

**TIM-3/GAL-9 ÉS PD-1/PD-L1 ÚTVONALAK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA  
EGÉSZSÉGES, ABORTUSZ-INDUKÁLT ÉS PACAP-HIÁNYOS VEMHES  
EGEREK BEN**

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**



**LAJKÓ ADRIENN**

**Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet**

**Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Vezetője: Prof. Dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár  
Programvezető: Prof. Dr. Szekeres Júlia, egyetemi tanár  
Témavezető: Dr. Szereday László, egyetemi docens**

**OGYDHT PÉCS**

**2020**

## Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés .....	7
I.1.	A terhesség immunológiai paradoxona .....	7
I.2.	A terhesség gyulladásos paradoxona.....	7
I.3.	A terhesség komplex, többlépcsős folyamata .....	9
I.4.	Az anyai immunrendszer.....	11
I.4.1.	Veleszületett immunitás .....	11
I.4.2.	Adaptív immunitás .....	12
I.5.	Humán és egér placenta szövettani összehasonlítása.....	13
I.6.	Terhességmegszakítás, mifepriszton hatása.....	16
I.7.	Immun checkpoint molekulák és ligandjaik.....	18
I.8.	T-sejt immunglobulin és mucin domain 3 (TIM-3).....	20
I.8.1.	TIM-3 molekula jellemzői.....	20
I.8.2.	TIM-3 molekula ligandjai .....	20
I.8.3.	TIM-3 és Gal-9 molekulák kapcsolódása.....	22
I.8.4.	A TIM-3 és Gal-9 útvonal szerepe az egér vemhesség során.....	23
I.9.	Programozott sejthalál receptor 1 (PD-1).....	24
I.9.1.	A PD-1 molekula jellemzői .....	24
I.9.2.	PD-1 molekula ligandjai .....	25
I.9.3.	PD-1 molekula és ligandjainak szerepe egér vemhesség során.....	26
I.10.	Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) .....	27
I.10.1.	PACAP molekula általános bemutatása .....	27
I.10.2.	PACAP molekula ligandjai és működésük .....	28
I.10.3.	PACAP-hiányos egerek .....	29
I.10.4.	PACAP szerepe várandósság során .....	29
I.11.	Transzlációs kutatások .....	30
II.	Célkitűzések .....	32
III.	Anyagok és módszerek .....	33
III.1.	Felhasznált anyagok.....	33
III.1.1.	Mononukleáris sejtek izolálása során felhasznált anyagok .....	33
III.1.2.	Kezelés során alkalmazott hatóanyag.....	33
III.1.3.	Mononukleáris sejtek jelölésére használt fluorokrómmal konjugált antitestek .....	34
III.1.4.	Mononukleáris sejtek jelöléséhez használt speciális reagensek .....	34

III.1.5. Immunhisztokémiai festések során használt anyagok.....	35
III.2. Felhasznált műszerek.....	36
III.2.1. Áramlási citométer .....	36
III.2.2. Panoramic Midi Scanner .....	38
III.3. Módszerek .....	39
III.3.1. Állatmodellek.....	39
III.3.1.1 Etikai engedély.....	40
III.3.2. Egerek pároztatása .....	40
III.3.3. Mifepriszton (RU-486) kezelés.....	40
III.3.4. A lép és a decidua izolálása.....	41
III.3.5. Mononukleáris sejtek izolálása decíduális szövetből .....	41
III.3.6. Mononukleáris sejtek izolálása lépből.....	41
III.3.7. Fluorokrómmal konjugált antitest jelölés.....	42
III.3.8. Galektin-9 immunhisztokémiai detektálása .....	43
III.3.9. Áramlási citometriás eredmények értékelése .....	44
III.3.10. Statisztikai analízis .....	45
IV. Eredmények.....	46
IV.1. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben .....	46
IV.1.1. Gal-9 immunhisztokémiai kimutatása egér placentában .....	46
IV.1.2. Treg-sejtek Gal-9 expressziója vemhes egér lépében és decíduájában .....	47
IV.1.3. Gal-9 pozitív Th-sejtek aránya vemhes egér lépében és decíduájában .....	47
IV.1.4. Lép és decidua mononukleáris sejtjeinek fenotípusos analízise egér vemhesség 14 és feledik napján .....	48
IV.1.5. Vemhes egér lép és decidua mononukleáris sejtjeinek TIM-3 és PD-1 expressziója .....	49
IV.1.6. Decíduális és lép immunsejtek citotoxikus aktivitásának vizsgálata .....	51
IV.2. Mifepriszton hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben.....	53
V.2.1. Gal-9 immunhisztokémiai kimutatása mifeprisztonnal kezelt és kezeletlen vemhes egerek placentáiban .....	53
V.2.2. Mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egér perifériás és decíduális mononukleáris sejtjeinek fenotípusos analízise .....	54
IV.2.3. Decíduális és perifériás mononukleáris sejtek Gal-9 expressziójának vizsgálata mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerekben.....	55
IV.2.4. Mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek decíduális és perifériás Gal-9+ Th-sejtjeinek megoszlása .....	57

IV.2.5. Mifeprisztin kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek TIM-3 expressziója .....	58
IV.2.6. Mifeprisztin kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek deciduális és perifériás NK-, NKT-, $\gamma/\delta$ T-sejtjeinek CD107a expressziója.....	59
IV.3. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata PACAP-hiányos és vad típusú (CD1) egerekben .....	62
IV.3.1. Gal-9 immunhisztokémiai kimutatása PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek placentáiban .....	62
IV.3.2. PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek deciduális és perifériás sejtjeinek immunfenotípusos analízise.....	63
IV.3.3. PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulási aránya .....	64
IV.3.4. PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek TIM-3 és PD-1 expressziója.....	65
IV.3.5. PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek Gal-9 expressziója.....	67
IV.3.6. PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek perifériás és deciduális CD8+ T-, $\gamma/\delta$ T-, NK- és NKT-sejtjeinek citotoxikus aktivitása .....	69
V. Diskusszió .....	70
V.1. TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben .....	70
V.2. Mifeprisztin hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben.	74
V.3. TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos vemhes egerekben.....	79
VI. Új eredmények .....	83
VI.1. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben .....	83
VI.2. Mifeprisztin hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben	84
VI.3. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos egerekben .....	85
VII. Köszönetnyilvánítás .....	87
VIII. Hivatkozások.....	88
IX. Publikációk.....	101

## Rövidítések jegyzéke

ADC	Analóg-digitális konverter
AIF	Apoptózis indukáló faktor
APC	Allo-fikocianin
Bad	BCL-2-asszociált halál promoter
Bat3	HLA-B asszociált transzkript fehérje 3
BATF	Leucin transzkripciós faktor
BSA	Borjú szérum albumin
BV	Brilliant violet
cAMP	Ciklikus adenzin-monofoszfát
Ceacam-1	Karcinoembrionális antigén-rokon sejt adhéziós molekula 1
CRE	cAMP-reszponzív elem
CREB	CRE-kötő protein
CTLA-4	Citotoxikus T-limfocita asszociált protein 4
DAB	Diaminobenzidin
ERK	Extracelluláris szignálok által regulált kináz
FCS	Magzati borjú szérum
FITC	Fluorescein izo-tiocianát
FoxP3	Forkhead box P3 molekula
FSC	Előre irányuló fényszórás
Gal-9	Galektin-9
GITR	Glükokortikoid-indukált TNFR családhoz kapcsolódó gén
GM-CSF	Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor
HMGB1	Magas mobilitású protein B1
ICOS	Indukálható T-sejt kostimulátor
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IVF	<i>In vitro</i> fertilizáció
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LPS	Lipopoliszacharid

MAPK	Mitogén-aktivált protein-kináz
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex
NK-sejt	Természetes öló sejt
NKT-sejt	Természetes öló T-sejt
p38MAPK	P38 mitogén-aktivált protein kináz
PAC1	1. típusú PACAP receptor
PACAP	Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PBS	Foszfát-pufferelt sóoldat
PD-1	Programozott sejthalál receptor 1
PD-L1	Programozott sejthalál ligand 1
PE	Fikoeritrin
PE-Cy7	Fikoeritrin cianin 7
PerCp	Peridin klorofill protein
PFA	Paraformaldehid
PGE2	Prostaglandin E2
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PIBF	Progeszteron indukálta blokkoló faktor
PMA	Forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMT	Fotoelektron sokszorozó
PtdSer	Foszfatidil-szerin
RU486	Mifepriszton (Roussel Uclaf 486)
SSC	Oldalra irányuló fényezés
TBS	Tris-pufferelt sóoldat
TBST	Tris-pufferelt sóoldat 0,1% Tween20 detergensel
Tc	Citotoxikus T-sejt
TGF-β	Transzformáló növekedési faktor béta
Th	T segítő limfocita
TIM-3	T-sejt Immunglobulin domain és Mucin domain-3
TLR	Toll-like receptor
TNFR	Tumor nekrozis faktor receptor

TNF- $\alpha$	Tumor nekrozis faktor alfa
Treg-sejt	Regulatorikus T-sejt
TRS	Target retrieval solution
Tyr	Tirozin
VEGF	Vaszkuláris endotél növekedési faktor
VIP	Vazoaktív intesztinális polipeptid
VPAC1	VIP és PACAP receptor1
VPAC2	VIP és PACAP receptor2
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

## I. Bevezetés

### I.1. A terhesség immunológiai paradoxona

A reproduktív immunológia az orvostudomány azon területe, mely az immunrendszer és a reprodukciós rendszer közötti kapcsolattal (mint például a magzattal szembeni anyai immuntolerancia) foglalkozik. A reproduktív immunológia a tudományos és gyógyító-orvosi diszciplínák határmezsgyéjén található (mukózális immunitás, perinatológia, reproduktív endokrinológia, sejtbiológia, infektológia és patológia).

A terhesség immunológiai szempontból tulajdonképpen egy paradoxonnak tekinthető, mivel az anya immunrendszere a fele részben idegen eredetű apai antigéneket is hordozó magzat ellen nem lép fel (a magzat immunológiailag szemi-allogénnek tekinthető), hanem egy igen összetett toleranciamechanizmusok révén elfogadja azt, elősegítve így az egészséges magzat zavartalan fejlődését, majd világra jövetelét. Abban az esetben, ha a tolerancia nem megfelelően alakul ki, az számos terhességi komplikációhoz vezethet, legrosszabb esetben vetélés is létrejöhet.<sup>1</sup> Immunológiai szempontból a terhesség az egyik legérdekesebb élettani folyamatok egyike: várandósság során az anyai immunrendszer működése módosul, majd a szülést követően teljesen visszaáll a megszokott rendjébe. A terhesség immunológiai folyamatainak teljes mértékű feltérképezése hozzájárulhat más immunológiai eredetű komplikációk gyors és hatékony felismeréséhez és kezeléséhez.

### I.2. A terhesség gyulladáisos paradoxona

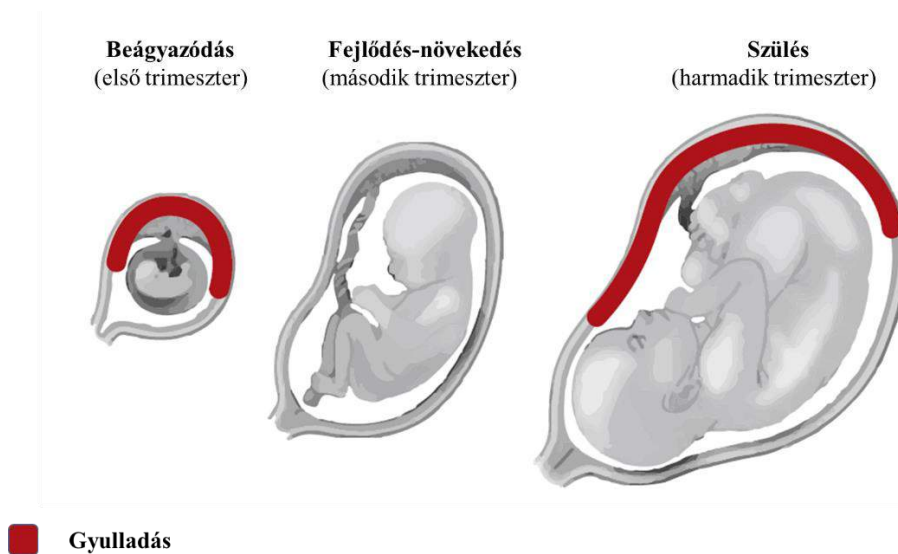
Sir Peter Brian Medawar angol biológus, immunológus 1953-as publikációjában<sup>2</sup> írta le először az azóta már széles körben elfogadott „immunológiai paradoxon”-t. Medawar szerint három fő mechanizmusnak köszönhető a magzat életben maradása: (1) Az embrió anatómiailag az anyától elválasztva fejlődik, immunrendszerük között nincs kapcsolat. (2) A magzat antigenikusan éretlen, szövetei nem fejezik ki az apai antigéneket, így az immunrendszer nem ismeri fel. (3) Az anya a terhesség alatt ideiglenesen



immunhiányos állapotba kerül, így nem képes felismerni az apai antigéneket.<sup>2</sup> Medawar eredményei és feltevései igen sok kérdésre próbáltak választ adni. Azóta számos adat rámutatott, hogy a terhesség immunológiai paradoxon ezen értelmezése és magyarázata kissé félrevezette a kutatást és a klinikai gyakorlatot.

Ma inkább „gyulladásos paradoxon”-ról beszélhetünk.<sup>3</sup> Az anyai immuntolerancia kialakításában számos mechanizmus vesz részt, melyek együttes jelenléte és összehangolt működése biztosítja a magzat zavartalan fejlődését. Egyik ilyen tényező a magzatot az anyától elválasztó, illetve összekötő szövetek speciális tulajdonságai, melyek részletes magyarázatot adnak az anyai immunrendszerrel való különleges kapcsolatra. A placentában az anyai részt a terhes méh nyálkahártyája, a decidua alkotja. Az embrionális eredetű trophoblaszt sejtek képezik az anya és a magzati felszínek közötti érintkezési felületet. A spongiotrophoblaszton lévő magzati eredetű sejtek folyamatos kapcsolatban állnak a terhesség alatt az anyai vérrel illetve szövetekkel, így itt van elsősorban lehetőség a magzati antigének anyai limfociták általi felismerésére, illetve a trophoblaszt lehet az anyai immunválaszok támadásának célpontja.

Hogyan lehetséges, hogy az implantáció folyamata során gyulladásos folyamatok indulnak el, miközben a gyulladás jelenti az egyik legnagyobb veszélyt a terhességre? Sőt, mindezek ellenére az egyre növekvő magzattal szemben az azonnali kilöködés helyett tolerancia alakul ki. A reproduktív immunológiával fogalkozók által régóta ismert, hogy bonyolult kapcsolat van a gyulladás és a várandósság között. A humán terhesség lefolyása nagyjából három fő fázisra osztható: beágyazódás, fejlődés-növekedés és szülés (**1. ábra**). A gyulladás jelei megfigyelhetők a beágyazódás során, de normális esetben hiányoznak a terhesség középső szakaszában, majd a szülést megelőzően és a szülés alatt ismét visszatérnek.<sup>4,5</sup>



**1. ábra:** Gyulladás a várandósság három fázisa alatt<sup>3</sup>

A kérdéssel foglalkozók előszeretettel tesznek különbséget a várandósság alatti „jó” és „rossz” gyulladás között, mely kifejezéseket először Gil Mor amerikai orvos kezdte el használni.<sup>3</sup>

Az orvostudományi ismereteink napjainkra tovább bővültek, s a terhesség immunológiai és gyulladásos változásairól számos esetben sikerült pontosabb jellemzést írni.

### I.3. A terhesség komplex, többlépcsős folyamata

A terhesség egy rendkívül összetett, soklépcsős folyamat. A megtermékenyítés után a blasztociszta a méh falához tapad és beágyazódik, melynek következtében az anya immunrendszere felismeri a magzatot. A magzat, valamint a placenta fejlődése, növekedése és érése egy stabil, fetomaternalis határfelületet hoz létre. Az implantációs folyamat magában foglalja az appozíciót (a blasztociszta az embriócsomóval előrefelé fordulva helyezkedik el), a megtapadást és a blasztociszta méhbe történő behatolását.<sup>6</sup> A méhüreg hámszövetében strukturális és molekuláris változások mennek végbe, amelyek lehetővé teszik mind az implantációt, mind a placentációt.<sup>7</sup> Az epitheliális változásokat a „decidualizáció” követi, mely az endometrium stróma átalakulását jelenti. Ezen felül módosul az endometrium érrendszere is módosul.<sup>8</sup> A terhesség további fennmaradásához

elengedhetetlen, hogy a méh „befogadja” a magzatot, azaz felismerje a terhességet.<sup>9</sup> A következményes anyai immuntolerancia kialakulása nélkülözhetetlen része a terhesség sikeres kihordásának és az egészséges magzat világra jöttének. Ez a folyamat vezet a magzati-anyai egység létrejöttéhez.

Amikor ezek a létfontosságú változások nem jönnek létre vagy nem teljesek, a blasztociszta nem tud beágyazódni, s ez koraterhességi sikertelenséghez vezet.<sup>10</sup> Humán vonatkozásban a sikertelen terhességek 75%-a a nem megfelelő vagy eredménytelen implantáció következménye. Ez az implantációs probléma az *in vitro* fertilizáció (IVF) kezelések eredményességét is nagyban csökkenti. Az elmúlt évtized kutatásai sem tudtak klinikailag hatékony kezeléseket létrehozni, annak érdekében, hogy a méhreceptivitást növeljék.<sup>11</sup>

Az implantáció paradox módon gyulladós mechanizmuson alapszik.<sup>5</sup> A „beágyazódási ablak” idején a deciduálisan átalakult méh befogadó állapotba kerülve több gyulladós markert, így prosztaglandin E2-t (PGE2) és számos gyulladós Interleukint, köztük IL-1, IL-6, IL-8, Tumor nekrozis faktort (TNF-t), IL-6-ot és Interferon-gammát (IFN- $\gamma$ -t) termel.<sup>12</sup> Ez a klasszikus gyulladáshoz hasonló folyamat alapvető fontosságú a sikeres beágyazódáshoz, mely során szöveti változások hozzák létre a fetomaternalis határfelületet.<sup>9,12</sup> A beágyazódás azonban két szempontból eltér a klasszikus gyulladástól: egyrészt nem történik meg a neutrofilek beáramlása, másrészt a Prosztaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) szignálok csökkenésével jár.<sup>13-15</sup> Az előbbi akadályozza meg az implantáció alatt a magzat károsítását, az utóbbi pedig a luteolízist és a méhösszehúzóásokat.<sup>3,16</sup>

A beágyazódást követően olyan lokális immunválasz jön létre az anyai oldalon, mely megakadályozza a magzat kilökődését, annak ellenére, hogy a magzat apai géneket is hordoz, mely gyulladáskeltő hatása révén csökkenti az endometrium szövetintegritását.<sup>9</sup> A terhesség további fenntartásához gyulladásmentes állapot szükséges, és e periódus zavartalansága és optimális időtartama teszi lehetővé az anya számára, hogy magzata zavartalanul fejlődjön. A terhesség gyulladásmentes állapotának fenntartásában a főként a placenta által termelt nagy mennyiségű progeszteronnak döntő szerepe van.<sup>17,18</sup>

A terhesség előrehaladtával a keringő progeszteron mennyiségének csökkenése, majd hiánya miatt elégtelenné válnak a progeszteron hatások, ami az IL-8 és egyéb gyulladós citokinek termelését és a terminusra jellemző gyulladást már nem képes

visszaszorítani. Ez a méhnyak éréséhez, a fájások megindulásához és szüléshez vezet. Ez tulajdonképpen a „jó” gyulladás.<sup>3</sup> Ezzel ellentétben, különösen a magzatburok gyulladásáról ismert, hogy a terhesség fennmaradására a legnagyobb veszélyt jelentheti. Ezen felvetések késztették arra a kutatókat, hogy különbséget tegyenek a „jó” és a „rossz gyulladás” között.<sup>19</sup>

#### I.4. Az anyai immunrendszer

A várandósság immunológiai hátterének megértése és feltérképezése klinikai szempontból igen fontos. A fertilitást az immunrendszer nagyban képes befolyásolni mind nők, mind férfiak esetében.<sup>20</sup> Az immunrendszer diszregulációja akár az ismételt vetélések okozója is lehet.<sup>21</sup> A nők termékenységet és a terhesség kimenetelét számos immunológiai eredetű betegség képes csökkenteni, ilyenek az autoimmun betegségek, az immunhiányos betegségek és például az asztma.<sup>22</sup> A terhes anya immunrendszere és a fertőző ágensek közötti kölcsönhatás is befolyásolhatja a fertilitást.<sup>23</sup>

##### I.4.1. Veszületett immunitás

A veszületett immunitást első védelmi vonalnak is szokás nevezni, mely gyors és meglehetősen aspecifikus. A veszületett immunitás képes észlelni az idegen kórokozókat és azonnali reakciót beindítani ellenük. A veszületett immunválasz az antigénnel való ismétlődő találkozás ellenére azonos szinten marad, mivel immunmemóriával nem rendelkezik (ellentétben a adaptív immunitással). A várandósságra a veszületett immunrendszer szisztémás aktivitása jellemző. A lokális veszületett immunitás a terhesség során folyamatosan módosul, a korai szakaszban az implantációt segíti, majd a további időszakokban megváltozott funkcióval rendelkezik.

A doktori értekezés során a veleszületett immunrendszer következő sejtípusait vizsgáltuk:

**Természetes ölü sejtek (NK-sejtek):** Az NK-sejtek alkotják a T- és a B-limfociták mellett a harmadik fő limfoid sejtpopulációt. A veleszületett immunrendszer elemeiként azonnal reagálnak aktivációs stimulusra. Az NK-sejtek képesek a célsejt felismerésére és elpusztítására antigén prezentáció nélkül. Az NK-sejtek effektor működését a Fő hisztokompatibilitási komplex I-specifikus (MHC I) gátló receptorok, valamint az aktiváló receptorok egyensúlya határozza meg.<sup>24</sup> Az NK-sejtek a citokinek széles skáláját termelik és részt vesznek az immunválasz szabályozásában.

**$\gamma/\delta$  T-sejtek:** Többek között ezen sejtek képezik a mukózális felszín első védelmi vonalát, s képesek befolyásolni a természetes ölü sejtek aktivitását.<sup>25,26</sup> Jelen vannak a placentában és a reprodukciós traktus egyéb részeiben, ahol részt vesznek a helyi immunitás szabályozásában.<sup>27</sup>

**Természetes ölü T sejt (NKT-sejtek):** NK- és T-sejt tulajdonságokkal egyaránt rendelkeznek. A természetes ölü T-sejtek specifikitása limitáltabb, de hasonló effektor funkciókat látnak el, mint a klasszikus T-sejtek. Képesek IL-4 citokin termelésére.<sup>28</sup> Szomatikusan átrendeződött  $\alpha/\beta$  antigénreceptort hordoznak, de nem rendelkeznek diverzitással, hasonlóan a  $\gamma/\delta$  T-sejtekhez. Mindkét sejtípusnak egyaránt szerepet tulajdonítanak a veleszületett és az adaptív immunitásban. Egerekben kimutatták, hogy a reprodukciós traktusban az aktivált NKT-sejtek befolyásolhatják a vemhesség korai szakaszát és szerepet játszhatnak a vetélésben is.<sup>29</sup>

#### 1.4.2. Adaptív immunitás

A veleszületett immunrendszer aktiválódását követően az adaptív immunitás humorális és celluláris mechanizmusai is aktiválódnak. A veleszületett és az adaptív immunitás nem egymástól függetlenül működik, összefonódva és egymásra épülve biztosítják a hatékony védelmet. Önmagában teljes és megfelelő immunvédelmet egyik sem képes biztosítani. Az adaptív immunválaszt a T- és B-limfociták közvetítik, melyek az antigén felismerését követően aktiválódnak. Az adaptív immunitás fontos tulajdonsága

az immunológiai memória, mely során a szervezet antigénnel való ismételt találkozása esetén a válaszreakció gyorsabb és hatékonyabb.

A doktori értekezés során az adaptív immunrendszer következő sejtípusait vizsgáltuk:

A T segítő limfocita (Th-sejtek) sejtek, vagy más néven CD4+ T-sejtek citokin termeléstől és immunválasztól függően különböző sejtípussá tudnak differenciálódni: Th1-, Th2-, Regulatorikus T-sejtek (Treg- sejtek) és Th17-sejtek.

**Th1-sejtek:** A naiv T-sejtek IL-12 és IFN- $\gamma$  hatására Th1-sejtekké differenciálódnak. A Th1-sejtek képesek IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelésére.

**Th2-sejtek:** A naiv T-sejtek IL-4 citokin hatására Th2-sejtekké differenciálódnak. A Th2-sejtek IL-4, IL-5, IL-6 és IL-13 termelésére képesek. A Th1- és Th2-sejtek a terhesség során a tolerancia mechanizmusokat citokinek termelésével szabályozzák, s megfelelő arányuk a várandósság során nélkülözhetetlen.

**Treg-sejtek:** A naiv T-sejtek Transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ) hatására Treg-sejtekké alakulnak. A Treg-sejtek képesek TGF- $\beta$  és IL-10 termelésére. Egyik fő feladatuk a tolerancia kialakítása és fenntartása az egészséges terhesség alatt.

**Th17-sejtek:** A naiv T-sejtek TGF- $\beta$  és IL-6 hatására Th17-sejtekké alakulnak. A Th17-sejtek IL-17, IL-21 és IL-22 termelésére képesek. Az autoimmunitásban és a vetélés folyamatában is szerepet játszhatnak. A Th17 differenciálódását az IFN- $\gamma$  és az IL-4 képes gátolni.<sup>30</sup>

## I.5. Humán és egér placenta szövettani összehasonlítása

Számos humán vonatkozású tudományos alap kutatás kezdeti szakaszában egér modelleket alkalmaznak. Fontos szem előtt tartanunk az egér és ember közti reprodukciós különbségeket, hogy kísérleteink kiértékelése során a megfelelő következtetéseket vonhassuk le. Magas prioritással bír az anyai-magzati határon lévő immunsejtek és immunregulatorikus mechanizmusok viselkedésének összehasonlítása is.

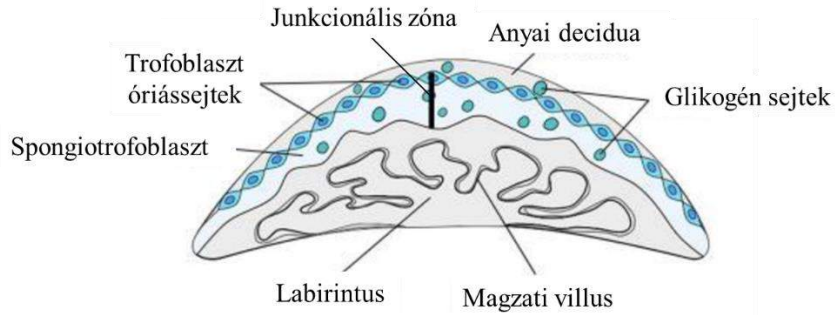
Az implantáció összehasonlítása humán terhesség és egér vemhesség között:

A humán terhesség során általában egy megtermékenyített petesejt ágyazódik be, míg egereknél ez a szám igen magas, 10-15 is lehet. Az implantáció mindkét esetben a corpus luteum által termelt progeszteron és ösztrogén által szabályozódik. Egerekben a mezometrium a méh egyik oldala, mely erekkel erősen behálózott. A blasztociszták luminális epitélhez való kapcsolódása a 4-4 és feledik napon következik be, ez egybeesik a megnövekedett érrendszeri permeabilitással. A luminális epitélium apoptózison esik át, lehetővé téve a blasztociszták kötődését a méhfalhoz. A trofoblaszt sejtek elfedik a strómát, ezzel indukálják a sejtek proliferációját, amely következtében kifejlődik a decidua. A decidua kezdetben a magzatot és a placentát borítja, később pedig a placentáció után egy vékony, külső fedőréteggé alakul.

Annak ellenére, hogy az emberi terhesség 280 napig tart az egér vemhesség 20 napjával szemben, az implantáció rögtön a folyamat elején, közvetlenül az ovuláció után, az 5-9. napon végbemegy. A terhesség ezt követően az egér vemhességgel megegyezően, az előbb leírtak mentén zajlik tovább.<sup>31</sup>

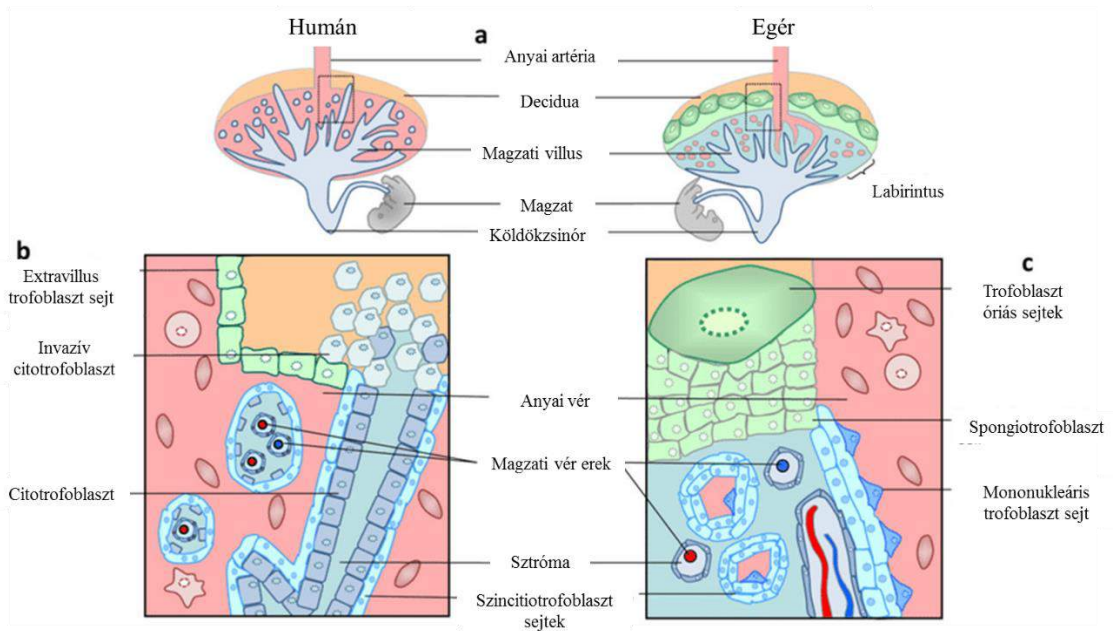
Placentáció összehasonlítása humán terhesség és egér vemhesség között:

A terhesség alatt a placenta létfontosságú szerv - élettani, endokrin és immunológiai funkciókkal rendelkezik.<sup>32</sup> A placenta hasonló felépítésű emberben és egérben, de különbséget fedezhetünk fel az anyai és magzati immunsejtek összetételében.<sup>33</sup> A trofoblaszt rétegei a blasztocisztából fejlődnek ki. Az egerek placentája három rétegből áll: a labirintus réteg, a junkcionális zóna (spongiotrofoblaszt sejtekkel, a trofoblaszt óriássejtekkel és a glikogén sejtekkel) és az anyai decidua<sup>34</sup> (**2. ábra**). Az anyai vér a spongiotrofoblaszton keresztül jut az érrendszerbe, amely implantáció után átalakul. Az anyai vér bejut a labirintusba, ahol a magzati villózus réteggel érintkezik, biztosítva az anyai és a magzati vérrendszer közötti tápanyageserét.<sup>33</sup> A méhlepény magzati érrendszerét a köldökzsinór köti össze a fejlődő magzattal (**3. ábra**).



