

**TIM-3 ÉS GALECTIN-9 MOLEKULÁK VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES ÉS
PATHOLÓGIÁS TERHES, VALAMINT INFERTILIS NŐKNÉL**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Meggyes Mátyás

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Témavezető: Dr. Szereday László, egyetemi docens

Programvezető: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Pécs

2015



BEVEZETÉS

Immunológiai háttér, az anyai immuntolerancia

A terhesség egy „immunológiai rejtély”, ugyanis a petesejt és a hímivarsejt találkozásakor a fejlődésnek induló új egyed genetikai állományának felét az anyától felét az apától örökli, így a magzat fele részben apai, az anyai immunrendszer számára idegen antigéneket hordoz. Az allograftok kilökődéséért immunrendszerünk tehető felelőssé tehát a terhesség ilyen szempontból immunológiailag paradoxonnak minősül, mivel a semi-allograft magzat zavartalanul fejlődik a terhesség ideje alatt. Az embrionális eredetű trophoblast sejtek képezik az anya és a magzati felszín közötti érintkezési felületet. A placenta bolyhos struktúráját adó cytotrophoblast és syncytiotrophoblast rétegek mellett az extravillosus cytotrophoblast (EVCT) sejtek alkotják a méhlepény invazív szubpopulációját, melyek az anyai szövetekbe hatolva képesek közvetlen, sejt-sejt szintű kapcsolatot teremteni az anyai sejtekkel, így itt van elsősorban lehetőség a magzati antigének anyai lymphocyták általi felismerésére, illetve az EVCT lehet az anyai immunválaszok támadásának célpontja. Az EVCT-ről ugyanis részben hiányoznak az egyén immunológiai ujjlenyomatának tekinthető klasszikus hisztokompatibilitási antigének (HLA), melyeknek egyezése vagy különbözősége határozza meg a beültetett szerv sorsát. Az EVCT-n a klasszikus polimorf HLA-A, illetve HLA-B antigének nem fejeződnek ki, de kis mennyiségben a HLA-C igen. Kimutathatóak rajta továbbá trophoblast szövetspecifikus antigének és I. osztályú korlátozott polimorfizmusú HLA antigének is (HLA-E, illetve HLA-G). Ezek az antigének alacsonyabb molekulásúlyúak, mint a klasszikus HLA antigének és hiányoznak róluk az apai alléldeterminánsok, melyek a graft kilökődési reakciójának targetjei. A cytotoxikus T-lymphocyták (Tc) aktiválódásának feltétele a klasszikus, polimorf HLA antigének jelenléte, míg az NK sejtek aktiválódását éppen ezen antigének hiánya idézi elő. Az EVCT-n nagymértékben expresszálandó HLA-G tehát nem képes antigént prezentálni a Tc sejteknek, ezzel védve a trophoblast sejteket az eliminációtól, ugyanakkor képes az NK sejt gátló receptorához is kapcsolódni, ami negatív szignált közvetít az ől sejteknek, következésképpen a HLA-G jelenléte védheti a trophoblastot a Tc-, illetve az NK sejt mediálta lízissel szemben.

A magzat és az anya immunológiai kapcsolata egy olyan kétoldalú folyamat, melyet magzati részről az arra jellemző antigének prezentálása, anyai részről azok felismerése és reagálva rá az immunválasz mértéke határoz meg. Terhesség során az említett anyai immunválasz immunszuppresszív jellegű, így például a citokin termelés egyensúlya T helper 2-es (Th2) irányba tolódik el, illetve alacsony perifériás NK aktivitás figyelhető meg. A terhesség alatt az anyai immunválaszokat szabályozó immunregulációs folyamatok megfelelő működése rendkívül fontos az előbb említett két ellentétes folyamat közötti egyensúly kialakításában. Ennek az egyensúlynak a megléte biztosítja a magzat fejlődését, megbomlása azonban koraszüléssel, pre-eclampsia kialakulásával vagy akár a magzat elvesztésével is járhat.

A TIM-3

A TIM-3 receptort elsőként kísérletes allergiás encefalitisz (EAE) egérmodellben (Th-1 mediálta autoimmun betegség) kezdték vizsgálni, amelyet párhuzamba lehet állítani a humán sclerosis multiplex-xel (SM). A kísérleti eredmények alapján arra következtettek, hogy a TIM-3 szövetroncsoló gyulladással immunválaszokban, EAE esetén egy negatív szabályzó molekula és úgy azonosították, mint egy a CD4+ Th1-es sejteken igen, de a Th2-es sejteken nem expresszálandó receptor fehérjét.

TIM-3-Ig fúziós protein alkalmazása a T-sejtek hyperproliferációját eredményezi továbbá elősegíti citokin termelésüket, gátolva ezzel a perifériás tolerancia mechanizmusok kialakulását.

