

**Streszczenie rozprawy doktorskiej lek. Joanny Kosalki Węgiel pt.: „Limfocyty  
T efektorowe i T regulatorowe w toczniu rumieniowatym układowym z zajęciem nerek”**

Toczeń rumieniowaty układowy (SLE – *systemic lupus erythematosus*) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, w której dochodzi do utraty tolerancji na własne antygeny, zwiększenia produkcji przeciwciał przeciwjądrowych i zapalenia w wielu narządach wewnętrznych.

Jedną z najważniejszych manifestacji SLE jest nefropatia toczniowa (LN), która rozwija się u ok. 70% chorych, stanowiąc główną przyczynę zgonu związaną z zajęciem narządów w przebiegu tej choroby. W doniesieniach naukowych opisano udział limfocytów Th17 w rozwoju LN oraz protekcyjnego działania limfocytów T regulatorowych. Jednakże wciąż brakuje jednoznacznych badań obejmujących określenie zależności między tymi subpopulacjami limfocytów T.

**Cele pracy:**

- (1) Ocena fenotypu krążących limfocytów efektorowych T CD4<sup>+</sup> ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów Th17 w LN.
- (2) Ocena funkcji, zmian liczbowych i odsetkowych limfocytów Treg w LN.
- (3) Ocena zależności pomiędzy limfocytami T efektorowymi a Treg (test supresji *in vitro*) w LN.
- (4) Ocena udziału limfocytów T CD4<sup>+</sup> w aktywnej nefropatii toczniowej na podstawie oceny profilu immunologicznego próbek moczu, poprzez określenie poziomu ekspresji mRNA wybranych genów w komórkach osadu moczu oraz zbadanie stężenia wybranych cytokin w surowicy krwi i w moczu.

**Metody:**

Do badania zakwalifikowano 34 chorych na SLE z zajęciem nerek (27 kobiet, 7 mężczyzn) w wieku od 24 do 63 lat, którzy spełnili następujące kryteria (1) wiek >18 lat, (2) dobowy dawka metyloprednizolonu <48 mg lub równoważna dobowy dawka innego glikokortykosteroidu, (3) >6 miesięcy od ostatniej dawki cyklofosfamidu, mykofenolanu mofetylu lub leków biologicznych (rytuksymab, belimumab). Kryteriami wykluczenia były: (1) inne choroby autoimmunologiczne, (2) ostre zakażenie (<30 dni od włączenia do badania), (3) pierwotny lub wtórny niedobór odporności, (4) stan po przeszczepie narządowym, (5) choroby nowotworowe, (6) ciąża, (7) okres połogu oraz (8) dializoterapia. Grupę kontrolną stanowiło 19 zdrowych ochotników dobranych pod względem wieku i płci. Badane grupy nie różniły się pod kątem podstawowych parametrów demograficznych. Stopień

aktywności SLE oceniono na podstawie międzynarodowej skali SLEDAI-2K (za zaostrzenie przyjęto SLEDAI-2K >6). Zajęcie nerek w przebiegu SLE zostało stwierdzone na podstawie wykonanej biopsji nerki, która pozwoliła na określenie klasy nefropatii toczniowej zgodnie z klasyfikacją ISN/RPS. U chorych na LN, u których nie została wykonana biopsja nerki lub nie uzyskano reprezentatywnego wyniku biopsji nerki, nefropatia została rozpoznana na podstawie typowych objawów klinicznych i laboratoryjnych wskaźników zajęcia nerek występujących w trakcie zaostrzenia SLE (białkomoczu lub cech aktywnego osadu moczu). Dodatkowo aktywność nefropatii toczniowej została oceniona przy pomocy wskaźnika r-SLEDAI (za zaostrzenie przyjęto r-SLEDAI >4).

Limfocyty izolowano z krwi żyłnej. Następnie oceniano obraz odsetkowy subpopulacji limfocytów T efektorowych metodą cytometrii przepływowej na podstawie ekspresji receptorów chemokinowych (CXCR3, CCR4, CCR6 i CCR10) oraz produkcji cytokin IFN $\gamma$ , IL-4, IL-22, IL-17A po stymulacji PMA i jonomycyną. Limfocyty Treg identyfikowane były jako komórki CD25+CD127- lub na podstawie obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Dodatkowo funkcję limfocytów Treg określono na podstawie testu supresji proliferacji konwencjonalnych limfocytów T CD4+ (test *in vitro*), zbadanie odsetka limfocytów Treg wykazujących podwyższoną ekspresję izoformy  $\Delta E2$  FoxP3 (wiążąca się z obniżonym potencjałem supresyjnym) oraz poprzez zbadanie produkcji TGF- $\beta$ 1 przez komórki Treg stymulowane *in vitro*. Panel 19 cytokin oznaczono w zabezpieczonych próbkach surowicy krwi i moczu za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów ELISA. Poziom ekspresji mRNA wybranych 43 genów prozapalnych oznaczono w komórkach osadu moczu z wykorzystaniem techniki RT-PCR.