**2. ábra:** Egér placenta sematikus ábrája. Az egér placenta három rétege: labirintus réteg, junkcionális zóna (spongiotrofoblaszt sejtekkel, trofoblaszt óriássejtekkel és glikogén sejtekkel) és az anyai decidua.<sup>34</sup>

Emberekben az anyai méh kiterjedt spirális artériái a korion bolyhoknál végződnek, ami szincitiotrofoblasztból és bolyhos citotrofoblasztból áll. Ezen struktúra szállítja az anyai vért, s analóg a funkciója az egerek labirintusával. Az anyai oldallal való kapcsolódása a citotrofoblaszt külső részén és a trofoblasztokon keresztül történik.<sup>31</sup>



**3. ábra:** Egér és humán placenta összehasonlítása: a) Egér és humán placenta hasonló szövetei. b) Humán placenta felépítése. c) Egér placenta felépítése.<sup>31</sup>

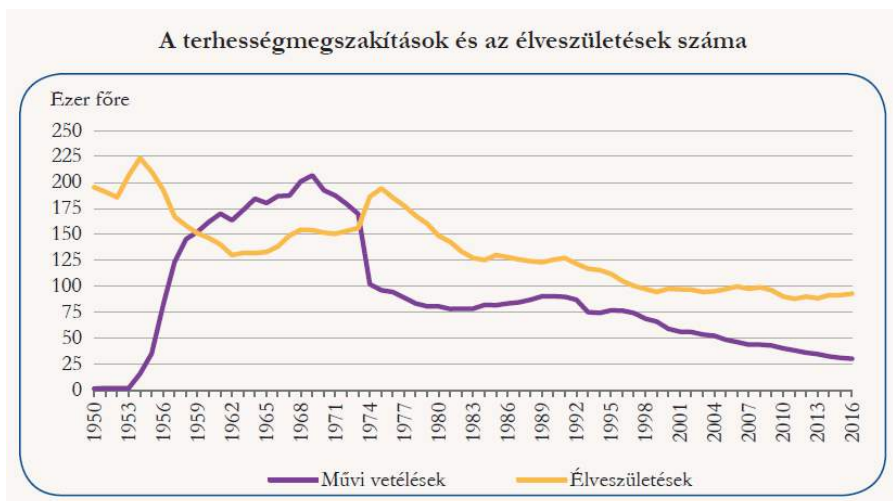


Összegezve az egérben és az emberben végbemenő élettani folyamatokat, a placenta és az immunszabályozás hasonlóságai lehetővé teszik, hogy vizsgálatainkat egérmodell segítségével végezzük el.<sup>31</sup>

## I.6. Terhességmegszakítás, mifepriszton hatása

Napjainkban egyre gyakoribb a nem tervezett, nem várt terhességből adódó egészségügyi beavatkozás. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) nemrég megjelent tanulmánya szerint 2010 és 2014 között évi 55,7 millió terhességmegszakítást végeztek világszerte, melyek közül 30,6 millió volt biztonságos.<sup>35</sup> A közelmúltban bontották tovább a nem biztonságos abortusz kategóriáját „kevésbé biztonságos” és „legkevésbé biztonságos” alkategóriákra. A fennmaradó esetek közül 17,1 millió kevésbé biztonságos, míg 8 millió a legkevésbé biztonságos kategóriába tartozott. Ez a különbségtétel segít jobban megérteni, milyen körülmények között kerül sor a terhességmegszakításra olyan nők esetében, akik nem jutnak hozzá, hogy képzett személyzet biztonságos körülmények között hajtsa rajtuk végre a beavatkozást. A legtöbb nem biztonságos terhességmegszakítás (azaz az esetek 97%-a) fejlődő országokban, azaz Afrikában, Ázsiában és Latin-Amerikában történt.<sup>35</sup>

Magyarországon különösen magas a nem kívánt terhességek aránya: száz kihordott terhességre a 2016-ot megelőző években közel 50-60, míg 2016-ban több mint 30 terhességmegszakítás jutott, vagyis minden három születésre esett egy művi vetélés. E mutató 2016. évi értéke az elmúlt 60 év legalacsonyabb szintjére süllyedt. A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint itthon évente közel harmicezer nőt érint a terhességmegszakítás kérdése<sup>36</sup> (**4. ábra**).



**4. ábra:** A terhességmegszakítások és élveszületések számának alakulása Magyarországon 1950 és 2016 között<sup>36</sup>

A legelterjedtebb és egyben a legtöbbet vitatott módszer a műtétes beavatkozás, amit az első trimeszter időszakában lehet biztonságosan elvégezni.<sup>37</sup>

A mifeprisztont (RU486) 1988-tól használják korai terhességek biztonságos és hatékony megszakításának céljából.<sup>38</sup> Kémiai szempontból egy szintetikus szteroid, amely antiprogesztagén hatású, mivel a progeszteronnal „versenyez” a progeszteronreceptorokért. Nőknél a legalább 1 mg/kg adagban adott mifepriszton gátolja a progeszteron által az endometriumra és miometriumra gyakorolt hatást. A terhesség során a prosztaglandinok izom-összehúzóást indukáló hatásával szemben érzékenyíti a miometriumot. A terhesség korai megszakítása esetén a mifepriszton után szakaszos adagolásban alkalmazott prosztaglandin-analóg (Misoprostol) kombinációja 95%-ra növeli a sikeres beavatkozások arányát, és felgyorsítja a magzat kilökődését.<sup>39</sup>

Ma már a világon oly mértékben elterjedt, hogy a beavatkozások 10-15%-ában ezt a módszert alkalmazzák, azonban Magyarországon erre ma még nincs lehetőség.<sup>40</sup> Elterjedését segítette, hogy az esetleges mellékhatásai általában igen enyhék (hasi fájdalom, émelygés, hányás, hasmenés, bőrküütések, fejfájás, rosszullét és láz), bár ritkább esetekben vérzés (erős vérzés az eseteknek mintegy 5%-ában fordul elő, és legfeljebb 1,4%-ban van szükség vérzés miatti küretre) és fertőzés (endometritis, kismedencei gyulladás) is kialakulhat.<sup>41,42</sup>

A mifepriszton pontos immunológiai hatásmechanizmusa, molekuláris és sejtes kölcsönhatásai még nem teljesen ismertek, így egy állatmodell kialakítása sokat segítené ezen folyamatok hátterének feltérképezésében.

A szakirodalom szerint az abortusz folyamata során a mifepriszton csökkenti a Treg-sejtek számát, valamint gátolja azok funkcionális működését az anyai-magzati határon.<sup>43</sup> Li és munkatársai szerint a mifepriszton blokkolja a Th2 és Treg túlsúlyt, aminek következtében a Th1 és Th17 citokinek szintje emelkedik a fetomaternalis határon, ami a terhesség megszakítását eredményezheti.<sup>44</sup> Számos hasonló tanulmányban olvasható, hogy egerekben a mifepriszton által indukált abortusz Th1-es típusú citokin szint (IFN- $\gamma$ , IL-2) emelkedéssel jár.<sup>45</sup> Bogdan és munkatársai kísérleteikben kimutatták, hogy a deciduális NK-sejtek granulumaiban együttesen szekretálódik a perforin és a progeszteron indukált blokkoló faktor (PIBF). A mifepriszton-kezelt egerekben a PIBF+ NK-sejtek száma 50%-kal csökkent, míg a perforin-pozitív sejtek aránya nőtt a PIBF+ sejtpopuláción belül, a kontroll egerekhez képest.<sup>46</sup>

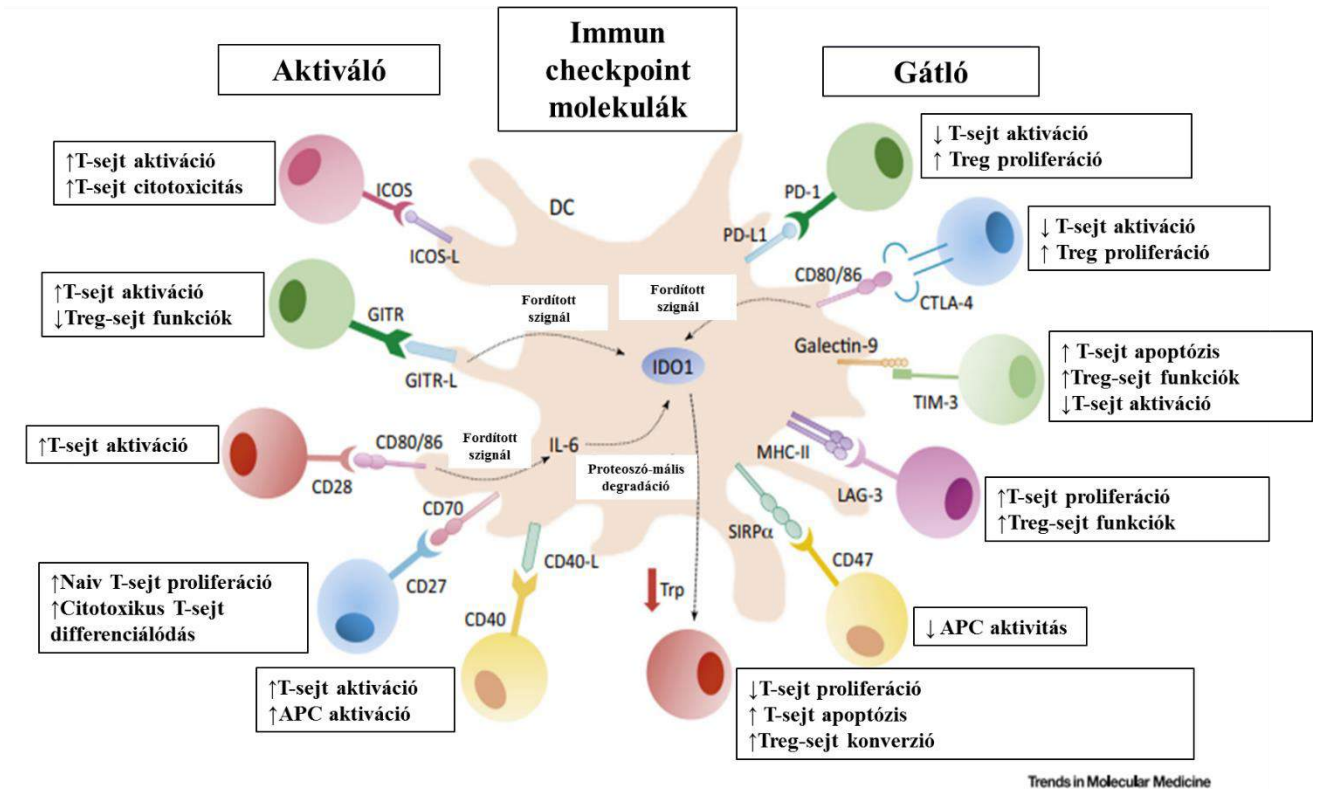
## 1.7. Immun checkpoint molekulák és ligandjaik

A T-sejtek aktivált állapotba kerüléséhez aktiváló szignálok jelenlétére és gátló szignálok hiányára van szükség. A T-sejteken található T-sejt receptor ligandja az antigén prezentáló sejt felszínén megjelenő peptid-MHC komplex. Ez a kölcsönhatás biztosítja a T-sejt számára az aktivációs jelet, az első szignált. Ez a szignál azonban önmagában még nem váltja ki a T-sejtek aktiválódását, szükség van egy második szignálra is, melyet az aktivált hivatásos antigén prezentáló sejtek felszínén kifejeződő adhéziós és kostimulációs molekulák közvetítenek.

A T-sejtek aktivációja során számos immunellenőrzési pont (immun checkpoint) működik, amely negatív regulátor molekulák (immun checkpoint molekulák) segítségével leállítja a T-sejteket. Ez a mechanizmus alapvetően az autoimmunitás kivédésére és a tolerancia fenntartására szolgál, viszont a tumorelles immunválaszban megakadályozhatja a hatékony és hosszú ideig fennálló T-sejtes immunválaszt. Az immun checkpoint molekulák az immunrendszerünk regulátorai. A magzattal szembeni anyai immuntolerancia kialakulása igen nagy kihívást jelent a női szervezetnek: az anyai

immunrendszernek el kell fogadnia a szemiallogén magzatot, miközben általános védelmi funkcióját is betölti. Az immun checkpoint molekulák moduláló hatása ezért is nélkülözhetetlen ezen különleges állapot fenntartásában.<sup>47-49</sup>

Működésüket tekintve az immun checkpoint molekulákat két nagyobb csoportra bonthatjuk: aktiváló és gátló molekulák (5. ábra).



5. ábra: Aktiváló és gátló immun checkpoint molekulák és ligandjaik<sup>50</sup>

Az antigén prezentáló sejtek és a dendritikus sejtek számos immun checkpoint molekula ligandját expresszálják. Ezen ligandok limfociták receptoraihoz kötődve specifikus aktiváló vagy gátló hatást indukálnak. Főbb aktiváló receptor-ligand párok: ICOS/ICOS-L, GITR/GITR-L, CD27/CD70, CD40/CD40-L és CD28/CD80-86. A főbb gátló receptor-ligand párok a következők: PD-1/PD-L1, CTLA-4/CD80-86, TIM-3/Galectin-9, MHC-II/LAG-3 és SIRP $\alpha$ /CD47. A doktori értekezés során a TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalakat vizsgáltuk.

## I.8. T-sejt immunglobulin és mucin domain 3 (TIM-3)

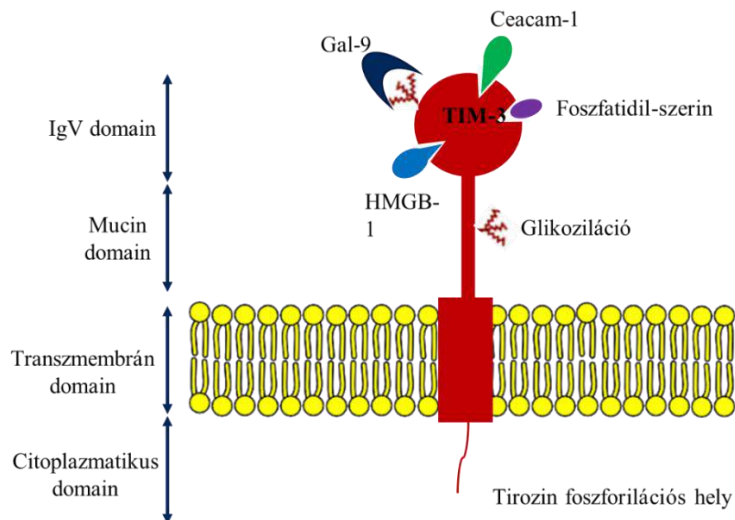
### I.8.1. TIM-3 molekula jellemzői

A T-sejt immunglobulin és mucin domain 3 (TIM-3) egy 281 aminosavból álló membránfehérje, melyet először Kuchroo és munkatársai írtak le 2002-ben.<sup>51</sup> N-terminális végén IgV domainnel rendelkezik, melynek mucinszerű vége glikozilációra képes. A C-terminális része egy citoplazma domain, amelynek foszforilációja felel a TIM-3 molekula által irányított szignálok kialakításáért.

A TIM-3 molekulát először, mint IFN- $\gamma$  termelő CD4+ T helper-sejtek (Th1) és CD8+ citotoxikus T-sejtek (Tc1) felszínén termelődő immunglobulint írták le.<sup>51</sup> Azóta a TIM-3 expressziót számos további immunsejt felszínén kimutatták (Th17-sejtek, Treg-sejtek, dendritikus sejtek, NK-sejtek, monociták, makrofágok, hízósejtek és antigén prezentáló sejtek).<sup>52</sup>

### I.8.2. TIM-3 molekula ligandjai

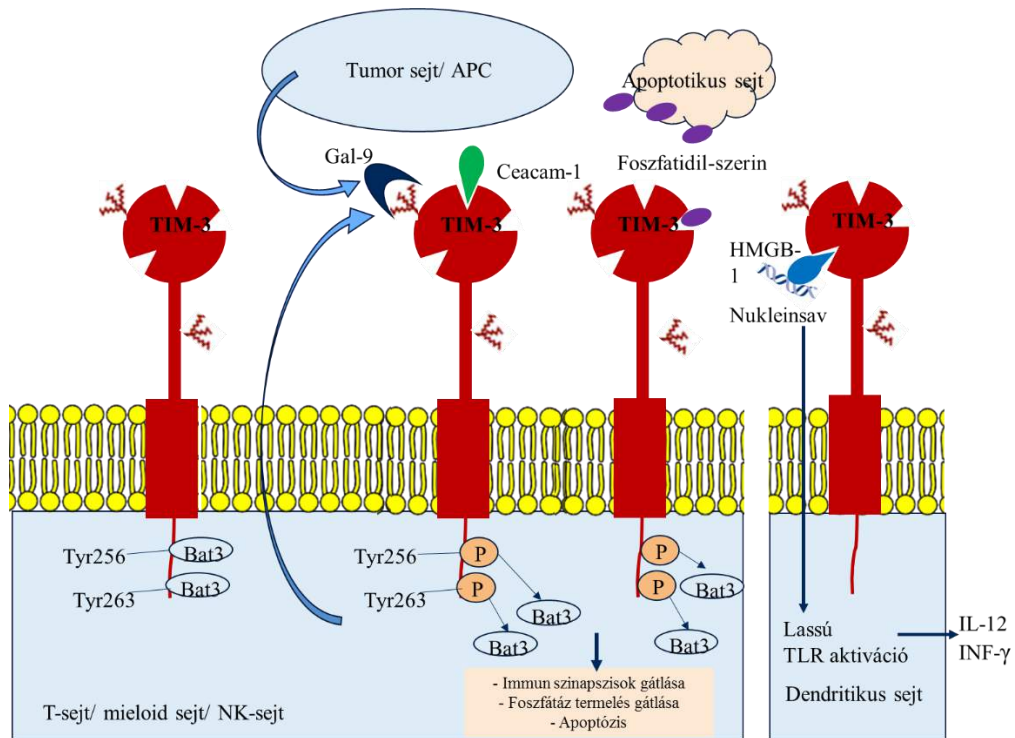
A TIM-3 molekulának számos ligandját ismerjük: Gal-9 (Galektin-9), a HMGB1 (High Mobility Group Box1), Ceacam-1 (Karcioembrionikus antigén sejt adhesziós molekula 1) és a PtdSer (Foszfátidil-szerin) (6. ábra).<sup>53</sup>



6. ábra: TIM-3 molekula felépítése és ligandjai

Zhu és munkatársai 2005-ben publikáltak először a Galektin-9-ről, a TIM-3 molekula elsőként felfedezett ligandjáról<sup>54</sup>. Kutatásukban feltárták, hogy a Gal-9 képes *in vitro* szabályozni a kalciumion sejtekbe áramlását, továbbá a Th1- és Th17-sejtek aggregációját és apoptózisát. *In vivo* Gal-9 kezelés az IFN- $\gamma$  termelő sejtek szelektív pusztulásához vezet.<sup>54</sup> A TIM-3 és Gal-9 molekulák kapcsolódása szabályozza a Th1/Th2 citokin egyensúlyt, segítve az egészséges immuntolerancia kialakítását és fenntartását.<sup>52</sup>

A TIM-3 molekula számos szignál útvonalat képes elindítani a citoplazmatikus domainjén keresztül. A Gal-9 és Ceacam-1 ligandok receptorhoz kötődése során foszforilálódik a Tyr256 és a Tyr263. Ennek következtében a Bat3 molekula leválik a TIM-3 receptorról és beindulnak a gátló mechanizmusok. A TIM-3 receptor HMGB1 ligandjához való kapcsolódásának következtében a dendritikus sejtekben a TLR gátlása valósul meg<sup>55</sup> (7. ábra).



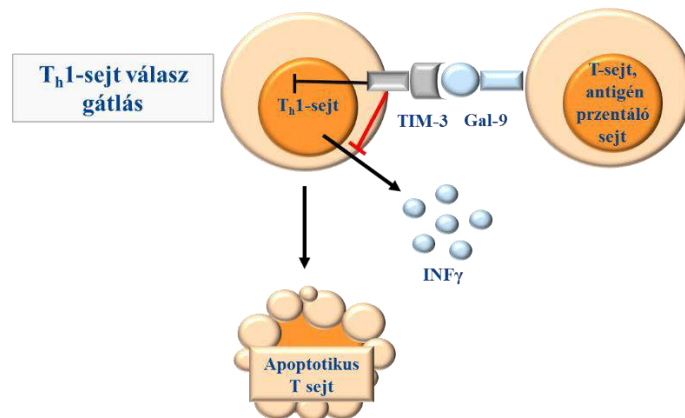
7. ábra: TIM-3 működési mechanizmusa

### I.8.3. TIM-3 és Gal-9 molekulák kapcsolódása

A galektin fehérjecsalád tagjai lektinek, melyek legfőbb jellemzői, hogy szénhidrátkötő domainjük révén sejt felszíni glikokonjugátumokhoz kötődnek, a  $\beta$ -galaktozidokhoz mutatnak nagy affinitást. Ez idáig tizenöt különböző galektin molekulát azonosítottak. Ezek közül a Gal-9 molekulát vizsgáltuk. A Gal-9 egy tandem-ismétlődésű galektin, két szénhidrátkötő domainnel rendelkezik, amelyek linker szekvenciával kapcsolódnak.<sup>56,57</sup>

A Gal-9 a Th1 és Th2 citokinek termelődését befolyásolhatja, valamint gátolhatja a Th17-sejtek differenciálódását. A CD8+ citotoxikus T-sejtek apoptózisát is indukálhatja.<sup>56,57</sup>

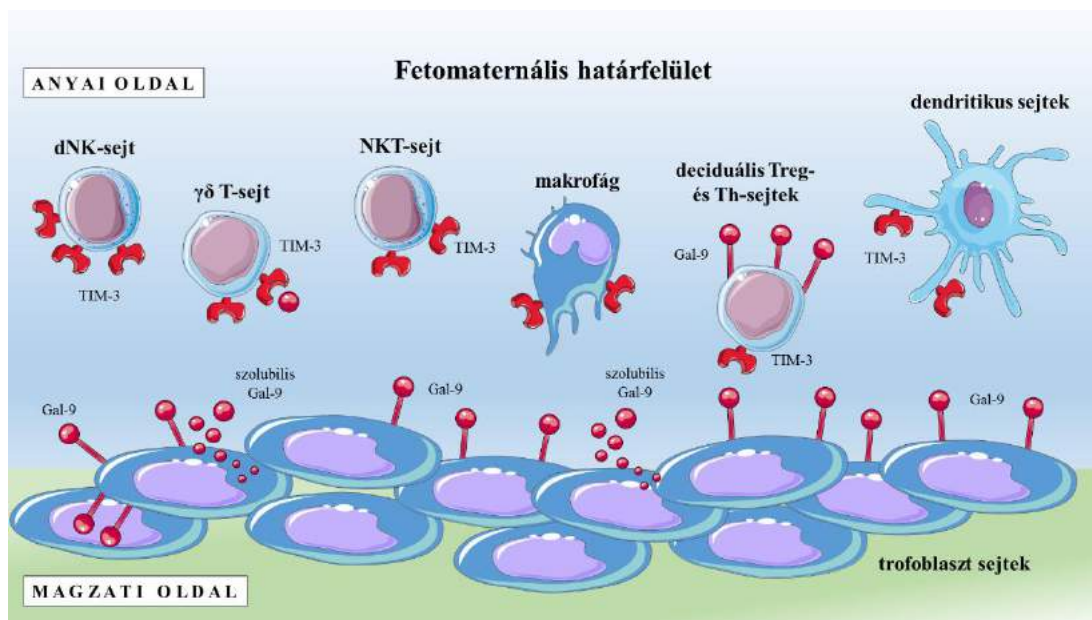
A TIM-3 és Gal-9 molekulák interakciója gátolja az NK-sejtek citotoxikus aktivitását és a Th1- és Th17-sejtek INF- $\gamma$  szekrécióját (**8. ábra**). Ezen kívül szabályozza a T-sejtek toleranciájának kialakítását és Th1-es immunsejtek aktivációját egerekben és emberekben.<sup>54, 58, 59</sup> Felel a Th1/Th2 egyensúly kialakításáért.<sup>60</sup> Serkenti a naiv T-sejtek Treg-sejtekké való differenciálódását, valamint elősegíti a Th17-sejtek termelődését a naiv T-sejtek gátlásával. A CD4+ Th1, Th17 és a CD8+ citotoxikus T-sejtekben és a csecsemőmirigy T-sejtjeinek CD4/CD8 kettős negatív vagy kettős pozitív timocitáiban kiemelkedő az apoptotikus aktivitása. Azonban nem minden TIM-3+ sejt képes apoptotizálni (pl. a TIM-3+ Treg-sejtek), amelynek hátterében a glikoziláltságokból adódó különbségek, vagy egyéb stimuláló vagy gátló molekulák jelenléte is állhat.<sup>56</sup>



**8. ábra:** Th1-sejtek apoptózisa TIM-3 és Gal-9 interakciója során

#### I.8.4. A TIM-3 és Gal-9 útvonal szerepe az egér vemhesség során

A TIM-3 molekula képes az immunsejtek gátlására vagy serkentésére. Egészséges terhesség során a Th1-függő T-sejt válaszokat gátolja, elősegítve az anyai immuntolerancia kialakítását. A TIM-3 receptor reprodukcióban betöltött szerepét számos egérkísérlet is alátámasztja.<sup>61,62</sup> A TIM-3 molekula expresszióját rágcslók méhében immunfluoreszcens festéssel is kimutatták, továbbá jelenléte bizonyított mind az uterusz, mind a decidua számos immunsejtjén (pl. NK-,  $\gamma/\delta$  T-, NKT-sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek)<sup>61,63</sup> (9. ábra). Az egerek vemhessége során ezen sejtek TIM-3 expressziója változik, a deciduában domináló NK-sejtek esetében emelkedett az egér vemhesség első felében.<sup>61</sup>



9. ábra: TIM-3 és Galektin-9 expresszió a fetomaternalis határfelületen vemhes egerekben

Egér vemhesség során a Gal-9 molekula kimutatható a placentában és a deciduában lévő Treg- és Th-sejtekben. Mivel az anyai-magzati határon mind a TIM-3 molekulának, mind pedig a Gal-9-nek a jelenléte bizonyított, feltételezhetjük, hogy az immuntolerancia kialakításában is részt vesznek. Ezt a hipotézist támasztja alá az a megfigyelés, hogy a TIM-3 molekula *in vivo* gátlásával csökken az egy vemhességre jutó élve született utódok száma és nő a magzatok méhen belüli felszívódásának



valószínűsége.<sup>61,64</sup> A TIM-3 molekulának monoklonális antitestekkel történő *in vivo* gátlása további információkkal szolgál ezen molekula anyai-magzati határfelületen betöltött szerepéről. A gátlást követően lokálisan felszaporodnak az apoptotikus sejtek és makrofágok, utalva a TIM-3 károsodott funkciója következtében kialakuló fagocitafunkció zavarára és a gyulladásos citokinek fokozott termelődésére.<sup>61</sup> Az uterinális NK-sejtek felszínén expresszálandó TIM-3 molekula gátlása ezen sejtek fenotípusos és funkcionális változását eredményezi.<sup>63</sup> Habár a TIM-3+ uterinális NK-sejtek lokális száma és a citotoxikus aktivitása nem változik, fokozódik azok CD69 expressziója és megváltozik aktiváló és gátló sejt felszíni receptoraiknak kifejeződése. A TIM-3+ uterinális NK-sejtek angiogénikus (Vaszkuláris endotél növekedési faktor /VEGF és INF- $\gamma$ ) és immunszuppresszív citokinjeinek szekréciója is csökken.<sup>52</sup> Továbbá a TIM-3 gátlás következtében csökken az NK-sejtek túlélésében és fejlődésében szerepet játszó IL-15 és IL-9 placentális expressziója.<sup>63,65</sup>

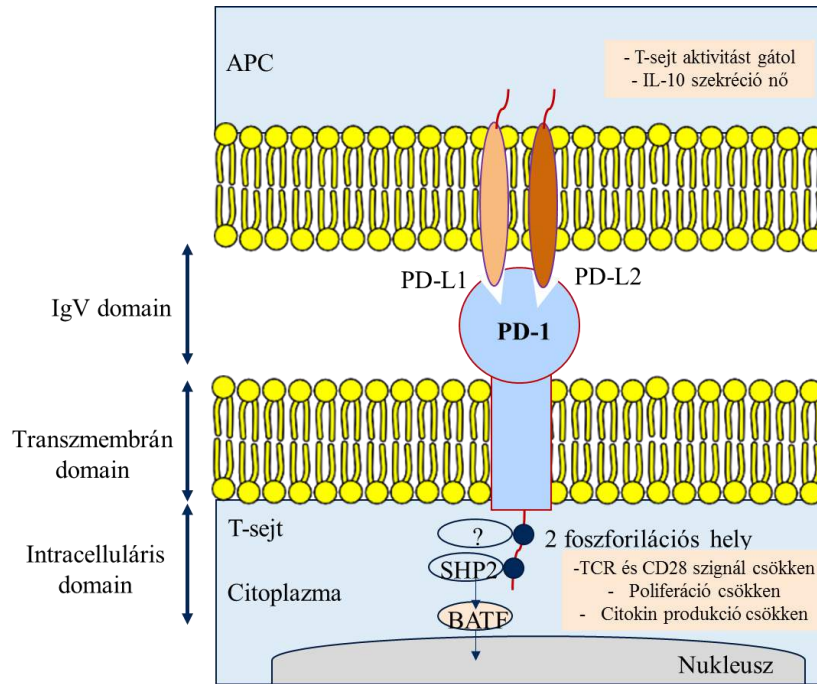
A vetélésre hajlamos (abortusz) egérmodellekben csökken a Th1 citokin profilú TIM-3+ decíduális NK- és CD4+ Th-sejtek száma.<sup>62,66</sup> Ezen egérkísérletekből származó eredmények alátámasztják a TIM-3 molekula vemhesség alatti fetomaternalis határon játszott protektív szerepét.<sup>52</sup>

## I.9. Programozott sejthalál receptor 1 (PD-1)

### I.9.1. A PD-1 molekula jellemzői

A PD-1 molekula (CD279) egy gátló immun checkpoint transzmembrán receptor, a B7/CD28 család tagja. Számos immunsejt expresszálja (T-sejtek, B-sejtek, NK-sejtek és antigén prezentáló sejtek).<sup>67</sup> Felépítését tekintve rendelkezik egy extracelluláris IgV domainnel, amit egy transzmembrán régió követ, és egy intracelluláris véggel, aminek két foszforilációs helye van. Az intracelluláris végen történnek a különböző molekuláris interakciók. Érdekes tulajdonsága, hogy nem expresszálódik naiv T-sejteken. Elsősorban a perifériás szövetek gyulladásos reakcióiban vesz részt. Ligandjához való kötődése során az SPH2 foszfatáz foszforilálja az intracelluláris végen elhelyezkedő foszforilációs helyeket (aminek hatására BATF transzkripció faktor szabadul fel, amely a sejtmag

átíródási folyamatait szabályozza) és blokkolja a T-sejt receptor és a CD28 aktivációját és a citokin termelést<sup>68,69</sup> (10. ábra).



10. ábra: PD-1 molekula felépítés, ligandjai és működése

### 1.9.2. PD-1 molekula ligandjai

A PD-1 molekula két ismert ligandja a B7 család tagjai: PD-L1 (B7-H1) és a PD-L2 (B7-DC). A PD-L1 és PD-L2 ligandok transzmembrán glikoproteinek, melyek egy rövid citoplazmatikus véggel rendelkeznek.

