

Patogenetikai tényezők (dohányzás, citrullináció és mikrovezikulák) vizsgálata autoimmun reumatológiai kórképekben

Doktori tézisek

Dr. Baka Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy György, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Szekanez Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Dérfalvi Beáta, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fekete Béla, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Bajtay Zsuzsa, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Prohászka Zoltán, tudományos főmunkatárs, az MTA doktora

Budapest

2012

BEVEZETÉS

Autoimmun betegségek patomechanizmusa

Az autoimmun reumatológiai betegségek a népesség 1,5-2,5%-át érintik, népegészségügyi szempontból jelentős terhet jelentenek. Gyakran kíséri őket súlyos szervkárosodás, és a számos új gyógyszer ellenére terápiájuk ma is kihívást jelent a gyakorló orvos számára. Ezért a patogenezis jobb megértése és a hajlamosító tényezők megismerése kulcsfontosságú.

Kialakulásukban mind a genetikai, mind a környezeti tényezők szerepet játszanak. A környezeti tényezők (például dohányzás és fertőzések) a betegségre genetikailag fogékony egyénekben (bizonyos HLA-allélek hordozása esetén) immunregulációs zavart idézhetnek elő. Ez az állapot a betegség preklinikai stádiumának tekinthető. Ebben a stádiumban laboreltéréseket - pl. autoantitestek (rheumatoid faktor [RF], citrullinált protein ellenes antitest [ACPA], anti-Jo-1) megjelenése a vérben – tapasztalunk klinikai tünetek nélkül. A fennálló és újonnan jelentkező környezeti tényezők hatására az immunregulációs zavar autoimmun betegségben manifesztálódhat. A kórfolyamatot számos effektortényező szabályozza: gyulladásozó sejtek (T- és B-lymphocyták, makrofágok, fibroblastok) és az általuk kibocsátott mediátorok - citokinek (tumornekrózis-faktor [TNF], interleukin 1, 6, 17, interferonok), proszttaglandinok, reaktívoxigén-gyökök és extracelluláris vezikulák. A hosszantartó gyulladás definitív szervkárosodást (pl. porc- és csontdestrukció, tüdőfibrosis) is előidézhethet - ez betegségenként eltérő lehet. Munkánk során ebből a patogenetikai láncból vizsgáltunk egy-egy tényezőt.

Mikrovezikulák

Számos autoimmun reumatológiai betegség patogenezisében felmerült az MV-k szerepe. Az MV-k az extracelluláris vezikulák közé tartoznak, melyek a sejtekről lefűződve részt vesznek az intercellularis kommunikációban. Méret szerint megkülönböztetjük az 50-100 nm átmérőjű exosomákat, a 100-1000 nm-es MV-eket és az apoptózis során képződő, 1-5 μm átmérőjű apoptotikus testeket. Rheumatoid arthritisben (RA-ban), szisztémás lupus erythematosusban, szisztémás sclerosisban és vasculitisekben az egészséges kontrolloknál magasabb MV-szinteket igazolt számos kutatócsoport, ami alapján felmerül az MV-k patogenetikai szerepe és biomarkerként való alkalmazása.

Rheumatoid arthritis

Az RA főként a kéz és láb kisízületeit érintő, általában szimmetrikus polyarthritissel járó autoimmun betegség. Populációgenetikai vizsgálatok fontos gén-környezeti tényező kölcsönhatást igazoltak, azaz a HLA-DRB1-allélek hordozása dohányos egyéneknél jelentős kockázatot jelent az ACPA-pozitív RA kialakulására. A legújabb irodalmi adatok alapján az ACPA-knak patogenetikai szerepe lehet a betegségben, bár az ACPA-termelés és a dohányzással való összefüggésének pontos mechanizmusa még nem ismert.

Az ACPA-k citrullinált fehérjék ellen képződnek. A citrullináció a poszttranszlációs módosítások egyike: a fehérjék argininjét a peptidil-arginin-demimináz (PAD) enzim citrullinná alakítja. RA-ban a PAD2 és 4 izoforma nagy mennyiségben megtalálható a synovialis gyulladás területén. Irodalmi adatok szerint a dohányzás fokozhatja a citrullinációt a tüdőben.

RA-ban a TNF-nek kulcsszerepe van a gyulladás fenntartásában, és a TNF-gátlók hatékony gyógyszerek a betegség kezelésében. Azonban ma még nem ismert, hogy a dohányzás hogyan befolyásolhatja a TNF szerzteágazó hatásait, termelését, illetve a genetikával összefüggésben hogyan járulhat hozzá a betegség patogeneziséhez.