### **Wyniki:**

Odsetek krążących limfocytów Th17 był zwiększony w LN w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio mediana: 1,2% i 0,6% z komórek CD4+,  $p < 0,01$ ), podczas gdy wartości odsetkowe limfocytów Treg nie różniły się istotnie w badanych grupach (odpowiednio mediana: 12,3% i 12,1% z komórek CD4+), co skutkowało obniżonym stosunkiem Treg/Th17. Chorzy na LN z ekspansją limfocytów Th17 nie różnili się od tych z prawidłowym odsetkiem komórek Th17 pod względem aktywności LN, wyników badania histopatologicznego biopatu nerki, natomiast cechowali się ~2-krotnie większą skumulowaną dawką cyklofosfamidu. W LN limfocyty Treg były zdolne do zwiększonego wytwarzania TGF- $\beta$ , jednak, co zaskakujące, ich aktywność supresyjna w teście proliferacji limfocytów była zmniejszona w porównaniu z grupą kontrolną. Wspólna hodowla limfocytów Treg i konwencjonalnych komórek T CD4+ spowodowała wyraźną supresję subpopulacji Th1,

ale także ułatwiała ekspansję aktywowanych limfocytów Th17 (efekt ten był ~2-krotnie silniejszy u pacjentów z LN w porównaniu do grupy kontrolnej,  $p < 0,05$ ). Co więcej chorzy na LN nie wykazywali istotnego zwiększenia odsetka komórek FoxP3 $\Delta$ 2 w porównaniu z grupą kontrolną.

Jedną z cech zaostrzenia LN było zwiększenie stężenia cytokin m.in. CXCL10, CCL5, CCL4, CCL2 i IL-10 we krwi oraz CXCL10, CCL5, CCL2 i IL-6 w moczu. Ponadto chorych z aktywną LN wykazano zwiększoną ekspresję mRNA mediatorów prozapalnych (np. *CCL2*, *CCL5*, *CXCL3*, *CXCL10*) i markerów odpowiedzi Th1 (np. *TBX21*). Z drugiej strony w tej samej grupie chorych odnotowaliśmy negatywną regulację markerów odpowiedzi typu Th2 (np. *CCL17*, *GATA3*). Co ciekawe markery odpowiedzi typu Th17 w moczu (np. transkrypty *IL17A* i *RORC*) nie były zwiększone u chorych z zaostrzeniem LN. U dwóch z czterech chorych w remisji LN, wykazujących duże podobieństwo w profilu ekspresji mRNA określonych genów w porównaniu do zaostrzenia, wystąpiło zaostrzenie nerkowe w ciągu 3 miesięcy od rekrutacji do badania. U obu tych chorych stwierdziliśmy w komórkach osadu moczu obniżony stosunek ekspresji mRNA *GATA3/TBX21*.

### **Wnioski:**

Podsumowując, nasze wyniki pokazują, że ekspansja limfocytów Th17 w LN nie koreluje z aktywnością choroby, a raczej wynika z przewlekłego leczenia immunosupresyjnego. Ta sygnatura immunologiczna prawdopodobnie związana jest z nieprawidłową funkcją komórek Treg, których aktywność supresyjna u chorych na LN była mniejsza, a nawet komórki te ułatwiały różnicowanie w kierunku limfocytów Th17. Chorzy z aktywną LN charakteryzowali się znacznym wzrostem mediatorów prozapalnych w moczu. Cytokiny w moczu (CCL2 i CXCL10) i markery genowe w komórkach osadu moczu związane z limfocytami Th1 stanowią istotne biomarkery aktywności choroby.

## Summary

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with loss of tolerance to self-antigens, increased titer of antinuclear antibodies and inflammation in many inner organs. Lupus nephritis (LN) develops in ~70% SLE patients, representing the main cause of mortality associated with organ involvement in the course of the disease. Th17 cells participation in development of LN and protective activity of Treg cells has been described. Nevertheless, there are not clear research data concerning the relationship between these T cells.

### Aims:

- (1) Evaluation of the T helper cell phenotype, especially Th17 cells, in LN.
- (2) Evaluation of function and quantitative changes of T regulatory cells in LN.
- (3) Evaluation of relationship between T effector and Treg cells (*in vitro* suppression assay) in LN.
- (4) Evaluation the role of serum and urine cytokine levels and mRNA expression related to T cells in LN exacerbation.