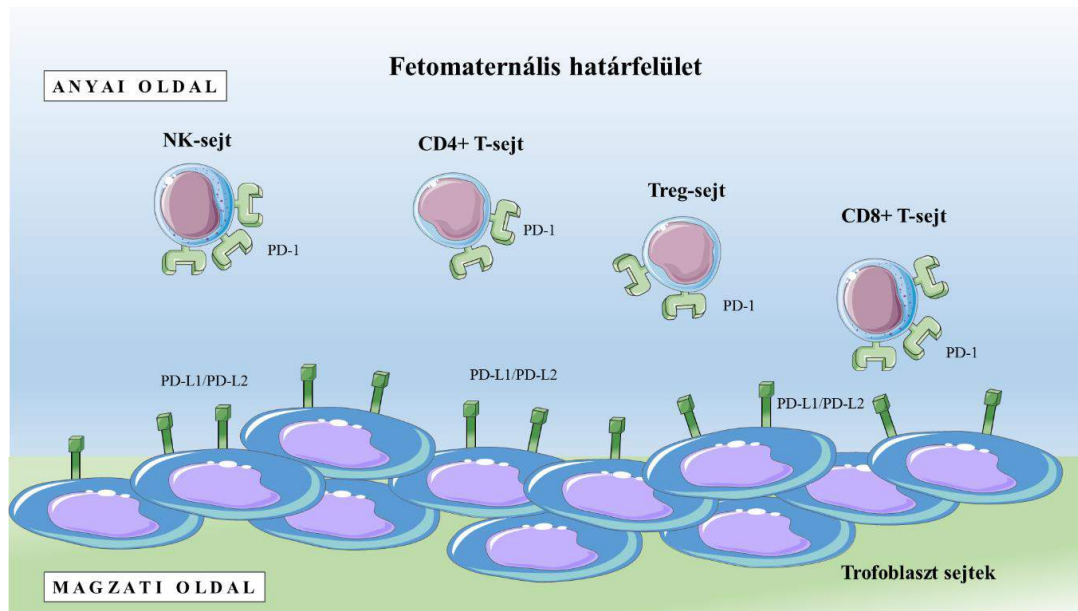
A PD-L1 molekula gátolja a gyulladásos T-sejt reakciókat. A T-sejteken, B-sejteken, dendritikus sejteken és makrofágokon expresszálódik, továbbá mRNS-e a szívben, placentában, izmokban, májban, lépben, nyirokcsomókban és a csecsemőmirigyben is kimutatható.<sup>70,71</sup> A PD-1 receptorához kapcsolódva hatását a T-sejteken, B-sejteken, monocitákon, dendritikus sejteken, endotél sejteken és a miokardiumon fejt ki. T-sejtekhez való kapcsolódásakor csökkenti a citokintermelődést és csökkenti a T-sejtek osztódását. Gyulladásos faktorok (Lipopoliszacharid/ LPS, Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor/ GM-CSF, VEGF) és egyes citokinek (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) fokozzák expresszióját.<sup>72</sup>

Ezzel ellentétben a PD-L2 expressziója a makrofágokra és a dendritikus sejtekre korlátozódik.<sup>73</sup> mRNS szinten kimutatható a szívben, a placentában, a tüdőben és a májban is.<sup>74</sup>

### I.9.3. PD-1 molekula és ligandjainak szerepe egér vemhesség során

A PD-1 receptor mindkét ligandja expresszálódik az anyai-magzati határfelületen.<sup>75</sup> A PD-L2 expressziója megfigyelhető az egér decidua összes rétegében, míg a PD-L1 kifejeződése a decidua basalis rétegére korlátozódik.<sup>75</sup> A PD-L1 trofoblaszton történő expressziójáról kevés adattal rendelkezünk, melyek szerint a PD-L1 expressziója megfigyelhető a szincitiotrofoblaszt rétegben, de a trofoblaszt óriássejteken nem.<sup>76</sup> Ezek alapján elmondható, hogy a PD-1 molekula ligandjaival történő interakciója elsősorban a deciduában valósul meg (**11. ábra**).

Vemhes egérmodellben a PD-1 molekula ligandjainak *in vivo* gátlásával kimutatható, hogy az anti-PD-L1 kezelés hatására nő a magzatok rezorpciós aránya, míg a PD-L2 gátlásnak nincs hatása a magzatok életképességére.<sup>52,75</sup> A PD-L1 gátlás következtében a fetomaternális határon megnő a T-sejtek száma, mely az emelkedett IFN- $\gamma$  szinttel egy lokális T-sejt közvetítette kilökődésre utal. A PD-1/PD-L1 útvonal fetomaternális protektív szerepét mutatja az is, hogy a PD-L1 hiányos egerekben észlelhető hasonló magzatszámok, rezorpciós arányok és a Th17 irányú eltolódás hangsúlyozza a PD-L1 molekulát expresszáló Treg-sejtek szerepét a magzati antigénekre specifikus T-sejtek szabályozásában.<sup>77,78</sup>



**11. ábra:** PD-1 és ligandjainak expressziója a fetomaternalis határfelületen vemhes egerekben

Ezzel szemben egy másik kísérletben azt találták, hogy sem a PD-1, sem a PD-L1-hiányos egerekben nincsenek szignifikáns eltérések a vemhességre és a magzatokra vonatkozó adatokat illetően.<sup>79</sup> Ezen ellentétes adatok alapján a PD-1/PD-L1 útvonal további vizsgálata és egér vemhesség alatt betöltött szerepének tisztázása és pontosítása szükséges.

## I.10. Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

### I.10.1. PACAP molekula általános bemutatása

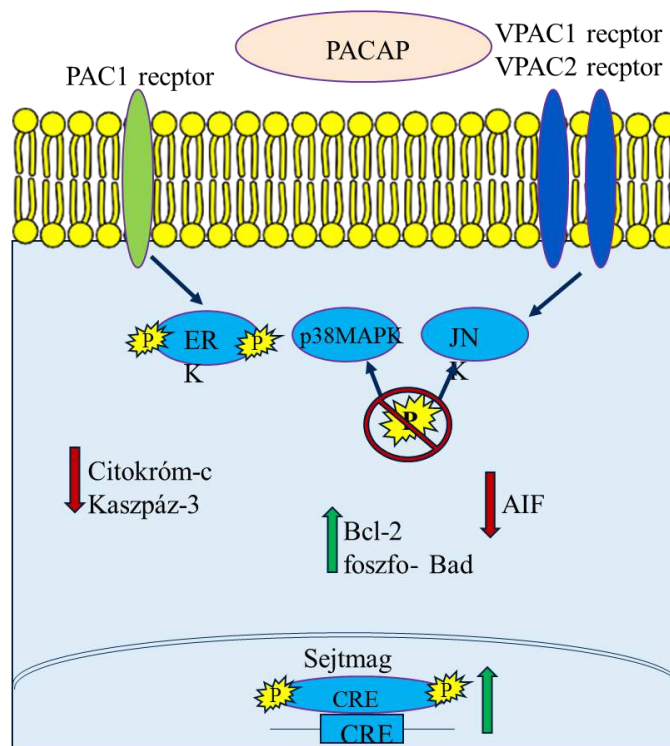
A PACAP-ot (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) 1989-ben Arimura és munkatársai izolálták birka hipotalamuszból.<sup>80</sup> Nevét a hipofízisben kifejtett hatásáról kapta, miszerint az adenilát-cikláz stimulálásával emeli a cAMP szintjét a hipofízis sejtjeiben. A PACAP egy multifunkcionális neuropeptid, ami a glukagon-szekretin-vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) család tagja, szerkezete a VIP-pel 68%-os homológiát mutat. A szervezetünkben két formája található: az egyik 27, a másik 38 aminosavból áll (PACAP1-27 és PACAP1-38).<sup>81</sup> Legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben és az endokrin szervekben termelődik. Nagy mennyiségben található

meg a központi, valamint a perifériás idegrendszerben, ahol legelőször neurotróf és neuroprotektív hatásait írták le.<sup>82</sup> A PACAP védő funkciókat lát el különböző sejt- vagy szövetkárosító hatásokkal szemben. Protektív funkcióit antiapoptotikus, antiinflammatorikus és antioxidáns hatásainak köszönheti. Számos degeneratív idegrendszeri betegségben, valamint cerebrális iszkémia modellben is kimutatták védő szerepét.<sup>83,84</sup> Citoprotektív funkciói egyéb szervrendszerekben is ismertek, például a bélrendszerben, a vesében és a kardiovaszkuláris rendszerben is.<sup>85</sup> Az elmúlt évek kutatásai kimutatták, hogy mind előfordulásában, mind funkciójában túlmutat az előbb leírt hatásokon.<sup>86</sup>

#### I.10.2. PACAP molekula ligandjai és működésük

A PACAP-nak három féle receptora van: PAC1, VPAC1, VPAC2. Ezek közül a PAC1 receptornak a legmagasabb a PACAP-hoz való affinitása. E különbözőség miatt a PAC1 receptort nevezzük 1. típusúnak, a VPAC1 és VPAC2 receptorokat pedig 2. típusúnak.<sup>86</sup>

A PAC1 receptor aktiválja az adenilát-cikláz és a foszfolipáz C-t, beindítva a cAMP-függő és -független utakat. A VPAC receptorok G proteinhez kötődnek, majd ezt követően aktiválják az adenilát-cikláz. A PACAP növeli az antiapoptotikus foszfo-ERK, foszfo-CREB, foszfo-Bad szintjét, s ezzel szemben csökkenti a proapoptotikus jelátviteli molekulák, a JNK, p38MAPK, AIF, citokróm-c és kaszpáz 3 expresszióját<sup>87</sup> (**12. ábra**).



12. ábra: PACAP működési mechanizmusa

### I.10.3. PACAP-hiányos egerek

Az endogén PACAP hiányának vizsgálatára Hashimoto és munkatársai 2001-ben PACAP-hiányos (KO) egértörzset hoztak létre.<sup>88</sup> Ezek az egerek makroszkóposan nem térnek el vad társaiktól, azonban a mikroszkópos morfológiai és a funkcionális vizsgálatok különbségeket mutatnak. Az egerek viselkedése is eltér vad társaikétól.<sup>89</sup> A PACAP terhességben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PACAP-hiányos egerek fertilitása csökken.<sup>90</sup>

### I.10.4. PACAP szerepe várandósság során

Ma már jól ismert, hogy a PACAP rendkívül változatos élettani hatásokkal rendelkezik, szinte valamennyi szervrendszer működését befolyásolja. Számos vizsgálat kimutatta, hogy a PACAP rendelkezik a gonadális sejtekre közvetlenül kifejtett hatással is és fontos szerepet tölt be a genitális rendszerben. A PACAP-ot és receptorát kimutatták

az ováriumban, a vaginában, az uterusban, a placentában, és az uteroplacentáris egység működésének szabályozásában is fontos szerepe van.<sup>90,91</sup>

Fontos megjegyezni, hogy a reprodukciós endokrinológiában is kiemelkedő szereppel bír. Képes befolyásolni a fertilitást, az implantációt, a reprodukciós viselkedést, a spermatogenezist és a placenta funkcióját.<sup>86,92,93</sup> A PACAP molekula képes késleltetni a pubertást és befolyásolni a folliculusok érését a petefészekben,<sup>94</sup> valamint irányítja a petefészek hormontermelését,<sup>95</sup> továbbá hatással van a sejtek meiotikus osztódására és fontos lokális regulátora a folliculáris fejlődésnek.<sup>96</sup>

Az egyre bővülő ismereteink ellenére jelentős hiányosságok vannak a PACAP reprodukcióban betöltött szerepének megértésében. Míg sok tanulmány *in vitro* hatásokat ír le, addig néhány megfigyelés következtelen vagy ellentmondásos, és kevés az *in vivo* vizsgálat.

### I.11. Transzlációs kutatások

A reprodukciós immunológiában a pontos immunológiai folyamatok vizsgálatához és méréséhez nehéz és bonyolult megfelelő rendszert kiépíteni, mivel az immun-tolerancia mechanizmusok szemiallogén magzattal szembeni szabályozása igen komplex folyamat. A reproduktív immunológiai kutatásokban a legtöbbet használt és legjobban elfogadott modellállat az egér. Ahhoz, hogy megfelelő következtetéseket vonhassunk le a kísérleteink során, fontos, hogy megfelelő tudással rendelkezünk mind az ember-, mind az egér-implantáció és -placentáció folyamatairól. Immunológiai célú kísérletek során azon immunsejteket célszerű vizsgálni, amelyek az anyai-magzati határfelületen ezen bonyolult szabályozási folyamatokban vesznek részt.

Minden állatkísérlet vonatkozásában fontos szem előtt tartani William M.S. Russell és Rex Burch 1959-es 3R szabályát: csökkentés/reduction; tökéletesítés/refinement; helyettesítés/replacement. A reproduktív immunológiai kísérletek tervezésekor felmerül a humán placenta vizsgálata. Ezen placenták vizsgálatakor a lehetőségeink limitáltak, mivel csak az első és utolsó trimesztert és annak immunsejtjeit tudjuk vizsgálni. A kísérletek tervezésekor optimalizálni kell a vizsgálandó elemek számait. Ezen számok meghatározásakor törekedni kell a mintaszám/kapott

információ optimális arányára, vagyis, hogy a lehető legkevesebb mintaszámból a lehető legtöbb információt nyerjük. Humán minták esetében a megfelelő mintaszám begyűjtése hosszas és időigényes procedúra lehet, s a kiszámíthatatlanság okán nehézkes a kísérletek tervezése és kivitelezése. Végül fontos a kísérleti protokoll körültekintő és pontos megtervezése, az állatok megfelelő ellátása és elhelyezése, esetleges speciális tartási körülmények betartása. Humán minták esetében fennáll a rizikó, hogy szülés után nem megfelelően tárolják a placentát, esetleg sérül, ami a kísérleti eredményeinket nagyban befolyásolhatja.<sup>97</sup>

A terhesség alatti fiziológiás és patogén kölcsönhatások, valamint az immuntolerancia feltérképezésére számos egérmodell használható. Az ilyen jellegű kísérletekre további megoldás lehet a humán placenta tenyészetek *in vitro* alkalmazása. A vizsgálatainkat az egérikísérletek megfelelően kiegészíthetik, melyek eredménye és tudományos értéke megalapozott.<sup>31</sup>



## II. Célkitűzések

Vizsgálatunkban célul tűztük ki a fetomaternalis immuntolerancia kialakulásának feltérképezését. Kísérleteink során az egyes immun checkpoint molekulák szerepét és funkcióját kívántuk részletesen vizsgálni a várandósság során különböző állatmodellek felhasználásával.

Kutatásainkat három témakörbe osztottuk:

### **1. Egészséges terhesség vizsgálata: TIM-3/Gal-9 útvonal és PD-1 immun checkpoint molekula szerepének vizsgálata**

Egér kísérleteink során célunk volt a perifériás és anyai-magzati határon izolált immunsejtek fenotípusos elemzése és citotoxikus aktivitásának mérése. Továbbá vizsgálni kívántuk a detektált sejtek TIM-3/Gal-9 és PD-1 útvonalát, illetve azok lehetséges szerepét az immuntolerancia kialakulásában az egér vemhesség 14 és feledik napján. Célunk volt továbbá a Gal-9 molekula kifejeződési helyének meghatározása a placentában.

### **2. Abortuszt indukáló gyógyszeres kezelés hatásának vizsgálata: mifepriszton hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra**

Célul tűztük ki a TIM-3/Gal-9 útvonal vizsgálatát mifepriszton kezelést követően. Kísérleteink fókuszában a 14 és fél napos vemhes egerek anyai-magzati határán izolált mononukleáris sejtjei álltak. A fenotípusos elemzés során az immunsejtek arányának meghatározását követően a sejtek TIM-3 és Gal-9 expresszióját, illetve citotoxikus aktivitását mértük flow citometriás módszerrel. Célunk volt továbbá a Gal-9 szövetszintű expressziós változásait detektálni mifepriszton kezelést követően.

### **3. PACAP molekula hatása a terhességre: TIM-3/Gal-9 útvonal és PD-1 immun checkpoint molekula vizsgálata PACAP-hiányos egerekben**

Kísérleteink harmadik részében az előzőleg leírt egészséges terhességi folyamatokat PACAP-hiányos egerekben terveztük megismételni. Célunk volt a perifériás és deciduális immunsejtek fenotípusos elemzése, valamint ezen sejtek Gal-9, TIM-3, PD-1 expressziójának vizsgálata és citotoxikus tulajdonságainak mérése. Ezen felül össze kívántuk hasonlítani a vad típusú és PACAP-hiányos egerek Gal-9 kifejeződési helyét placenta mintákon.

### III. Anyagok és módszerek

Kísérleteinket a következő három nagyobb témakörre bonthatjuk:

1. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben
2. Mifepriszon hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben
3. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos (KO) egerekben

#### III.1. Felhasznált anyagok

##### III.1.1. Mononukleáris sejtek izolálása során felhasznált anyagok

- a) Foszfáttal pufferelt sóoldat (PBS) (Bio-Science)
- b) IV. Típusú kollagenáz (Sigma- Aldrich)
- c) Türk-oldat (Szkarabeusz Kft.)
- d) Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare)

##### III.1.2. Kezelés során alkalmazott hatóanyag

- a) Mifepriszon (Sigma-Aldrich)

### III.1.3. Mononukleáris sejtek jelölésére használt fluorokrómmal konjugált antitestek

Antitest	Fluorokróm	Gazdaszervezet	Klón	Gyártó
anti-PD-1	BV-421	patkány	J43	BD Pharmingen (USA)
anti-CD3	BV-510	patkány	145-2C11	BD Pharmingen (USA)
anti- $\gamma/\delta$	BV-510	hörsög	GL3	BD Pharmingen (USA)
anti-CD4	FITC	patkány	GK1.5	Miltenyi Biotec (Németország)
anti-CD49b	FITC	patkány	DX5	BD Pharmingen (USA)
anti-TIM-3	PE	patkány	215008	R&D Systems (USA)
anti-Gal-9	PE	patkány	RG9-35	Biolegend (USA)
anti-CD45	PerCP	patkány	30F11	Miltenyi Biotec (Németország)
anti-CD25	PE-Cy7	patkány	PC61	BD Pharmingen (USA)
anti-TIM-3	APC	patkány	215008	R&D Systems (USA)
anti-FoxP3	APC	patkány	FJK-16s	eBioscience (USA)
anti-CD107a	FITC	patkány	1D4B	BD Pharmingen (USA)
anti-CD8a	APC-H7	patkány	53-67	BD Pharmingen (USA)
anti-CD49b	PE	patkány	DX5	BD Pharmingen (USA)

**1. táblázat:** Felhasznált fluorokrómmal konjugált antitestek

### III.1.4. Mononukleáris sejtek jelöléséhez használt speciális reagensek

- a) Forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) / Ionomycin stimulálás
  - Magzati borjú szérum (FCS)(BioWest)
  - Ionomycin (Sigma-Aldrich)
  - Forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) (Sigma–Aldrich)
  - Roswell Park Memorial Institute médium (RPMI 1640) (Gibco)
- b) FoxP3 transzkripciós faktor jelölő kit
  - Permeabilizációs puffer (eBioscience)
  - Fixáló/Permeabilizációs diluens (eBioscience)
  - Fixáló/Permeabilizációs koncentrátum (eBioscience)

### III.1.5. Immunhisztokémiai festések során használt anyagok

- a) Paraformaldehid (PTE ÁOK Klinikai Központi Gyógyszertár)
- b) Paraffin (Hexán)
- c) Xilol (PTE ÁOK Klinikai Központi Gyógyszertár)
- d) Target Retrieval Solution (TRS) (Dako)
- e) Tris pufferezt sóoldat (TBS) (Dako)
- f) TBS+Tween (0,05%) pH 7,4 oldat (TBST)
- g) Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- h) Biotinilált kecske anti-egér Galektin-9 (R&D Systems)
- i) Biotinilált Sztreptavidin Tormaperoxidáz Komplex (GE Healthcare)
- j) Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako)
- k) Mayer-féle hematoxin (Molar Chemicals)
- l) Glicerines zselatin (Dako)

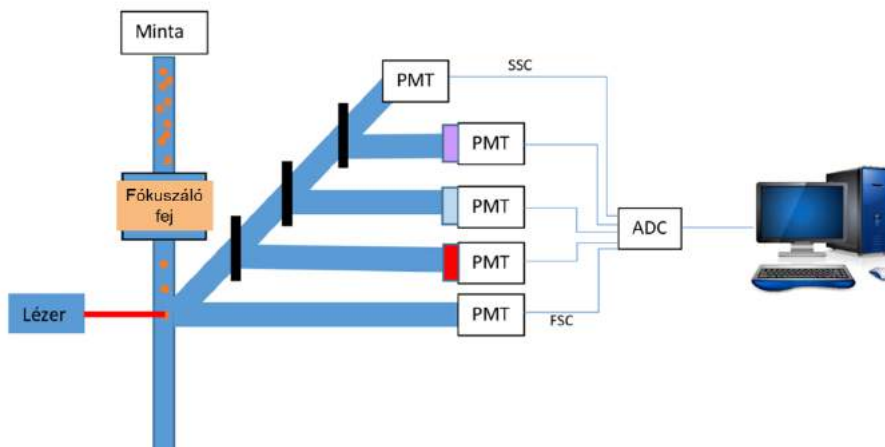
## III.2. Felhasznált műszerek

### III.2.1. Áramlási citométer

A méréseinket a PTE Szentágotthai János Kutatóközpontjában lévő BD FACSCanto II (BD Biosciences) áramlási citométeren végeztük, FACSDiva V6 program (BD Biosciences) segítségével (2. táblázat) (13. ábra).

BD FACSCanto II lézer konfigurációja		
Excitációs lézer	Filter (Detektálható nm tartomány)	Detektálni kívánt fluorokróm
Ibolya (405nm)	450/50: 425-475nm	BV421
	510/50: 485-535nm	BV510
Kék (488nm)	780/60: 750-810nm	PE-Cy7
	670 LP: 670nm felett	PerCP
	585/42: 564-606nm	PE
	530/30: 515-545nm	FITC
Vörös (633nm)	780/60: 750-810nm	APC-H7
	660/20: 650-670nm	APC

2. táblázat: BD FACSCanto II lézer konfiguráció



13. ábra: Áramlási citométer általános felépítése

Az áramlási citométer működési elve:

A BD FACSCanto II áramlási citométer a mérni kívánt mintát egy pumpa és egy vékony kapilláris cső segítségével a gép fluidikai rendszerébe juttatja. Ezt követően a sejteket a hidrodinamikai fókuszálással egymás után sorba rendezi, s az előzetesen beállított áramlási sebességnek megfelelően a lézer irányába juttatja. A néhány milliméter vastagságú lézer előtt a sejtek egyesével haladnak át, és gerjesztődnek. A megvilágítás időtartama igen rövid, néhány mikro szekundum, így nagy sebességű analízis érhető el, akár néhány tízezer sejt/mp alatt is. Mérés során információt kapunk a sejtek nagyságáról (Forward scatter/FSC) és granuláltságáról (Side scatter/SSC). Továbbá detektáljuk a fluoreszcens markerrel kötött mintáink, festékre jellemző hullámhosszúságú emittált fény intenzitását is. A jeleket a detektorok gyűjtik, majd egy fotoelektron cső felsokszorozza (PMT), s végül digitális jellé alakítja (Analog-digitális konverter/ADC). Az áramlási citométer vezérlő szoftvere segítségével beállítjuk a kísérletre jellemző mérési paramétereket, felvesszük a kívánt dot blotokat és hisztogramokat, amiket megfelelő kapuzási stratégiával látunk el.

Antitestre konjugált fluoreszcens markerek								
	BV421	BV510	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7
1. kombináció			CD4	Gal-9	CD45*	CD25	FoxP3	
2. kombináció	PD-1		CD4	TIM-3	CD45*	CD25	FoxP3	
3. kombináció	PD-1	CD3	CD49b	Gal-9	CD45*		TIM-3	CD8
4. kombináció	PD-1	$\gamma/\delta$		Gal-9	CD45*		TIM-3	
5. kombináció	PD-1	CD3	CD107a	CD49b	CD45*		TIM-3	CD8

\* A CD45 antitestet a decidua sejtuszpenzió szubpopulációinak kikapuzásához használtuk.

### 3. táblázat: Kísérleteinkben alkalmazott antitest jelölési protokoll

### III.2.2. Panoramic Midi Scanner

Az immunológiai alapú eljárással megfestett metszeteket Panoramic Midi Scanner (3D Histech Ltd.) és a műszerhez ajánlott Case Viewer program segítségével digitalizáltuk és elemeztük. A szkennelő egy igen magas minőségű optikai műszer, mely méretéből adódóan igen kompakt, gyors és igen nagy felbontású 40x vagy 80x Carl Zeiss objektívvel rendelkezik. Kamerája 15MP-es képek készítésére alkalmas, továbbá három csatornás RGB (red green blue) LED fényforrással és számos filterrel is rendelkezik.

Az elemző programmal automatikusan beállítható a fókus, ami nagyban megkönnyíti a kamera pontos beállítását, illetve a szkennelést élőben is nyomon követhetjük a „show image” opció alkalmazásával. Előzetesen meghatározhatjuk a szkennelés pontos területét, abban az esetben, ha csak bizonyos szövet vagy minta részletre vagyunk kíváncsiak, meggyorsítva így a működési folyamatot. Az elkészült digitális képet könnyedén nagyíthatjuk, méretre vághatjuk, a kontrasztot módosíthatjuk és jpeg formában elmenthetjük. Továbbá az elemzés során lehetőségünk van egyszerre több képet is összehasonlítani.

### III.3. Módszerek

#### III.3.1. Állatmodellek

Kísérlet	A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben	Mifepriszton hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben	A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos egerekben
Egerek életkora	2 hónap	2 hónap	2 hónap
Egerek fajtája	BALB/c	BALB/c	CD1 és PACAP-hiányos
Egerek neme	Hím és nőstény	Hím és nőstény	Hím és nőstény
Egerek tartása	12 órás periódusú világos és sötét váltakozása	12 órás periódusú világos és sötét váltakozása	12 órás periódusú világos és sötét váltakozása
Hőmérséklet	20-22°C	20-22°C	20-22°C
Páratartalom	40-60 %	40-60 %	40-60 %
Egerek táplálása	Ad libitum	Ad libitum	Ad libitum
Egerek kezelése	Nincs	Kezelt: RU486 0,8 mg/kg Kontroll: PBS	Nincs
Etikai engedély	BA02/2000-20/2006, PTE	BA02/2000-7/2015, PTE	BA02/2000-24/2011, PTE

**4. táblázat:** Állatkísérleteink összefoglaló táblázata



### III.3.1.1 Etikai engedély

Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága engedélyezte (engedélyek száma: BA02/2000-20/2006, BA02/2000-7/2015, BA02/2000-24/2011) az állatok védelméről szóló 1998. évi XXVIII törvény alapján, figyelembe véve Európai Közösség Tanácsa 1986. november 24-én kelt irányelvét és a Helsinki Deklarációt is. Mindezek mellett mindent megtettünk annak érdekében, hogy minimalizáljuk a felhasznált állatok számát, és hogy a lehető legkevesebb szenvedést okozzuk az állatoknak.

### III.3.2. Egerek pároztatása

A kísérleteinkben 2 hónapos hím és nőstény egyedeket használtunk. Az állatok aktív éjszakai periódusát kihasználva esténként az egyedül tartott hímek mellé két nőstény egyed lett elhelyezve pároztatás céljából. Másnap kora reggel a nőstények hüvelyének ellenőrzésére került sor. A kopulációs dugó jelenléte esetén megjelöltük az adott állatot, s ezt követően két hétig elkülönített helyen tartottuk. Ezen időszak alatt folyamatosan ellenőriztük a nőstény egyedeket, s ha mutatták a vemhesség jeleit, felkészültünk a 14 és feledik napon a feldolgozásra vagy további kezelésre.

### III.3.3. Mifepriszton (RU-486) kezelés

Kísérleteink második részében a nőstény egereket vemhességük 14 és feledik napján PBS-ben oldott mifepriszton 0,8mg/kg/500µl dóziséval, intraperitoneálisan kezeltük, míg a kontroll egyedek kezelése 500 µl steril PBS-sel történt. A 24 órás kezelést követően az állatok leölésre kerültek.

#### III.3.4. A lép és a decidua izolálása

A cervikális diszlokációt követően a kísérleti egereket rögzítettük és előkészítettük a boncoláshoz. Az állat hasfalának preparálását követően, a hashártyát Y alakban átmetsztük. Az uteruszt és a magzatokat a dilatált méhnyak átmetszésével izoláltuk, majd a magzatok számát meghatároztuk, katalogizáltuk. Az uterusz hártvás szövete alatt feltártuk a magzatokat, s a hozzájuk kapcsolódó lencse alakú placentákat. A méhlepény külső domború része a decidua, amit óvatos mozdulattal körbemetsztünk, s eltávolítottunk, majd PBS-be helyeztünk. Ezt követően a bal bordaív alatt, a bal vese és a rekeszizom között elhelyezkedő lépet izoláltuk. A *vena lienalis* elválasztását követően, az esetleges zsíros szöveti részeket eltávolítottuk, majd PBS-be helyeztük.

#### III.3.5. Mononukleáris sejtek izolálása deciduális szövetből

A deciduát IV. típusú kollagenázzal, folyamatos keverés mellett, 37°C-on 30 percen keresztül emésztettük. Ezt követően a szuszpenziót különböző méretű (70µm és 40µm) sejtszűrőkön (BD Biosciences) szűrtük át és PBS-sel mostuk. Az antitesttel való jelöléshez a sejtszámot 1 millió/tesztre állítottuk, végül a jelölést megelőzően a kapott sejtsuszpenziót ismét átmostuk PBS-sel.

#### III.3.6. Mononukleáris sejtek izolálása lépből

Hasonlóan a deciduához a lépet is különböző méretű szűrők (70µm és 40µm) segítségével homogenizáltuk. Ezt követően Ficoll gradiens segítségével izoláltuk a mononukleáris sejteket, melyeket 1 millió/tesztre állítottuk be, majd a jelölést megelőzően PBS-sel átmostuk.

### III.3.7. Fluorokrómmal konjugált antitest jelölés

#### A mononukleáris sejtek sejtfelszíni jelölése

A sejteket 100µl PBS pufferben felfuszpendáltuk, majd fluorokrómmal konjugáltatott monoklonális antitestekkel jelöltük. Ezt követően szobahőmérsékleten, 30 percig inkubáltuk majd újabb PBS-es mosást követően a sejteket 1%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk. A jelölt mintákat az áramlási citometriás mérésig +4°C-on tároltuk.

#### FoxP3 intracelluláris jelölés

A sejtfelszíni jelölést követően a mintákat PBS-sel mostuk, majd a sejteket 1:3 arányban hígított permeabilizációs (eBioscience) oldatban inkubáltuk 60 percen keresztül +4°C-on. Ezt követően a mintákat 1:10 arányban hígított permeabilizációs mosó pufferrel kétszer mostuk. Az intracelluláris jelölést APC-vel konjugált anti-egér FoxP3 antitesttel (eBioscience) végeztük, 60 percig, +4°C-on. Ezt követően a sejtek kétszeri permeabilizációs mosó pufferrel történő mosása következett. Végül a sejteket 1%-os PFA-val fixáltuk és az áramlási citometriás mérésig +4°C-os hűtőben tároltuk.

#### CD107a degranulációs teszt

A CD107a molekula expressziójának mérésével határoztuk meg a sejtek aktivációs potenciálját. A felszíni jelölést megelőzően a sejteket 10% magzati borjú szérumot (FCS), 0,5 mg/ml ionomycin-t (Sigma-Aldrich) és 0,1 mg/ml Forbol-12-mirisztát-13-acetátot (PMA) (Sigma-Aldrich) tartalmazó Roswell Park Memorial Institute médiumban (RPMI 1640) szuszpendáltuk fel, és anti-CD107a antitest jelenlétében 37°C-on, 4 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a mintákat PBS-sel átmostuk, a felszíni jelölést elvégeztük, s végül +4°C-os hűtőbe helyeztük az áramlási citometriás analízisig.

