aktivitás megítélésében és monitorozásában MCTD-ben.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## Irodalom

- [1] Sharp, G. C., Irvin, W. S., Tan, E. M., Jolla, L., Gould, G. R., Holmand, H. R.: Mixed connective tissue disease; An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972, 52, 148–149.
- [2] Ortega-Hernandez, O. D., Shoenfeld, Y.: Mixed connective tissue disease: An overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheum* 2012, 26, 61–72.
- [3] Hoffman, R. W., Maldonado, M. E.: Immune pathogenesis of mixed connective tissue disease. A short analytical review. *Clin Immunol* 2008, 128, 8–17.
- [4] Reichlin, M., van Venrooij, W. J.: Autoantibodies to the URNP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis. *Clin Exp Immunol* 1999, 83, 286–290.
- [5] Greidinger, E. L., Hoffman, R. W.: Autoantibodies in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis North Am* 2005, 31, 437–450.
- [6] Keith, M. P., Moratz, C., Tsokos, G. C.: Anti-RNP immunity: implications for tissue injury and the pathogenesis of connective tissue disease. *Autoimmun Rev* 2007, 6, 232–236.
- [7] Pettersson, I., Wang, G., Smith, E. I., et al.: The use of immunoblotting and immunoprecipitation of (U) small nuclear ribonucleoproteins in the analysis of sera of patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. A cross-sectional, longitudinal study. *Arthritis Rheum* 1986, 29, 986–996.
- [8] Holyst, M. M., Hill, D. L., Hoch, S. O., Hoffman, R. W.: Analysis of human T cell and B cell responses against U small nuclear ribonucleoprotein 70-kd, B, and D polypeptides among patients with systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 1997, 40, 1493–1503.
- [9] Greidinger, E. L., Foecking, M. F., Ranatunga, S., Hoffman, R. W.: Apoptotic U1-70 kd is antigenically distinct from the intact form of the U1-70-kd molecule. *Arthritis Rheum* 2002, 46, 1264–1269.
- [10] Greidinger, E. L., Hoffman, R. W.: The appearance of U1 RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70 kd and B'/B proteins as predominant U1 RNP immunogens. *Arthritis Rheum* 2001, 44, 368–375.
- [11] Alarcon-Segovia, D., Villarreal, M.: Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. In: Kasukawa R, Sharp GC, ed. *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) 1987, 33–40.
- [12] Maldonado, M. E., Perez, M., Pignac-Kobinger, J., et al.: Clinical and immunological manifestations of mixed connective tissue disease in a Miami population compared to a Midwestern US Caucasian population. *J Rheumatol* 2008, 35, 429–437.
- [13] Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., 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* 2007, 178, 6624–6633.
- [14] Jacobi, A. M., Reiter, K., Mackay, M., et al.: Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum* 2008, 58, 1762–1773.
- [15] Lipsky, P. E.: Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001, 2, 764–766.
- [16] Chan, O. T., Madaio, M. P., Shlomchik, M. J.: The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 1999, 169, 107–121.
- [17] Salomonsson, S., Jonsson, M. V., Skarstein, K., et al.: Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003, 48, 3187–3201.

- [18] Marston, B., Palanichami, A., Anolik, J. H.: B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010, 22, 307–315.
- [19] Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Takehara, K., Tedder, T. F.: Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 2004, 41, 1123–1133.
- [20] Arce, E., Jackson, D. G., Gill, M. A., Bennett, L. B., Banchereau, J., Pascual, V.: Increased Frequency of Pre-germinal Center B Cells and Plasma Cell Precursors in the Blood of Children with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 2001, 167, 2361–2369.
- [21] Dörner, T., Jacobi, A. M., Lee, J., Lipsky, P. E.: Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus *J Immunol Methods* 2011, 363, 187–197.
- [22] Jacobi, A. M., Obendahl, M., Reiter, K., et al.: Correlation between circulating CD27<sup>high</sup> plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003, 48, 1332–1342.
- [23] Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., et al.: Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2000, 165, 5970–5979.

Levelezés: Bodolay Edit dr.,  
e-mail: edit.bodolay@gmail.com

„Ami él, mind elmúló.  
Csak maga a mulandóság,  
Az az örökkévaló.”

Vajda János