Autoimmun diabetes egérmodell vizsgálatakor, TIM-3 antitest, illetve TIM-3-Ig fúziós protein kezelést alkalmazása egyaránt a betegség súlyosbodását idézi elő. A TIM-3 receptor és a valószínűsíthető ligandja közti kapcsolat blokkolása szintén a tolerancia kialakulásának elmaradását idézi elő, tehát a TIM-3 és ligandja közti interakció létrejöttének gátlása ezen autoimmun betegség súlyosbodásához vezetett. A TIM-3 receptor blokkolása a Th1-es immunválaszok up-regulációjával jár, amit pedig a Th2-es immunválaszok intenzitásának csökkenése kísér. Az utóbbi évek kísérleteiből tehát egyértelműnek tűnik, hogy a TIM-3 a Th1-es immunválaszok negatív regulátora, de újabban azt is valószínűsítik, hogy a T-sejtes válaszokban bizonyos körülmények, illetve feltételek mellett pozitív szabályzó szerepe is lehet. Ugyanis a TIM-3 folyamatos expresszióját figyelték meg monocytákon, dendritikus- (DC) és mikroglia sejteken, illetve a TIM-3 ligand kötése egyaránt növelte ezen sejtek kostimulációs receptorainak expresszióját és citokin termelését. Abból adódóan, hogy a TIM-3 a veleszületett, illetve az adaptív immunrendszer sejtjein különbözőképpen expresszálódhat képes elindítani vagy terminálni a Th1-es immunválaszokat, illetve befolyásolni számos gyulladási folyamat kimenetelét.

A Galectin-9 (Gal-9)

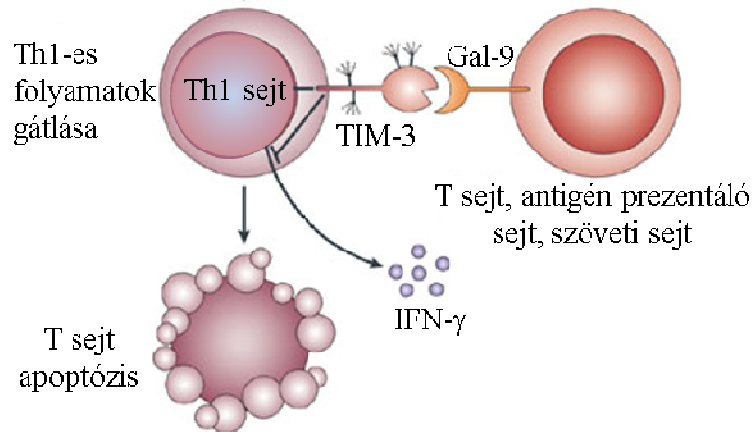
A Gal-9-et először eozinofil kemoattraktánsként azonosították, ami elősegíti a szuperoxid termelést és megnöveli a sejtek túlélését, ugyanakkor számos egyéb biológiai folyamatban is nagy jelentőséggel bír, úgy mint sejtadhézió, proliferáció, apoptózis, illetve a sejtciklus.

A Gal-9 anti-metasztatikus hatással is bír bizonyos rákbetegségnél, mint az emlőrák vagy az orális laphám karcinóma. A Gal-9 immuntoleranciát idéz elő olyan esetekben, ahol az immunválaszok túlzott mértékűek, mint pl. az autoimmun betegségeknél is. Bizonyítást nyert továbbá, hogy apoptózist indukál az aktivált CD4⁺ Th sejtekben, ami a nyugvó sejtek esetében elmarad. Tumor indukálta immunszuppresszív állapotban a TIM-3/Gal-9 útvonalon keresztül antitumor aktivitása van, ugyanakkor hyperimmun feltételek mellett apoptózist idéz elő TIM-3+ Th1-es, Th17-es és CD8⁺ Tc-sejteken. Egy nemrégiben megjelent publikációban olyan Gal-9+ sejtpopulációt azonosítottak (Gal-9+ Th sejtek), amely összefüggésbe hozható a keringő Gal-9 molekula koncentrációjával. Egyre valószínűbb, hogy a Gal-9-nek egy „termosztát” szerű, kulcsfontosságú szerepe lehet az immunológiai homeosztázis fenntartásában, ugyanis az immunrendszer túlzott működése esetén immunszuppresszív, míg immunhiányos állapotban az immunológiai válaszképességet növelő hatása is bizonyított.

A TIM-3/Gal-9 interakció

Mint az immunoglobulin szuperfamília tagja, a TIM-3 egy transzmembrán protein, melynek expresszióját elsősorban a differenciált Th1-es sejteken írták le. A Gal-9-et a TIM-3 ligandjaként azonosították, melynek folyamatos expressziója T-sejtek felszínén kívül egyéb szövetekben is megfigyelhető, így a thymus, lép, máj, vese, tüdő és különböző izmokon is. Továbbá néhány gyulladáskeltő citokin, úgy mint az IFN- γ vagy az IL-1 β képesek indukálni a Gal-9 expresszióját endotheliális illetve fibroblast sejteken. A TIM-3 lényeges szerepet játszik a Th1-es immunválasz és a humán autoimmun betegségek szabályozásában. SM-ben szenvedő betegek lépéből izolált természetes és adaptív immunsejtek TIM-3 expressziójának vizsgálatakor a receptor nyugalmi állapotban elsősorban a DC-ken expresszálódik, ami elősegíti a sejtek TNF- α szekrécióját. Th1-es immunválaszok során, a differenciálódott Th1-es sejteken a TIM-3 nagyobb arányban expresszálódik, mint a DC-ken, ami a Gal-9 mediálta jelátviteli útvonal up-

regulációját eredményezi, ez pedig megnövekedett IFN- γ produkcióhoz vezet. A Gal-9 továbbá TIM-3 expressziót idéz elő a Th-1-es sejteken, ami megszünteti a Th1-es immunválaszt.



