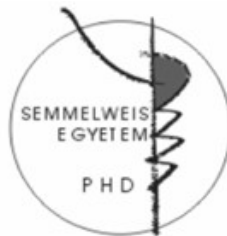


A T sejtek szerepe az autoimmun 1-es típusú diabetes mellitusban

Doktori tézisek

Dr. Kis János Tibor

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Treszl András, PhD.

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Halmos Tamás
Dr. Pánczél Pál, kandidátus

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Madácsy László
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hamvas József, kandidátus
Dr. Vásárhelyi Barna, PhD.

Budapest
2007

BEVEZETÉS

Az 1-es típusú diabetes mellitus (T1DM) minden 400-600- adik embert érint, a betegség incidenciája világszerte emelkedik. A betegséget az inzulintermelő β -sejtek krónikus autoimmun pusztulása okozza. A betegség pontos etiológiája, illetve az autoimmun folyamatot elindító autoantigén, a pontos szabályozó mechanizmusok azonban még nem ismertek. A betegség autoimmun, krónikus, progresszív jellege joggal veti fel az intervenció lehetőségét, azaz hogy kezdeti, lehetőleg prediabeteses állapotban lassítsák, vagy blokkolják a β -sejtek destrukcióját.

Egyre több bizonyíték gyűlik össze arról, hogy az autoimmun folyamatok szabályozásában, a T sejteknek, azon belül a regulátoros T sejteknek és a természetes öló T (natural killer T - NKT) sejteknek alapvető szerepük van.

A leggyakrabban használt regulátoros marker a CD4+ T sejtek felszínén a CD25 fehérje (IL-2 receptor alegysége) magas expressziója, illetve egy transzkripciót szabályozó enzim a FoxP3 jelenléte.

Az NKT sejtek a thymus eredetű T sejtek azon speciális alcsoportját jelentik, melyek felszínén egyaránt megtalálhatóak az NK (természetes öló) sejtek markerei és a T sejt receptor (TCR-T cell receptor). Az NKT sejtek többsége invariáns TCR-t expresszál, ami azt jelenti, hogy a $V\alpha 24$ - $J\alpha Q$ (az alfa lánc 24-es variábilis régiója és az alfa lánc kapcsolódó Q régiója - $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ egérben) régió között nincs nukleotid beékelődés. A CD4 és CD8 expressziója alapján ezen sejtek lehetnek pozitívak az egyikre, illetve lehetnek dupla negatívak. Az iNKT sejtek, a TCR aktiválása után gyorsan,

nagy mennyiségben, egyaránt képesek Th1 (T helper 1, mint pl.: IFN- γ) vagy Th2 (IL-4) típusú citokinek termelésére. A termelődött citokinek hatással lehetnek a naiv T sejtek differenciálódására, és befolyásolhatják a gyulladós és akár a gyulladáellenes válaszokat, szerepük lehet mind a veleszületett, és szerzett immunitásban.

CÉLKITŰZÉS

Az eddigi irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a CD4+ humán T sejtek funkciója összességében megváltozik T1DM-ban. A funkcióváltozás vizsgálatára DNS microarray technikát alkalmaztuk, hogy analizáljuk a CD4+ T sejtek génexpresszióját újonnan diagnosztizált T1DM (newly diagnosed T1DM-ndT1DM), régóta diagnosztizált 2-es típusú diabetes mellitus (long-term Type 2 diabetes-ltT2DM), és egészséges (healthy-H) kontroll csoportokból. Továbbá célul tűztük ki, hogy a génexpresszió-változásokat protein szinten (Western Blot, flow citometria) is megvizsgáljuk.

A CD4+ T sejtek differenciálódásában az iNKT sejteknek, az egyéb regulátoros sejtek mellett, alapvető szerepük van. Mivel az iNKT sejtek detektálása a sejtek alacsony száma miatt technikailag nehéz, ezért először keresnünk kellett egy módszert, mely megbízhatóan és reprodukálhatóan detektálja az iNKT sejteket. Ezt a technikát alkalmazva célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk az iNKT sejtek gyakoriságát H, ndT1DM, ltT1DM, ltT2DM csoportok között, jellemezzük az alcsoportokat, azokat összehasonlítsuk egymással, analizáljuk funkcióikat, citokin termelésüket. Az iNKT sejtek regulátoros funkciójára több közleményben hivatkoznak, azonban a

citokin termelésén kívül erre egyéb bizonyíték ez idáig nem volt, célul tűztük ki ezért, hogy megvizsgáljuk a legelfogadottabb regulátoros markereket, és alkalmazzuk az iNKT sejteket in vitro kevert limfocita antigén stimulációs vizsgálatokban.