Polymyositis/dermatomyositis

A polymyositis/dermatomyositis (PM/DM) progresszív izomgyengességgel és bőrelváltozásokkal kísért autoimmun betegség. Kialakulásában egyaránt szerepet játszanak a genetikai (DR3-asszociáció) és a környezeti (pl. fertőzés, UV-sugárzás) tényezők. A betegekben myositisspecifikus autoantitestek jelenhetnek meg a szérumban. Ezen ellenanyagok közé tartoznak az antiszintetáz antitestek (pl. anti-Jo-1), melyek az antiszintetáz szindrómában gyakrabban fordulnak elő.

CÉLKITŰZÉS

1. Az ACPA-termelés mechanizmusának vizsgálata egy nem arthritises betegcsoportban:
 - A. a dohányzás hatására fokozódik-e a citrullináció,
 - B. illetve a fokozott citrullináció indukál-e autoantitesttermelést.
2. A dohányfüst hatásának tanulmányozása humán T-lymphocytákon:
 - A. Standardizált módszer kidolgozása a dohányfüst elnyeletésére.
 - B. A dohányfüst hatásának vizsgálata a TNFR1-2 kifejeződésre, valamint az apoptózisra.
3. PM/DM-ben az MV-k szerepének vizsgálata:
 - A. A keringő MV-mintázat (lymphocyta, monocyta és izom eredetű MV-k) vizsgálata.
 - B. Az MV-k morfológiájának tanulmányozása.
 - C. Biomarkerkeresés: az MV-k összefüggésének elemzése a betegség patogenezisével, terápiájával, klinikumával és diagnosztikus laboratóriumi eltéréseivel.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati alanyok

Betegek a dohányzás–citrullináció–ACPA kapcsolat vizsgálatához

A Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájáról gyűjtöttük a betegektől és egészséges kontrolloktól származó mintákat (n=109). A dohányzási szokás és a tüdőgyógyászati diagnózis szerint 10 betegcsoportot különböztettünk meg: nem dohányos (soha nem dohányzott) és dohányos (jelenleg vagy korábban dohányzott) egészséges kontrollok, asthma bronchialében, sarcoidosisban, krónikus obstruktív tüdőbetegségben és tüdőrákban szenvedő betegek. Vért vettünk ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) vizsgálatokhoz (RF, PAD4 és ACPA). 18 betegből bronchoszkópos szövettani mintát is gyűjtöttünk szöveti microarray-hez (TMA-hoz), amelyet azután immunhisztokémiai módszerrel (CK7, PAD4 és citrullinált fehérje) festettünk. További 100 tüdődagyanatos TMA állt rendelkezésünkre az I. sz. Patológiai és Rákkutató Intézetben, amelyeket az előbb említett három szöveti antigénre szintén megfestettünk. Minden beteg kérdőívet töltött ki dohányzási szokásairól. A dohányzás intenzitását a csomagévvel (= naponta elszívott átlagos cigarettamennyiség x dohányzással töltött évek száma / 20; pl. napi 1 doboz cigaretta 5 év alatt 5 csomagévet jelent) számszerűsítettük.

Betegek a mikrovezikula-vizsgálatokhoz

Hús PM/DM-es beteg és hús egészséges kontroll vérmintáját kaptuk a prágai Károly Egyetem Reumatológiai Tanszékéről. Az izomerőt manuális izomteszttel becsültük meg, és vizuális analóg skálán határoztuk meg a szervspecifikus és globális betegségaktivitást. A laboratóriumi paraméterek közül rögzítettük a C-reaktív protein, a kreatin-kináz (CK), a laktát-dehidrogenáz, a myoglobin és a kreatinin vérszintjét, a lymphocyta- és thrombocytaszámot, az anti-Jo-1 pozitivitást és a tüdőérintettséget.

Dohányfüst elnyelése

A cigarettát steril fülke alatt nyeltük el az általunk kidolgozott, standardizált és reprodukálható kísérleti rendszerben. A munkához piros Symphonia cigarettát használtunk. Jurkat-sejteket és egészséges egyén perifériás vér mononukleáris sejtjeit kezeltük a dohányfüstös médium különböző koncentrációival.

Szérum PAD4, ACPA és IgA RF ELISA vizsgálatok

A Pulmonológia Klinikáról származó betegszérumok PAD4 és RF szintjét ELISA módszerrel mértük. A szérum ACPA szintet kétféle módon határoztuk meg: 1) kereskedelmi forgalomban megvásárolható ELISA-kittel (anti-CCP titer) és 2) az Eötvös Loránd Tudományegyetem Peptidkémiai Kutatócsoportja által szintetizált, citrullint vagy arginint tartalmazó filaggrinpeptidek (filaggrin ellenes antitest) felhasználásával beállított ELISA-módszerrel. A filaggrin ellenes antitestek mérése a következőképpen történt: meghatároztuk a citrullin tartalmú és a nem módosított, arginin tartalmú filaggrinpeptid ellen képződött antitestek szintjét, majd a két érték

hányadosát képeztük. Az 1,5 alatti hányados azt jelzi, hogy nincs citrullinált fehérje (filaggrin) ellenes immunválasz, míg az RA-ban megfigyelhető, jellemzően 1,5-nél magasabb érték az ACPA-képzést mutatja.