### Methods:

34 patients with LN (27 females and 7 males) were qualified for the study in age range from 24 to 63 years, that met the following criteria: (1) age above 18 years old; (2) treatment with methylprednisolone below 48 mg/d or equivalent dose of other glucocorticoid, (3) last treatment with cyclophosphamide, mycophenolate mofetil or biologic therapies (rituximab, belimumab) at least 6 months before the enrollment. The exclusion criteria were: (1) coexisting other autoimmune diseases, (2) acute infection (less than 30 days prior to the study), (3) primary or secondary immunodeficiencies, (4) state after organ transplant, (5) cancer, (6) pregnancy, (7) postpartum and (8) dialysis. The control group consisted of 19 healthy volunteers of similar age and sex to patients. Both groups did not differ concerning basic demographic parameters. SLE activity was estimated by international scale SLEDAI-2K (SLEDAI-2K >6 was a definition of SLE flare). Renal disease was confirmed by renal biopsy and staged according to the ISN/RPS criteria. In the remaining patients LN was diagnosed based on overt renal symptoms. Furthermore, activity of lupus nephritis was estimated according r-SLEDAI (r-SLEDAI >4 was a definition of LN flare).

Lymphocytes were isolated from venous blood. Next, lymphocytes immunophenotyping was performed by using fluorescence-activated cell sorting to detect the presence/absence of chemokine receptors (CXCR3, CCR4, CCR6 and CCR10) expression and by assessing cytokine production (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-22 and IL-17) after stimulation with PMA and

ionomycin. Treg cells were identified as CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> and FoxP3 (transcription factor) positive. Moreover, Treg cells function was defined by *in vitro* suppression assay, percentage of Treg cells with higher  $\Delta$ E2 FoxP3 isoform expression (associated with Treg cells impaired suppressive function) and level of TGF- $\beta$ 1 secreted by stimulated *in vitro* Treg cells. Nineteen cytokines were measured in serum and urine by commercially available ELISA kits. mRNA expression of 43 genes expression form urinary cells was performed using real-time PCR.

### **Results:**

Percentage of circulating Th17 cells was increased in LN (median 1.2% of CD4<sup>+</sup> cells as compared to 0.6% in control group,  $p < 0.01$ ), while Treg cells remained unchanged (12.3% vs. 12.1% of CD4<sup>+</sup> cells in controls), resulting in significantly lower Treg/Th17 ratio. Th17 expansion in patient group was not related to LN activity, renal histology, but it was associated with 2-fold higher cumulative dose of cyclophosphamide in the past. Treg cells in LN displayed expressed higher levels of TGF- $\beta$ , however, their suppressory activity in lymphocyte proliferation assay was diminished as compared to controls. Co-culture of Treg and conventional CD4<sup>+</sup> T-cells resulted in marked suppression of Th1 subset, similarly in both studied groups, but also in a potent expansion of Th17 cells, which in LN was 2-fold higher as in controls ( $p < 0.05$ ). Moreover, percentage of Treg cells with higher FoxP3 $\Delta$ 2 isoform expression did not significantly differ in studied groups.

Level of CXCL10, CCL5, CCL4, CCL2, IL-10 in serum and CXCL10, CCL5, CCL2, IL-6 in urine were increased in LN exacerbation. In the active disease, urinary cell transcriptome showed marked upregulation of proinflammatory cytokines (e.g. *CCL2*, *CCL5*, *CXCL3*, *CXCL10*), and type-1 immunity-related genes (e.g. *TBX21*). On the other hand, in the LN group we observed negative regulation of Th2 markers (e.g. *CCL17*, *GATA3*). Interestingly, markers of type-17 immune axis (e.g. *IL-17A*) were not significantly increased in active LN. An active pattern of gene expression was also observed in four patients in remission, who had moderately increased urinary leucocyte count. Two patients from this group developed renal exacerbation during the following 3 months. Those two patients had decreased mRNA *GATA3/TBX21* ratio.

### **Conclusions:**

In conclusion, our results demonstrate that Th17 expansion in LN is not increased during disease exacerbation, but is rather related to the chronic immunosuppressive therapy. This immune signature is likely linked to the abnormal function of Treg cells, which were less suppressive in LN patients and even facilitated differentiation of Th17 cells. Active LN patients were characterized by marked increase of proinflammatory mediators in the urine.

Urine cytokines (CCL2 and CXCL10) and type-1 T-cell-related gene markers in the urine sediment had significant diagnostic performance in detection of active LN.