Célkitűzéseink pontokba szedve:

- DNS microarray technika segítségével analizáljuk a CD4+ T sejtek génexpresszióját, azt hasonlítsuk össze a H, ndT1DM és a ltT1DM csoport között;
- az egyes betegcsoportok között talált különbséget protein szinten is leellenőrizzük;
- keresünk egy módszert, mely megbízhatóan, és reprodukálhatóan detektálja az invariáns NKT sejteket;
- összehasonlítjuk az iNKT sejtek gyakoriságát a H, ndT1DM, ltT1DM, ltT2DM csoportok között;
- karakterizáljuk az alcsoportokat, illetve hasonlítjuk őket össze egymással;
- analizáljuk a sejtfunkciókat, elsősorban a citokintermelésüket;
- megvizsgáljuk a jelenleg legelfogadottabb regulátoros sejtfelszíni markereket;

- alkalmazzuk az iNKT sejteket, illetve citokin termékeiket, a regulátoros hatást ellenőrző, in vitro végzett T sejt stimulációs kísérletekben.

MÓDSZEREK

Mágneses gyöngyök segítségével CD4⁺ T sejteket izoláltunk egészséges (healthy-H), újonnan diagnosztizált (kevesebb, mint 4 hónap, newly diagnosed type 1 diabetes mellitus - ndT1DM) 1-es típusú diabeteses és régóta, azaz több mint 1 éve fennálló 2-es típusú diabeteses (long term type 2 diabetes mellitus - ltT2DM) betegektől. A CD4⁺ sejteket gén chip technológia segítségével hasonlítottuk össze. A gén chip adatokat több lépcsőben hasonlítottuk össze, hogy kizárjuk a megváltozott szénhidrát anyagcsere befolyásoló hatását. Az eredményeket további genetikai vizsgálatokkal (RT-PCR), illetve fehérje szinten (Western blott és FACS analízis) és funkcionális vizsgálatokkal is megerősítettük.

Az iNKT sejtek, a teljes CD4⁺ sejtpopulációt potenciálisan szabályozni képes sejtcsoport. Invariáns NKT sejteket számoltunk, izoláltunk, klónoztunk H, ndT1DM, ltT1DM és ltT2DM betegekből. Megvizsgáltuk a különböző iNKT sejtcsoportok tulajdonságait, funkcióját. Az iNKT sejtek detektálására az invariáns TCR elleni antitesteket használtunk. Egyetlen sejt szortolás technikájával nyert sejteket (felszaporítás során), FACS analízis segítségével, a sejtfelszíni markerek szerint karakterizáltuk, a kapott eredményeket RT-PCR és Western blott technikával is megerősítettük. Mivel a klónozás elméletileg befolyásolhatja sejtek egyes tulajdonságait, a vizsgálatokat elvégeztük nem aktivált iNKT sejtekkel is.

EREDMÉNYEK

Az immunszignál komponensei úgy, mint az adhéziós molekulák, citokinek, chemokinek, azok receptorai és immuntranszkripciós faktorok alapvető szerepet játszanak a T1DM pathogenezisében. Mi úgy találtuk, hogy a CD4+ T sejtek működése a T1DM betegekben összességében sérült. Közel 23000 szekvenciát vizsgáltunk meg, melyek közül 143 gén bizonyult T1DM specifikusnak, mindegyik gén aktivitása csökkent. A leginkább érintett géneknek az immunológiai válaszban, a sejt ciklus szabályozásában és a sejtfelszíni receptorokhoz kötött szignál transzdukcióban van szerepük. A gén chip technológia segítségével kapott eredményeket genetikai vizsgálatokkal (RT-PCR), illetve fehérje szinten (Western blott és FACS analízis) és funkcionális vizsgálatokkal is megerősítettük.