A TIM-3/Gal-9 kapcsolódás és hatásmechanizmusa

A Gal-9 a Th1-es lymphocytákon sejthalált idéz elő, ha a TIM-3 receptorral kölcsönhatásba lép, ami mind apoptózist mind nekrozist is jelenthet a kalcium-kalpain-kaspáz útvonalon keresztül. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a TIM-3 képes módosítani a Th1/Th2-es cytokin egyensúlyt és valószínűsíti a molekulák szerepét az anyai immuntolerancia mechanizmusok kialakulásában.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során az anyai immuntoleranciát szabályzó folyamatokat egy új oldaláról tanulmányoztuk; egy a közelmúltban azonosított és leírt ligand-receptor páros jelenlétét és annak lehetséges funkcionális következményeit vizsgáltuk a terhesség során. A TIM-3 és a Galectin-9 molekulák immunológiai toleranciában betöltött szerepére számos nemzetközi publikáció hívja fel a figyelmet, terhességben betöltött szerepükről azonban igen kevés információval rendelkezünk, ebből kifolyólag az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. A TIM-3/Gal-9 útvonal szerepe egészséges terhességben

A terhesség előremenetelével hogyan változik a TIM-3 receptor és a Gal-9 ligand sejtfelszíni kifejeződése az egyes lymphocyta szubpopulációkon terhes nők perifériás vérében? Mik a funkcionális jellemzői az egyes TIM-3+ lymphocyta szubpopulációknak: eltér-e cytotoxikus aktivitásuk, cytokintermelésük a TIM-3 negatív sejtektől? Mutat-e időfüggő változást a szérumban szolubilis Gal-9 koncentrációja a terhesség előrehaladtával

2. A TIM-3/Gal-9 útvonal lehetséges szerepe pathológiás terhességben

Mutat-e eltérést a TIM-3 és Gal-9 molekulák megoszlása, expressziója, az immunológiai eredetű pre-eclampsias betegek perifériás vérében egészséges terhesekhez képest? Járnak-e az esetleges változások funkcionális következménnyel is?

3. TIM-3/Gal-9 útvonal prognosztikai szerepe mesterséges megtermékenyítés során

Elsősorban arra kerestünk választ, hogy változik-e az NK sejtek aránya, receptor expressziós mintázata, illetve funkciói az IVF beavatkozást követően, és ha igen, a változásoknak van-e valamilyen hatása az eljárás sikeres kimenetelére.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteink során az alábbi módszereket alkalmaztuk:

- PBMC (mononukleáris sejtek) szeparálás perifériás vérből Ficoll grádiensen
- Szeparált sejtek fagyasztása humán savóban oldott DMSO-val
- Fagyasztott sejtek vízfürdős felolvasztása
- A sejtek fenotípusos jelölése flow cytometriás méréshez
- Intracelluláris jelölés anti-perforinnal
- FoxP3-at expresszáló sejtek fenotípus jelölése
- CD107a aktivációs marker mérése
- Flow cytometria
- Mágneshez kötött sejtszeparálás (MACS)
- Fluoreszcens sejtszortolás
- PMA/Ionomycin kezelés
- Termelt citokinek meghatározása CBA módszerrel
- Szolubilis Galectin-9 szint mérése ELISA módszerrel
- Statisztika analízis SPSS szoftverrel

EREDMÉNYEK

1. A TIM-3/Gal-9 útvonal szerepe egészséges terhességben

Részletesen elemeztük a CD3⁺ T sejteket, ezen belül a CD4⁺ Th, CD8⁺ Tc szubpopulációkat, az NK (CD3⁻ CD56⁺) sejteket és azok NK^{dim}- és NK^{bright} szubpopulációit, továbbá az NKT (CD3⁺ CD56⁺)- valamint a Gal-9⁺ Th sejtek megoszlását egészséges terhesség három trimeszterében, illetve nem terhes kontroll mintákban. Az NK sejtek azon belül is a NK^{dim} populáció aránya magasabb, míg a NK^{bright} populáció aránya alacsonyabb volt a kontroll csoport mintáiban összehasonlítva a különböző trimeszter mintáival, azonban a különbségek nem érték el a statisztikai szintet. A harmadik trimeszteri nőkben 2,39% a Gal-9⁺ Th sejtek aránya, amely érték szignifikánsan magasabb, mint az első, illetve a második trimeszterben és a nem terhes kontroll nőkben mért értékeknél.

