

I. BEVEZETÉS

Az „*immunitás*” latin eredetű szó, a római szenátorok mentelmi jogát, a jogi felelősségrevonás alóli mentességet, védelmet jelentette. Az élettudományok területén az immunitás védettséget jelent, az **immunrendszer** feladata a szervezet védelme, integritásának megőrzése. Feladatait az immunrendszer két fő funkcionális rendszerével látja el: az ősi (vagy természetes) immunitás akut, gyors, aspecifikus védelmet nyújt, míg az adaptív (vagy szerzett) immunitás specifikus válaszra képes, valamint immunológiai memóriával rendelkezik.

Az ősi immunrendszer egyik legfőbb sejtjes összetevői a **természetes ölő (NK) sejtek**, melyek nagy mennyiségű citokin – elsősorban interferon-gamma (IFN- γ) – termelésére képesek, valamint citotoxikusak. Célsejtjeiket **perforin** vagy **FasL (Fas ligand)** segítségével pusztítják el. Felszínükön CD56-ot expresszálnak, CD56 pozitívak (CD56⁺).

A **T sejtek** (T limfociták) az adaptív immunrendszer egyik alapvető sejtcsoportja. **T sejt-receptorai (TCR, CD3)** segítségével a különböző antigén determinánsok specifikus felismerésére képesek. A TCR α és β transzmembrán polipeptid láncból épül fel, melyek mindegyike tartalmaz változó (V, variable) és állandó (C, constant) domént. A variábilis domén az α lánc esetében V és J (joining), a β lánc esetében V, D (diverz, diversity) és J régiókból áll, melyek kapcsolódási pontjai alkotják a hipervariábilis CDR (complementarity-determining region) régiókat. Ezek felelősek a specifikus antigénfelismerésért. A harmadik hipervariábilis régió (CDR3) lép közvetlen kontaktusba az antigénnel.

Az $\alpha\beta$ T sejtek lehetnek CD8⁺ citotoxikus és az immunválaszt meghatározó, citokineket termelő CD4⁺ T helper (Th) sejtek. A citokinek funkcionálisan csoportosíthatóak. **A T helper 1 (Th1) gyulladáskeltő vagy pro-inflammatórikus citokinek** – mint az IFN- γ , interleukin (IL)-12 – a gyulladásos reakciókban, a sejtjes immunválaszban, a citotoxicitásban és a makrofágok aktiválásában vesznek részt. **A T helper 2 (Th2)-es gyulladásgátló citokinek** – mint az IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 – a humorális immunválasz és az ellenanyagtermelés generálásában játszanak szerepet. Nemrégiben egyéb gyulladáskeltő citokinekről, az **IL-23**-ról és az **IL-17**-ről kimutatták, hogy szerepük van különböző autoimmun betegségek kialakulásában. Az IL-17-et termelő T sejteket Th17 sejteknek nevezték el. A Th17 sejtek fennmaradásához, expansziójához és részben differenciálódásához IL-23 szükséges, amely a Th17 sejteken található receptorán (IL-23 receptor, IL-23R) keresztül fejti ki hatását.

A TCR specifikus MHC (fő hisztokompatibilitási komplex)-antigénfelismerése által elindított első szignálon kívül a teljes aktivációhoz egy további, ún. kostimulációs szignálra van szükség. Az immunválasz terminációja ugyanakkor rendkívül fontos az autoimmun tolerancia mechanizmusában, az autoimmun kórképekkel szembeni védelemben. A termináció egyik fő közvetítője a T sejtek felszínén az aktiváció hatására expresszálódó **CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)**.

A T sejtek egy alcsoportja, a **$\gamma\delta$ T sejtek**, egy γ és egy δ láncból álló $\gamma\delta$ TCR-ral rendelkeznek, az $\alpha\beta$ T sejtektől elkülönült sejtpopulációt alkotnak. Mivel rövid idő alatt nagy mennyiségű IFN- γ termelésére képesek, ami alapvetően az ősi immunrendszer sejteinek a sajátja, a $\gamma\delta$ T sejteket az ősi és az adaptív immunrendszert összekötő, azok határán álló sejteknek tartják. A citotoxikus tulajdonsággal bíró, δ 2TCR variábilis láncot expresszáló V δ 2 alcsoport teszi ki a felnőttkori $\gamma\delta$ T sejtek döntő többségét.

Az $\alpha\beta$ T sejtek egy kis része a TCR-on (CD3) kívül az NK sejtekre jellemző markereket, CD56-ot is expresszál. Ez a populáció natural killer T, azaz **NKT és NKT-szerű-sejteket** tartalmaz. Az ún. **invariáns NKT-k (iNKT-k)** TCR-a invariáns α CDR3 V α 24-J α Q

TCR α láncot tartalmaz. Fontos, immunválaszt szabályozó funkciókkal bírnak, és jelentős a szerepük a tumorok és az autoimmunitás elleni védelemben.