Az iNKT sejtek invariáns TCR ellenes festődésén alapuló szelektálása megbízhatóan és reprodukálhatóan (korreláció $r=0,97$) detektálja az iNKT sejteket. A különböző betegcsoportokban az iNKT átlagos gyakorisága 0,055-0,061% volt a limfociták között, szignifikáns különbség a csoportok között nem volt. Az iNKT sejteken belül a CD4+ iNKT sejtek aránya, összehasonlítva a H (88%) és a ltT2DM (91%) betegcsoportokhoz képest, szignifikánsan csökkent ltT1DM (45%) betegeknél. Az iNKT sejtek citokin termelése a ndT1DM és a ltT1DM csoportokban az immunológiailag ártalmasabb (Th1) irányba tolódott el. Genetikai és fehérje szinten is bebizonyítottuk a regulátoros markerek (CD25^{high}+, FoxP3) jelenlétét az iNKT sejteken. Az in vitro kevert limfocita vizsgálatok

során az iNKT sejtek és azok termékeinek erőteljes, dóziszfüggő aktiváló hatására derült fény.

KÖVETKEZTETÉSEK

A CD4+ T sejtek és az iNKT sejtek vizsgálata több helyen kapcsolódik egymással. Az iNKT sejtek a nagykapacitású citokin termelő képességük lehetővé teszik, hogy karmester módjára befolyásolják az immunológiai folyamatokat, így lehetséges, hogy a CD4+ T sejteknél észlelt eltérések ennek következményei. Nem vizsgáltuk a két sejtcsoport közötti interakció mikéntjét. A jelen vizsgálatok nem terjedtek ki az antigén-specifikus T sejtek vizsgálatára, ezért meglepő, hogy a teljes a CD4+ T sejt populáció szintjén ilyen markáns különbségeket találtunk. Az iNKT sejteket, azok alcsoportjait részletesebben és több ellenőrző mechanizmust beépítve analizáltuk, mint a korábbi hasonló publikációk, és találtunk új, korábban nem publikált eredményeket.

A teljes CD4+ sejtpopulációban leírt különbségek, a potensebb regulátoros tulajdonságokkal rendelkező CD4+ iNKT alosztály arányának csökkenése, illetve a megváltozott citokin termelés természete segít megérteni az 1-es típusú diabetes mellitus pathogenezisében lezajló immunológiai folyamatokat. A T sejtek, és ezen belül az iNKT sejtek befolyásolásán alapuló klinikai vizsgálatok megkezdődtek, reméljük, hogy vizsgálati eredményeink ezen intervenciós vizsgálatoknak segítséget nyújtanak.

PUBLIKÁCIÓK

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Cikkek:

Kis J, Engelmann P, Farkas K, Richman G, Eck S, Lolley J, Jalahej H, Borowiec M, Kent SC, Treszl A, Orban T. (2006) Reduced CD4+ subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus. *J Leukoc Biol.* Mar;81(3):654-62. *impact factor: 4,57*

Kis János, Engelmann Péter, Heyam Jalahej, Orbán Tihamér (2006) Az immunológiai prevenció lehetősége 1-es típusú diabetes mellitusban. *LAM.* 16(8-9):771–773.

Orban T, **Kis J**, Szereday L, Engelmann P, Farkas K, Jalahej H, Treszl A. (2007) Reduced CD4+ T-cell-specific gene expression in human type 1 diabetes mellitus. *J Autoimmun.* Jun;28(4): 177-87. *impact factor: 2,15*

Előadások:

Kis J. Characterization of natural killer T cells. *Joslin Diabetes Center, Immunology data club.* Boston, USA 2005.12.12.

Kis J. Natural killer T cells in type 1 diabetes. *Joslin Diabetes Center, Harvard,* Boston, USA, 2006.02.14.

Posztterek/ Abstraktok :

Janos Kis, Peter Engelmann, James Lolley, Geoff Richman, Heyam Jalahej, Tihamer Orban, (2005) Characterization of Human NKT Cell Clones Identified by V α 24 and 6B11 Double Staining in Type 1 Diabetes poszter: *ADA San Diego, 65th Scientific Sessions, 43-LB*

Peter Engelmann, **Janos Kis**, Geoffrey Richman, Shawn Eck, Heyam Jalahej, Tihamer Orban (2006) The Regulatory Function of the Invariant Natural Killer T Cells, poszter: *ADA Washington, DC 66th Scientific Sessions, 1179-P*, absztrakt: *Diabetes. Jun;55(Suppl.:1):A278*

Janos Kis, Peter Engelmann, Geoffrey Richman, Shawn Eck, Heyam Jalahej, Tihamer Orban. (2006) Human Invariant Natural Killer T Cells in Type 1 Diabetes Mellitus, poszter: *ADA Washington, DC 66th Scientific Sessions, 1187-P*, absztrakt: *Diabetes. Jun;55(Suppl.:1):A279*