Eredményeink alapján egészséges terhesség alatt az NK sejtek és azon belül a NK^{dim} szubpopuláció expresszálja legnagyobb arányban a TIM-3-at míg az NK^{bright} szubpopuláció, a CD8⁺ Tc, és a CD4⁺ Th sejtek receptor expressziójának szintje alacsonyabbnak bizonyult. NK sejtek esetében a harmadik trimeszteri nők NK sejtjeinek TIM-3 expressziója szignifikánsan magasabb volt a második trimeszteri csoportnál. Elemezve az NK sejt szubpopulációkat a harmadik trimeszteri NK^{dim} sejtek szignifikánsan nagyobb arányban fejezik ki a receptort, mint az első és második trimeszterből származó, illetve a kontroll minták NK^{dim} sejtjei, míg a NK^{bright} szubpopuláció esetében a kontroll mintákhoz képest emelkedik a TIM-3 expressziója, ami az egész terhesség alatt megfigyelhető.

Th1, Th2 és Th17-es cytokineket CBA módszerrel analizáltuk, amely során az IL-4, IL-6, IL-10- és az NK sejtek esetében az IL-17 cytokin koncentráció a kimutathatósi határ alatt maradtak. Méréseink során kimutattuk, hogy a TIM-3+ CD8+ Tc sejtek szignifikánsan kisebb mennyiségben termeltek pro-inflammatorikus (IL-2, TNF- α és IFN- γ) és Th17-es cytokineket összehasonlítva a TIM-3 negatív CD8+ Tc sejtekkel az első és a harmadik trimeszterben, valamint a nem terhes kontroll mintákban. Szintén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az TIM-3+ NK^{dim} sejtek esetében az IL-2 termelést illetően összehasonlítva a TIM-3 negatív NK^{dim} sejtekkel az első és második trimeszter mintáiban. Érdekes eredményeket mértünk a NK^{bright} sejtek cytokin termelését analizálva ugyanis a TIM-3+ NK^{bright} szubpopuláció szignifikánsan nagyobb mennyiségű IFN- γ cytokint termelt a terhesség második trimeszterében, mint a TIM-3 negatív NK^{bright} szubpopuláció.

Vizsgálva a cytotoxikus aktivitással korreláló CD107a molekula kifejeződését a harmadik trimeszter TIM-3+ CD8+ Tc sejtjei szignifikánsan nagyobb mennyiségben expresszálják, mint a terhesség többi trimeszteréből származó, illetve a nem terhes kontroll minták. Figyelemre méltó eredmény továbbá, hogy a harmadik trimeszteri TIM-3+ CD8+ Tc sejtek CD107a szintje szignifikánsan magasabb összehasonlítva a TIM-3 negatív CD8+ Tc sejtekkel. A TIM-3+ NK sejtek cytotoxikus aktivitása a harmadik trimeszterben szignifikáns emelkedést mutat, mint az első trimeszterben és a nem terhes mintákban. Összehasonlítva a TIM-3 receptort kifejező és nem kifejező sejtek CD107a expresszióját minden vizsgált csoportban a TIM-3 negatív sejtek cytotoxikus aktivitása mutatkozott magasabbnak. Az NK^{dim} szubpopuláció cytotoxicitása hasonló mintázatot mutat, mint az NK sejté, mely szerint a CD107a expresszió a harmadik trimeszterben szignifikánsan magasabb, mint az első trimeszterben és a nem terhes mintákban. Összehasonlítva az NK sejt szubpopulációk TIM-3 pozitív és TIM-3 negatív sejtpopulációit érdekes eredményeket kaptunk, amely szerint a TIM-3+ NK^{dim} szubpopuláció cytotoxikus aktivitása összes vizsgált csoportban szignifikánsan alacsonyabb, mint a TIM-3 receptort nem expresszáló NK^{dim} szubpopulációkéval. Az NK^{bright} sejtek vizsgálata során a nem terhes minták TIM-3 negatív szubpopulációjában szignifikánsan emelkedett értéket mértünk a TIM-3 pozitív populációhoz viszonyítva.

A szérum Gal-9 molekula koncentrációjának vizsgálatakor, a nem terhes kontroll mintákban szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattunk ki, mint a trimeszterek mintáiban. Összehasonlítva egymással a terhességi trimesztereket a második és harmadik trimeszterben mért keringő Gal-9 molekula szignifikánsan nagyobb koncentrációban van jelen, mint az első trimeszterben.

2. A TIM-3/Gal-9 útvonal lehetséges szerepe pathológiás terhességben

Kísérletünk során részletesen elemeztük a CD3+ T sejtek ezen belül a CD4+ Th és CD8+ Tc, a Treg, az NK ezen belül NK^{dim} és NK^{bright} valamint az NKT sejtek megoszlási arányát a perifériás vérből egészséges terhes, illetve early-onset pre-eclamsziás mintákból. Szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a Treg, illetve a NK^{bright} sejtek arányát illetően a pre-eclamsziás csoportban összehasonlítva a kontroll mintákkal.