### III.3.8. Galektin-9 immunhisztokémiai detektálása

Az egér placenták 24 órás paraformaldehides fixálást követően egy víztelenítési eljárás után, majd végül paraffinba ágyasztuk őket. A szövet blokkokból 4 µm vastag metszeteket készítettünk a hisztokémiai eljáráshoz. A protokoll első lépésében xilol oldattal deparaffináltuk a szövetet, majd egyre hígabb koncentrációjú alkoholos oldatokkal rehidratáltuk a mintákat. Egy rövid desztillált vizes mosást követően megkezdjük az antigén feltárást. A mintákat gyári TRS és citrát puffer 1:10 arányban hígított desztillált vizes oldatába helyeztük 20 percre +95°C-os vízfürdőben. Egy újabb desztillált vizes mosást követően az endogén peroxidázok gátlását végeztük el. Ehhez a lépéshez TBS hígított 3%-os hidrogén-peroxid oldatot készítettünk, amelyben mintáinkat 15 percig inkubáltuk. Az ismételt desztillált vizes mosást követően, 3x5 perces TBS+Tween (0,05%) pH 7,4 oldattal (TBST) történő mosást végeztünk. A metszetek előblokkolásához 3%-os BSA oldatot használtunk. Az előblokkolást 20 percig nedves kamrában végeztük. Ezt követően a mintákat a küvetába visszahelyeztük és 10 percig TBST-vel mostuk. A primer, biotinilált kecske anti-egér Galektin-9 antitestet (1:10) 1%-os TBST-ben hígítottuk, majd a mintákra rétegeztük, amiket 1 óráig nedves kamrában inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével egy ismételt TBST-s mosás következett. A szekunder antitestet, a Biotinilált Sztreptavidin Tormaperoxidáz Komplex-et (1:100) ráregeztük a metszetekre, majd 30 percig nedves kamrában inkubáltuk. A mosást követően a metszetek előhívását Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako) oldattal végeztük. A barnás színreakció megjelenését folyamatos mikroszkópos kontroll mellett 5-30 percen keresztül monitoroztuk. A szövetminták festődését ultratiszta vízzel állítottuk le, majd desztillált vízzel mostuk. A szöveti sejtek magfestését Mayer-féle hematoxilinnal végeztük, amit langyos csapvizes öblítéssel tovább kékítettünk. Lefedéshez és fixáláshoz glicerines zselatint alkalmaztunk.

### III.3.9. Áramlási citometriás eredmények értékelése

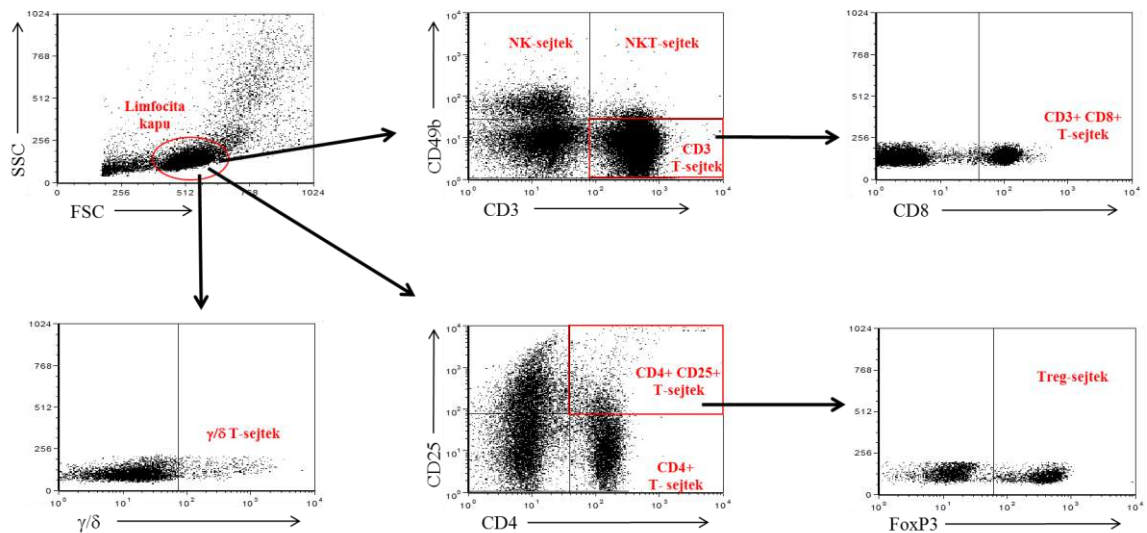
Kapuzási stratégia:

#### III.3.9.1. Perifériás immunsejt-populációk meghatározása

Az áramlási citometriás mérés során a limfocita sejtpopuláció a totál lépsejtszuspenzióból az FSC/SSC paraméterek alapján lett elkülönítve. Az általunk vizsgált immunsejt alpopulációk (szubpopulációk) azonosításához a kapott populációt további specifikus antitest kombinációk fluoreszcens jelének detektálásával azonosítottuk (5. táblázat) (14. ábra).

Immunsejt alpopulációk	Sejtfelszíni markerek alapján
NK-sejtek	CD49b+ CD3- sejtek
NKT-sejtek	CD49b+ CD3+ sejtek
Citotoxikus T-sejtek (CD8+ T)	CD3+ CD49b- CD8+ sejtek
Regulatórikus T-sejtek (Treg)	CD4+ CD25+ FoxP3+ sejtek
$\gamma/\delta$ T-sejtek	$\gamma/\delta$ T+ sejtek
Helper T-sejtek (CD4+ T)	CD25- CD4+ sejtek

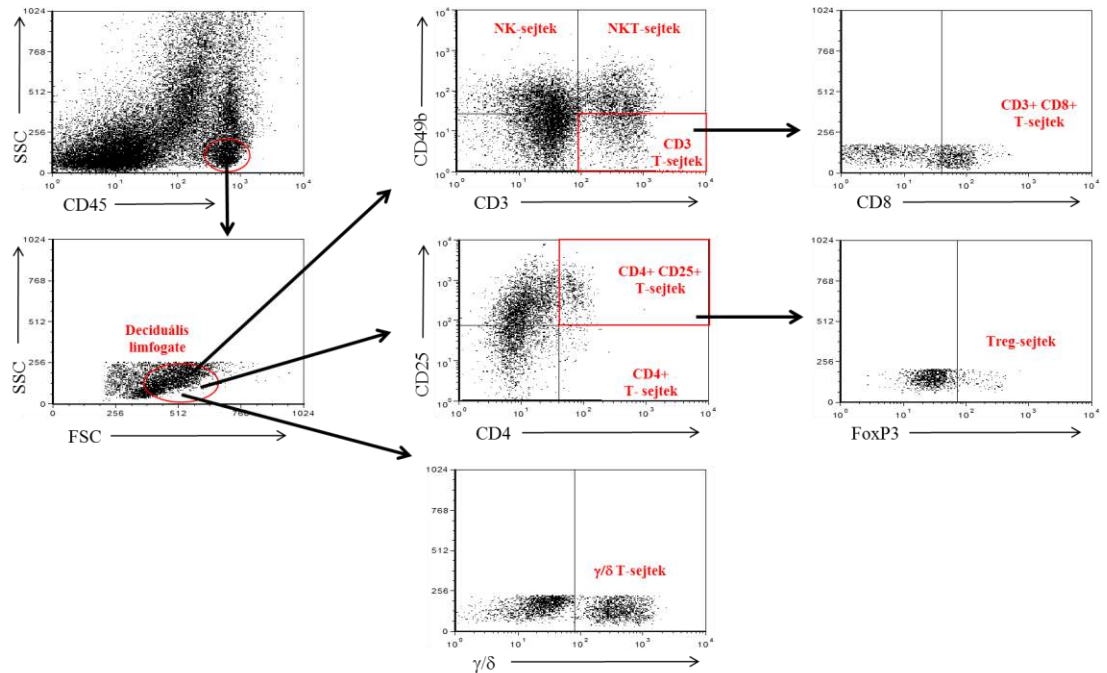
5. táblázat: Perifériás és decíduális immunsejt populációk azonosítása sejtfelszíni markereik alapján



14. ábra: Perifériás immunsejt populációk kapuzási stratégiája

### III.3.9.2. Deciduális immunsejt populációk meghatározása

Az áramlási citometriás mérés során a teljes decidua sejtuszuszenzióból elkülönítettük a CD45+ leukocita sejtpopulációt. A CD45+ sejteket tartalmazó populációkat tovább differenciáltuk specifikus antitestek fluoreszcens jelének detektálásával (15. ábra).



15. ábra: Deciduális immunsejt populációk kapuzási stratégiája

### III.3.10. Statisztikai analízis

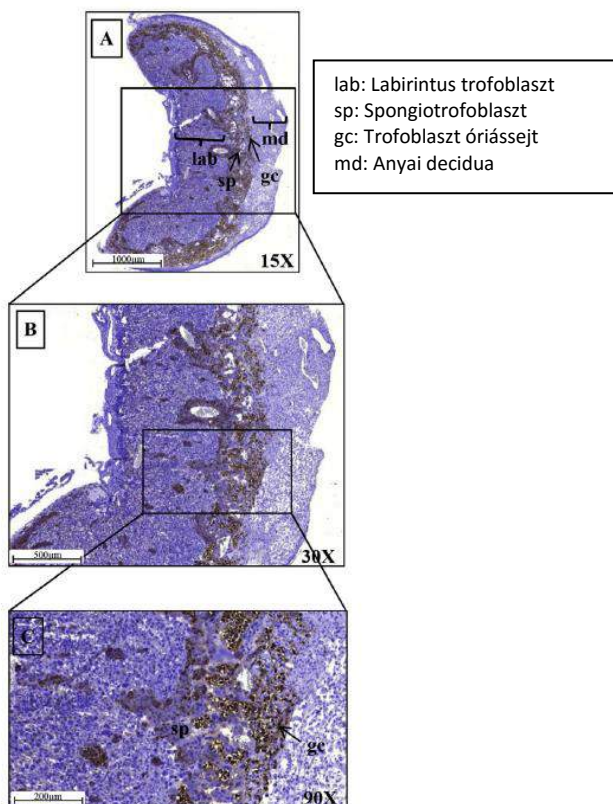
Az eredmények kiértékelését, illetve a statisztikai analízist parametrikus Student t-próbával, illetve nem parametrikus Mann-Whitney U teszttel, továbbá Bonferroni korrekciójú egyutas varianciaanalízissel végeztük SPSS V23. szoftver (IBM Corp.) segítségével. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték kisebb vagy egyenlő volt, mint 0,05.

## IV. Eredmények

### IV.1. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben

#### IV.1.1. Gal-9 immunhisztokémiai kimutatása egér placentában

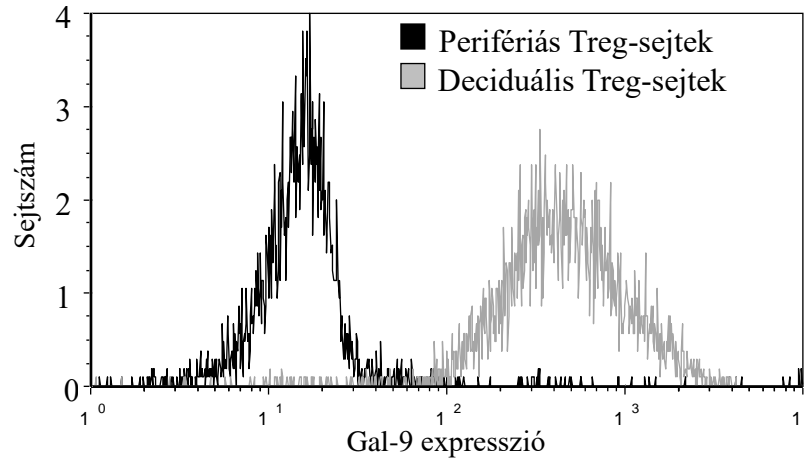
Immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk meg a 14 és fél napos vemhes egerek placentájában a fetomaternalis határ Gal-9 expresszióját. Eredményeink alapján a placenta óriás sejtjeiben és spongiotrofoblaszt rétegében mutatható ki Gal-9 pozitivitás. A metszetek elemzése során leírtuk, hogy az óriás sejtek lényegesen erőteljesebb Gal-9 pozitivitást mutattak, mint a spongiotrofoblaszt rétegben lévő egyéb sejtek. Az analízist a 3DHISTECH által forgalmazott Panoramic Desk szkennelvel, s a hozzá tartozó Panoramic viewer szoftverrel végeztük (**16. ábra**).



**16. ábra:** BALB/c egér placenta immunhisztokémiai festése anti-Gal-9 antitesttel

#### IV.1.2. Treg-sejtek Gal-9 expressziója vemhes egér lépében és decíduájában

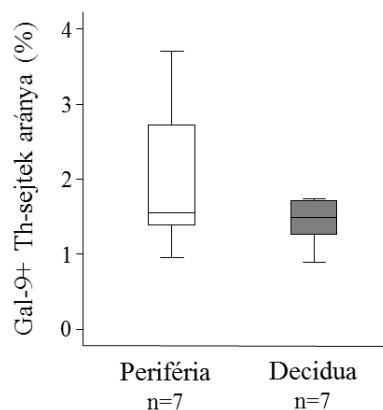
Kísérleteink során összehasonlítottuk a Treg-sejtek Gal-9 expresszióját vemhes egerek lépében és decíduájában. A decíduális Treg-sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálták a Gal-9 molekulát, mint a perifériás Treg-sejtek (**17. ábra**).



**17. ábra:** Perifériás és decíduális Treg-sejtek Galektin-9 expressziója 14 és fél napos vemhes egerekben. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

#### IV.1.3. Gal-9 pozitív Th-sejtek aránya vemhes egér lépében és decíduájában

A Gal-9 pozitív Th-sejtek aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a periférián a decíduához képest (**18. ábra**).

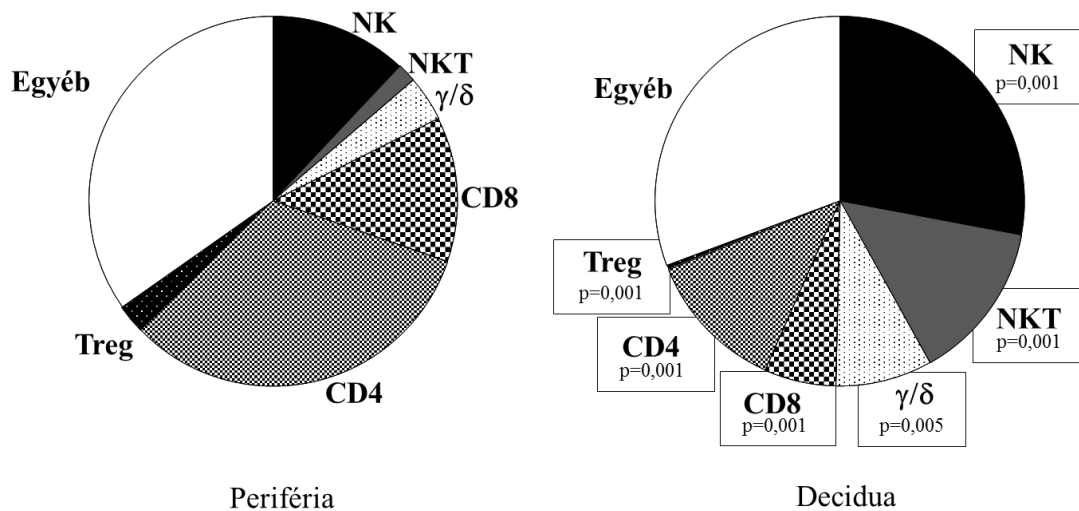


**18. ábra:** Gal-9+ Th-sejtek aránya 14 és fél napos vemhes egér lépében és decíduájában. Az ábrákon a bokszt plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .



#### IV.1.4. Lép és decidua mononukleáris sejtjeinek fenotípusos analízise egér vemhesség 14 és feledik napján

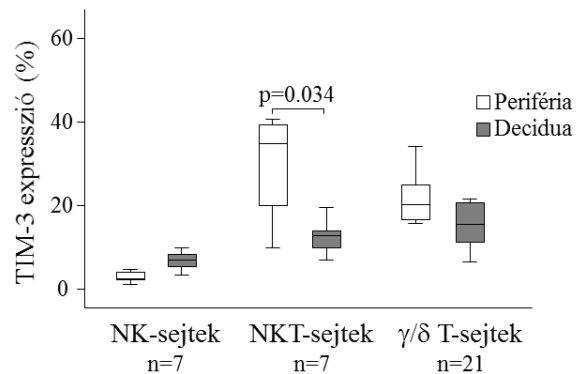
Megvizsgáltuk a CD4+ T-, CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, Treg-, NK- és NKT-sejtek előfordulási arányát vemhes egerek lépében és deciduájában. A decidua  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtjeinek aránya szignifikánsan emelkedett a perifériához képest, ezzel szemben a decidua CD4+ T-, CD8+ T- és Treg-sejtjeinek aránya szignifikáns csökkenést mutatott (19. ábra).



**19. ábra:** 14 és fél napos vemhes egér lép és decidua mononukleáris sejtjeinek fenotípusos elemzése. A kördiagram az egyes szubpopulációk előfordulási arányát reprezentálja a két vizsgált szövetben. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

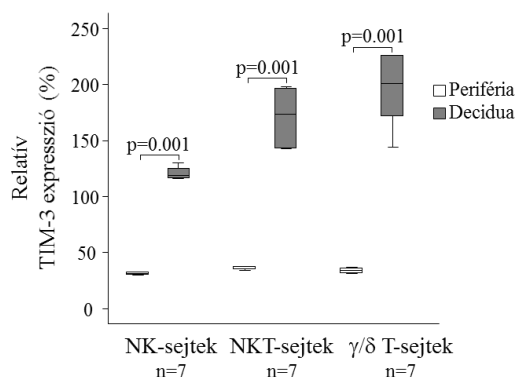
#### IV.1.5. Vemhes egér lép és decidua mononukleáris sejtjeinek TIM-3 és PD-1 expressziója

A különböző limfocita populációk TIM-3 expresszióját áramlási citométerrel határoztuk meg. A deciduális NKT-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a perifériához képest. A lép és a decidua NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtjein statisztikai különbséget nem mértünk (**20. ábra**).



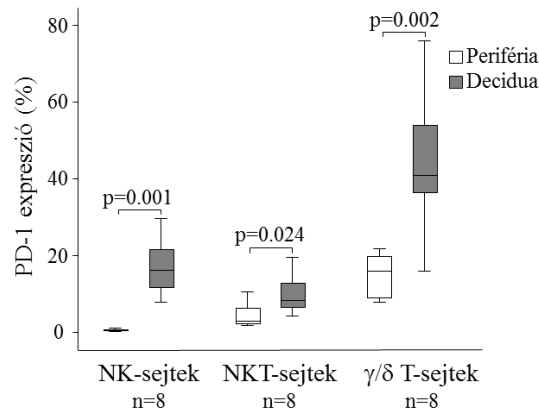
**20. ábra:** TIM-3 expresszió vizsgálata 14 és fél napos vemhes egér lép és decidua mononukleáris sejtjein. Az ábrákon a boksziplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

A deciduális NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek relatív TIM-3 expressziója (sejtszintű receptor denzitás) szignifikáns emelkedést mutatott a perifériához képest (**21. ábra**).



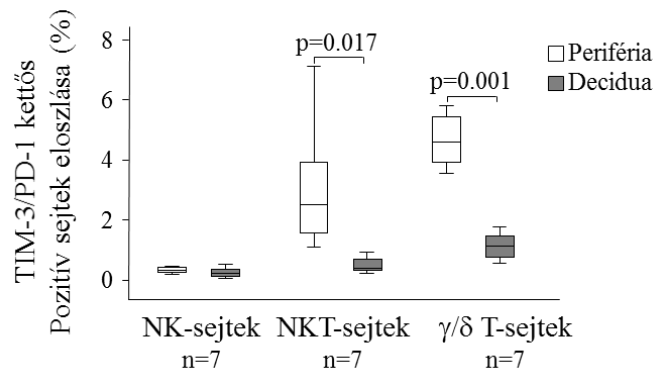
**21. ábra:** Relatív TIM-3 expresszió 14 és fél napos vemhes egér perifériás és deciduális NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtjein. Az ábrákon a boksziplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

A deciduális NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejteken szignifikánsan emelkedett a PD-1 expresszió a perifériához képest (**22. ábra**).



**22. ábra:** PD-1 expresszió 14 és fél napos vemhes egér perifériás és deciduális NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtjein. Az ábrákon a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

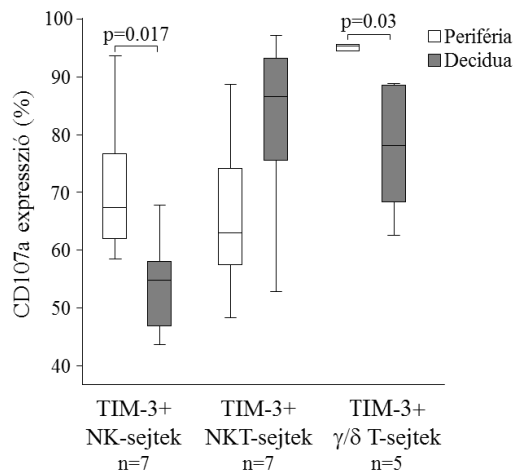
A deciduális TIM-3/PD-1 kettős pozitív NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek eloszlása szignifikáns csökkenést mutatott a perifériához képest, ugyanakkor TIM-3/PD-1 kettős pozitív NK-sejtek esetében szignifikáns különbség nem volt detektálható (**23. ábra**).



**23. ábra:** TIM-3/PD-1 kettős pozitív sejtek eloszlása 14 és fél napos vemhes egér perifériás és deciduális NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtjein. Az ábrákon a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

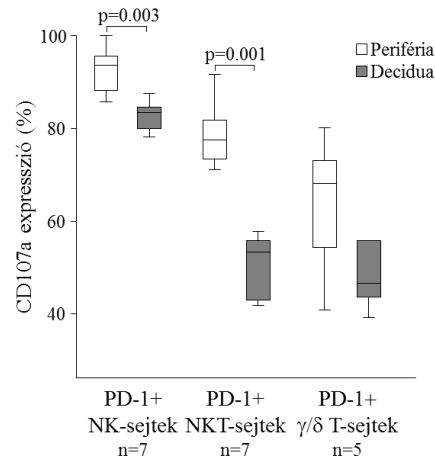
#### IV.1.6. Deciduális és lép immunsejtek citotoxikus aktivitásának vizsgálata

A sejtek citotoxikus aktivitását CD107a expresszió vizsgálatával mértük. A deciduális TIM-3+ NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek szignifikánsan alacsonyabb CD107a expressziót mutattak, összehasonlítva a perifériás sejtekkel. A decida TIM-3+ NKT-sejtjei CD107a expresszió növekedést mutattak a perifériához képest, bár ezen eredmények nem mutattak statisztikai különbséget (**24. ábra**).



**24. ábra:** TIM-3+ NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek CD107a expressziója vemhes egér lépében és deciduájában. Az ábrákon a boksplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

A deciduális PD-1+ NK- és NKT-sejtek citotoxikus aktivitása csökkent a perifériás sejtekhez képest. Habár a deciduális PD-1+  $\gamma/\delta$  T-sejtjein alacsonyabb citotoxikus aktivitás mérhető a perifériához képest, a különbség nem volt szignifikáns (**25. ábra**).

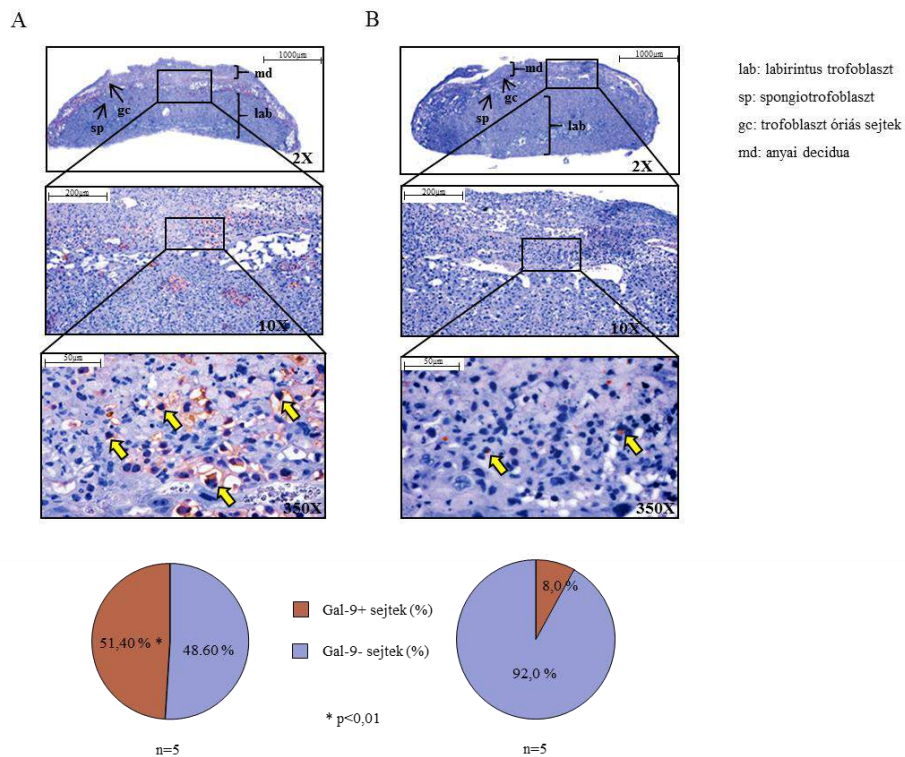


**25. ábra:** PD-1+ NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek CD107a expressziója vemhes egér lépében és deciduájában. Az ábrákon a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

## IV.2. Mifepriszton hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben

### V.2.1. Gal-9 immunhisztokémiai kimutatása mifeprisztonnal kezelt és kezeletlen vemhes egerek placentáiban

Vizsgálataink során a kezeletlen vemhes egerek placentáinak a spongiotrofoblaszt rétegében és az óriás sejtjeiben mutattuk ki a Gal-9 expressziót (**26. ábra/A**). Az óriás sejtek erőteljesebb festődést mutattak, mint a spongiotrofoblaszt réteg sejtjei. A Gal-9 pozitív sejtek számának meghatározásakor azt tapasztaltuk, hogy a mifepriszton kezelt egerek esetében ezen sejtek száma szignifikáns csökkenést mutatott a kezeletlen egerekhez képest (**26. ábra/B**).



**26. ábra:** Kezeletlen és mifepriszton kezelt egér placenta Gal-9 expressziójának kimutatása immunhisztokémiai festéssel. **A:** Kezeletlen, egészséges, kontrol placenta. **B:** Mifepriszton kezelt placenta. A sárga nyilak jelzik a Gal-9+ sejteket (nagyítás 350x). A kördiagrammok demonstrálják a Gal-9+ sejtek arányát a két csoportban. A metszetek digitalizálása a 3DHISTECH által forgalmazott Panoramic Desk Szkennerrel történt, számítógépes elemzése pedig a hozzá tartozó Panoramic viewer szoftverrel készült. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

## V.2.2. Mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egér perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek fenotípusos analízise

Elsőként a CD4+ T-, CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, Treg-, NK- és NKT-sejtek előfordulási arányát határoztuk meg kezelt és kezeletlen egerek lépében, valamint deciduális szövetében. Kezelt egerek esetében sem a deciduában, sem a periférián nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az immunsejtek fenotípusos arányának megoszlásában a kontroll csoporthoz képest. A deciduális CD4+ T-, CD8+ T- és Treg-sejtek aránya szignifikáns csökkenést mutatott a perifériához képest, míg a deciduális  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtek aránya szignifikánsan emelkedett a perifériához képest, mindkét egércsoportban (**6. táblázat**).

	Periféria (n=12)		Decidua (n=12)	
	Mifepriszton kezelt egér	Kezeletlen egér	Mifepriszton kezelt egér	Kezeletlen egér
CD4+ T-sejtek	40,70±1,85	35,90±2,06	8,36±1,30	10,00±1,50
CD8+ T-sejtek	13,43±0,88	13,61±0,89	3,46±0,92	4,85±0,72
$\gamma/\delta$ T-sejtek	3,78±0,48	4,57±0,56	16,55±2,61	14,56±2,93
Treg-sejtek	2,71±0,36	2,67±0,23	1,07±0,28	0,39±0,05
NK-sejtek	11,14±0,85	12,36±0,51	24,77±1,18	28,16±1,37
NKT-sejtek	1,80±0,26	1,76±0,16	17,77±4,00	14,38±1,34

**6. táblázat:** Mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek immunfenotípusos analízise.

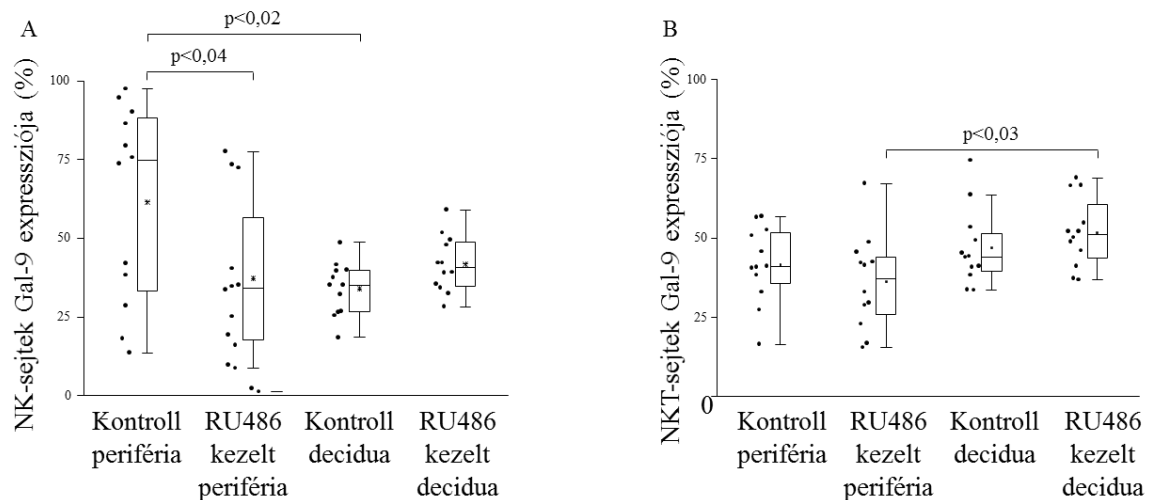
A statisztikai összehasonlítást Bonferroni korrekciójú egyutas ANOVA teszttel végeztük. Az eredmények az átlag értékeket mutatják± standard deviáció. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

### IV.2.3. Deciduális és perifériás mononukleáris sejtek Gal-9 expressziójának vizsgálata mifeprisztin kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerekben

Következő lépésben a kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális NK-, NKT-,  $\gamma/\delta$  T-, CD4+ T- és Treg-sejtjeinek Gal-9 expresszióját hasonlítottuk össze. A kezeletlen egerek deciduális CD4+ T- és Treg-sejtjein szignifikánsan magasabb Gal-9 expressziós értéket mértünk a perifériához képest (**27. ábra/D,E**), míg a deciduális NK-sejtek Gal-9 expressziója szignifikáns csökkenést mutatott összehasonlítva a perifériával (**27. ábra/A**). Összevetve a deciduális és perifériás NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek Gal-9 expresszióját szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk (**27. ábra/B,C**).

Mifeprisztin kezelt egerek deciduális NKT-,  $\gamma/\delta$  T-, CD4+ T- és Treg-sejtjeinek Gal-9 expressziója szignifikánsan emelkedett a kezelt egerek perifériájához képest (**27. ábra/B,C,D,E**), míg a deciduális NK-sejtek Gal-9 expressziója nem mutatott változást a perifériával szemben (**27. ábra/A**).