Jellemző lokalizációjuk, a bél lamina propria alapján elnevezett, és nemrég azonosított **MAIT (mucosal-associated invariant T) sejtek** szintén invariáns α CDR3 V α 7.2-J α 33 TCR-t expresszálnak, mely V β 2 vagy V β 13 TCR β láncot tartalmaz. Gyulladásgátló szerepüket veti fel, hogy a V α 7.2-J α 33 TCR-t mind központi, mind perifériás idegrendszeri autoimmun léziókban kimutatták fokozott IL-4 expresszióval együtt, és az egér MAIT sejtek kísérletes modellekben az autoimmunitást gátolják.

Fontos tudnivalók:

iNKT: invariáns natural killer T sejtek, invariáns V α 24-J α Q TCR-t expresszáló T sejt populáció, az autoimmunitás és tumorok elleni védelemben alapvető

MAIT: mucosa-asszociált T sejtek, melyek invariáns V α 7.2-J α 33 TCR-t expresszálnak

NK sejtek: természetes ölő sejtek: CD56⁺CD3⁻

T sejtek: CD3⁺

NKT-szerű sejtek: natural killer T-szerű sejtek: CD3⁺CD56⁺

LAR: leukocita antiszedimentációs ráta: a leukociták aktivációjával korrelál

CTLA-4: citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén-4: a T sejt aktivációt gátolja

IL-23R: interleukin-23-receptor: a Th17 sejtek differenciálódásában játszik szerepet, melyek alapvetőek a különböző autoimmun betegségek kialakulásában

A **sclerosis multiplex (SM)** a központi idegrendszer krónikus, progresszív, demielinizációval járó betegsége, amely különböző és változó súlyosságú neurológiai tünetekhez vezet. Magyarországon körülbelül 6-10 ezer, világszerte 2-3 millió ember szenved a kórképből. Négyfajta patológiai altípusa különíthető el, ami heterogén patomechanizmusra utal. A jelenleg leginkább elfogadott, autoimmun hipotézis szerint a demielinizációért elsősorban autoimmun CD4⁺ Th1 sejtek felelősek, melyek központi idegrendszeri autoantigéneket felismerve IV. (késői) típusú hiperszenzitivitást váltanak ki. Az SM komplex genetikai betegség, kialakulásában számos gén egymáshatása (többgénes öröklődés) és környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak.

A **stroke** – agyi vaszkuláris katasztrófa – világszerte magas incidenciájú, a harmadik vezető halálok, a túlélők sokszor különböző fokban rokkantakká válnak, akár az önellátásra sem képesek. A stroke okozta halálozás Közép-Kelet-Európában kirívóan magas, Magyarországon évente körülbelül 40 ezer ember kerül kórházba stroke miatt. Míg a korai halálozáshoz elsősorban az elszennvedett neurológiai lézió vezet, a posztakut fázisban fertőzőes komplikációk, főleg tüdőgyulladás és húgyúti infekciók dominálnak és járulnak hozzá a kedvezőtlen kimenetelhez, ami az immunválasz érintettségét veti fel.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Neurológiai betegségek molekuláris alapjait vizsgáltuk, az autoimmun betegségek elleni védelem, és a hatékony immunválasz szabályozásának molekuláris és sejtes mechanizmusaira koncentrálnak. Kiemelt figyelmet fordítottunk az “ősi” T sejtek központi idegrendszeren belüli immunválaszban játszott szerepére, valamint a központi idegrendszeri autoimmun betegségek neurogenetikai hátterére, különös tekintettel a sclerosis multiplex-re.

A. Az “ősi” T sejtek szerepe a központi idegrendszert érintő betegségekben

Az elmúlt években a fenotípusosan és funkcionálisan egyaránt hasonló iNKT és MAIT sejtek szerepe is felvetődött az autoimmunitás immunológiai szabályozásában, valamint a tumorok elleni védelemben.