Vizsgálva a TIM-3 expressziót az early-onset pre-eclamsziás mintákban szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a receptor expresszióban a CD8+ Tc, NK és a NK^{dim} sejtek esetén összehasonlítva a kontroll mintákkal, míg a NK^{bright} sejteknél különbséget nem tapasztaltunk.

Méréseink során a perifériás lymphocyták Gal-9 expressziójában szignifikáns emelkedést figyeltünk meg az early-onset pre-eclamsziás CD8+ Tc, NK és a NK^{bright} sejtpopulációk esetében összehasonlítva az egészséges kontroll mintákkal, míg Treg sejtek esetében különbséget nem mértünk.

Kísérletünk során szignifikánsan magasabb CD107a expressziós értéket mértünk az early-onset pre-eclampsias TIM-3+ CD8+ Tc és TIM-3+ NK sejteken összehasonlítva az egészséges terhes kontroll azonos sejtpopulációival.

Elemezve a két NK sejt szubpopulációt szintén egy szignifikánsan emelkedett cytotoxikus aktivitást mértünk az early-onset pre-eclampsias nők TIM-3+ NK^{dim} sejtjeinél összehasonlítva az egészséges terhes nők mintáival, NK^{bright} sejtek esetében azonban különbséget nem tapasztaltunk a két vizsgált csoport értékeit illetően.

3. TIM-3/Gal-9 útvonal prognosztikai szerepe mesterséges megtermékenyítés során

Összehasonlítva az IVF előtti és utáni állapotot szignifikáns különbséget csak a sikertelen csoportban mértünk. Ugyanis ezen páciensek perifériás vérében lévő NK sejtek és NK szubpopulációk (NK^{dim}, NK^{bright}) aránya szignifikánsan megemelkedik 1 héttel az IVF procedúra után összehasonlítva az eljárás előtti állapottal. Továbbá 1 héttel a beültetést követően ezek az emelkedett arányban jelen lévő NK sejtek és NK szubpopulációk szignifikánsan nagyobb arányban expresszálják a CD160 és NKG2D receptorokat összehasonlítva az IVF eljárás előtti mintákkal. Megvizsgálva a sikertelen IVF procedúrán átesett nők NK sejtjeinek TIM-3 receptor, illetve CD69 aktivációs marker kifejeződését a két mintavételi időpont között emelkedést tapasztaltunk, ami azonban nem érte el a szignifikáns értéket.

Funkcionális tesztheink során az NK sejtek cytotoxikus aktivitását és perforin termelését vizsgáltuk sikeres és sikertelen IVF-en átesett nőknél összehasonlítva a beavatkozás előtti és utáni állapotot. Perifériás vérből származó mintáinkból a sikertelen IVF kezelésen átesett csoportban az eljárás után szignifikánsan megemelkedett a perforin granulumok száma az NK^{bright} sejteknél. A cytotoxikus aktivitás vizsgálatakor az NK és NK^{dim} sejtek szignifikánsan emelkedett CD107a expressziót mutattak egy héttel az embrió visszaültetését követően azon pácienseknél, akiknél később sikertelenül zárult a procedúra.

Kísérletünk során részletesen elemeztük az NKT sejtek felszínén lévő receptorok expressziós szintjét sikeres és sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nőknél. Sikertelen beültetést követően szignifikánsan megemelkedett az NKT sejtpopuláció aránya összehasonlítva a beültetést megelőző állapothoz képest. Megvizsgálva a sejtek perforin granulumainak expresszióját sikeres IVF beavatkozást követően számuk szignifikánsan lecsökkent az eljárás előtti állapothoz viszonyítva. Hasonló mintázatot mutatott ezen csoportban a CD160 aktivációs receptor expressziója is. A sikertelen eljárásen átesett nőknél azonban a CD160, illetve egy másik általunk vizsgált aktivációs receptor az NKG2D expressziója szignifikánsan megemelkedik a beavatkozás előtti szinthez hasonlítva.