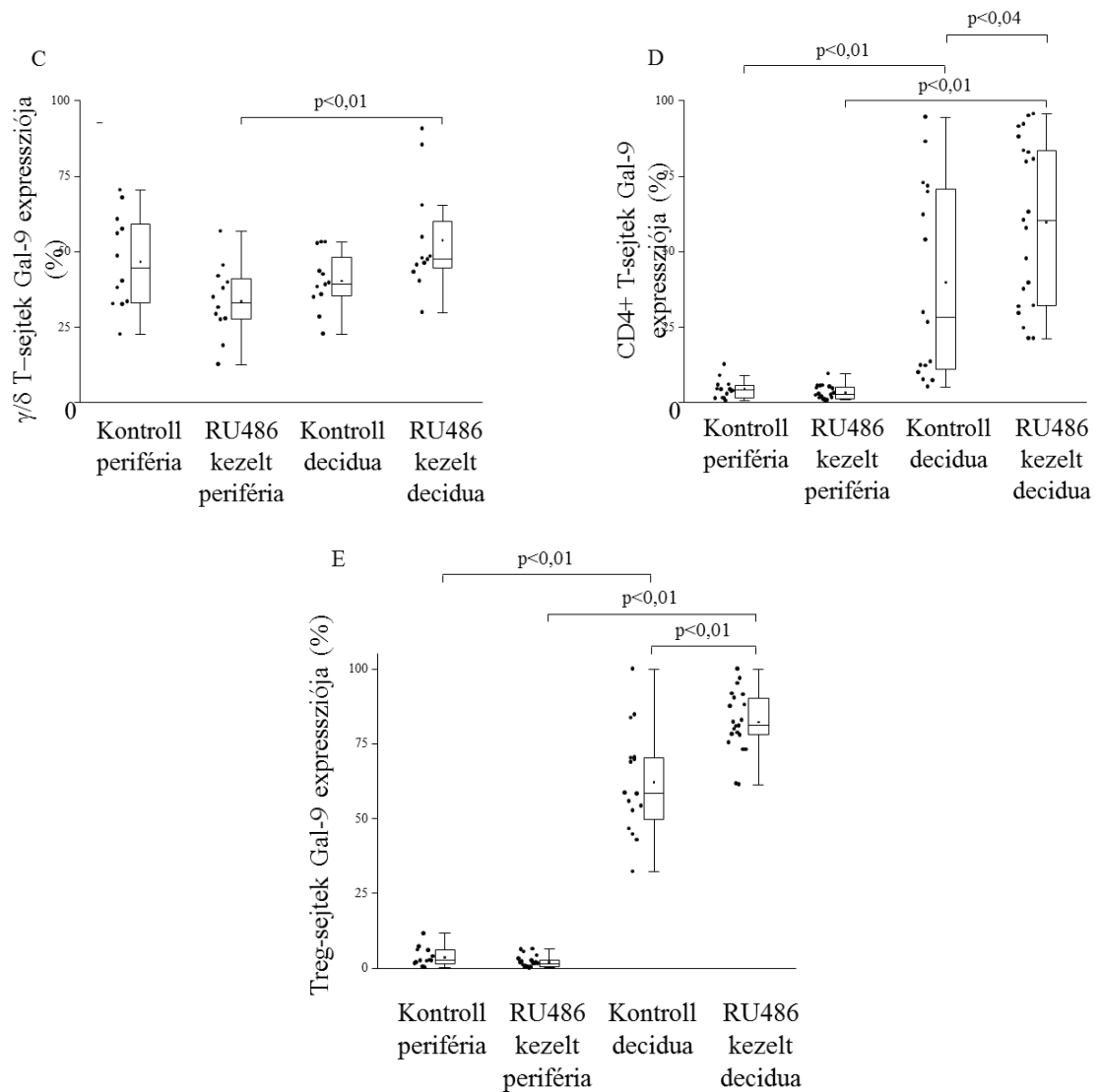
Hasonló eredményt kaptunk a kezelt csoport deciduális CD4+ T- és Treg-sejtjeinél, ahol azok Gal-9 expressziója szignifikánsan magasabb volt, összehasonlítva a kezeletlen deciduális sejtekkel (**27. ábra/D,E**). A kezelt egerekben a perifériás NK-sejtek Gal-9 expressziója szignifikánsan csökkent a kontroll csoport perifériás sejtjeihez képest (**27. ábra/A**).



**27. ábra:** Gal-9 expresszió vizsgálata mifeprisztin kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjein.

**A:** NK-sejtek Gal-9 expressziója. **B:** NKT-sejtek Gal-9 expressziója.





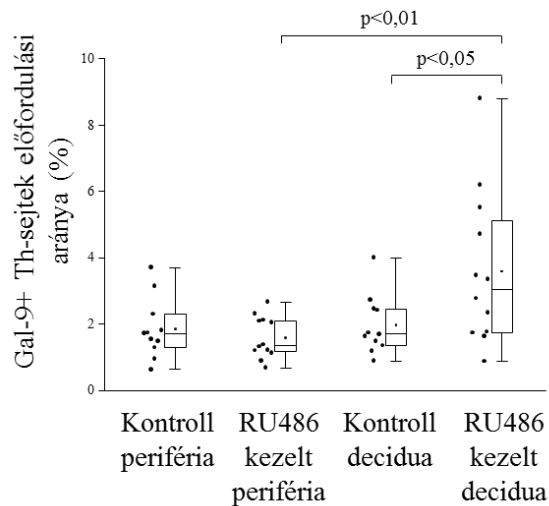
**27. ábra:** Gal-9 expresszió vizsgálata mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjein.

**C:**  $\gamma/\delta$  T-sejtek Gal-9 expressziója. **D:** CD4+ T-sejtek Gal-9 expressziója. **E:** Treg-sejtek Gal-9 expressziója.

Az ábrákon a boksziplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

#### IV.2.4. Mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek deciduális és perifériás Gal-9+ Th-sejtjeinek megoszlása

Kísérleteink folytatásában a kezelt és kezeletlen csoportok perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek megoszlási arányát hasonlítottuk össze. A mifepriszton kezelt egerek deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulása szignifikánsan nagyobb a kezelt perifériájához, illetve a kontroll deciduájához képest (**28. ábra**).



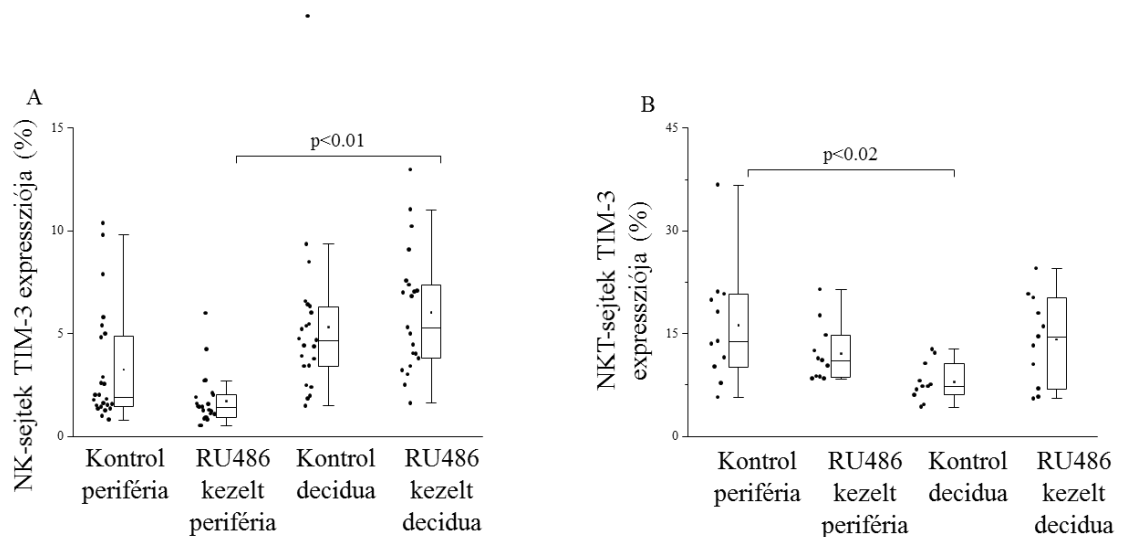
**28. ábra:** Mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulási aránya

Az egyes értékek a mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulási arányát mutatják. Az ábrán a boksplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha a p értéke  $\leq 0,05$ .

#### IV.2.5. Mifepriszton kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek TIM-3 expressziója

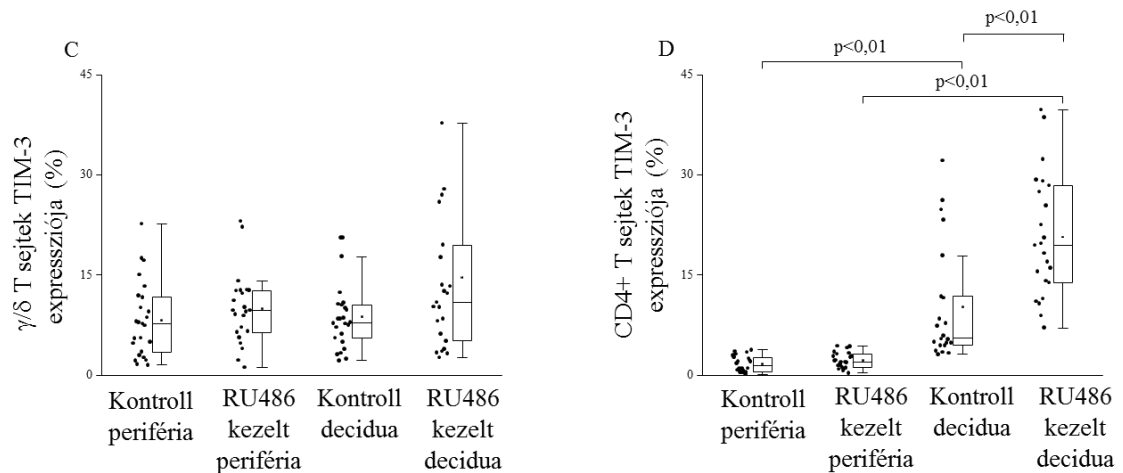
Kísérletünk következő részében a mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális NK-, NKT-,  $\gamma/\delta$  T- és CD4+ T-sejtjeinek TIM-3 expresszióját hasonlítottuk össze.

A mifepriszton kezelt deciduális NK-sejtek TIM-3 expressziója szignifikáns emelkedést mutatott a perifériához képest (**29. ábra/A**). Ezzel ellentétben a kezeletlen deciduális NKT-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan csökkent a perifériához képest (**29. ábra/B**). Szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kezelt és kezeletlen csoportok deciduális CD4+ T-sejtek receptor expresszióját illetően a perifériához képest (**29. ábra/C**). A  $\gamma/\delta$  T-sejtek esetében pedig nem tudtunk kimutatni statisztikai különbséget a kezelt és kezeletlen egyedek perifériája és deciduája között (**29. ábra/D**).



**29. ábra:** TIM-3 expresszió vizsgálata mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjein.

**A:** NK-sejtek TIM-3 expressziója. **B:** NKT-sejtek TIM-3 expressziója.



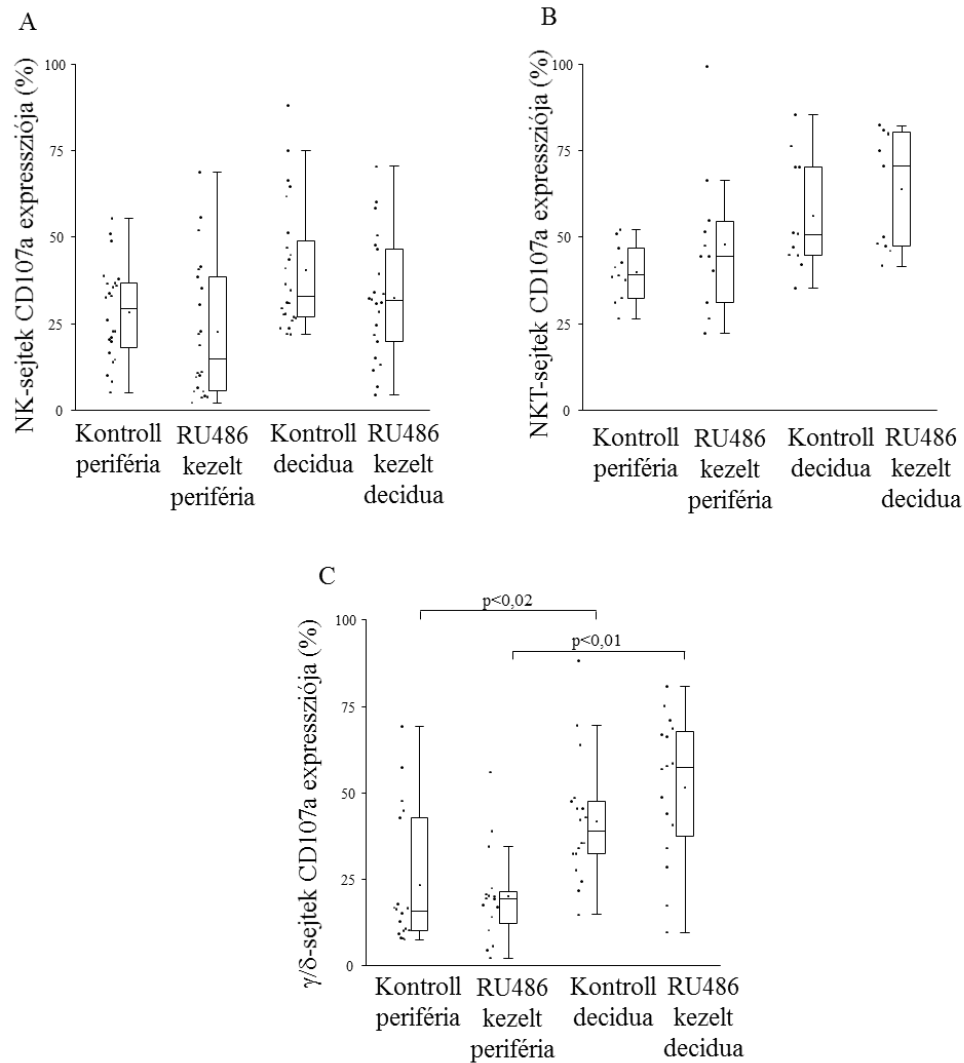
**29. ábra:** TIM-3 expresszió vizsgálata mifepriszon kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjein.

**C:**  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója. **D:** CD4+ T-sejtek TIM-3 expressziója.

Az ábrákon a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

#### IV.2.6. Mifepriszon kezelt és kezeletlen 14 és fél napos vemhes egerek deciduális és perifériás NK-, NKT-, $\gamma/\delta$ T-sejtjeinek CD107a expressziója

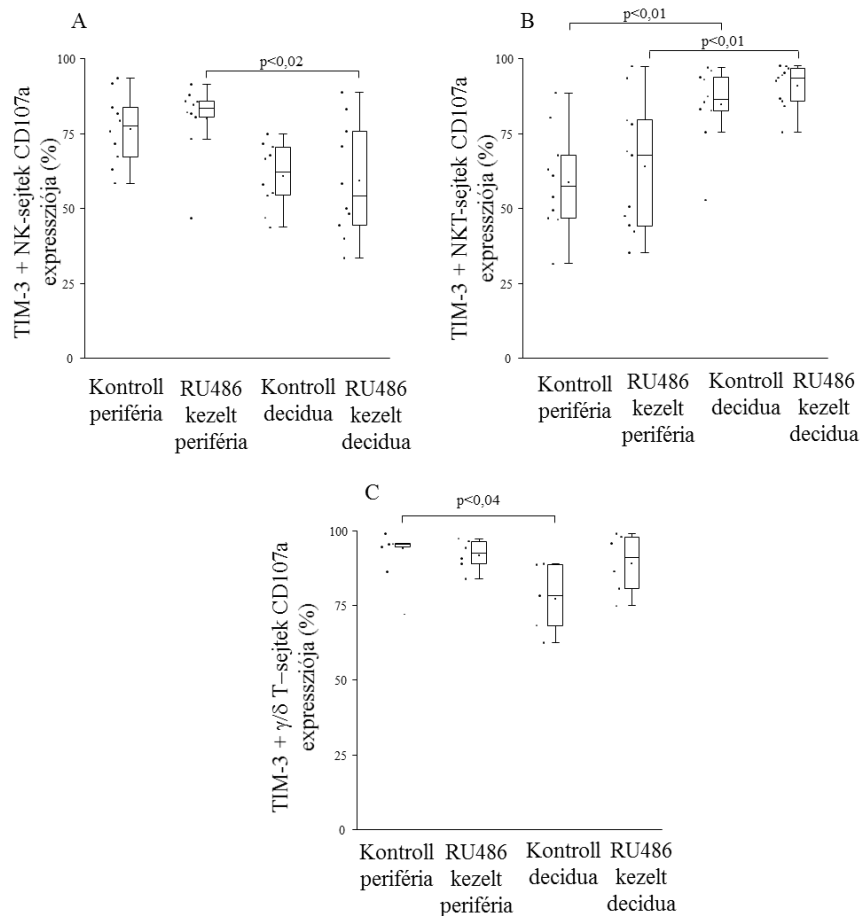
A deciduális és perifériás mononukleáris sejtek citotoxikus aktivitásának összehasonlításához a CD107a degranulációs markert használtunk. A kezeletlen egerek deciduális NK- és NKT-sejtjeinek cytotoxicitása nem mutatott szignifikáns különbséget (**30. ábra/A,B**). Mind a mifepriszon kezelt, mind a kezeletlen egerek deciduális  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek CD107a expressziója viszont szignifikánsan emelkedett a perifériához képest. (**30. ábra/C**).



**30. ábra:** Mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és deciduális NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek CD107a expressziója.

**A:** NK-sejtek CD107a expressziója. **B:** NKT-sejtek CD107a expressziója. **C:**  $\gamma/\delta$  T-sejtek CD107a expressziója. Az ábrán a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

A decíduális NK-sejtek CD107a expressziója szignifikánsan csökkenést mutatott a mifepriszton kezelt egerek perifériájához képest (**31. ábra/A**), míg mifepriszton kezelt decíduális TIM-3+ NKT-sejtek CD107a expressziója szignifikánsan emelkedett. Továbbá a kezeletlen egerek decíduális NKT-sejtjeinek CD107a expressziója szignifikánsan növekedett a perifériával szemben (**31. ábra/B**). A kezeletlen egerek decíduális TIM-3+  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek CD107a expressziója szignifikánsan csökkent a perifériához képest (**31. ábra/C**).



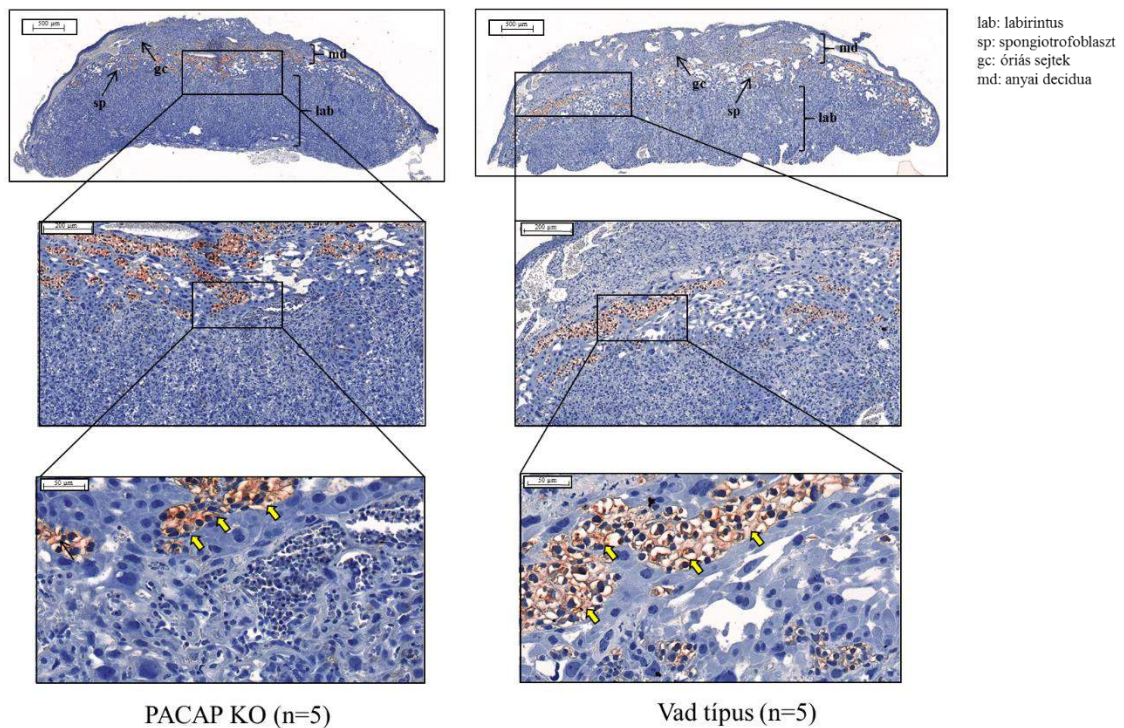
**31. ábra:** Mifepriszton kezelt és kezeletlen vemhes egerek perifériás és decíduális TIM-3+ NK-, NKT-,  $\gamma/\delta$  T-sejtek CD107a expressziója.

**A:** TIM-3+ NK-sejtek CD107a expressziója. **B:** TIM-3+ NKT-sejtjek CD107a expressziója. **C:** TIM-3+  $\gamma/\delta$  T-sejtjek CD107a expressziója. Az ábrán a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha  $p$  értéke  $\leq 0,05$ .

### IV.3. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata PACAP-hiányos és vad típusú (CD1) egerekben

#### IV.3.1. Gal-9 immunhisztokémiai kimutatása PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek placentáiban

PACAP-hiányos és egészséges, vad típusú vemhes egerek placentájának immunhisztokémiai vizsgálata során kimutattuk, hogy a spongiotrofoblaszt, valamint a citoplazma óriássejtjein jelen van a Gal-9 molekula. A trofoblaszt óriássejtek Gal-9 expressziója intenzívebb expressziót mutatott, összehasonlítva a spongiotrofoblaszt rétegével, ugyanakkor a PACAP-hiányos vemhes egerek placentája nem mutatott jelentős különbséget Gal-9 expresszióban a vad típushoz képest (**32. ábra/A**).



**32. ábra:** PACAP-hiányos és vad típusú egér placenta Gal-9 kimutatása immunhisztokémiai festéssel. A nyilak a Gal-9+ sejteket jelölik. Az analízis a 3DHISTECH által forgalmazott Panoramic Desk Szkennerrel, s a hozzá tartozó Panoramic viewer szoftverrel történt.

#### IV.3.2. PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek deciduális és perifériás sejtjeinek immunfenotípusos analízise

A fenotípusos analízis során a perifériás és deciduális CD4+ T-, CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, Treg-, NK- és NKT-sejtek vizsgáltuk. A PACAP-hiányos és a vad típusú egerek deciduális  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtjeinek aránya szignifikánsan emelkedett a perifériához képest. A deciduális CD4+ T- és CD8+ T-sejtek száma szignifikáns csökkenést mutatott a perifériához képest mindkét egér csoportban. A PACAP-hiányos egerek perifériás Treg- és CD4+ T-sejtjeinek aránya szignifikánsan magasabb, mint a deciduában. A vad típus perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek aránya ugyanakkor alacsonyabb, összehasonlítva a vad típus deciduájában mértékkel. (7. táblázat)

	Periféria		Decidua	
	PACAP-hiányos egerek (n=14)	Vad típusú egerek (n=13)	PACAP-hiányos egerek (n=14)	Vad típusú egerek (n=13)
CD4+ T-sejtek	30,66±5,08	25,32±3,23	8,00±6,02	6,94±2,76
CD8+ T-sejtek	10,51±3,48	7,93±2,20	2,19±1,45	2,32±1,20
$\gamma/\delta$ T-sejtek	3,85±1,56	4,02±1,77	57,90±19,03	39,94±19,2
Treg-sejtek	1,67±0,65	1,37±0,67	0,81±0,47	1,02±1,07
NK-sejtek	10,17±5,03	9,40±4,01	22,58±7,23	24,78±6,34
NKT-sejtek	1,32±0,87	0,72±0,39	10,12±8,34	6,24±4,07
Gal-9+ Th-sejtek	1,36±0,76	1,35±1,37	9,31±5,31	4,93±2,78

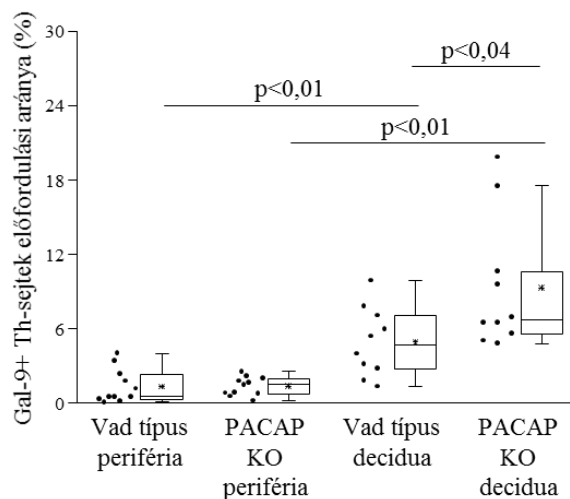
**7. táblázat:** PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek immunfenotípusos analízise.

A statisztikai összehasonlítást Bonferroni korrekciójú egyutas ANOVA teszttel végeztük. Az eredmények az átlag értékeket mutatják± standard deviáció. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .



### IV.3.3. PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulási aránya

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a PACAP-hiányos és a vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek arányát, amely során elsőként demonstráltuk a PACAP-hiányos egerek deciduális Gal-9+ Th-sejtjei arányának szignifikáns növekedését a vad típusú egyedekéhez képest. A vad típusú és a PACAP-hiányos egerekben egyaránt szignifikáns emelkedést mutatott a deciduális Gal-9+ Th-sejtek frekvenciája a perifériához képest (**33. ábra**).



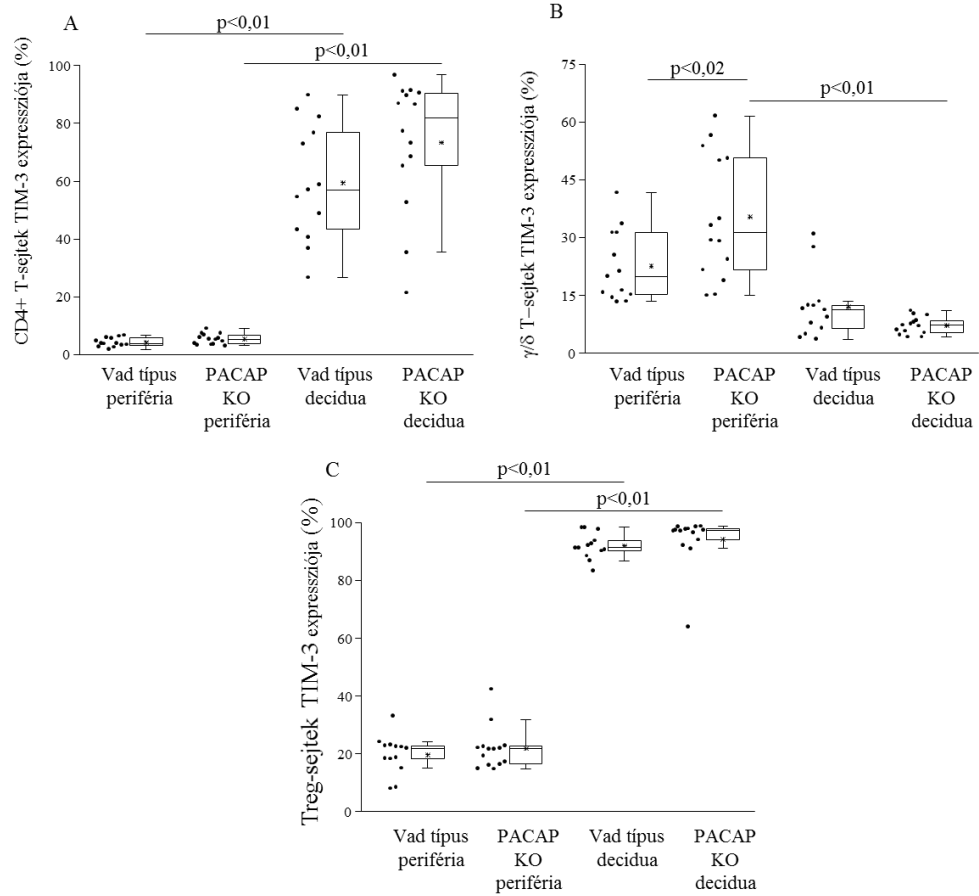
**33. ábra:** Vad típusú és PACAP-hiányos 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulási aránya.

Az egyes értékek a vad típusú és PACAP-hiányos 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek előfordulási arányát mutatják. Az ábrán a boks plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

#### IV.3.4. PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek perifériás és deciduális mononukleáris sejtjeinek TIM-3 és PD-1 expressziója

Kísérletünk folytatásában a PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és deciduális CD4+ T-, CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, Treg-, NK- és NKT- sejtek TIM-3 expresszióját hasonlítottuk össze. A PACAP-hiányos és vad típusú egerek deciduális CD4+ T- és Treg-sejtjeinek TIM-3 expressziója szignifikánsan magasabb a periférián mért értékhez képest. A PACAP-hiányos egerek deciduális  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek TIM-3 expressziója szignifikánsan csökkent a perifériához képest, míg a PACAP-hiányos egerek perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek receptor expressziója emelkedést mutatott a vad típus perifériájához képest (**34. ábra/A,B,C**).

Statisztikai különbséget a perifériás és a deciduális CD8+ T-, NK- és NKT-sejtek TIM-3 expressziójában nem találtunk.

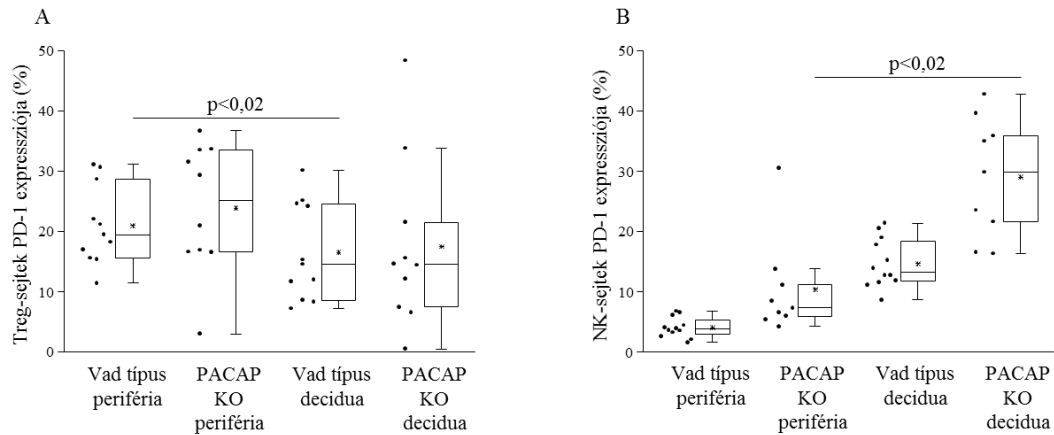


**34. ábra:** Vad típusú és PACAP-hiányos 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és decíduális CD4+ T-,  $\gamma/\delta$  T- és Treg-sejtek TIM-3 expressziója.