Nemrég került kimutatásra (Illes Z. et al.), hogy központi idegrendszeri SM plakkokban nincsenek $V\alpha 24\text{-J}\alpha Q$ iNKT sejtek, nem invariáns $V\alpha 24^+$ TCR-t expresszáló konvencionális T sejtek azonban megtalálhatók. Nem volt egyértelmű, hogy az iNKT sejtek szelektív hiánya a kórkép sajátja-e, vagy pedig a központi idegrendszeri immunválasz speciális szabályozásának, antigéneknek köszönhető. Ennek eldöntésére a következő kérdéseket tettük fel:

1. Központi idegrendszeri és azon kívüli tumorokat egyaránt infiltrálnak-e iNKT sejtek?
2. Egyéb invariáns T sejtek kimutathatóak-e a tumorokban, különös tekintettel a MAIT sejtekre, amelyek az iNKT-khoz hasonló funkciókkal rendelkezhetnek?
3. Amennyiben a MAIT sejtek megtalálhatóak tumorokban, milyen a gyulladáso környezetük, milyen citokineket termelnek? Ismert, hogy képesek Th2-es citokinek termelésére, azonban állatkísérletes eredmények és az iNKT-khoz való hasonlóságuk alapján funkcionálisan heterogének is lehetnek.
4. Milyen kapcsolat van a MAIT és az NKT-szerű sejtek között tumorokban? Expresszálnak-e CD56-ot a MAIT sejtek?
5. Amennyiben igen, a $CD56^+$ MAIT sejtek részt vesznek-e a tumor elleni immunválaszban?

Az atherosclerosis-t és az akut ischaemiás stroke-ot immunológiai változások kísérik. Az immunfunkciók korai eltérései feltételezhetően kapcsolatba hozhatók a kedvezőtlen kimenetellel, magas mortalitáshoz vezető poszt-stroke infekciók kialakulásával. Ennek tisztázására NK, $\gamma\delta T$ és NKT-szerű sejteket vizsgáltunk akut ischaemiás stroke korai fázisában, továbbá vizsgáltuk a leukocita-aktivációt és a poszt-stroke infekciókkal való összefüggését:

6. Érintettek-e az ősi immunrendszer sejtjei, köztük a $CD3^+CD56^+$ NKT-szerű sejtek akut ischaemiás neurológiai eseményekben?
7. Mi az összefüggés a leukocita-aktiváció és a poszt-stroke infekciók között?
8. Az ischaemia időtartamának és az infarktus kiterjedtségének függvénye-e a stroke-ot követő leukocita-aktiváció?
9. Prognosztizálható-e a kimenetel és a poszt-stroke infekciókra való fogékonyság egyszerű, a betegágnál kivitelezhető vizsgálatokkal?

B. Az immunválasz és az autoimmun tolerancia szabályozásában szerepet játszó génpolimorfizmusok asszociációja sclerosis multiplex-szel

A CTLA-4 kiemelten fontos molekula az immunválasz terminációjában, ezáltal az autoimmunitás kialakulásának megelőzésében. Az SM *CTLA4* polimorfizmusokkal való asszociációjára vonatkozó adatok ellentmondásosak. A következő kérdések megválaszolásához végeztünk nagy betegszám mellett vizsgálatokat:

10. A *CTLA4* gén különböző polimorfizmusai asszociáltak-e SM-mel?
11. A *CTLA4* gén polimorfizmusai befolyásolják-e az immunválasz terminációjában, illetve szabályozásában lényeges kostimulációs molekulák expresszióját?

Nemrég került felismerésre egy funkcionálisan új Th sejt populáció, az ún. Th17 sejtek, melyeket a legfőbb autoimmun T sejt csoportnak tartanak. A Th17 sejtek fennmaradásához, expansziójához és részben differenciálódásához IL-23 szükséges, amely a Th17 sejteken található receptorán (IL-23R) keresztül fejti ki hatását. Az *IL23R* gén polimorfizmusainak asszociációját kimutatták gyulladáso bélbetegséggel (IBD). Az alábbi kérdéseket tettük fel:

12. Az *IL23R* gén különböző polimorfizmusai asszociáltak-e SM-mel?
13. Közös autoimmun gén-e az *IL23R*?

Az SM komplex genetikai betegség, kialakulásában számos gén egymásrahatása és környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak. Mindemellett a génextpressziót számtalan transzkripció faktor együttese szabályozza. Gén-hálózatokat vizsgáltunk az SM patomechanizmusának hátterében álló komplex autoimmun folyamatok felderítése céljából SM monoizógóta ikrek T sejtjeiben:

14. Vannak-e diszregulált génextpressziós hálózatok SM-ben?

III. VIZSGÁLATOK

A. AZ ŐSI, VELESZÜLETETT T SEJTEK SZEREPE A KÖZPONTI IDEGRENSZERT ÉRINTŐ BETEGSÉGEKBEN

1. Humán vese és agytumorokban kimutatható az invariáns V α 7.2-J α 33 T sejt receptor (TCR), amely a tumorok MAIT sejtekkel való infiltrációját jelzi