TÉZISEK

1. A TIM-3/Gal-9 útvonal szerepe egészséges terhességben

- 1.1 Egészséges terhes nők perifériás lymphocytáinak felszínén a TIM-3 receptor expressziója dinamikus változást mutat a terhesség előrehaladtával mind az adaptív, mind a természetes immunitás sejtjeinek felszínén.
- 1.2 Egészséges terhesség alatt az NK sejtek és azon belül a NK^{dim} szubpopuláció expresszálja legnagyobb arányban a TIM-3 receptort.
- 1.3 A CD8⁺ Tc sejtek TIM-3 expressziója nem mutat változást a terhesség első kétharmadában, ugyanakkor a TIM-3 receptort hordozó alpopuláció csökkent pro-inflammatórikus citokintermelése révén támogatja az anyai tolerancia mechanizmusokat.
- 1.4 A terhesség harmadik trimeszterében TIM-3⁺ CD8⁺ Tc sejtek cytotoxicitása fokozódik, kedvező immunológiai feltételeket teremtve a szülés megindulásának a közeljövőben.
- 1.5 Minden vizsgált csoportban, beleértve a kontroll csoportot is a TIM-3 receptort hordozó NK sejtek cytotoxicitása alacsonyabbnak mutatkozott, mint a receptort nem expresszáló sejtéké.
- 1.6 A terhesség első kétharmadában az NK sejtek TIM-3 expressziója változatlan, ugyanakkor lecsökken a TIM-3⁺ NK^{dim} sejtek IL-2 termelése, míg a TIM-3⁺ NK^{bright} sejtek IFN- γ termelése nő.
- 1.7 A terhesség 3. trimeszterében az NK sejtek és azon belül is az NK^{dim} sejtek fokozott TIM-3 expressziót mutatnak, cytotoxicitásuk megemelkedik.
- 1.8 Egészséges terhességben már az első trimeszterben jelentősen megnő a szérumban szolubilis Gal-9 koncentrációja, amely a terhesség második és harmadik harmadában további növekedést mutat. Ezzel párhuzamosan, a szolubilis Gal-9-et termelő Th sejt populáció aránya is megemelkedik a periférián a terhesség utolsó harmadában. Az emelkedett szolubilis Gal-9 szinttel magyarázható a TIM-3⁺ CD8⁺ Tc sejtek csökkent pro-inflammatórikus citokintermelése, valamint a TIM-3⁺ NK és NK^{dim} sejtek csökkent cytotoxikus aktivitása.

2. A TIM-3/Gal-9 útvonal lehetséges szerepe patológiás terhességben

- 2.1 Early-onset pre-eclampsziás betegek perifériás vérében a CD8⁺ Tc, NK és NK^{dim} sejtek felszínén csökken a TIM-3 receptor expressziója.
- 2.2 Early-onset pre-eclampsziás betegek perifériás vérében CD8⁺ Tc, NK és NK^{bright} sejtek nagyobb arányban expresszálják Gal-9 molekulát a felszínükön.
- 2.3 A TIM-3 receptort hordozó CD8⁺ Tc és NK^{dim} sejtek cytotoxikus kapacitása fokozódik early-onset pre-eclampsziában, feltételezhetően a csökkent TIM-3 expresszió következtében, amit még a sejtek megnövekedett Gal-9 expressziója sem tud kompenzálni.

3. A TIM-3/Gal-9 útvonal prognosztikai szerepe mesterséges megtermékenyítés során

- 3.1 In vitro fertilizáció során egy héttel a beültetést követően megemelkedett az NK, és azon belül a NK^{dim} és a NK^{bright}, továbbá az NKT sejt populációk aránya a perifériás vérben azokban a nőkben, akiknél az eljárás sikertelen volt.
- 3.2 A sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nők csoportjában magasabb volt a NK^{bright} sejtek perforin expressziója.

- 3.3 Az IVF eljárás sikertelenségével mutat összefüggést a beavatkozás után az NK és NKT sejteken megnövekedett NK aktiváló receptorok, a CD160 és NKG2D expressziója mindkét szubpopulációt érintve.
- 3.4 Sem az NK, sem az NKT sejtek TIM-3 expressziójának mértéke nem mutat eltérést sikeres illetve sikertelen IVF eljáráson átesett nők perifériás vérében.
- 3.5 Az NK és NK^{dim} sejtpopulációk cytotoxicitásának megemelkedése az embriótranszfer utáni héten összefüggést mutat az eljárás sikertelenségével.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Összesített impakt faktor: **12,67**

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: **10,39**

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások száma: **7**

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia poszterek száma: **6**

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

1. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z, Szereday L. Peripheral Blood TIM-3 Positive NK and CD8+ T Cells throughout Pregnancy: TIM-3/Galectin-9 Interaction and Its Possible Role during Pregnancy. PLoS One. 2014 Mar 20;9(3):e92371. (Impakt faktor: **3,534**)

2. Miko E, Meggyes M, Bogar B, Schmitz N, Barakonyi A, Varnagy A, Farkas B, Tamas P, Bodis J, Szekeres-Bartho J, Illes Z, Szereday L. Involvement of Galectin-9/TIM-3 Pathway in the Systemic Inflammatory Response in Early-Onset Preeclampsia. PLoS One. 2013 Aug 2;8(8):e71811. (Impakt faktor: **3,534**)

3. Szereday L, Miko E, **Meggyes M**, Barakonyi A, Farkas B, Bodis J, Lynch L, O'Farrelly C and Szekeres-Bartho J. Commitment of decidual haematopoietic stem cells in first trimester pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2012 Jan;67(1):9-16. (Impakt faktor: **3,317**)