**A:** CD4+ T-sejtek TIM-3 expressziója. **B:**  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója. **C:** Treg-sejtek TIM-3 expressziója. Az ábrán a boksziplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

A vad típusú vemhes egerek decíduális Treg-sejtjeinek PD-1 expressziója csökkenést mutatott a perifériához képest, ugyanakkor szignifikáns emelkedést mértünk a PACAP-hiányos egerek decíduális NK-sejtjeinek PD-1 expressziójában a periférián mért értékhez képest (**35. ábra/A,B**).

Statisztikai különbséget a CD4+ T-, CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T- és NKT-sejtek PD-1 expressziós értékeiben nem találtunk.

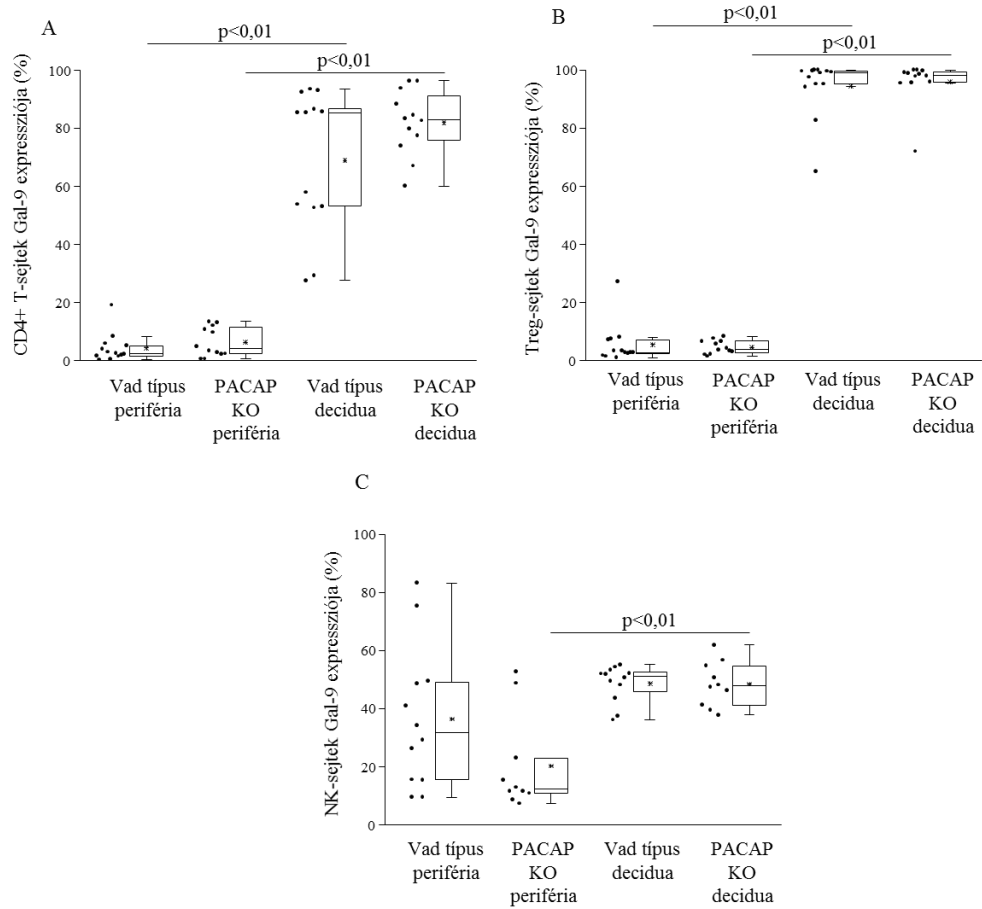


**35. ábra:** PACAP-hiányos és vad típusú 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és decíduális Treg- és NK-sejtek PD-1 expressziója.

**A:** Treg-sejtek PD-1 expressziója. **B:** NK-sejtek PD-1 expressziója. Az ábrán a bokszt plotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

#### IV.3.5. PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek perifériás és decíduális mononukleáris sejtjeinek Gal-9 expressziója

Kísérleteink következő részeként az egyes limfocita szubpopulációk sejt felszíni Gal-9 expresszióját határoztuk meg. A PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek decíduális CD4+ T- és Treg-sejtek Gal-9 expressziója szignifikánsan emelkedett a perifériájukhoz képest. A PACAP-hiányos egerek decíduális NK-sejtjeinek Gal-9 expressziója ugyancsak emelkedést mutatott a periférián mért értékhez képest (**36. ábra/A,B,C**).



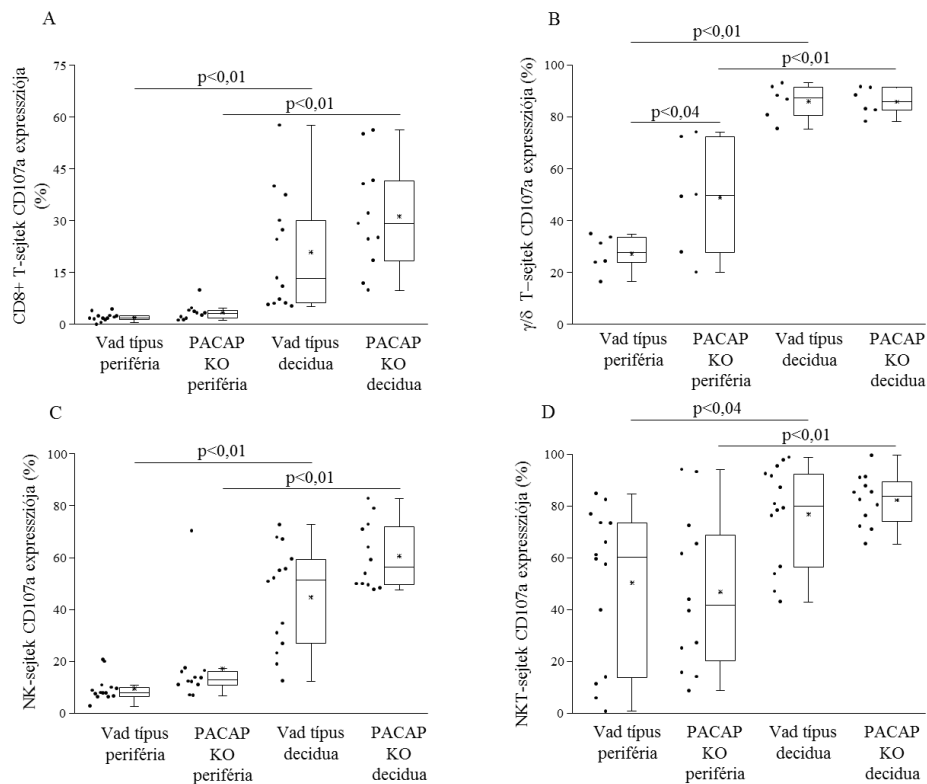
**36. ábra:** Vad típusú és PACAP-hiányos 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és decíduális CD4+ T-, Treg- és NK-sejtek Gal-9 expressziója

**A:** CD4+ T-sejtek Gal-9 expressziója. **B:** Treg-sejtek Gal-9 expressziója. **C:** NK-sejtek Gal-9 expressziója. Az ábrán a boksplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha  $p$  értéke  $\leq 0,05$ .

IV.3.6. PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egerek perifériás és decíduális CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtjeinek citotoxikus aktivitása

A decíduális és perifériás mononukleáris sejtek citotoxikus aktivitását a CD107a degranulációs marker expressziójával határoztuk meg. A PACAP-hiányos és vad típusú vemhes egereknél a decíduális CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtek citotoxikus aktivitása szignifikánsan emelkedett a perifériához képest (**37. ábra/A,B,C,D**).

Továbbá a PACAP-hiányos egerek perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejtjeinek CD107a expressziója szignifikánsan magasabb értéket mutatott, összehasonlítva a vad típusú egereknél mért értékekkel (**37. ábra/B**).



**37. ábra:** Vad típusú és PACAP-hiányos 14 és fél napos vemhes egerek perifériás és decíduális CD8+ T-,  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtek CD107a expressziója.

**A:** CD8+ T-sejtek CD107a expressziója. **B:**  $\gamma/\delta$  T-sejtek CD107a expressziója. **C:** NK-sejtek CD107a expressziója. **D:** NKT-sejtek CD107a expressziója. Az ábrán a boksplotok az interkvartilis tartományt jelölik, s a vízszintes vonalak szemléltetik a medián értékeket, a jelölt pontok pedig az egyes értékeket. Az interkvartilis tartományból induló függőleges vonalak a szélsőértékeket prezentálják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha p értéke  $\leq 0,05$ .

## V. Diszkusszió

### V.1. TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben

Az evolúciós fejlődés során immunrendszerünk megtanulta felismerni a körülöttünk levő és bennünket alkotó struktúrákat. Ennek köszönhető, hogy a szervezetünkben megtalálható számos sejttípus és velük összehangoltan működő mechanizmusok együtt képesek a felismert struktúrákra toleranciával vagy immunválasszal reagálni. Ez a bonyolult és összetett rendszer biztosítja a kórokozókkal szembeni folyamatos védelmet, valamint felelős a saját, de kórosan működő sejtek elpusztításáért is.

Terhesség során az endokrin, immun és metabolikus folyamatok finom összehangolása járul hozzá a magzat zavartalan fejlődéséhez. A fetomaternalis határ mindkét oldalán megfigyelhető a szimultán zajló komplex folyamatok koordinálása, melynek részét képezik a sejtek növekedését és differenciálódását irányító szignalizációs utak, az uterinális érrendszer átalakulása, valamint az immunológiai szabályozó folyamatok, melyek mind kritikusak a sikeres terhesség szempontjából.<sup>98</sup> A placentáció folyamatában történő bármilyen zavar kihathat a placenta funkciójára, így nem csak a magzat, de az anya szervezetére is káros lehet. A placenta tartja fenn a terhességet azáltal, hogy kedvező immunológia környezetet biztosít a magzat számára, emellett szabályozza az oxigén, a szén-dioxid és a tápanyagok szállítását, valamint hormonokat, citokineket és szignalizációs faktorokat termel. Mindezek mellett folyamatos aktív kommunikációt tart fenn a magzat és az anya között.

Az immunregulációs folyamatok egy részét képezi a gátló útvonalak aktiválódása, melyben számos receptor, ligand, sejt és szövet vehet részt. A ko-inhibitoros receptorok (mint pl. a PD-1 és TIM-3) alkalmasak az immunológiai folyamatok szabályozására. A PD-1 és TIM-3 sejtfelszíni gátló receptorok számos immunsejt felszínén megtalálhatóak, utalva az immunsuppresszióban, így a fetomaternalis toleranciában betöltött fontos szerepükre. Fontos megjegyezni, hogy ligandjaik expressziója szövetspecifikus, nem

pedig sejtspecifikus, ennek köszönhetően képesek szabályozni *in vivo* a lokális immunválaszokat.<sup>99–101</sup>

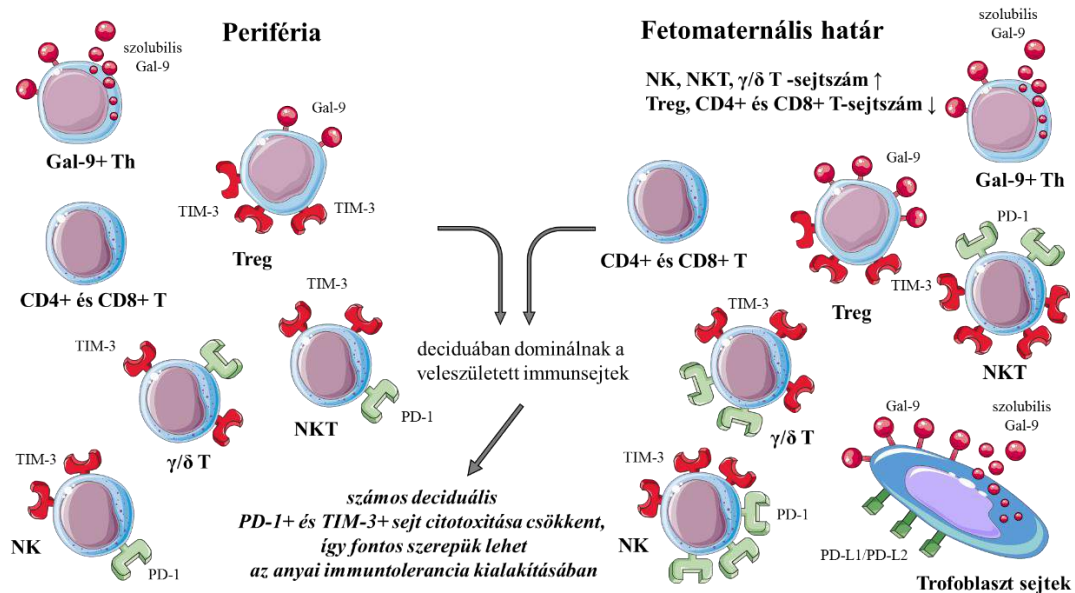
A PD-1 receptor ligandjainak (PD-L1 és PD-L2) placentáris expresszióját már számos publikáció leírta, viszont a mi kutatócsoportunk publikálta elsőként az egér placenta Gal-9 (a TIM-3 receptor egyik ligandja) expresszióját.<sup>102</sup> Vizsgálataink során leírtuk, hogy a Gal-9 a placenta spongiotrofoblaszt rétegében expresszálódik, mely elválasztja az anyai deciduális réteget a labirintus rétegtől. A labirintus réteg sejtjei MHC-I- és MHC-II-negatívak, míg a spongiotrofoblaszt réteg polimorf, apai eredetű MHC-I molekulákat expresszál direkt kapcsolatba lépve az anyai deciduával, így is elősegítve az anya immunrendszerének az embrió immun-felismerését.<sup>103–105</sup> Egy nemrég közölt tanulmányban He és munkatársai spontán abortusz egérmodelljében immunhisztokémiai módszerrel mutatták ki a Gal-9 expresszió csökkenését a vizsgált egerek placentájában.<sup>106</sup> Továbbá kimutatták, hogy ugyanebben a modellben a Gal-9 molekula gátlása felborítja a Th1/Th2 immunitás egyensúlyát.<sup>106</sup>

A Gal-9 molekula lokális fetomaternalis határon történő előfordulásának másik lehetséges módja az anyai oldalon történő megjelenése. Wang és munkatársai mutatták ki, hogy a Treg-sejtek egy fontos immunszabályozó (immunszuppressziós) eszköze azok sejt felszíni Gal-9 expressziója.<sup>107</sup> Kutatásaink során igen magas Gal-9 expressziót mértünk a deciduális Treg-sejtek felszínén a perifériához képest. A Gal-9 molekulának létezik egy szolubilis formája is, melyet a Gal-9-pozitív Th-sejtek termelnek.<sup>108</sup> Habár a deciduában csökkent a CD4+ Th-sejtek aránya, a Gal-9 termelő szubpopuláció a perifériához hasonlóan változatlan szinten van jelen. Hipotézisünk szerint a PD-L1, PD-L2 és Gal-9 ligandok domináns jelenléte az anyai-magzati határon potenciális immunmoduláló hatást sejtetnek, melynek szerepe lehet az anyai immuntolerancia kialakulásában.

Az egér deciduában megtalálható limfocita szubpopulációk között domináltak a veleszületett immunsejtek (NK-,  $\gamma/\delta$  T- és NKT-sejtek), ezzel szemben a CD4+ T- és CD8+ T-sejtek száma csökkent a perifériához képest. Eredményeink megerősítik a szakirodalomban fellelhető megfigyeléseket, miszerint a vemhesség során az egér deciduájában feldúsulnak ezen immunsejtek.<sup>109–111</sup> Emiatt tűztük ki célul az NK-,  $\gamma/\delta$  T- és NKT-sejtek vizsgálatát és azok gátló hatású receptor expressziójának karakterizálását.



Eredményeink szerint a deciduális limfociták PD-1 expressziója a perifériához képest nőtt az összes vizsgált szubpopulációban. A sejtek citotoxikus aktivitását CD107a sejtfelszíni expressziójának mérésével vizsgáltuk. A deciduális PD-1+ NK-,  $\gamma/\delta$  T- és NKT-sejteken csökkent a CD107a expresszió, így feltételezhető, hogy a PD-1/PD-L1 útvonalnak ezen sejtek közvetítésével fontos szerepe lehet az anyai immuntolerancia kialakításában (38. ábra).



**38. ábra:** A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben

Míg a deciduális és perifériás NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója hasonló értéket mutatott, addig ezen sejtek relatív TIM-3 expressziója (magasabb a sejtkenkénti receptor-denzitás) emelkedett a deciduában a perifériához viszonyítva, utalva a TIM-3 pozitív sejtek érettebb voltára és azok teljes funkcionalitására.<sup>112</sup> A deciduális TIM-3+ NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek citotoxikus aktivitása kisebb, mint a perifériás sejteké, amit a fokozott relatív TIM-3 expresszió vagy akár a Gal-9 ligand dominánsabb lokális jelenléte okozhat, mivel a TIM-3 és Gal-9 kapcsolódásakor gátolódhatnak az effektor immunfunkciók, így a CD107a expresszió csökkenésével járó citotoxicitás is (38. ábra).

A deciduális NKT szubpopulációk vizsgálata során azt találtuk, hogy a perifériához képest csökkent mértékben expresszálják a TIM-3 receptort, ezzel szemben magas az egy sejtre vonatkoztatott relatív TIM-3 receptor expressziójuk. Lokálisan a

deciduában ugyan emelkedett a citotoxicitásuk, viszont ez nem bizonyult szignifikánsnak a perifériához viszonyítva. Méréseink szerint a deciduában van egy kis TIM-3+ NKT-sejt populáció, mely magasabb lítikus aktivitással bír, így elmondhatjuk, hogy a TIM-3 molekula inkább elősegíti ezen sejtek citotoxicitásának fokozódását, hozzájárulva az enyhe fokú gyulladással való reakció kialakításához, ezzel is segítve az egészséges terhesség lefolyását (**38. ábra**).

A limfociták PD-1 és TIM-3 ko-expressziójának vizsgálatakor azt találtuk, hogy a sejteknek csak nagyon kis százaléka vesz részt egy időben a mindkettő receptor szabályozta gátló útvonalakban. Továbbá kimutattuk, hogy ezen kettős pozitív NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek száma tovább csökken a deciduában a perifériához képest. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a limfociták vagy PD-1 vagy TIM-3 irányban mutatnak elkötelezettséget, utalva ezen ko-inhibitoros receptorok elkülönült sejt szintű hatásaira (**38. ábra**).

A magzati antigének felismerését követően kialakuló anyai immunválasz elsősorban tolerogén, azaz magzatvédő mechanizmusokból áll, azonban az egészséges határok között mozgó gyulladással járó folyamatok jelei is megfigyelhetők, melyek mind a magzat (sikeres placentáció és érrendszeri átalakulás), mind az anya (immunvédelem a patogénekkel szemben) érdekeit szolgálják. Ezen folyamatokban elsősorban a deciduában felszaporodó azon immunsejtek vesznek részt, melyek a veleszületett immunitás részei. Eredményeink szerint a deciduális PD-1 és a TIM-3 pozitív sejtek dominánsabb szereppel bírnak, mint a perifériás társaik. Míg a PD-1+ limfociták csökkent citotoxikus aktivitással bírnak, addig a TIM-3+ sejtek lítikus aktivitása sejttípustól függően változik, utalva arra, hogy a TIM-3 molekula szerepe eltérő lehet különböző limfocita szubpopulációkon.

Kísérleteinket 14 és fél napos vemhes egereken végeztük, ami egy késői időpont egér vemhesség vonatkozásában, így feltételezéseink szerint a kapott eredményeken túl további jelentős eltéréseket is feltárhatnánk egy korábbi időpont vizsgálatával. Ez további kutatások alapját képezheti.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az anyai-magzati határfelületen kapott eredményeink egy igen komplex, szövet- és sejtspecifikus immunregulációs mechanizmust mutatnak a vizsgált gátló receptorok vonatkozásában.

## V.2. Mifepriszton hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben

Az előző pontban összefoglalt kísérleti eredményeink alátámasztják azokat a feltételezéseket, miszerint mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer sejtjeinek fontos szerepe van az anyai immuntolerancia kialakításában, továbbá bármiféle fiziológiás módosulásuk vagy funkcionális változásuk terhességi komplikációkhoz vezethet. A tudomány számára még nem pontosan ismert ezen immunsejtek mifeprisztonkezelést követően kialakuló regulációs mechanizmusa.

A mifepriszton igen magas affinitást mutat mind a progeszteron, mind a glükokortikoid receptorok iránt.<sup>113</sup> Számos kutatás felveti annak lehetőségét, hogy a mifepriszton szerepet játszhat a fetomaternalis immunfolyamatokban.<sup>17,113-115</sup> *In vitro* kísérletekben megfigyelték, hogy a mifepriszton képes gátolni a limfociták proliferációját,<sup>116</sup> és növelni a perifériás NK-sejtek citotoxikus aktivitását.<sup>117</sup> Ezen túlmenően az egerekben gátolja a progeszteron hormon progeszteron indukálta blokkoló faktor (PIBF) által modulált immunszuppresszív hatását.<sup>118</sup>

A mifepriszton egy hatásos szer a terhesség megszakítására. Számos kutatócsoport megállapította, hogy 1,25-2,50mg/kg dózisban az egérvemhesség 4. napján alkalmazva nincs szignifikáns hatása az egerek szaporodására.<sup>119-121</sup> Azonban egy későbbi időpontban (a vemhesség 8 és feledik napján) 0,3-2mg/kg dózisban alkalmazva a mifepriszton 60-100%-os sikerességgel képes megszakítani egerekben a korai vemhességet.<sup>120,122</sup> A folyamat során a progeszteron-megvonás következtében csökken a PIBF molekulát expresszáló sejtek száma, ami a deciduális NK-sejtekben a perforin expresszió növekedéséhez vezet, emellett a perifériás NK-sejtek aktivitása is fokozódik.<sup>46,123</sup> Másrészt a terhesség késői szakaszában (14-19. napon) adott 0,4-12,5mg/kg mifepriszton az esetek 66-100%-ban szakítja meg a terhességet időelőtti szülést okozva.<sup>113</sup> Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a mifepriszton dózisa és az alkalmazásának időpontja nagyban befolyásolhatja a vemhes egerekben az abortusz kialakulásának arányát.

Mao és munkatársai leírták, hogy már 6-8 órával a mifepriszton kezelés után megfigyelhetőek az abortusz korai jelei, de a decidua és a placenta csak 12-24 órával a

kezelés után kezd károsodni.<sup>124</sup> Kimutatták, hogy a kezelés után már 6-8 órával csökken a Treg-sejtek FoxP3 expressziója, ami a fetomaternalis határon gyulladásoos citokinek szintjének emelkedéséhez vezet.<sup>124</sup> Ezen adatok alapján a mi általunk választott időpont (24 óra) az abortusz késői immunológiai változásait és a szöveti gyógyulási folyamatok megindulását mutatják a korai abortusz kialakulása helyett.

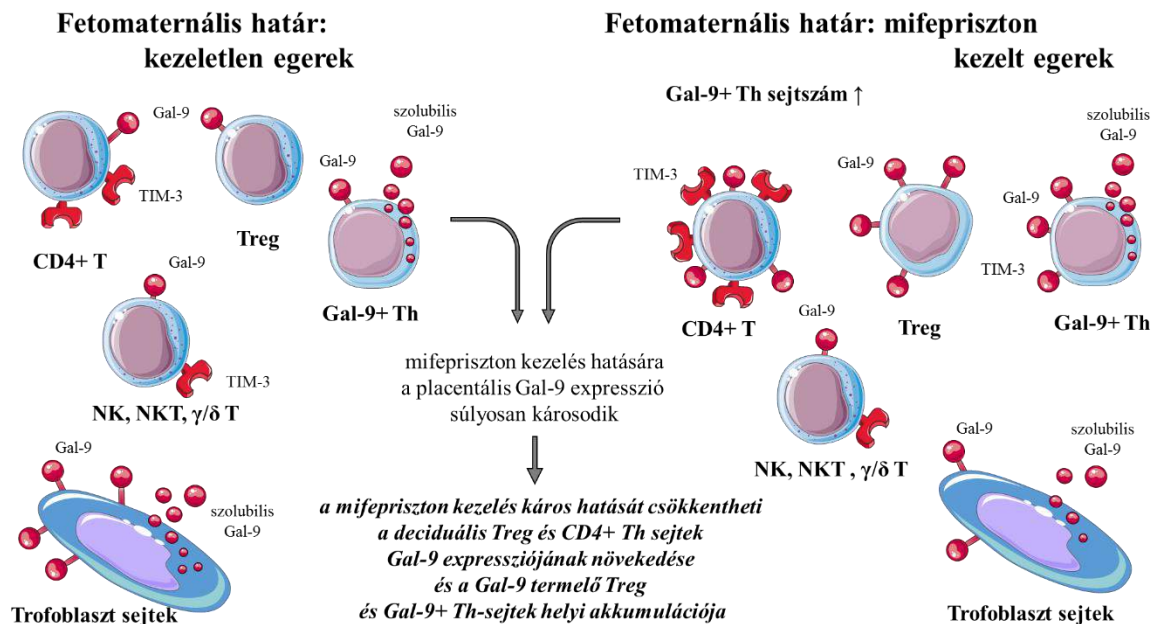
Feltételezésünk szerint az érrendszeri és szöveti károsodás helyi gyulladásoos immunválaszt indukál, mely hatására a mifepriszton kezelés után 12-24 órával megfigyelhető a Treg-sejtek perifériáról történő beáramlása. Feltehetően ez a folyamat próbálja meg kontrollálni a lokálisan kialakuló kóros gyulladásoos és káros citotoxikus folyamatokat. A Treg-sejtek gyors toborzása így segíti elő a szövetek regenerálódását és az immun homeosztázis helyreállítását.<sup>125</sup>

A TIM-3/Gal-9 útvonalnak fontos szerepe van az anyai immuntolerancia kialakításában, illetve potenciális koordináló feladata lehet a terhesség alatt a veleszületett és adaptív immunitás létrejöttében.<sup>126-128</sup> Emiatt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk a TIM-3/Gal-9 útvonal szerepét alacsony dózisú mifepriszton kezelés hatására BALB/c egerekben, a vemhességük 14 és feledik napján.

A Gal-9 expresszió a fetomaternalis határ számos területén<sup>100,126,128,129</sup>, valamint a Treg és a CD4+ T-sejteken is kimutatható.<sup>102,130</sup> A Gal-9+ Th-sejtek immunszuppresszív tulajdonságúak, s képesek az IL-10/TGF- $\beta$  citokinek serkentésével szabályozni a Th17/Treg egyensúlyt.<sup>108</sup>

Kutatócsoportunk korábbi humán kísérleteiben leírta, hogy a szérum Gal-9 szintje és a perifériás CD4+ T-sejtek felszíni Gal-9 expressziója a terhesség során emelkedő tendenciát mutat.<sup>128</sup> Jelen kísérleti eredményeink kimutatták, hogy vemhes egerekben a perifériás NK-, NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek szintén magas Gal-9 pozitivitást mutatnak. Habár a perifériás Treg-sejtek Gal-9 expressziója elenyésző, a decíduális Treg-sejtek Gal-9 expressziója szignifikánsan magasabb, mint a periférián. Ezzel szemben kezeletlen egerekben a decíduális NK-sejtek Gal-9 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a periférián. A 0,8mg/kg mifepriszton kezelés következtében pedig szinte teljesen eltűnt a Gal-9 expresszió a placenta junkcionális zónájában. A mifepriszton kezelés szignifikánsan csökkentette a perifériás NK-sejtek Gal-9+ expresszióját, viszont szignifikánsan növelte a decíduális Treg és CD4+ T-sejtek Gal-9+ kifejeződését. Emellett

a szuppresszív hatással rendelkező Gal-9+ Th-sejtek aránya a kezelés hatására szignifikánsan nőtt a decíduában (39. ábra).



39. ábra: Mifepriszton hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben

Kutatásaink arra utalnak, hogy még a kis dózisú mifepriszton kezelés is képes megszüntetni a placenta Gal-9 termelődését. A megfigyelt deciduális Treg- és CD4+ T-sejtek fokozott Gal-9 expressziója arra utal, hogy a kezelés után 24 órával már beindulnak helyi immunszuppresszív mechanizmusok, feltehetően azért, hogy fenntartsák a károsodást szenvedett placenta megfelelő működését. Továbbá valószínűsíthető, hogy a lokálisan felszaporodó Gal-9 molekulát termelő Gal-9+ Th-sejtek szerepe is az, hogy részben kompenzálják a placenta csökkent Gal-9 expresszióját a fetomaternalis határon. Ezen folyamatok gátolhatják a Th1- és Th17-sejtek gyulladásos citokin termelését a TIM-3/Gal-9 útvonalon keresztül<sup>131</sup> és így védik a placenta működését (39. ábra).

Ezen eredményeink alapján feltételezzük, hogy a trofoblaszt és a deciduális sejtek mellett a Gal-9+ Th- és Treg-sejtek is alternatív Gal-9 források lehetnek az anyai-magzati határfelületen. Fiziológias körülmények között a lokálisan magas Gal-9 szint elősegítheti a Treg- és Gal-9+ Th-sejtek kialakulását és azok szuppresszív funkcióját, aminek szerepe lehet a Th17-sejtek differenciálódásának blokkolásában, valamint csökkentheti a lokális Th1/Th17 citokin termelődést, és a deciduális Th1 CD4+ és aktivált CD8+ T-sejtek

apoptózisát indukálhatja. Továbbá feltételezzük, hogy akár a sejtek felszínén expresszált, akár szolubilis formában jelen lévő Gal-9, kapcsolódva az effektor sejtek felszínén lévő TIM-3 receptorhoz, direkt vagy indirekt módon befolyásolhatja a veleszületett és az adaptív immunrendszer elemeit a fetomaternalis határon (**39. ábra**).

Az alacsony dózisú mifepriszton kezelés hatására a placentális Gal-9 expresszió súlyosan károsodhat. Mivel a lokális Gal-9 expresszió fontos a placenta fejlődéséhez és a magzattal szembeni immunválasz regulálásához, így a Gal-9 által szabályozott tolerancia-mechanismusok károsodása terhességi komplikációk kialakulásához<sup>99</sup> vagy akár vetéléshez, illetve koraszüléshez vezethet. Az alacsony dózisú mifepriszton kezelés káros hatását csökkentheti a deciduális Treg és CD4+ Th-sejtek Gal-9 expressziójának növekedése és a Gal-9 termelő Treg- és Gal-9+ Th-sejtek helyi akkumulációja és/vagy differenciációja. Feltételezésünk szerint a kompenzatorikus mechanizmusok csak akkor tudják fenntartani a károsodást szenvedett placenta működését, ha csak részleges progeszteron-megvonás történik, viszont egy nagy dózisú mifepriszton kezelés során ez a kompenzáló mechanizmus hatástalanná válik. Az egér vemhességének 14-19. napja közötti 2mg/kg vagy magasabb dózisú mifepriszton kezelés teljesen leblokkolhatja a progeszteron-receptorokat, aminek következtében ösztrogén dominancia alakul ki, az uterusz prosztaglandin-érzékenysége fokozódik, ami pedig a magzatok elvesztéséhez vagy koraszüléshez vezethet (**39. ábra**).