Az iNKT sejtek szerepe a tumorok elleni immunválaszban egyértelmű. A nemrég felismert MAIT (mucosa-asszociált invariáns T) sejtek az iNKT-khoz hasonló szabályozó funkciókkal rendelkeznek autoimmun betegségekből és állatmodellekben, azonban egyéb betegségekből játszott szerepük kevésbé feltárt. Klonotípus antitestek hiánya is nehezíti az azonosításukat. Központi idegrendszeri SM plakkokban a MAIT sejtekkel ellentétben nincsenek V α 24-J α Q iNKT sejtek, míg perifériás idegrendszeri autoimmun gyulladással demielinizációs léziókban vannak. Annak eldöntésére, hogy az iNKT sejtek szelektív hiánya a kórkép sajátja-e, vagy pedig a központi idegrendszeri immunválasz speciális szabályozásának, antigéneknek köszönhető, négy ismert, invariáns α TCR-t expresszáló T sejt alcsoport, köztük az iNKT-k jelenlétét vizsgáltuk központi idegrendszeri, illetve azon kívüli lokalizációjú tumorokban. A V α 24-J α Q (iNKT), V α 7.2-J α 33 (MAIT), V α 4-J α 29 és a V α 19-J α 48 TCR szekvenciákat vizsgáltuk összesen 19 humán agy- és vesetumor mintában reverz-transzkriptáz-PCR-t (polimeráz láncreakciót) követő SSCP-elektroforézis (single-strand conformation polymorphism) módszerrel, majd az invariáns szekvenciákat (klonotípus) specifikus próbákkal (probe) hibridizálva azonosítottuk.

A MAIT klonotípus a tumorok felében volt kimutatható az iNKT klonotípussal együtt. Az invariáns V α 4 és V α 19 T sejt klonotípusok nem voltak jelen a tumorokban. Vizsgáltuk továbbá a MAIT sejtek V β lánc expresszióját – mely V β 2 vagy V β 13 lehet –, antigén-prezentáló molekulája, az MR1 expresszióját, valamint a gyulladáskeltő és -gátló citokin környezetet is a MAIT sejteket tartalmazó tumorokban. A MAIT α TCR-t expresszáló vesetumorok mind a V β 2, mind a V β 3 láncot is expresszálták, míg az agytumorok egy része nem, ami arra enged következtetni, hogy a központi idegrendszeri tumorokban a MAIT sejtek egyéb V β láncokat is expresszálhatnak. Valamennyi, az invariáns MAIT TCR-pozitív tumorban észleltük a MAIT sejtek antigén-prezentáló molekuláját (MR1), ami a MAIT sejtek lokális reaktivációját jelezheti. A tumor-infiltráló T sejtek nagy része CD8⁺ T sejt volt, és HLA-DR-t expresszált, ami szintén aktivációra utal. A tumorokban a MAIT klonotípus jelenléte gyulladáskeltő (pro-inflammatórikus) citokinek expressziójával korrelált, míg az anti-inflammatórikus IL-4, IL-5 és IL-10 citokinek expressziójával nem járt együtt, ami felveti egy pro-inflammatórikus MAIT sejt alcsoport létezését. A MAIT sejtek CD56 expresszióját is vizsgáltuk a tumormintákban, valamint a tumoros betegek perifériás vérében. A MAIT α TCR a CD56⁺ és a CD56⁻ sejtek között is azonosítható volt a perifériás vérben, a tumor-infiltráló limfociták azonban valamennyien CD56 negatívak voltak.

Eredményeink szerint az iNKT sejtekhez hasonlóan a CD56⁻ MAIT sejtek részt vesznek a tumorok elleni gyulladáskeltő immunválaszban. Továbbá a MAIT sejteknek lehet egy pro-inflammatorikus, gyulladáskeltő alcsoportja, a humán iNKT és az egér MAIT sejtekhez hasonlóan. Eredményeink ezen felül azt támasztják alá, hogy az iNKT sejtek szelektív hiánya a központi idegrendszeri SM plakkokban sclerosis multiplex-re jellemző, és nem a központi idegrendszeri speciális antigén- és immunológiai környezet következménye.