Egyéb publikációk

1. Miko E, Manfai Z, **Meggyes M**, Barakonyi A, Wilhelm F, Varnagy A, Bodis J, Illes Z, Szekeres-Bartho J and Szereday L. The possible role of NK and NKT-like cells in implantation failure after in vitro fertilization. Reprod Biomed Online 2010 Dec;21(6):750-6. (Impakt faktor: **2,285**)

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások

1. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Lajko A., Szekeres-Bartho J., Szereday L. TIM-3/Galectin-9 in normal pregnancy and in early-onset preeclampsia. A Magyar Immunológiai Társaság XLIII. Vándorgyűlése, 2014. Október 15-17. Velence, Immunológiai Szemle, 2014, 3: 36

2. Meggyes M., Miko E, Palkovics T., Bogar B., Barakonyi A., Szekeres-Bartho J., Farkas B., Tamas P., Varnagy A., Bodis J., Illes Zs., Szereday L. Investigating the Galectin-9/TIM-3 Pathway in Pre-Eclampsia. A Magyar Reprodukív Immunológiai Társaság II. Konferenciája, 2012. December 12. Pécs

3. **Meggyes M.**, Palkovics T., Mikó É., Bogar B., Barakonyi A., Szekeres-Barthó J., Illés Zs., Farkas B., Tamas P., Varnagy A., Szereday L. Galectin-9/TIM-3 útvonal szerepének vizsgálata preeclampsziában. A Magyar Immunológiai Társaság XLI. Vándorgyűlése, 2012. Október 17-19. Debrecen, Immunológiai Szemle, 2012, 3: 24
4. **Meggyes M.**, Palkovics T., Barakonyi A., Mikó É., Illés Zs., Szekeres-Barthó J., Szereday L. A TIM-3 és galectin-9 molekulák expressziójának vizsgálata terhes BALB-C egérmodellben. A Magyar Immunológiai Társaság XL. Vándorgyűlése, 2011. Október 12-15. Kecskemét, Immunológiai Szemle, 2011, 3: 23
5. **Meggyes M.**, Barakonyi A., Mikó É., Mánfai Z., Wilhelm F., Várnagy Á., Bódis J., Illés Zs., Szekeres-Barthó J., Szereday L. Természetes ölüsejtek (NK) összehasonlító vizsgálata sikeres vagy sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nőkben. A Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2010. November 3-5. Szeged, Immunológiai Szemle, 2010, 4: 18
6. **Meggyes M.** Természetes ölüsejtek (NK) összehasonlító vizsgálata sikeres vagy sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nőkben, 2009. február 19-21. PTE-ÁOK TDK konferencia, Pécs
7. Szereday L., **Meggyes M.**, Bogar B., Miko E., Barakonyi A., Varnagy A., Farkas B., Tamas P., Bodis J., Szekeres-Bartho J., Illes Zs. Involvement of galectin-9/TIM-3 pathway in normal pregnancy and in early onset preeclampsia. International Congress of the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) and the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR) 29 March - 1 April 2014. Budapest

Egyéb előadások

1. **Meggyes M.** Mifepristone kezelés hatásának vizsgálata a TIM-3/Galectin-9 mediálta immunológiai folyamatokra terhes egér modellben. Astellas I. Országos Ifjú Kutató Szimpózium, 2014 Szeptember 24., Pécs
2. **Meggyes M.**, Palkovics T., Bogar B., Barakonyi A., Mikó É., Illés Zs., Szekeres-Barthó J., Szereday L. Az anya immunológiai tolerancia mechanizmusai a terhesség során: TIM-3/galectin-9 molekulák szerepe az immuntolerancia kialakításában egérmodellben. A Magyar Reprodukív Immunológiai Társaság I. Konferenciája, 2012. Január.28., Budapest
3. **Meggyes M.** A TIM-3 és galectin-9 molekulák expressziójának vizsgálata terhes BALB-C egérmodellben. 2011. február 17-18. PTE-ÁOK TDK konferencia, III. helyezés, Pécs
4. Mikó É., Szereday L., Bogár B., **Meggyes M.**, Barakonyi A., Várnagy Á., Bódis J., Szekeres-Barthó J., Mezősi E. Pajzsmirigyellenes autoanitest pozitív infertilis/vetelő nők perifériás lymphocytáinak vizsgálata. A Magyar Reprodukív Immunológiai Társaság I. Konferenciája, 2012. Január 28. Budapest
5. Mikó É., Szereday L., **Meggyes M.**, Barakonyi A., Farkas B., Bódis J., Szekeres-Barthó J. Deciduális haematopoieticus őssejtek jellemzése a terhesség első trimeszterében. A Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2010. November 3-5. Szeged, Immunológiai Szemle, 2010, 4: 17
6. Mikó É., Szereday L., Bogár B., **Meggyes M.**, Barakonyi A., Várnagy Á., Bódis J., Szekeres-Barthó J., Mezősi E. Pajzsmirigyellenes autoantitestek pozitív infertilis/vetelő nők perifériás lymphocytáinak vizsgálata. A magyar endokrinológiai és anyagcsere társaság XXIV. Kongresszusa, 2012. 05. 17-19, Szolnok