Pinget és munkatársai leírták, hogy a Gal-9 molekula képes a deciduális  $\gamma/\delta$  T-sejtek citotoxicitását gátolni<sup>132</sup>, ugyanis ezen sejtek szignifikánsan több TIM-3 receptort expresszálnak a felszínükön, mint a perifériás társaik.<sup>102</sup> Korábbi kísérletünkben mi is megfigyeltük, hogy vemhes egerekben a deciduális NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek megnövekedett relatív TIM-3 expressziója azok csökkent citotoxikus aktivitásával jár.<sup>102</sup> Egérkísérleteink eredményeivel összhangban egy nemrég publikált humán kísérlet kimutatta, hogy a deciduális NK-sejtek fokozott TIM-3 expressziót mutatnak a perifériás sejtekhez viszonyítva, mely arra utal, hogy ezen emelkedett TIM-3 expresszió jelezheti a deciduális NK-sejtek specifikus aktivitási állapotát.<sup>112,130</sup>

Jelen kísérletünkben megfigyeltük, hogy a mifepriszton kezelés következtében a deciduális NK- és CD4+ T-sejtek szignifikánsan több TIM-3 molekulát expresszálnak a felszínükön, mint a perifériás társaik. A TIM-3 pozitív deciduális NK-sejtek csökkent

citotoxicitását sikerült kimutatnunk, ezzel szemben viszont a decíduális NKT-sejtek fokozott CD107a expressziót mutattak a perifériához képest. A mifepriszton kezelés minden vizsgált decíduális immunsejt esetében fokozta a TIM-3 expressziót a kezeletlen egerekhez viszonyítva, azonban csak a decíduális CD4+ T-sejtek esetében voltak az eltérések szignifikánsak (39. ábra).

A fent említett hatásokon túl a mifepriszton kezelés képes a TIM-3/Gal-9 útvonaltól függetlenül is immunológiai változásokat indukálni. A progeszteron legfontosabb terhesség védő hatásait a Th1/Th2/Th17/Treg-sejtek szabályozásán keresztül valósítja meg.<sup>133</sup> A progeszteron egy Th1-Th2 irányú eltolódást hoz létre a PIBF és Th2 citokinek expressziójának fokozásával, valamint a Th1 citokinek termelődésének gátlásával.<sup>134</sup> A mifepriszton, mint egy progeszteron-receptor antagonist, *in vitro* blokkolni képes a progeszteron terhességet védő immunológiai hatásait akár TIM-3 független útvonalon is, mivel gátolja a limfociták proliferációját<sup>116</sup>, serkenti a prosztoglandinok, ciklooxygenázok és gyulladáscitokinek termelődését. Mindezek a hatások a TIM-3/Gal-9 útvonal diszregulációjával együtt képesek lehetnek módosítani a lokális immunosuppresszív/angiogénikus citokin-környezetet egy gyulladáscitokinek irányába. Ezek a folyamatok megzavarhatják a Th1/Th2/Th17/Treg egyensúlyt, aminek következtében gyulladáscitokinek termelődhetnek és a citotoxikus immunválasz aktiválódhat, ami végül a terhesség megszakadásához vezethet.<sup>135-137</sup>

A kutatásaink a következő pontokban voltak limitáltak: (1) csak egy mifepriszton dózist (0,8 mg/kg) alkalmaztunk; (2) a mifepriszton *in vivo* hatásait az egér vemhesség 14 és feledik napján vizsgáltuk, a terhesség korai stádiumáról nincs információnk; (3) vizsgálatainkat 24 órával a mifepriszton kezelést követően végeztük. Lv és munkatársai szerint a magas dózisú (>2mg/kg) mifepriszton kezelés már teljes abortuszt képes indukálni 48 óra alatt<sup>120</sup>, aminek következtében a vizsgált szövetek oly mértékben roncsolódnának, hogy alkalmatlanok lennének immunhisztokémiai és áramlási citometriás vizsgálatokhoz.

### V.3. TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos vemhes egerekben

A PACAP terhességben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a megfigyelés, hogy a PACAP-hiányos egerek fertilitása csökken.<sup>90</sup> Isaac és Sherwood kutatócsoportja a 2000-es évek eleje óta vizsgálja a PACAP-hiányos egerek reprodukciós készségeit. Kimutatták, hogy a PACAP-hiányos egerek csökkent fertilitását részben az implantáció zavara okozza.<sup>138</sup> Méréseik szerint, a vad típusú egerekben az implantáció 81%-ban sikeres, ezzel szemben a PACAP-hiányos egereknél szignifikánsan alacsonyabb (13,3%).<sup>138</sup> Shintani és munkatársai 2002-ben végzett kísérleteikben viszont azt mutatták ki, hogy a csökkent fertilitás (a szülések száma a párzások számához viszonyítva) másik oka részben a csökkent párzási szám.<sup>139</sup>

A PACAP különböző útvonalakon keresztül vesz részt a reprodukcióban és a női reprodukciós rendszer működésében. Képes stimulálni a corpus luteumot és a progeszteron szintézisét, valamint parakrin úton a petefészek progeszteron szekrécióját.<sup>138</sup> A PACAP-hiányos nőstény egerekben a szérum progeszteron- és prolaktin-szintje szignifikánsan alacsonyabb a vad típusúhoz képest<sup>138</sup>, ami csökkentheti az implantáció során az uterus receptivitását. Ezen kutatási eredmények alátámasztják, hogy a PACAP a terhesség kezdetén és a beágyazódáskor is igen fontos szerepet tölt be, viszont arról nincs információnk, hogy részt vesz-e a terhesség alatt az anyai-magzati határon kialakuló immunológiai folyamatok szabályozásában.

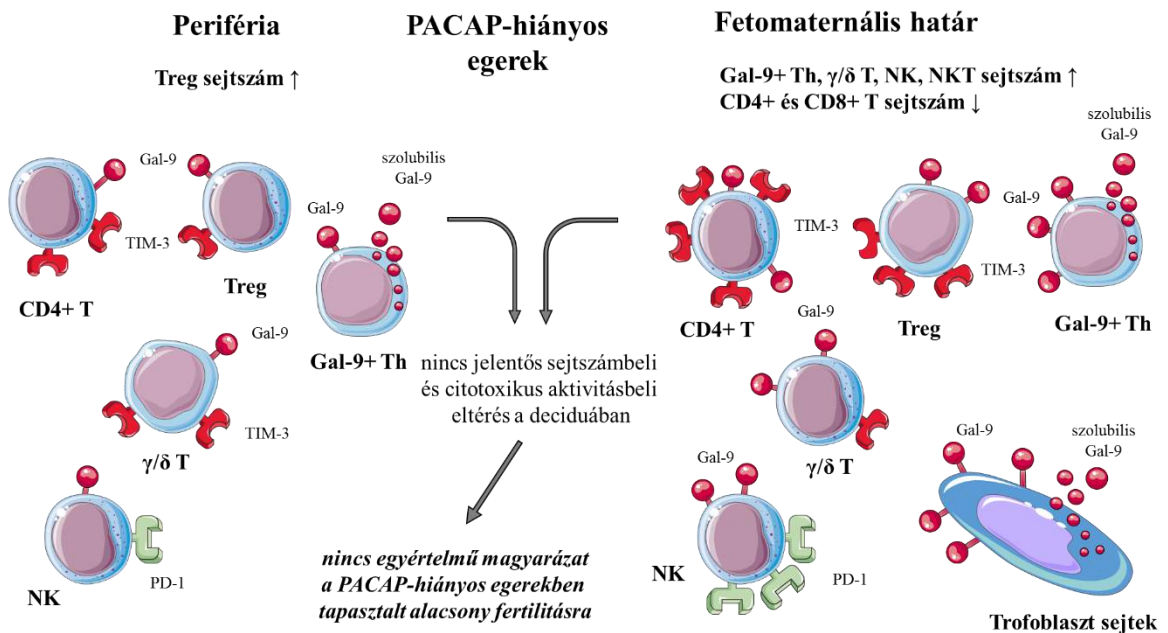
Terhesség során az anyai immunrendszer lokális változásai lehetővé teszik, hogy az anya és fele részben idegen eredetű, apai antigéneket is hordozó magzat között sikeres és mindkét fél számára előnyös fiziológiai és immunológiai kapcsolat alakuljon ki. Az anyai immunrendszer magzathoz való alkalmazkodásának első szövettani jele a terhesség során az immunsejt szubpopulációk relatív arányainak megváltozása az uterusban.

Mind a PACAP-hiányos, mind a vad típusú egereknél szignifikánsan emelkedtek a decíduális  $\gamma/\delta$  T-, NK- és NKT-sejtszámok, miközben a decíduális CD4+ T- és CD8+ T-sejtek száma szignifikánsan csökkent a perifériához képest. A PACAP-hiányos egerekre továbbá a periférián egy szignifikáns Treg-sejtszám emelkedés jellemző a decíduához képest. A PACAP-hiányos egerek esetében szignifikánsan nőtt a perifériás



CD4+ T-sejtek száma, valamint a deciduális  $\gamma/\delta$  T-sejtek frekvenciája is emelkedést mutatott a vad típusúhoz viszonyítva.

Egészséges vemhes BALB/c egerekben végzett korábbi kísérleteink során leírtuk, hogy ezen egerek placentájában a spongiotrofoblaszt rétegben mutatható ki a Gal-9 molekula expressziója.<sup>102</sup> Jelen kutatásaink során nem sikerült különbséget kimutatnunk a PACAP-hiányos és vad típusú egerek placentális Gal-9 expressziós mintázata között, a spongiotrofoblaszt rétegek mindkét esetben azonos Gal-9 pozitivitást mutattak. A Gal-9 molekulát viszont az anyai oldal immunsejtjei is képesek expresszálni. Habár a PACAP-hiányos és a vad típusú egyedekben egyaránt csökkent a CD4+ T-sejtek aránya a deciduában, a Gal-9 termelő szubpopuláció (Gal-9+ Th-sejtek) aránya szignifikánsan emelkedett az anyai-magzati határon a perifériához képest. Az egyetlen PACAP-specifikus sejtszámbeli változás a Gal-9+ Th-sejtekhez köthető, miszerint elsőként sikerült kimutatnunk a Gal-9+ Th-sejtek számának szignifikáns emelkedését a PACAP-hiányos egerek deciduájában a vad típusú egerek deciduájához képest (**40. ábra**).



**40. ábra:** A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos (KO) egerekben

A mifepriszon abortuszt okozó hatásának vizsgálatát célzó kísérletünkben kimutattuk, hogy a vemhesség egy késői időpontjában (14 és feledik napján) adott kis dózisu mifepriszon hatására a placenta Gal-9 expressziója súlyosan károsodik, viszont a deciduális Gal-9+ Th-sejtek aránya szignifikánsan megemelkedik a kezeletlen egerek deciduájához viszonyítva.<sup>53</sup> Fontos azonban kiemelni, hogy a kezelés nem okozott szignifikáns változást sem a deciduális, sem a perifériás immunsejtek számát illetően, de megváltoztatta bizonyos NK- és T-sejtek Gal-9 és TIM-3 expresszióját.<sup>53</sup> A progeszteronreceptor-antagonista mifepriszon képes gátolni mind a TIM-3 függő és független utakon keresztül a progeszteron terhességet védő immunológiai hatásait. Mivel a vemhesség alatt a PACAP-hiányos egerek szérum progeszteronszintje szignifikánsan alacsonyabb, mint a vad típusú egyedeké,<sup>138</sup> logikus magyarázat lenne, hogy a PACAP-hiányos egerek esetében az általunk kapott eredmények háttérében a progeszteron hiány következtében kialakuló immunológiai változások és a megemelkedett Gal-9+ Th-sejtek száma állhat. Annak kiderítése, hogy ez a hipotetikus mechanizmus vagy más ok áll a PACAP-hiányos egerek Gal-9+ Th-sejtek számának deciduális emelkedése mögött, további vizsgálatok elvégzését indokolhatja.

A placenta Gal-9 termelése és a Gal-9 termelő sejtek aktív jelenléte a fetomaternalis határon utal a TIM-3/Gal-9 útvonal lokális immunszabályozó szerepére.

A deciduális CD4+ T- és Treg-sejtek TIM-3 expressziója szignifikáns emelkedést mutatott mind a PACAP-hiányos, mind a vad típusú egerekben a perifériához képest. Ezzel szemben a  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan csökkent a PACAP-hiányos egerek deciduájában a perifériához képest. Érdekes megfigyelés, hogy a perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan emelkedett a PACAP-hiányos egerekben a vad típus perifériájához viszonyítva. Ezen eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a CD4+ T- és Treg-sejtek feltehetőleg a TIM-3 molekula immunológiai szabályozása alatt állnak (**40. ábra**).

Egy másik immun-checkpoint molekula vizsgálatokor kimutattuk, hogy a PACAP-hiányos egerek deciduájában az NK-sejtek PD-1 expressziója szignifikánsan emelkedett a perifériához képest (**40. ábra**).

A sejtek citotoxikus aktivitásának méréséhez a CD107a markert használtuk. Az egyedüli PACAP-specifikus változást a perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejteknél tapasztaltuk, ahol a

CD107a expresszió szignifikáns emelkedést mutatott a PACAP-hiányos egerekben a vad típusúhoz képest. A terhesség alatti fetomaternalis progeszteron-függő immunológiai szabályozás jól dokumentált.<sup>140,141</sup> A kapott eredményeinket részben magyarázhatja, hogy a PACAP-hiányos nőstény egerek terhesség alatti szérumprogészteron szintje szignifikánsan alacsonyabb a vad típusú egerekéhez képest.<sup>138</sup> Nem mértünk szignifikáns különbséget a fetomaternalis határon vizsgált többi sejtsoport citotoxikus aktivitásában, így arra következtetésre jutottunk, hogy a TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalakban terhesség alatt nem jelentkezik lokális funkcionális zavar. Ezen adatainkat immunhisztokémiai eredményeink is alátámasztják, ahol szintén nem tapasztaltunk különbséget sem a PACAP-hiányos, sem a vad típusú egerek trofoblaszt sejteinek Gal-9 expressziójában. Ezzel szemben a PACAP-hiányos egerek deciduális Gal-9+ Th-sejtjeinek száma szignifikánsan emelkedett a vad típusúhoz képest, utalva arra, hogy a Gal-9 képes kontrollálni a TIM-3 pozitív sejtek citotoxikus aktivitását. A Gal-9 molekula kapcsolódva különböző immunsejtek felszíni TIM-3 receptorához feltehetően képes szabályozni a lokális gyulladási folyamatokat és gátolni a saját antigénekkal szemben kialakuló túlzott, káros citotoxikus folyamatokat. Hasonló folyamat alakulhat ki a deciduális CD8+ T- és NK-sejtek esetében, ahol ugyan nem szignifikáns, de kis mértékű emelkedés volt mérhető a PACAP-hiányos egerek citotoxikus aktivitásában a vad típusú egerekhez képest. Hipotézisünk szerint a vemhes PACAP-hiányos egerek deciduális Gal-9+ Th-sejtjei segítik elő a terhesség alatti lokális immunhomeosztázist. Oomizu és munkatársai leírták, hogy a Gal-9+ Th-sejtek immunszuppresszorként viselkednek, IL-10 és TGF- $\beta$  citokineket termelnek, továbbá szabályozzák a Th17/Treg egyensúlyt.<sup>108</sup> Ezen sejtek képesek fokozni a Treg- és Th1-sejtek differenciálódását, mely további IL-10 és Gal-9 expresszióhoz vezethet, hatékonyan gátolva a lokális Th1 típusú immunválaszokat<sup>108</sup> (40. ábra).

Összegzésként elmondhatjuk, hogy a periférián észlelt változások ellenére nem tudtunk kimutatni olyan jelentős sejtszámbeli és citotoxikus aktivitásbeli eltérést a deciduában, ami egyértelműen megmagyarázná a PACAP-hiányos egerekben tapasztalt alacsony reprodukciós képességet.

## VI. Új eredmények

### VI.1. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata egészséges vemhes BALB/c egerekben

1. A Gal-9 az egészséges egerek placentájának spongiotrofoblaszt rétegében expresszálódik.
2. A decíduális Treg-sejtek magasabb Gal-9 expressziót mutatnak a periférián lévő társaikhoz képest.
3. Habár a decíduában csökkent a CD4<sup>+</sup> Th-sejtek aránya, a Gal-9 termelő szubpopuláció (Gal-9<sup>+</sup> Th-sejt) a perifériához hasonlóan változatlan szinten van jelen.
4. A decíduális NK, NKT és  $\gamma/\delta$  T-sejtek PD-1 expressziója a perifériához képest nőtt. A vizsgált decíduális PD-1 pozitív NK- és NKT-sejtek citotoxicitása csökkent a perifériához képest.
5. Míg a decíduális és perifériás NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója hasonló értéket mutatott, addig ezen sejtek relatív TIM-3 expressziója emelkedett a decíduában a perifériához viszonyítva. Továbbá a decíduális TIM-3 pozitív NK- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek citotoxikus aktivitása kisebb, mint a perifériás sejteké. A decíduális NKT-sejtek TIM-3 expressziója kisebb, mint a periférián, viszont magas az egy sejtre vonatkoztatott relatív TIM-3 receptor expressziójuk. Lokálisan a decíduában ugyan emelkedett citotoxicitásuk, viszont ez nem bizonyult szignifikánsnak a perifériához viszonyítva.
6. A PD-1 és TIM-3 kettős pozitív NKT- és  $\gamma/\delta$  T-sejtek száma csökkent a decíduában a perifériához képest.
7. A decíduális PD-1 és a TIM-3 pozitív sejtek dominánsabb szereppel bírnak, mint a perifériás társaik. Míg a PD-1<sup>+</sup> limfociták csökkent citotoxikus aktivitással bírnak, addig a TIM-3<sup>+</sup> sejtek lítikus aktivitása sejtípustól függően változik, utalva arra, hogy a TIM-3 szerepe eltérő lehet különböző limfocita szubpopulációkon.

## VI.2. Mifeprisztin hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben

1. A kis dózisú (0,8mg/kg) mifeprisztin kezelés következtében szinte teljesen eltűnt a Gal-9 expresszió a kezelt egerek placentájában a kontroll csoporthoz viszonyítva.
2. A mifeprisztin kezelés szignifikánsan csökkentette a perifériás NK-sejtek Gal-9 expresszióját, viszont szignifikánsan növelte a deciduális Treg- és CD4+ T-sejtek Gal-9 kifejeződését a kezeletlen csoporthoz viszonyítva.
3. A szuppresszív hatással rendelkező Gal-9+ Th-sejtek aránya a kezelés hatására szignifikánsan nőtt a mifeprisztin kezelt egerek deciduájában a perifériához és a kezeletlen egerek deciduájához képest.
4. Mifeprisztin kezelés következtében a deciduális NK- és CD4+ T-sejtek szignifikánsan több TIM-3 molekulát expresszálnak a felszínükön, mint a perifériás társaik.
5. A TIM-3 pozitív deciduális NK-sejtek csökkent citotoxicitási aktivitással rendelkeznek, míg a deciduális NKT-sejtek fokozott CD107a expressziót mutattak a perifériához képest.
6. A mifeprisztin kezelés minden vizsgált deciduális immunsejt esetében fokozta a TIM-3 expressziót a kezeletlen egerekhez viszonyítva, azonban csak a deciduális CD4+ T-sejt esetében voltak az eltérések szignifikánsak.

### VI.3. A TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalak vizsgálata vad típusú (CD1) és PACAP-hiányos egerekben

1. Mind a PACAP-hiányos, mind a vad típusú egereknél szignifikánsan nő a deciduális  $\gamma/\delta$  T-, NK-, NKT-sejtek aránya, miközben a deciduális CD4+ T- és CD8+ T-sejteké szignifikánsan csökken a perifériához képest.
2. A PACAP-hiányos egerek esetében szignifikánsan nőtt a perifériás CD4+ T-sejtek száma, valamint a deciduális  $\gamma/\delta$  T-sejtek frekvenciája is emelkedést mutatott a vad típusúhoz viszonyítva.
3. Nincs szignifikáns különbség a PACAP-hiányos és vad típusú egerek placentális Gal-9 expressziós mintázata között, a spongiotrofoblaszt rétegek mindkét esetben azonos Gal-9 pozitivitást mutattak.
4. Habár a PACAP-hiányos és a vad típusú egyedekben egyaránt csökkent a CD4+T-sejtek aránya a deciduában, a Gal-9 termelő szubpopuláció (Gal-9+ Th-sejtek) aránya szignifikánsan emelkedett az anyai-magzati határon a perifériához képest.
5. Az egyetlen PACAP specifikus sejtszámbeli változás a Gal-9+ Th-sejtekhez köthető, miszerint a Gal-9+ Th-sejtek száma szignifikánsan emelkedett a PACAP-hiányos egerek deciduájában a vad típusú egerek deciduájához képest.
6. A deciduális CD4+ T- és Treg-sejtek TIM-3 expressziója szignifikáns emelkedést mutatott mind a PACAP-hiányos, mind a vad típusú egerekben a perifériához képest. Ezzel szemben a  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan csökkent a PACAP-hiányos egerek deciduájában a perifériához képest.
7. A perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan emelkedett a PACAP-hiányos egerekben a vad típusú perifériájához viszonyítva.
8. A PACAP-hiányos egerek deciduájában az NK-sejtek PD-1 expressziója szignifikánsan emelkedett a perifériához képest.

9. Az egyedüli PACAP specifikus változást a perifériás  $\gamma/\delta$  T-sejteknél tapasztaltunk, ahol a CD107a expresszió szignifikáns emelkedést mutatott a PACAP-hiányos egerekben a vad típushoz képest.
10. A periférián észlelt változások ellenére nem tudtunk kimutatni olyan jelentős sejtszámbeli és citotoxikus aktivitásbeli eltérést a deciduában, ami egyértelműen megmagyarázná a PACAP-hiányos egerekben tapasztalt alacsony reprodukciós képességet.

## VII. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szereday Lászlónak mindazon segítségéért, amivel kutatói munkásságomat és doktori értekezésem elkészültét támogatta. Köszönettel tartozom Dr. Meggyes Mátyásnak, témavezetőm 2015-ben fokozatot szerzett volt hallgatójának, aki szakmai előmenetelével doktori pályafutásom során mindvégig jó példával járt előttem, akinek szakmai támogatását doktori kutatásaim első percétől élvezem.

Köszönöm a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet minden dolgozójának, akik segítettek kutatásaim megvalósításában. Hálával tartozom Dr. Polgár Beátának, Dr. Barakonyi Alízának és Dr. Mikó Évának, akik hasznos tanácsaikkal, szakmai meglátásaikkal segítettek kutatómunkámban és doktori értekezésem elkészítésében. Szeretném még név szerint megköszönni Molnár Évának és Bacher-Számuel Rékának a kezdeti időszakban nyújtott segítségüket az alap technikák elsajátításában.

Külön szeretném megköszönni a PTE ÁOK Pathológia Intézetének készséges és hasznos együttműködését, s engedélyüket a műszereik használatára.

Köszönöm munkáltatómnak, a Soft Flow KFT-nek, hogy dolgozatom elkészítésében minden tekintetben támogatott, rugalmas hozzáállásával és szakmai hozzáértésével.

Kutatásaim megvalósítását az EFOP-3.6.1-16-2016-00004 projekt is támogatta.

Végül szeretném megköszönni családomnak és férjemnek türelmét, és töretlen támogatását.



## VIII. Hivatkozások

1. Ismétlődő vetélések – miért fontos az immunológiai kivizsgálás? Available at: <https://www.immunkozpont.hu/immunologia-hirek/ismetlodo-vetelesek---miert-fontos-az-immunologiai-kivizgalas>. (Accessed: 31st March 2019)
2. Medawar, P. B. Some Immunological and Endocrinological Problems Raised by the Evolution of Viviparity in Vertebrates. in *Symp. Soc. Exp. Biol.* (1954).
3. Chavan, A. R., Griffith, O. W. & Wagner, G. P. The inflammation paradox in the evolution of mammalian pregnancy: turning a foe into a friend. *Current Opinion in Genetics and Development* **47**, 24–32 (2017).
4. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V. & Guller, S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1221**, 80–87 (2011).
5. Murrieta-Coxca, J. M. *et al.* IL-36 cytokines: Regulators of inflammatory responses and their emerging role in immunology of reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1649 (2019).
6. Cross, J. C., Werb, Z. & Fisher, S. J. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* **266**, 1508–1518 (1994).
7. Murphy, C. R. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Research* **14**, 259–267 (2004).
8. Ng, S. W. *et al.* Endometrial decidualization: The primary driver of pregnancy health. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1–20 (2020).
9. Stadtmayer, D. J. & Wagner, G. P. Cooperative inflammation: The recruitment of inflammatory signaling in marsupial and eutherian pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* **137**, (2020).
10. Cha, J., Sun, X. & Dey, S. K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine* **18**, 1754–1767 (2012).
11. Galliano, D., Bellver, J., Díaz-García, C., Simón, C. & Pellicer, A. Art and uterine pathology: How relevant is the maternal side for implantation? *Hum. Reprod. Update* **21**, 13–38 (2015).

12. Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I. & Mor, G. Inflammation and implantation. *American Journal of Reproductive Immunology* **63**, 17–21 (2010).
13. Brandon, J. M. Leucocyte distribution in the uterus during the preimplantation period of pregnancy and phagocyte recruitment to sites of blastocyst attachment in mice. *J. Reprod. Fertil.* **98**, 567–576 (1993).
14. Daimon, E. & Wada, Y. Role of Neutrophils in Matrix Metalloproteinase Activity in the Preimplantation Mouse Uterus. *Biol. Reprod.* **73**, 163–171 (2005).
15. Waclawik, A. Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: Regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig. *Reproduction* **142**, 389–399 (2011).
16. Poyser, N. L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **53**, 147–195 (1995).
17. Shah, N. M., Imami, N. & Johnson, M. R. Progesterone modulation of pregnancy-related immune responses. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
18. Szekeres-Bartho, J., Par, G., Szereday, L., Smart, C. Y. & Achatz, I. Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38**, 176–82 (1997).
19. Vilmos, F., Gábor, V. & János, D. The relationship between inflammatory and immunological processes during pregnancy. *Orvosi Hetilap* **160**, 1247–1259 (2019).
20. Carp, H. J. A. & Selmi, C. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J. Autoimmun.* **38**, J266–J274 (2012).
21. Bonney, E. A. & Brown, S. A. To drive or be driven: The path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction* **147**, (2014).
22. Pantham, P., Abrahams, V. M. & Chamley, L. W. The role of anti-phospholipid antibodies in autoimmune reproductive failure. *Reproduction* **151**, R79–R90 (2016).
23. Bonney, E. A. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **43**, 679–698 (2016).

24. Vacca, P. *et al.* Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunol.* **8**, 254–264 (2015).
25. Gu, S. & Luoma, A. M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cell. Immunol.* **296**, 31–40 (2015).
26. Roessner, K. *et al.* High expression of Fas ligand by synovial fluid-derived gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J. Immunol.* **170**, 2702–10 (2003).
27. Alcaide, M. L. *et al.* Bacterial Vaginosis Is Associated with Loss of Gamma Delta T Cells in the Female Reproductive Tract in Women in the Miami Women Interagency HIV Study (WIHS): A Cross Sectional Study. *PLoS One* **11**, e0153045 (2016).
28. Bendelac, A., Hunziker, R. D. & Lantz, O. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J. Exp. Med.* **184**, 1285–93 (1996).
29. Huijts, C. M. *et al.* mTOR Inhibition Per Se Induces Nuclear Localization of FOXP3 and Conversion of Invariant NKT (iNKT) Cells into Immunosuppressive Regulatory iNKT Cells. *J. Immunol.* **195**, 2038–45 (2015).
30. Figueiredo, A. S. & Schumacher, A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology* **148**, 13–21 (2016).
31. Krishnan, L., Nguyen, T. & McComb, S. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **97**, 62–73 (2013).
32. Herrick, E. J. & Bordoni, B. *Embryology, Placenta. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
33. Cross, J. C. *et al.* Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta* **24**, 123–130 (2003).
34. Woods, L., Perez-Garcia, V. & Hemberger, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 570 (2018).
35. Ganatra, B. *et al.* Global, regional, and subregional classification of abortions by safety, 2010–14: estimates from a Bayesian hierarchical model. *Lancet* **390**, 2372–2381 (2017).
36. *Terhességmegszakítások.* (2016).

37. Sedgh, G. *et al.* Abortion incidence between 1990 and 2014: global, regional, and subregional levels and trends. *Lancet* **388**, 258–267 (2016).
38. Kapp, N., Whyte, P., Tang, J., Jackson, E. & Brahmi, D. A review of evidence for safe abortion care. *Contraception* **88**, 350–63 (2013).
39. Abubeker, F. A., Lavelanet, A., Rodriguez, M. I. & Kim, C. Medical termination for pregnancy in early first trimester ( $\leq 63$  days) using combination of mifepristone and misoprostol or misoprostol alone: A systematic review. *BMC Womens. Health* **20**, (2020).
40. Nissi, R., Santala, M., Immonen, E. & Talvensaaari-Mattila, A. Mifepristone and misoprostol is safe and effective method in the second-trimester pregnancy termination. *Arch. Gynecol. Obstet.* **294**, 1243–1247 (2016).
41. Chen, M. J. & Creinin, M. D. Mifepristone With Buccal Misoprostol for Medical Abortion. *Obstetrics and Gynecology* **126**, 12–21 (2015).
42. Beaman, J., Prifti, C., Schwarz, E. B. & Sobota, M. Medication to Manage Abortion and Miscarriage. *Journal of General Internal Medicine* (2020). doi:10.1007/s11606-020-05836-9
43. Mao, G. *et al.* Progesterone Increases Systemic and Local Uterine Proportions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg Cells during Midterm Pregnancy in Mice. *Endocrinology* **151**, 5477–5488 (2010).
44. Li, X. *et al.* The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice. *J. Ethnopharmacol.* **145**, 241–253 (2013).
45. Zhong, X. *et al.* Influence of Radix scutellariae on Th1/Th2 cytokine balance in RU486-induced abortion in mice. *Front. Agric. China* **1**, 96–100 (2007).
46. Bogdan, A., Berta, G. & Szekeres-Bartho, J. PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J. Reprod. Immunol.* **119**, 38–43 (2017).
47. Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* (80-. ). **348**, 56–61 (2015).
48. Nirschl, C. J. & Drake, C. G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4917–24 (2013).

49. Williams, M. A. & Bevan, M. J. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 171–192 (2007).
50. Orabona, C., Mondanelli, G., Puccetti, P. & Grohmann, U. Immune Checkpoint Molecules, Personalized Immunotherapy, and Autoimmune Diabetes. *Trends in Molecular Medicine* **24**, 931–941 (2018).
51. Monney, L. *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–41 (2002).
52. Miko, E., Meggyes, M., Doba, K., Barakonyi, A. & Szereday, L. Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
53. Lajko, A., Meggyes, M., Polgar, B. & Szereday, L. The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. **13**, e0194870 (2018).
54. Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 1245–1252 (2005).
55. Wolf, Y., Anderson, A. C. & Kuchroo, V. K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nature Reviews Immunology* **20**, 173–185 (2020).
56. Moritoki, M. *et al.* Galectin-9 Ameliorates Clinical Severity of MRL/lpr Lupus-Prone Mice by Inducing Plasma Cell Apoptosis Independently of Tim-3. *PLoS One* **8**, e60807 (2013).
57. Zhou, X. *et al.* Galectin-9 Expression Predicts Favorable Clinical Outcome in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
58. Sabatos, C. A. *et al.* Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **4**, 1102–1110 (2003).
59. Seki, M. *et al.* Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.* **127**, 78–88 (2008).