2. Az ősi immunrendszer T sejtjei és az NK sejtek funkciója károsodott akut ischaemiás stroke-ban

Míg akut ischaemiás stroke-ban a korai halálozáshoz elsősorban az elszenvedett neurológiai lézió vezet, a posztakut fázisban fertőzések komplikációk, főleg tüdőgyulladás és húgyúti infekciók dominálnak, és járulnak hozzá a kedvezőtlen kimenetelhez. A fertőzések iránti fokozott fogékonyság stroke-ban az immunválasz korai érintettségét veti fel, a stroke-ot követő immundepresszió lehetősége merül fel. Az eddig végzett kevés számú állatkísérletes és humán vizsgálat elsősorban az adaptív immunrendszer T sejtjeire fókuszált. Vizsgálataink során az ősi immunrendszer sejtjei, illetve az ősi és az adaptív immunrendszert összekötő, azok határára álló T sejtek akut változásait állítottuk a középpontba. Ezen sejtek közös tulajdonsága, hogy nagy mennyiségű citokin gyors termelése vagy a citotoxicitás révén részt vesznek az immunválasz szabályozásában. V δ 2 T sejteket, CD3⁺CD56⁺ natural killer T (NKT)-szerű sejteket, valamint CD3⁻CD56⁺ természetes ölő (NK) sejteket vizsgáltunk. Flow citométerrel mértük a sejtszámot, a citokintermelést, az intracelluláris perforin és a felszíni Fas ligand (FasL) expressziót 28, akut ischaemiás stroke-ot elszenvedett beteg perifériás vérében a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 72 óra múlva. Ezen időpontokban az NK sejtek citotoxicitását is vizsgáltuk nem radioaktív, kolorimetriás citotoxicitás esszével. A fenti két időpontban mért eredményeket egymással, valamint 20 egészséges kontrollszemély hasonló módon mért adataival statisztikailag összehasonlítottuk.

A V δ 2, NKT-szerű és NK sejtek száma a stroke-ot 6 illetve 72 órával követően nem változott, és hasonló volt az egészséges egyéneknél mért sejtszámokkal. Ezzel szemben a V δ 2, NKT-szerű és NK sejtek gyulladáskeltő, intracelluláris IFN- γ expressziója, valamint a szeparált NK sejtek IFN- γ termelése a 6 órán belüli mintákban alacsony volt, majd a stroke-ot követően 72 órával érte el az egészségesekben mért szintet. A gyulladásgátló IL-4, IL-5 és IL-10 citokinek termelése nem változott NKT-szerű és NK sejtek esetében. Valamennyi vizsgált sejt intracelluláris perforin expressziója, továbbá az NK citotoxicitás a stroke tünetek kezdetétől számított 6 órán belül alacsony volt, majd 72 óra elteltével normalizálódott.

Eredményeink szerint akut ischaemiás stroke-ban deficienssé válik a V δ 2, NKT-szerű és NK sejtek pro-inflammatorikus és citotoxikus immunválasza, mely szerepet játszhat a fertőzések iránti fokozott fogékonyság kialakulásában stroke-ban.

3. Az elégtelen leukocita antiszedimentáció összefügg a poszt-stroke infekciók kialakulásával és a kedvezőtlen kimenetellel

A stroke betegek fertőzések iránti fokozott fogékonysága az immunválasz korai érintettségét veti fel, a stroke-ot követő immundepresszió lehetősége merül fel. Az előző pontban kifejtettek túlmenően akut ischaemiás stroke-ban a leukocita-aktivációt is vizsgáltuk, valamint összefüggését az ischaemia időtartamával és az infarktus nagyságával. Vizsgáltuk továbbá az elégtelen leukocita-aktiváció és a poszt-stroke infekciók, valamint a rossz kimenetel közötti esetleges kapcsolatot. A leukociták aktivációjának mérésére az ún. leukocita antiszedimentációs rátát (LAR) alkalmaztuk, majd a kapott értékeket korreláltattuk a különböző klinikai és laboratóriumi paraméterekkel. A LAR-teszt kivitelezése a süllyedés (Westergreen) méréséhez hasonló módon történik, a ráta kiszámításához a leukocita-szám

meghatározása is szükséges. A kimenetel és a poszt-stroke infekciókra való fogékonyság korai prognosztizálására alkalmas egyszerű, a betegágnál kivitelezhető vizsgálatok tesztelése is célunk volt.

A LAR értékét, mely a leukociták aktivációjának a mértékét fejezi ki, a stroke-ot, illetve TIA-t (tranziens ischaemiás attack) követően több időpontban is meghatároztuk, és korreláltattuk az infarktus nagyságát jelző S100 β vérszintekkel, az infekcióra utaló prokalcitonin-szintekkel, valamint a kimenetellel. 61 egészséges kontrollszemélytől, és összesen 49 akut ischaemiás történést elszenvedett betegtől (38 akut ischaemiás stroke- és 11 TIA-betegtől) gyűjtöttünk vérmintákat a vizsgálatokhoz. TIA-ban a tünetek 24 óránál tovább nem állnak fenn, a koponya CT felvételek pedig nem mutatják infarktus jeleit. A betegektől a tünetek fellépésétől számítva 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva vettünk perifériás vért. A LAR értékei a későbbi poszt-stroke infekciók kialakulásától függetlenül szignifikánsan magasabbak voltak a 6 órás mintákban akut ischaemiás történésekben. Mindemellett a LAR lassabban és kevésbé emelkedett TIA-ban a definitív stroke-hoz képest, továbbá pozitív korreláció volt megfigyelhető ischaemiás stroke-ban 72 óra elteltével a LAR és az S100 β értékei között. Mindkét eredmény a szövetkárosodás nagysága és az ősi immunválasz mértéke közötti összefüggést jelzi. Ezen túlmenően akut ischaemiás stroke-ban poszt-stroke infekció kialakulása és a Glasgow Outcome Scale-ben (GOS-skála) kifejezett kedvezőtlen kimenetel esetén a LAR korai emelkedésének elmaradását észleltük.