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia poszterek

- 1. Meggyes M.,** Mikó É., Polgár B., Bogár B., Farkas B., Illés Zs., Szekeres-Bartho J., Szereday L. Cytokine production by peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells during pregnancy. International Congress of the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) and the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR) 29 March - 1 April 2014. Budapest, Hungary
- 2. Meggyes M.,** Miko E., Polgar B., Farkas B., Illes Zs., Szereday L. Investigating the peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells during pregnancy. A Magyar Immunológiai Társaság XLII. Vándorgyűlése, 2013. Október 16-18. Pécs, Immunológia Szemle, 2013, 3:36
- 3. Meggyes M.,** Polgar B., Miko E., Farkas B., Szereday L. TIM-3/Galectin-9 interaction during pregnancy. 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences 11-12 September 2013 Pécs.
- 4. Meggyes M.,** Miko E., Farkas B., Illes Zs., Szereday L. TIM-3/Galectin-9 interaction in pregnancy: The significance of peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells during pregnancy. Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies 31. August - 3. September 2013 in Mátraháza.
- 5. Meggyes M.,** Bogar B., Miko E., Barakonyi A., Varnagy A., Farkas B., Tamas P., Bodis J., Szekeres-Bartho J., Illes Zs., Szereday L. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ cells throughout pregnancy. 14th International Symposium for Immunology of Reproduction, 28 May – 1 June 2013, Boston, Massachusetts, USA.
- 6. Meggyes M.,** Miko E., Barakonyi A., Bogar B., Szekeres-Bartho J., Varnagy A., Farkas B., Bodis J., Illes Zs., Szereday L. The possible role of Galectin-9/TIM-3 pathway in the pathogenesis of preeclampsia. International Congress of the American Society for Reproductive Immunology (ASRI) and the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) 31 May - 2 June 2012. Hamburg, Germany

Egyéb poszterek

- 1. Meggyes M.,** Bogar B., Palkovics T., Miko E., Barakonyi A., Szekeres-Bartho J., Illes Zs., Szereday L. The significance of Tim-3 and Galectin-9 expression during pregnancy in mouse model. International Congress of the American Society for Reproductive Immunology (ASRI) and the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) 31 May - 2 June 2012. Hamburg, Germany
- 2. Bogar B.,** Mezosi E, Szereday L., **Meggyes M.,** Barakonyi A, Szekeres-Bartho J., Miko E.. Examination of peripheral blood lymphocytes in thyroid autoantibody-positive women with infertility or pregnancy loss. . International Congress of the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) and the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR) 29 March - 1 April 2014. Budapest, Hungary
- 3. Bogár B.,** Mikó É., Szereday L., **Meggyes M.,** Barakonyi A., Várnagy Á., Bódis J., Szekeres-Barthó J., Mezősi E. Pajzsmirigyellenes autoantitest pozitív, infertilis/vetelő nők perifériás lymphocytáinak vizsgálata. A Magyar Immunológiai Társaság XLI. Vándorgyűlése, 2012. Október 17-19. Debrecen
- 4. Engels G.L., Meggyes M.,** Bogar B., Szereday L., Miko E., Farkas B., Varnagy A., Barakonyi A., Characterization of different CD160+innate lymphocyte populations during the inflammatory stage of preeclampsia. International Congress of the American Society for Reproductive Immunology (ASRI) and the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) 31 May - 2 June 2012. Hamburg, Germany

5. Mandel I., Csuta T., Lukács D., **Meggyes M.**, Nagy A., Illés Zs., Szereday L. The presence of MAIT cells in human peridontal tissues 7th Conference of the European Federation of Peridontology, June 6-9, 2012. Vienna, Austria

6. Szereday L., **Meggyes M.**, Lammel K., Barakonyi A., Miko E. The mechanisms of immunological tolerance during pregnancy: the possible role of regulatory T cells in the pathogenesis of pre-eclampsia. The Second International Conference on Regulatory T cells and Th17 Cells and Clinical Application in Human Diseases. July 17-20, 2010. Shanghai, China

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek Dr. Szereday Lászlónak szeretnék köszönetet mondani, aki a kezdetektől fogva egyengeti kutatói pályámat, és akitől rengeteg segítséget és támogatást kaptam az intézetben töltött éveim alatt.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júliának és az általa vezetett Terhességi Immunológiai Kutatócsoportnak, valamint a PTE-KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet minden dolgozójának, akik segítettek munkámat. Külön szeretném megköszönni Molnár Évának és Kiss Ágnesnek a kezdeti időszakban nyújtott segítségét mind az alap technikák elsajátítását, mind a csoportba való beilleszkedést illetően. Hálás köszönet Dr. Mikó Évának és Dr. Polgár Beátának, akik hasznos tanácsaikkal segítettek kutató munkámban és dolgozatom megírásában.

Végül szeretném kifejezni legszívélyesebb köszönetemet családomnak és kedvesemnek, akik mindenben támogattak és bíztattak.