CK enzimaktivitás mérése

Hat PM/DM-es beteg és hat egészséges kontroll vérplazmájának ultracentrifugált frakciójában kinetikus módszerrel (fotometria) meghatároztuk a CK enzimaktivitást.

Áramlási citometria

Fluorokrómmal konjugált monoklonális antitestek segítségével meghatároztuk a dohányfüsttel kezelt sejtek TNFR1 és 2 szintjét, valamint az apoptózist jelző annexin V kötődést.

Hús PM/DM-es és hús egészséges kontroll plazmamintájában flouorokrómmal konjugált monoklonális antitestek segítségével azonos módon és ideig mértük a T-sejt (CD3 pozitív), B-sejt (CD19 pozitív) és monocyta (CD14 pozitív) eredetű MV-k számát.

Immunhisztokémia

A CK7, PAD4 és citrullinált fehérjék szöveti kifejeződését a tüdődaganatos TMA sorozatmetszeteken immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az expresszió mértékét a festődés intenzitása és a festődő sejtek százalékos aránya alapján képzett immunhisztokémiai pontszámmal számszerűsítettük.

Elektronmikroszkópia

A PM/DM-es betegekből és egészséges kontrollokból származó MV-k morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Statisztika

Mann-Whitney-teszt, Kruskal-Wallis-féle egy mintás varianciaanalízis (majd Dunn-féle posthoc teszt), Fischer-teszt, Spearman-féle rangkorrelációs teszt és lineáris regressziószámítás. A PAD4 szintnél a nem dohányos kontrollokban mért átlag+2-szeres szórás feletti értékeket minősítettük emelkedettnek. A 0,05 alatti p értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

A dohányzás–citrullináció–ACPA kapcsolat vizsgálata

A citrullinált fehérjék, a CK7 és a PAD4 szöveti kifejeződése

A citrullinált fehérjék jól elkülönítették a tumoros szövetet, ahol erős festődést tapasztaltunk, bár egy enyhe alapfestődés a környező, nem daganatos szövetekben is látható volt. A citrullinált fehérjék festődése egybeesett az ismert tumormarkernek számító CK7 kifejeződéssel, és immunhisztokémiai pontszámuk is korrelált egymással.

A PAD4 enzim expressziója szintén egybeesett a CK7 festődéssel, és a daganatos sejteket specifikusan megfestette, a környező szövetek viszont negatívak voltak. A PAD4 és CK7 festődés immunhisztokémiai pontszáma szintén korrelált egymással. A citrullinált fehérjék, a CK7 és a PAD4 expresszióját tekintve nem találtunk különbséget a dohányos és nem dohányos tüdődaganatos betegek között.

Szérum PAD4, ACPA és IgA RF

Miután megvizsgáltuk szöveti szinten a citrullinációt és a citrullináló enzim kifejeződését, a vérben is megmértük a PAD4 szintet.

A dohányos tüdődaganatos betegek jelentős hányadában (46%) tapasztaltunk a kontrollokhoz képest emelkedett PAD4 szintet, ugyanakkor a nem dohányos tüdődaganatos betegekben a PAD4 a nem dohányzó egészséges kontrollokénak megfelelő tartományban volt. A dohányos tüdőrákos betegek PAD4 szintje szignifikánsan magasabb volt a nem dohányos egészséges kontrollokénál.

A legtöbb beteg és egészséges kontroll anti-CCP negatív volt, kivéve két dohányos tüdődaganatos beteget. A pulmonológiai mintákban nem találtunk filaggrin ellenes ACPA-választ.

A dohányos tüdődaganatos betegekben jelentős arányban tapasztaltunk magas RF-titert (23,5%), amely szignifikánsan különbözött a nem dohányos tüdődaganatos betegekéétől, ahol minden minta RF negatív volt.

Dohányfüst hatása a TNFR expresszióra

A médiumban elnyeletett dohányfüst a sejtek apoptózisához vezetett, de 5-10x hígítás mellett az apoptózis mértéke 5% alá csökkent.