Eredményeink szerint az emelkedett LAR által kifejezett korai, fokozott leukocita-aktiváció jellemző az akut ischaemiás cerebrovaszkuláris eseményekre. TIA-ban a LAR és a leukocita-aktiváció kisebb mértékű és lassabb, mint definitív stroke-ban. Eredményeink azt támasztják alá, hogy az eddig kifejezetten károsnak tekintett akut leukocita-aktivációnak szerepe van a poszt-stroke infekciók elleni védelemben. A leukocita-aktiváció hatása kettős: a központi idegrendszerben lokálisan károsodáshoz vezethet, azonban a szisztémás aktiváció fontos a poszt-stroke infekciók megelőzése szempontjából. A nem megfelelően szabályozott korai immunválasz vagy az elégtelen leukocita-aktiváció fertőzések iránti fokozott fogékonysághoz vezethet stroke-betegekben.

B. AZ IMMUNVÁLASZ ÉS AZ AUTOIMMUN TOLERANCIA SZABÁLYOZÁSÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNPOLIMORFIZMUSOK ASSZOCIÁCIÓJA SCLEROSIS MULTIPLEX-SZEL

4. A sclerosis multiplex nem asszociált az autoimmunitással összefüggésbe hozott *CTLA4* gén *CT60* polimorfizmusával nagy számú német, magyar és lengyel betegben

A TCR (T sejt receptor) specifikus antigénfelismerése és kötése által elindított első szignálon kívül a T sejtek teljes aktivációjához egy további, ún. kostimulációs szignálra van szükség. A kostimuláció során mind az antigén-prezentáló sejtek, mind a T sejtek aktiválódnak. Az immunválasz terminációja ugyanakkor rendkívül fontos az autoimmun tolerancia mechanizmusában, az autoimmun kórképekkel szembeni védelemben. A termináció egyik fő közvetítője a T sejtek felszínén az aktiváció hatására expresszálandó CTLA-4 (citotoxikus T limfocita-asszociált antigén-4).

A *CTLA4* gén polimorfizmusai különböző autoimmun betegségekre való fogékonysággal asszociáltak. A *CTLA4* gén 3' nem kódoló szakaszán (3' UTR, untranslated region) nemrégiben leírt SNP (single nucleotide polymorphism) *CT60* Basedow-Graves-betegséggel, autoimmun thyreoiditis-szel, autoimmun diabetes-szel és egyéb autoimmun betegségekkel asszociált, azonban a sclerosis multiplex-szel való asszociációra vonatkozó adatok ellentmondásosak. Ezért nagy számú német, magyar és lengyel SM betegekkel és kontroll személyekkel eset-kontrollált asszociációs vizsgálatokat végeztünk a *CTLA4 CT60* és +49A/G polimorfizmusára vonatkozóan polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásának

felhasználásával. Ezen túlmenően haplotípus-analízist is végeztünk, és a CTLA-4 és az ICOS (indukálható kostimulátoros molekula) expresszióját vizsgáltuk genotípusok szerint. Az ICOS szintén lényeges szerepet játszik az autoimmun toleranciában, és a Th2-mediált gyulladásgátló immunválasz kialakításában.

A vizsgált polimorfizmusok illetve az egyes haplotípusok, valamint az SM között nem találtunk szignifikáns asszociációt. Saját adatainkat korábban publikált kutatási eredményekkel kiegészítve metaanalízist is végeztünk, ami összesen 1228 SM beteg és 1440 egészséges kontrollszemély együttes vizsgálatát tette lehetővé. Nem találtunk asszociációt a CT60 genotípus és a T sejtek *in vitro* stimulációt követő ICOS illetve CTLA-4 expressziója között sem. Összességében a nagyszámú beteg és kontroll vizsgálatából származó eredményeink a CTLA4 polimorfizmus sclerosis multiplex iránti fokozott fogékonyságban játszott csekély szerepére utalnak.