Tihamer Orban, **Janos Kis**, Peter Engelmann, Laszlo Szereday, Geoffrey Richman, Shawn Eck, Andras Treszl. (2006) Impaired Function of the CD4+ T Cells in Human Type 1 Diabetes Mellitus, poszter: *ADA Washington, DC 66th Scientific Sessions, 1195-P*, absztrakt: *Diabetes. Jun;55(Suppl.:1):A281*

A disszertációtól független közlemények

Cikkek:

Kis János Tibor, Nemesánszky Elemér (2002) A gastrooesophagealis reflux betegség atípusos formái. *LAM*; 12(8):455-60

Dr. Kis János, Dr. Pálhegyi Erika (2003) Szokatlan lokalizációjú, ritkán előforduló hasi daganat felismerése és eredményes kezelése. *LAM*;13(7):555-8.

Előadások / absztraktok:

Kis J, Pálhegyi E, Lambert M, Gelley A, Székely Gy, Nemesánszky E (2003) The maze of abdominal ultrasound and computer tomography in the diagnosis of clinically silent abdominal space occupying lesions előadás: *45th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, Balatonaliga, June 3-7, 101.*, absztrakt: *Z Gastroenterol*;41(5): 442

Poszterek/absztraktok:

Kis J, Rédei Cs, Nemesánszky E. (2002) Az oesophagus pH monitorozás szerepe a gastrooesophagealis reflux betegség atípusos formáinak diagnosztikájában, poszter: *A Magyar Belgyógyász Társaság XXXIX. Nagygyűlése, nov. 21-23.*, absztrakt: *MBA*;LV(Suppl.:3):82

Kis J, Székely Gy, Nemesánszky E. (2002) The importance of the ultrasonography to reveal a rare case of portal hypertension, poszter: *44th Annual Meeting of the Hungarian Society of*

Gastroenterology, Balatonaliga, June 4-8, absztrakt: Z Gastroenterol;40(5):341

Janos Kis, Antal Csepregi, C. P. Strassburg, P. Obermayer-Straub, S. Kneip, A. Kayser, E. Nemesanszky and M. Manns (2002) Antimitochondrial antibodies against dihydrolipoamide acyltransferases (PDC-E2 and BCKADCE2) in immunofluorescent AMA-negative rheumatoid arthritis sera, poszter: *37th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Madrid, Spain, 17-21 April, 610*, absztrakt: *J. Hepatol;36(Suppl:1):153-154*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Orbán Tihamér**nak, aki lehetőséget adott, hogy az ő általa irányított laborban dolgozhassam, hogy részt vehettem az általa felügyelt vizsgálatokban.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, **PhD. Dr. Treszl András**nak, aki tanácsaival irányította munkámat, segített a kísérletek megtervezésében, végrehajtásában és az eredmények publikálásában.

Prof. Dr. Tulassay Tivadarnak és **Prof. Dr. Madácsy Lászlónak** köszönhetem, hogy PhD. munkámat az I. Sz. Gyermekklinikán írhatom.

Hálával tartozom **Dr. Grosz Andreának**, aki munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és észrevételeivel, tanácsaival segítette.

Köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Nemesánszky Elemér**nek, hogy pályám elején utamat egyengette.

Köszönöm **Prof. Dr. Balázs Csabának**, **Prof. Dr. Naszlady Attilának** és **Dr. Bene Krisztiánnak**, hogy tanulmányutamhoz hozzájárultak.

Köszönettel tartozom a Joslin Diabetes Center (Harvard, Boston, USA) Immonológiai és Immunogenetikai laborjában dolgozóknak, úgy, mint **Dr. Heyam Jalahejnek**, **PhD. Engelman Péternek**, **Geoffrey Richmannak**, **Shawn Ecknek**, **James Lolleynek**, **Dr. PhD. Farkas Klárának**, illetve **Dr. Sally C. Kentnek** (Brigham & Women's Hospital (Harvard Medical School, Boston, USA)) és a Joslin Diabetes Center ambulanciáján dolgozó

asszisztenseknek, nővéreknek, akik mindig készen álltak, hogy munkámat segítsék.

Hálás vagyok feleségemnek, aki biztosította a nyugodt családi hátteret, és elviselte távollétemet, illetve családomnak, akik mindig is támogattak.