A TNFR1-expresszió a dohányfüst koncentrációjának függvényében megemelkedett. A 10-szeres hígítású dohányfüstös médium hatására a TNFR1-expresszió kb. 5,5-szeresére növekedett, míg az 50-szeres hígítás kb. 2-szeres emelkedést okozott. A TNFR2-expresszió nem ilyen jelentős mértékben változott: a 10x dohányfűsthígítás hatására kb. 3,5x növekedést tapasztaltunk, míg az 50x hígításnál a TNFR2 kifejeződése a kontrollmintákhoz hasonló mértékű volt.

Mikrovezikulák

Az azonos módon és ideig mért CD3, CD14 és CD19 pozitív MV-k mennyisége szignifikánsan magasabb volt a PM/DM-es betegekben a kontrollcsoporttal összehasonlítva. Tehát szignifikánsan több T-sejt, B-sejt és monocyta eredetű MV van jelen a PM/DM-es plazmákban az egészségesekhez képest. Az MV-gazdag, ultracentrifugált csapadéokban nem mértünk CK enzimaktivitást.

A monocyta és B-lymphocyta eredetű MV-k pozitívan korreláltak az izomerővel. Az anti-Jo1 antitest pozitív betegekben és/vagy

tüdőérintettség esetén szignifikánsan több T- és B-sejt, illetve monocyta eredetű MV-t találtunk.

Elektronmikroszkópos feldolgozással az egészséges kontrollokban különböző méretű és denzitású MV-eket láttunk, a PM/DM-es betegekben nanocsöveknek tűnő struktúrák jelentek meg.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Leírtuk, hogy a fokozott PAD4 expresszió és citrullináció jellemző a tüdődaganatra, ami alapján felmerülhet tumormarkerként történő alkalmazásuk.
2. Kimutattuk, hogy dohányos tüdőrákos betegekben magasabb szérum PAD4 és IgA RF szint mérhető, de a szöveti citrullináció és PAD4 expresszió hasonló dohányosokban/nem dohányosokban.
3. Igazoltuk egy nem arthritises betegcsoportban (tüdőrákos betegekben), hogy a dohányzás és a fokozott citrullináció a tüdőben nem vezet feltétlenül autoantitesttermeléshez, azaz ACPA-k megjelenéséhez.
4. Kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel a dohányzás sejtműködésre gyakorolt hatásait *in vitro* rendszerben, standardizált módon lehet vizsgálni.
5. Kimutattuk, hogy a dohányfüst apoptózist indukál, és koncentrációfüggően fokozhatja a TNFR1 és 2 szintet humán T-lymphocytákon.
6. Eredményeink szerint szignifikánsabb több T-sejt, B-sejt és monocyta eredetű MV detektálható a PM/DM-es betegek plazmájában az egészségesekkel összehasonlítva.
7. Az immunsejt eredetű MV-k száma összefüggést mutatott az izomerővel, az anti-Jo-1 pozitivitással és a tüdőérintettségel, ami felveti biomarkerként történő alkalmazásuk PM/DM-ben.
8. CK enzimaktivitást (amely az izomeredetre utal) nem detektáltunk a PM/DM-es betegek keringő MV-iben.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Baka Z, György B, Géher P, Buzás EI, Falus A, Nagy G. (2012) Citrullination under physiological and pathological conditions. Joint Bone Spine, in press. **IF: 2,460**

Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenács T, Pápay J, Szarka E, Sármay G, Babos F, Magyar A, Géher P, Buzás EI, A, Nagy G. (2011) Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production. Int Immunol, 23: 405-414. **IF: 3,301**

Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Sebestyén SP, Kittel Á, Buzás E, Nagy G. (2010) Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. Immunol Lett, 128: 124-130. **IF: 2,511**

Baka Z, Buzás E, Nagy G (2009) Smoking and rheumatoid arthritis: putting the pieces together. Arthritis Res Ther, 11: 238. **IF: 4,271**

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Baka Z, Tóth S, Buzás I E, Falus A, Nagy G. (2011) A nem szerepe rheumatoid arthritisben. Magyar Reumatológia, 52: 91-95.

Baka Z, Nagy G. (2010) Nanoantitestek. Magyar Reumatológia, 51: 278-280.

Baka Z, Nagy G. (2010) Biomechanika kicsit más szemmel. MediArt, 3: 3-6.

Mendler L, **Baka Z**, Kovács-Simon A, Dux L. (2008) Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun, 361: 37–242. **IF: 2,749**

Mendler L, Kiricsi M, Pintér L, **Baka Z**, Dux L. (2007) The regeneration of reinnervated rat soleus muscle is accompanied by fiber transition toward a faster phenotype. J Histochem Cytochem, 56: 111-123. **IF: 2,823**

Összesített impaktfaktor (csak eredeti közlemény): **11,384**

Összesített impaktfaktor (eredeti közlemény és összefoglaló cikk): **18,115**