5. Az IL-23 receptor génjének C2370A allélje relapszáló-remittáló sclerosis multiplex-szel asszociált

Az IL-23-ról és az IL-17-ről kimutatták, hogy szerepük van különböző autoimmun betegségek kialakulásában. Az IL-17-et termelő T sejteket Th17 sejteknek nevezték el. A Th17 sejtek fennmaradásához, expansziójához és részben differenciálódásához IL-23 szükséges, amely a Th17 sejteken található receptorán (IL-23 receptor, IL-23R) keresztül fejti ki hatását. Az IL-23/IL-17 citokin tengelynek több autoimmun betegség, köztük a sclerosis multiplex kialakulásában játszott szerepe is felmerült.

223 relapszáló-remittáló sclerosis multiplex-es (RRSM) beteget és 200 egészséges kontrollszemélyt vizsgálva elemeztük az IL-23 receptor gén (*IL23R*) 3' nem kódoló szakaszán (3'UTR) található C2370A SNP (single nucleotide polymorphism) előfordulását PCR technikával. Egészséges kontrollokkal összehasonlítva (5,50%) az A2370A genotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő RRSM betegek (10,8%), illetve OGP pozitív (oligoklonális gammopathia) RRSM betegek esetében. Többszörös regressziós analízis szerint az AA genotípus az SM kialakulásának kockázatát kétszeresére növelte (OR=2,072; 95% CI: 0,988-4,347; p<0.05) csakúgy, mint az OGP megjelenését a liquorban (OR=2,554; p=0,03). Nem találtunk szignifikáns eltérést a női SM betegek, illetve a HLA-DRB1*1501 pozitív és negatív betegek, valamint a kontroll személyek között. A szekunder progresszív SM-mel való asszociációt is vizsgáltuk, habár kis esetszám mellett (45 beteg esetében), asszociáció nem volt kimutatható.

A sclerosis multiplex-szel való asszociáció kimutatásán túl eredményeink felvetik, hogy az *IL23R* új, közös autoimmun gén, hiszen egyéb autoimmun betegségekkel, többek között gyulladásgátló bélbetegséggel (IBD) és psoriasis-sal való asszociációját is igazolták.

6. Hibás transzkripció szabályozó hálózatok sclerosis multiplexben

Sclerosis multiplexben számos, mikroarray-vel nyert adat támasztja alá a génexpressziós profil eltérését, azonban transzkripció hálózatokat, melyek számos gén expresszióját szabályozzák, még nem vizsgálták. Emellett a genetikai különbségek is hozzájárulhatnak a génexpressziós eltérésekhez. Monozigóta ikrek konkordanciája 30% körüli, míg dizigótáké 5% alatti, ami arra enged következtetni, hogy nem egy, hanem több gén együttes hatása áll az SM iránti fogékonyság kialakulásának hátterében. Ráadásul ezen gének expresszióját is több transzkripció faktor együttesen szabályozza. Mindezek alapján az SM patogenezisének hátterében álló komplex autoimmun folyamatok feltárásához gén-hálózatok vizsgálatára van szükség.

SM-es monozigóta ikrek szeparált CD3⁺ T sejtjeinek génexpressziós profilját és transzkripció hálózatait vizsgáltuk DNS mikroarray-vel. Három konkordáns és egy

diszkordáns ikerpárt vizsgáltunk. Összesen 20 gén eltérő expresszióját azonosítottuk (DEG, differentially expressed genes) az SM beteg iker és a vele genetikailag azonos egészséges iker összehasonlítása során. A 20 eltérően expresszáló gén molekuláris hálózatának KeyMolnet-tel végzett analízise az Ets transzkripció faktor család és az NF- κ B nukleáris faktor szerepére utalt.

Ezen új, bioinformatikai megközelítés hibás, komplex transzkripció szabályozó hálózatok szerepét veti fel a kóros T sejtek kialakulásában sclerosis multiplex-ben.

IV. TÉZISEK

1. A MAIT és az NKT sejtek a jelenleg ismert egyetlen tumorokat infiltráló invariáns T sejtek.
2. Mivel az NKT sejtek megtalálhatók központi idegrendszeri (KIR) tumorokban, hiányuk a KIR-i SM plakkokban a betegség sajátossága és nem a KIR-i speciális antigén és immunológiai környezet következménye.
3. A MAIT sejtek egy alcsoportja pro-inflammatórikus, és részt vesz a tumorok elleni immunológiai védelemben.
4. Az agy- és vesetumorokat eltérő MAIT sejt alcsoportok infiltrálják: az agytumorokban megtalálható MAIT sejtek a V β 2 és a V β 13 láncon kívül egyéb TCR β láncokat is expresszálhatnak.
5. A tumor infiltráló MAIT sejtek nem expresszálják CD56-ot, míg mind egészséges kontrollszemélyek, mind a tumoros betegek perifériás vérében megtalálható a CD56⁺ és a CD56⁻ alcsoport is.
6. Az ősi immunrendszerhez tartozó V δ 2, NKT-szerű és NK sejtek száma nem változik akut ischaemiás stroke-ban, míg korábbi kutatások az adaptív immunrendszer T sejtjei számának csökkenését találták.
7. A változatlan sejtszámokkal ellentétben az ősi immunrendszer limfocitáinak funkcionális deficienciája mutatható ki akut ischaemiás stroke-ban a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül: alacsonyabb szintű a gyulladáskeltő citokinek termelése, a perforin expresszió és az NK citotoxicitás, azonban a Th2-es citokinek termelésében valamint a Th2-es immunválasszal összefüggő ICOS expressziójában nincs eltérés. Feltételezhetjük, hogy az immunválasz korai deficienciája vagy nem megfelelő normalizációja alapvetően befolyásolja az infekciók iránti fogékonyságot csakúgy, mint az állatkísérletes modellekben.
8. Az emelkedett LAR által jelzett fokozott leukocita-aktiváció az akut ischaemiás stroke-ot követően órákon belül jelentkezik.
9. Bár egészséges kontrollokhoz képest TIA-ban is magasabb a LAR, definitív stroke-kal összehasonlítva lassabban és kisebb mértékben emelkedik.
10. A LAR kellő emelkedésének elmaradása által jelzett deficiens leukocita-aktiváció poszt-stroke infekciók kialakulására hajlamosíthat, és kedvezőtlen kimenetelt jelezhet előre.
11. Az eddig kifejezetten károsnak tekintett akut leukocita-aktiváció szerepe új megvilágításba kerül: a leukocita-aktiváció hatása kettős, egyrészt a központi idegrendszerben lokálisan a károsodás fokozódásához vezethet, másrészt azonban a szisztémás aktiváció fontos a poszt-stroke infekciók megelőzése szempontjából.
12. Pozitív korreláció van a LAR és az S100 β a stroke-ot követő harmadik napon mért értékei között, ami az infarktus kiterjedtsége és az ősi immunválasz mértéke közti összefüggésre utal.

13. A *CTLA4 CT60*G* allélje más autoimmun kórképekkel szemben a sclerosis multiplex iránti fogékonyságot alig vagy egyáltalán nem befolyásolja. Nem találtunk a T sejtek CTLA-4 és ICOS expressziójában genotípustól függő eltéréseket. Korábbi vizsgálatokkal egyetemben eredményeink azt mutatják, hogy a *CTLA4* nem asszociált SM-mel.
14. A relapszáló-remittáló sclerosis multiplex az *IL23R* gén C2370A polimorfizmusával (AA) asszociált: az AA genotípus kétszeresére növeli az SM kialakulásának és a központi idegrendszeri humoralis immunválasz kockázatát.
15. Az *IL23R* új, közös autoimmun gén lehet.
16. A hibásan szabályozott, komplex transzkripciós hálózatok szerepet játszhatnak a kóros T sejt válasz kialakulásában sclerosis multiplex-ben.

V. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt témavezetőmnek, **Illés Zsolt**-nak mondok köszönetet, aki óriási tudásával, tapasztalatával, kitartásával és támogatásával mindvégig mellettem állt és tanított, segített, biztatott, örült a sikereimnek és megtalálta az akadályok és kudarcok leküzdésének módját. Nem csak tudományos előrehaladásomat alapozta meg, hanem munka- és életről is pozitív hatást gyakorolt.

Hálás köszönetet mondok **Szereday László**-nak, akitől rengeteget tanultam és dolgoztam vele együtt, akire mindig számíthattam, aki mindig szakértelemmel és türelemmel állt hozzám, támogatott, biztatott és segített, aki nem csak a kutatáshoz, hanem az élethez való pozitív hozzáállásomat is megerősítette.

Köszönöm Komoly Sámuel professzornak és Szekeres-Barthó Júlia professzor asszonynak, hogy szükség esetén mindig őszintén fordulhattam hozzájuk, és számíthattam támogatásukra.

Mindenkinek megköszönöm a tőle kapott segítséget, támogatást, tudást, mellyel munkámhoz hozzájárult. Külön köszönet illeti mindezekért Mikó Évát és Pál Józsefet. Ezúton is köszönöm mindenkinek a rám áldozott munkáját a Pécsi Tudományegyetem Neurológiai Klinikáján és az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetben.

Köszönöm szüleimnek, öcsémnek és valamennyi barátomnak a folyamatos támogatást, segítséget és megértést, amit kaptam és kapok tőlük.