60. Tang, Z.-H. *et al.* Tim-3/Galectin-9 Regulate the Homeostasis of Hepatic NKT Cells in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Immunol.* **190**, 1788–1796 (2013).
61. Chabtini, L. *et al.* TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance. *J. Immunol.* **190**, 88–96 (2013).
62. Li, Y.-H. *et al.* The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* (2015). doi:10.1038/cmi.2014.126
63. Tripathi, S. *et al.* Effect of TIM-3 blockade on the immunophenotype and cytokine profile of murine uterine NK cells. *PLoS One* **10**, (2015).
64. Shi, F. *et al.* PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. cancer* **128**, 887–96 (2011).
65. Ashkar, A. A. *et al.* Assessment of Requirements for IL-15 and IFN Regulatory Factors in Uterine NK Cell Differentiation and Function During Pregnancy. *J. Immunol.* **171**, 2937–2944 (2003).
66. Wang, S. *et al.* Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4+ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum. Reprod.* **31**, 700–11 (2016).
67. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
68. Joshi, H. & Press, M. F. Molecular Oncology of Breast Cancer. *The Breast* 282-307.e5 (2018). doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2
69. Mir, M. A. & Mir, M. A. Costimulation in Lymphomas and Cancers. *Dev. Costimulatory Mol. Immunother. Dis.* 185–254 (2015). doi:10.1016/B978-0-12-802585-7.00005-4
70. Petroff, M. G. *et al.* B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. *Biol. Reprod.* **68**, 1496–504 (2003).
71. Veras, E., Kurman, R. J., Wang, T.-L. & Shih, I.-M. PD-L1 Expression in Human Placentas and Gestational Trophoblastic Diseases. *Int. J. Gynecol. Pathol.* (2016). doi:10.1097/PGP.0000000000000305

72. Manjili, M. H. A Theoretical Basis for the Efficacy of Cancer Immunotherapy and Immunogenic Tumor Dormancy: The Adaptation Model of Immunity. *Adv. Cancer Res.* **137**, 17–36 (2018).
73. Lewkowich, I. P. *et al.* PD-L2 modulates asthma severity by directly decreasing dendritic cell IL-12 production. *Mucosal Immunol.* **6**, 728–39 (2013).
74. Rozali, E. N., Hato, S. V., Robinson, B. W., Lake, R. A. & Lesterhuis, W. J. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**, (2012).
75. Guleria, I. *et al.* A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J. Exp. Med.* **202**, 231–7 (2005).
76. Liang, S. C. *et al.* Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2706–2716 (2003).
77. D’Addio, F. *et al.* The Link between the PDL1 Costimulatory Pathway and Th17 in Fetomaternal Tolerance. *J. Immunol.* **187**, 4530–4541 (2011).
78. Habicht, A. *et al.* A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. *J. Immunol.* **179**, 5211–9 (2007).
79. Taglauer, E. S., Yankee, T. M. & Petroff, M. G. Maternal PD-1 regulates accumulation of fetal antigen-specific CD8+ T cells in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **80**, 12–21 (2009).
80. Miyata, A. *et al.* Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1989). doi:10.1016/0006-291X(89)91757-9
81. Miyata, A. *et al.* Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 643–648 (1990).
82. Botia, B. *et al.* Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* **28**, 1746–1752 (2007).
83. Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K. & Shioda, S. Role of PACAP in ischemic neural death. *Journal of Molecular Neuroscience* **36**, 16–25 (2008).
84. Reglodi, D., Vaczy, A., Rubio-Beltran, E. & MaassenVanDenBrink, A. Protective effects of PACAP in ischemia. *Journal of Headache and Pain* **19**, (2018).

85. Szakaly, P. *et al.* Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides* **45**, 113–121 (2011).
86. Reglodi, D. *et al.* Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient Mice. *Reproduction* **155**, 129–139 (2018).
87. Hirabayashi, T., Nakamachi, T. & Shioda, S. Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *J. Headache Pain* **19**, 28 (2018).
88. Hashimoto, H. *et al.* Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13355–13360 (2001).
89. Reglodi, D. *et al.* PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* **48**, 482–92 (2012).
90. Steenstrup, B. R. *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul. Pept.* **61**, 197–204 (1996).
91. Winters, S. J. & Moore, J. P. PACAP: A regulator of mammalian reproductive function. *Molecular and cellular endocrinology* 110912 (2020).  
doi:10.1016/j.mce.2020.110912
92. Reglodi, D., Tamas, A., Koppan, M., Szogyi, D. & Welke, L. Role of PACAP in Female Fertility and Reproduction at Gonadal Level - Recent Advances. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 155 (2012).
93. Brubel, R. *et al.* Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide on Human Sperm Motility. *J. Mol. Neurosci.* **48**, 623–630 (2012).
94. Brubel, R. *et al.* Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **46**, 189–194 (2011).



95. Kanasaki, H., Oride, A., Tselmeg, M., Sukhbaatar, U. & Kyo, S. Role of PACAP and Its PACAP Type I Receptor in the Central Control of Reproductive Hormones. in *D. Reglodi, A. Tamas (Eds.), Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP, Springer Nature, New York* 375–387 (2016). doi:10.1007/978-3-319-35135-3\_22
96. Canipari, R., Di Paolo, V., Barberi, M. & Cecconi, S. PACAP in the Reproductive System. in *D. Reglodi, A. Tamas (Eds.), Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide – PACAP, Springer Nature, New York* 405–420 (2016). doi:10.1007/978-3-319-35135-3\_24
97. Andersen, M. D. *et al.* Animal Models of Fetal Medicine and Obstetrics. in *Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy* (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.74038
98. Blois, S. M. *et al.* Pregnancy galectinology: Insights into a complex network of glycan binding proteins. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
99. Heusschen, R. *et al.* Profiling Lgals9 Splice Variant Expression at the Fetal-Maternal Interface: Implications in Normal and Pathological Human Pregnancy1. *Biol. Reprod.* **88**, 22 (2013).
100. Popovici, R. M., Krause, M. S., Germeyer, A., Strowitzki, T. & von Wolff, M. Galectin-9: a new endometrial epithelial marker for the mid- and late-secretory and decidual phases in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6170–6 (2005).
101. Shimizu, Y. *et al.* Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocr. J.* **55**, 879–87 (2008).
102. Meggyes, M. *et al.* Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta* **36**, 1153–1160 (2015).
103. Zuckermann, F. A. & Head, J. R. Expression of MHC antigens on murine trophoblast and their modulation by interferon. *J. Immunol.* **137**, 846–53 (1986).
104. Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 584–594 (2006).

105. Redline, R. W. & Lu, C. Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab. Invest.* **61**, 27–36 (1989).
106. He, M. *et al.* Impaired Gal-9 Dysregulates the PBMC-Induced Th1/Th2 Imbalance in Abortion-Prone Matings. *J. Immunol. Res.* **2018**, (2018).
107. Wang, F. *et al.* Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Immunobiology* **214**, 342–349 (2009).
108. Oomizu, S. *et al.* Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion. *PLoS One* **7**, e48574 (2012).
109. Mincheva-Nilsson, L. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 120 (2003).
110. Blois, S. M., Klapp, B. F. & Barrientos, G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J. Reprod. Immunol.* **88**, 86–92 (2011).
111. Ito, K. *et al.* Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 740–4 (2000).
112. Ndhlovu, L. C. *et al.* Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* **119**, 3734–43 (2012).
113. Zhu, H. *et al.* Mifepristone Treatment in Pregnant Murine Model Induced Mammary Gland Dysplasia and Postpartum Hypogalactia. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
114. Chen, Y., Wang, Y., Zhuang, Y., Zhou, F. & Huang, L. Mifepristone Increases the Cytotoxicity of Uterine Natural Killer Cells by Acting as a Glucocorticoid Antagonist via ERK Activation. *PLoS One* **7**, e36413 (2012).
115. Narvekar, N. *et al.* Low-dose mifepristone inhibits endometrial proliferation and up-regulates androgen receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2491–7 (2004).
116. Chien, C. H. *et al.* Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human T cells. *Hum. Reprod.* **24**, 1968–1975 (2009).

117. Hansen, K. A., Opsahl, M. S., Nieman, L. K., Baker, J. R. & Klein, T. A. Natural killer cell activity from pregnant subjects is modulated by RU 486. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166**, 87–90 (1992).
118. Szekeres-Bartho, J., Chaouat, G. & Kinsky, R. A progesterone-induced blocking factor corrects high resorption rates in mice treated with antiprogestosterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**, 1320–2 (1990).
119. Huang, D. M., Nardo, L. G., Huang, G. Y., Lu, F. E. & Liu, Y. J. Effect of a single dose of mifepristone on expression of pinopodes in endometrial surface of mice. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 212–219 (2005).
120. Lv, F. *et al.* Repeated abortion affects subsequent pregnancy outcomes in BALB/c mice. *PLoS One* **7**, e48384 (2012).
121. Chen, J. G. *et al.* Baicalin can attenuate the inhibitory effects of mifepristone on Wnt pathway during peri-implantation period in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **149**, 11–16 (2015).
122. Szekeres-Bartho, J., Par, G., Dombay, G., Smart, Y. C. & Volgyi, Z. The Antiabortive Effect of Progesterone-Induced Blocking Factor in Mice Is Manifested by Modulating NK Activity. *Cell. Immunol.* **177**, 194–199 (1997).
123. Szekeres-Bartho, J. *et al.* Progesterone-Dependent Immunomodulation. in *Immunology of Pregnancy* **89**, 118–125 (KARGER, 2005).
124. Mao, G. *et al.* Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology* **151**, 5477–88 (2010).
125. Gratz, I. K. & Campbell, D. J. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. *Front. Immunol.* **5**, 333 (2014).
126. Hu, X.-H., Tang, M.-X., Mor, G. & Liao, A.-H. Tim-3: Expression on immune cells and roles at the maternal-fetal interface. *J. Reprod. Immunol.* **118**, 92–99 (2016).
127. Meggyes, M. *et al.* Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta* **36**, 1153–60 (2015).

128. Meggyes, M. *et al.* 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* **9**, e92371 (2014).
129. Li, Y.-H. *et al.* The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal–fetal interface in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 73–81 (2016).
130. Sun, J. *et al.* Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway. *PLoS One* **11**, e0147186 (2016).
131. Hastings, W. D. *et al.* TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2492–2501 (2009).
132. Pinget, G. V *et al.* The majority of murine  $\gamma\delta$  T cells at the maternal-fetal interface in pregnancy produce IL-17. *Immunol. Cell Biol.* (2016).  
doi:10.1038/icb.2016.48
133. Lee, J. H., Ulrich, B., Cho, J., Park, J. & Kim, C. H. Progesterone Promotes Differentiation of Human Cord Blood Fetal T Cells into T Regulatory Cells but Suppresses Their Differentiation into Th17 Cells. *J. Immunol.* **187**, 1778–1787 (2011).
134. Miyaura, H. & Iwata, M. Direct and Indirect Inhibition of Th1 Development by Progesterone and Glucocorticoids. *J. Immunol.* **168**, 1087–1094 (2002).
135. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. & Ito, M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 601–610 (2010).
136. Liu, Y.-S. *et al.* Study on the Relationship Between Th17 Cells and Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* **65**, 503–511 (2011).
137. Piccinni, M.-P. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J. Reprod. Immunol.* **85**, 71–75 (2010).
138. Isaac, E. R. & Sherwood, N. M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **280**, 13–19 (2008).
139. Shintani, N. *et al.* Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regul. Pept.* **109**, 45–48 (2002).

140. Szekeres-Bartho, J. *et al.* Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1037–48 (2001).
141. Szekeres-Bartho, J., Par, G., Szereday, L., Smart, C. Y. & Achatz, I. Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38**, 176–82 (1997).

## IX. Publikációk

### A téziszhez kapcsolódó tudományos közlemények

**Lajkó A.**, Meggyes M., Fülöp BD., Gede N., Reglődi D., Szereday L.: Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018 Oct;80(4):e13035. doi: 10.1111/aji.13035. **IF: 3,091**

**Lajkó A.**, Meggyes M., Polgár B., Szereday L.: The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. *PLoS One*. 2018 Mar 22;13(3):e0194870. doi: 10.1371/journal.pone.0194870. **IF: 2,776**

Meggyes M., **Lajkó A.**, Palkovics T., Totsimon A., Illés Z., Szereday L, Mikó É.: Feto-maternal immune regulation by TIM-3/Galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta*. 2015.07.18.; pii: S0143-4004(15)30018-7. **IF: 2,972**

**Az értekezés alapját képező eredeti közlemények kumulatív impakt faktora: 8,839**

### Egyéb tudományos közlemények

Meggyes M., **Lajkó A.**, Fülöp BD., Reglődi D., Szereday L.: Phenotypic characterization of testicular immune cells expressing immune checkpoint molecules in wild-type and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-deficient mice. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2019 Nov 22:e13212. doi: 10.1111/aji.13212. **IF: 2,739**

Meggyes M., Mikó É, **Lajkó A.**, Csiszár B., Sándor B., Mátrai P., Tamás P., Szereday L.: Involvement of the PD-1/PD-L1 Co-Inhibitory Pathway in the Pathogenesis of the Inflammatory Stage of Early-Onset Preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Jan 29;20(3). pii: E583. doi: 10.3390/ijms20030583. **IF: 4,556**

Meggyes M., Szántó J., **Lajkó A.**, Farkas B., Várnagy Á., Tamás P., Hantosi E., Mikó É., Szereday L.: The possible role of CD8<sup>+</sup>/V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>/CD161<sup>++</sup> T (MAIT) and CD8<sup>+</sup>/V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>/CD161<sup>lo</sup> T (MAIT-like) cells in the pathogenesis of early-onset preeclampsia. American Journal of Reproductive Immunology. 2018 Feb;79(2). doi: 10.1111/aji.12805. **IF: 3,091**

**Kumulatív impakt faktor: 19,225**

A tézishez kapcsolódó előadások

**Lajkó A.**, Meggyes M., Mikó É., Szereday L.: Alternatív állatkísérleti módszerek a Pécsi Tudományegyetemen. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 2017.05.19-21., Pécs

**Lajkó A.**, Meggyes M., Mikó É., Szereday L.: A „3R szabály” alkalmazása a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézetében. Tavasz szél konferencia. 2017.01., Miskolc

**Lajkó A.**, Meggyes M., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: Feto-maternal immune regulation by PD-1 molecule in pregnant mice. 13th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction. 2016.06.22-26., Erfurt

**Lajkó A.**, Meggyes M., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: Immune regulation by PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 2016.05.27-29., Pécs

Szántó J., **Lajkó A.**, Szereday L., Meggyes M.: Immunreguláció pathológiás terhesség alatt: PD-1/PD-L1 expresszió összehasonlítása egészséges terhes és early-onset preeclampsias nőknél. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 2016.05.27-29., Pécs

**Lajkó A.:** Immunhisztokémia optimalizálása és Galektin-9 molekula vizsgálata egészséges és kóros placenta mintákon. Tavaszi szél konferencia. 2016.04.15-17., Budapest

**Lajkó A.,** Meggyes M., Tótsimon A., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: Galektin-9 molekula vizsgálata perifériás és deciduális mononukleáris sejteken terhes egérmódelben. Doctoral Workshop. 2015.10.10., Pécs

**Lajkó A.,** Meggyes M., Tótsimon A., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: Investigating Galectin-9 molecule expression by peripheral and decidual mononuclear cells in pregnant mice. Tavaszi szél konferencia. 2015.04.10-12., Eger

Meggyes M., Mikó É., Polgár B., **Lajkó A.,** Szekeres-Barthó J., Szereday L.: TIM3/Galectin-9 in normal pregnancy and in early-onset preeclampsia. Magyar Immunológiai Társaság XLIII. Vándorgyűlése, 2014.10.15-17. Velence, Immunológiai Szemle, 2014, 3:36

A tézishez kapcsolódó poszter prezentációk

**Lajkó A.,** Meggyes M, Szántó J, Polgár B, Szereday L: The role of Galectin-9/TIM-3 pathway in Mifepristone induced medical aborted mice. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology, 2016.09.27-30., Hamburg

**Lajkó A.,** Meggyes M., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: PD-1 molekula immunregulációja terhes egérben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferencia (FAMÉ 2016), 2016.06.1-4., Pécs

**Lajkó A.,** Meggyes M., Tótsimon A., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: The possible role of Galectin-9/TIM-3 pathway in Mifepristone induced medical abortion in mice. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése. 2015.10.14-16. Velence



Meggyes M., Szántó J, Mikó É, **Lajkó A**, Szereday L.: Investigating PD-1 and PD-L1 expression in normal pregnancy and in early onset preeclampsia. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése. 2015.10.14-16. Velence

Meggyes M., **Lajkó A.**, Mikó É., Illés Z., Szekeres-Barthó J., Szereday L.: The significance of Galectin-9/TIM3 pathway in mifepristone induced medical abortion in BALB/c mice. 12th Conference of the European Society for Reproductive Immunology. 2015.09.21-24. Oxford

**Lajkó A.**, Meggyes M., Tótsimon A., Szántó J., Mikó É., Szereday L.: The possible role of Galectin-9/TIM3 pathway in fetomaternal tolerance in pregnant mice. 4th European Congress of Immunology, 2015.09.6-9., Bécs



# Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy



Matyas Meggyes<sup>a, b</sup>, Adrienn Lajko<sup>a</sup>, Tamas Palkovics<sup>a, b</sup>, Anett Totsimon<sup>a</sup>, Zsolt Illes<sup>c, d</sup>, Laszlo Szereday<sup>a, b, \*</sup>, Eva Miko<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> University of Pecs, Clinical Centre, Department of Medical Microbiology and Immunology, Pecs, Hungary

<sup>b</sup> Janos Szentagothai Research Centre, Pecs, Hungary

<sup>c</sup> Department of Neurology, Odense University Hospital, Odense, Denmark

<sup>d</sup> Institute of Clinical Research, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 May 2015

Received in revised form

8 July 2015

Accepted 13 July 2015

### Keywords:

TIM-3

Gal-9

PD-1

Pregnancy

Feto-maternal interface

Immunity

## ABSTRACT

**Introduction:** Immunoregulation implies the activation of negative pathways leading to the modulation of specific immune responses. Co-inhibitory receptors (such as PD-1 and TIM-3) represent possible tools for this purpose. PD-1 and TIM-3 have been demonstrated to be present on immune cells suggesting general involvement in immunosuppression such as fetomaternal tolerance. The aim of our study was to investigate the expression pattern of PD-1, TIM-3, and its ligand Gal-9 on different immune cell subsets in the peripheral blood and at the fetomaternal interface in pregnant mice.

**Methods:** TIM-3 and PD-1 expression by peripheral and decidual immune cells from pregnant BALB-c mice in 2 weeks of gestational age were measured by flow cytometry. Placental galectin-9 expression was determined by immunohistochemically and RT-PCR.

**Results:** Gal-9 was found to be present in the spongiosotrophoblast layer of the haemochorial placenta. Decidual NK, NKT and  $\gamma/\delta$  T cells showed increased PD-1 expression and reduced cytotoxic potential when compared to the periphery. TIM-3 expression by NK cells and  $\gamma/\delta$  T cells is similar both in the periphery and in the decidua, notably, their relative TIM-3 expression is increased locally which is associated with reduced lytic activity. Decidual NKT cells exhibit a reduced TIM-3 expression with increased relative receptor expression and a slightly increased cytotoxicity when compared to the periphery.

**Discussion:** Our data reveals a particularly complex, tissue and cell type specific immunoregulatory mechanism by the investigated co-inhibitory receptors at the fetomaternal interface.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

During pregnancy, immunological recognition of the semi-allogenic fetus by the maternal immune system leads to a unique immune response phenomenon. At the very early stage of pregnancy, immunotolerance of the fetus has to be synchronized with decidual inflammatory processes required for successful

implantation and placentation of the embryo. Later on, besides allowing fetal development the maternal immune system should be able to generate adequate responses to infections or eradicate nascent tumor cells. Therefore, controlling and regulating contradictory immune effector functions during pregnancy portrays a key role in maintaining immune homeostasis. Immunoregulation is mediated by a complex network of cellular and molecular interactions with the predominant role of regulatory T cells as cellular components of the immune system and an increased number of molecules with immunoregulatory capacity.

TIM-3 was first identified as a receptor specifically expressed by terminally differentiated IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T helper 1 (Th1) and on CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells [1]. Several studies demonstrated the expression of TIM-3 on a variety of immune cells including Th1, Th17, NK cells, NKT cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (Tregs) and on cells of

**Abbreviations:** DC, dendritic cell; Gal-9, galectin-9; Gd, gestation day; PD-1, programmed cell death-1; RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute formulation 1640; QRT-PCR, quantitative real-time PCR; TIM-3, T cell immunoglobulin and mucin domain 3.

\* Corresponding author. University of Pecs, Clinical Centre, Department of Medical Microbiology and Immunology, Pecs, Hungary.

E-mail address: [szereday.laszlo@pte.hu](mailto:szereday.laszlo@pte.hu) (L. Szereday).

the innate immune system, including dendritic cells (DCs), macrophages [2], and mast cells [3]. Mounting evidence supports the crucial role of TIM-3 in regulating immune responses [4] but the *in vivo* function of this receptor is still poorly understood. Using an allogeneic mouse model of pregnancy Chabtni et al. examined the TIM-3 expression on antigen presenting myeloid cells and indicated their possible role in the regulation of tolerance at the fetomaternal interface [5].

Galectin-9 (Gal-9), an endogenous lectin, was originally described as a potent eosinophil chemoattractant. Gal-9 can influence the immune system in different ways [6], either by exacerbating the inflammatory process [7] or by exhibiting therapeutic effects in autoimmune disease models, such as autoimmune arthritis, experimental allergic encephalomyelitis, and type 1 diabetes mellitus. Notably, it is generally believed that the engagement of Gal-9 by its receptor TIM-3 established the Gal-9/TIM-3 pathway as a novel regulator of Th1 immunity and tolerance induction [8].

TIM-3 is the most extensively studied Gal-9 receptor. A growing body of evidence proves that the engagement of these two molecules leads to the death of Th1 and Th17 cells thus negatively regulates IFN- $\gamma$  secretion, furthermore influences the ability to induce T cell tolerance and triggers a significant signal cascade to induce apoptosis of Th1 type immune cells in both mice and humans [9–11]. Therefore, the connection between TIM-3 and Gal-9 may function as a negative regulator, dampening Th1- and Th17 driven immune responses and inducing peripheral tolerance by modulating the Th1/Th2 balance [12].

The TIM-3 mediated immunomodulation was first described as a clearly negative regulatory mechanism inducing immunotolerance and T cell apoptosis [13]. However, there are conflicting data surrounding the TIM-3 mediated regulation of innate immunity. In addition to suggesting similar immunosuppressive actions of TIM-3 on innate immune cells, as observed in T cells [14,15], TIM-3 was also found to promote innate immune responses [2,16]. Moreover, several recently published papers report that in reference to viral infections, overexpression of TIM-3 on NK cells was associated with effector dysfunction [17,18].

Programmed cell death-1 (PD-1) is a receptor and a member of the B7/CD28 family. It is known to downregulate T cell functions. PD-1 expression was observed on CD4<sup>+</sup> Th- and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, B lymphocytes, Tregs, NK, NKT cells, DCs, and activated monocytes [19]. PD-1 is not expressed on resting T cells but is inducible upon activation [20]. Known ligands of PD-1 include PD-L1 [21,22] and PD-L2 [23]. The binding of PD-1 on T cells with its ligand PD-L1 leads to decreased cytokine production and negatively regulates T cell proliferation and cell lysis during immune responses to pathogens or cancer [24]. Many publications revealed and characterized PD-1 as a classical exhaustion marker of T cells with poor effector functions [25,26].

Since pregnancy represents a unique model of local immunotolerance, regulatory pathways exerted by these co-inhibitory molecules could have significant impact on maternal immunosuppression. Therefore, the aim of our study was to investigate the expression pattern of TIM-3, PD-1 and Gal-9 on different immune cell subsets in the peripheral blood and at the fetomaternal interface.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal model

Young (2 months) BALB-c mice were purchased from the Pécs Experimental Central Animal Laboratory and maintained on a 12 h light/dark cycle at 20–22 °C, 40–60% humidity, and were fed with standard feed pellets and tap water. Potential mates were paired up

each evening and the presence of the copulatory plug was examined next morning. Once a plug is detected it is considered the gestation day (gd) 0.5. Gravid females were killed on gd 14.5 by cervical dislocation, the spleen and the uterine horns were aseptically removed. Animal housing, care, and application of experimental procedures were in accordance with institutional guidelines under approved protocols (No. BA02/2000–20/2006, University of Pécs).

### 2.2. Isolation of mononuclear cells from the spleen

Spleens were homogenized thoroughly with a syringe plunger, and single-cell suspensions were prepared using a 70- $\mu$ m nylon cell strainer (BD Pharmingen). Subsequently, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS). Supernatant was aspirated and the pellet was resuspended in PBS and filtered via 40- $\mu$ m nylon cell strainer (BD Pharmingen). Mononuclear cells were isolated on Ficoll–Paque (GE Healthcare) gradient. Cells were collected and resuspended in RPMI 1640 (Lonza) supplemented with penicillin (Lonza), streptomycin (Lonza) and 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco).

### 2.3. Isolation of mononuclear cells from the decidua

The conceptus with the placenta was removed from the surrounding area of the endometrial tissue. Then the decidua was separated from the isolated placenta, sliced with scissors and finally digested with collagenase (Sigma–Aldrich) for 30 min at 37 °C. Placentas were removed and divided into pieces for RNA isolation followed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and complete implantations were frozen for immunohistochemistry. The decidua next were homogenized thoroughly with a syringe plunger, and single-cell suspensions were prepared using a 70- $\mu$ m nylon cell strainer. Subsequently, cells were washed in RPMI 1640 supplemented with penicillin, streptomycin and 10% FCS. The supernatant was aspirated and the pellet was resuspended in PBS and filtered via 40- $\mu$ m nylon cell strainer. Mononuclear cells were isolated on Ficoll–Paque gradient. Cells were collected and resuspended in RPMI 1640.

### 2.4. Labeling of mononuclear cell and flow cytometric analysis

The isolated mononuclear cells ( $1 \times 10^6$  in 100  $\mu$ l PBS/tube) were incubated for 30 min at room temperature (RT) with fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. Following surface staining, the cells were washed with PBS, resuspended in 300  $\mu$ l PBS containing 1% paraformaldehyde (PFA) and stored at 4 °C in the dark until fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Labeled cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) equipped with the CellQuest software program (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) with the BD FACSDiva V6. software for data acquisition and analysis.

### 2.5. Antibodies

The following monoclonal antibodies were implemented:

Brilliant Violet (BV) 421-conjugated anti-mouse PD-1 (BD Pharmingen), BV510-conjugated anti-mouse CD3 (BD Pharmingen), BV510-conjugated anti-mouse  $\gamma/\delta$  (BD Pharmingen), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CD4 (BD Pharmingen), FITC-conjugated anti-mouse CD8 (BD Pharmingen), FITC-conjugated anti-mouse CD107a (BD Pharmingen), FITC-conjugated anti-mouse CD49b (BD Pharmingen), FITC-conjugated

anti-mouse  $\gamma/\delta$  (BD Pharmingen), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse  $\gamma/\delta$  (BD-Pharmingen), PE-conjugated anti-mouse TIM-3 (R and D Systems), PE-conjugated anti-mouse Gal-9 (Biolegend), PE-conjugated anti-mouse CD49b (BD Pharmingen), PE-conjugated anti-mouse CD8 (BD Pharmingen), peridinin chlorophyll a protein (PerCP)-conjugated anti-mouse CD3 (BD Pharmingen), PerCP-conjugated anti-mouse CD45 (BD Pharmingen), PE-Cy7-conjugated anti-mouse CD25 (BD Pharmingen), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human TIM-3 (R and D Systems), APC-conjugated anti-human FoxP3 (eBioscience) and APC-H7-conjugated anti-human CD8 (BD Pharmingen). Control antibodies included isotype-matched FITC-conjugated, PE-conjugated, PerCP-conjugated and APC-conjugated rat antibodies.

## 2.6. FoxP3 staining

Following surface labeling intracellular staining of FoxP3 was performed using the FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) accordance with the manufacturer's protocol. Briefly, cells were permeabilized in 1 ml fixation/permeabilization buffer (Concentrate/Diluent 1:4) for 1 h at 4 °C. Then the samples were washed twice in buffer and stained with the APC-conjugated anti-mouse FoxP3 monoclonal antibody for 1 h at 4 °C. Flow cytometric analysis was performed on FACSCalibur flow cytometer equipped with the CellQuest software and a BD FACSCanto II flow cytometer with the BD FACSDiva V6. software for data acquisition and analysis.

## 2.7. CD107a functional assay

To determine CD107a surface expression, the cells were incubated for 4 h at 37 °C in the presence of FITC-conjugated anti-mouse CD107a monoclonal antibody in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, penicillin, streptomycin, ionomycin (Sigma–Aldrich) and phorbol myristate acetate (PMA), (Sigma–Aldrich). The cells were washed and resuspended in PBS then incubated with PE-conjugated anti-mouse  $\gamma/\delta$ , PE-conjugated anti-mouse CD8, PE-conjugated anti-mouse CD49b and PerCP-conjugated anti-mouse CD3 mAb for 30 min at room temperature in complete darkness. The cells were washed in PBS, fixed with 1% PFA and evaluated by FACS.

## 2.8. PMA/ion treatment

The isolated peripheral and decidual mononuclear cells were treated in 96-well plates. The cells were diluted to a final concentration of  $2 \times 10^5$  cells/0.2 ml in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine, penicillin and streptomycin and washed for 7 min and centrifuged at 1200 RPM. The supernatant was aspirated and the cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, P, S, PMA (1 ng/ml), Ion (50 ng/ml) and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation the plates were centrifuged at 1200 RPM for 7 min. The cell free supernatants were collected, aliquoted and stored at –80 °C in mechanical freezer for additional cytokine analyses.

## 2.9. Immunohistochemistry (IHC)

Placental tissue sections were embedded in paraffin and 4  $\mu$ m thick sections were prepared after being fixed with 4% neutral formalin for more than 24 h. After being deparaffinized in xylol, three times in each for 5 min and rehydrated in degraded alcohol series (96%, 80%, 70%, 50%) for 5 min each, the mouse paraffin-embedded tissue sections were washed in distilled water (dH<sub>2</sub>O). Afterward the antigen retrieval was performed in boiling citrate buffer for 20 min (1:10; pH 6.0–6.2; Dako). Next, the samples were cooled down to RT and a double washing step was performed with

dH<sub>2</sub>O. During the blocking of endogenous peroxidase the samples were kept for 15 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which was diluted in TBS. The revealing was finished by a double washing step in dH<sub>2</sub>O. The samples were washed twice with TBS supplemented with Tween (0.05%, pH 7.4) for 5 min and pre-blocked with 3% BSA for 20 min. The tissue sections were washed with TBST for 5–10 min and incubated with biotinylated anti mouse Galectin-9 primary antibody (1:10; R&D) for 1 h at RT. After washing the slides three times in TBST the samples were incubated with Streptavidin-Biotinylated Horseradish Peroxidase Complex (1:100; GE Healthcare) for 30 min at RT. Following the washing procedure (three times), the signal was detected with Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako) for 5–30 min at RT. In an effort to stop and pause the reaction, the slides were positioned in ultrapure water followed by two distinct rinse cycles in dH<sub>2</sub>O was performed. Hematoxylin counterstain was performed for 3 min at RT then rinsed three times with tap water. During the final step, the slides were covered with gelatin-glycerol solution.

Histological evaluation was performed by a pathologist generating a qualitative assessment on all tissues sections.

## 2.10. RNA isolation, cDNA synthesis, qRT-PCR

Placental tissues and resorptions from mice were homogenized with tissue homogenizer (Sigma–Aldrich). Total RNA was isolated using RNeasyProtect Mini kit (Qiagen) accordance with the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity was checked by spectrophotometry using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Extracted RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). The differential expression of Gal-9 gene was confirmed by using qRT-PCR method. The qRT-PCR examinations were implemented using an SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) and a Rotor-Gene RG-3000 thermal cycler system (Corbett Research). QuantiTect primer assays were purchased from Qiagen for the genes LGALS9 as target and GAPDH as a house-keeping gene. Specificity of the PCR reaction was controlled by melting point analysis and gelelectrophoresis of the amplified DNA.

The relative changes (n-fold) in the transcription of the examined genes between samples were calculated by Rotor-Gene based on the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Statistical analysis was performed with the Relative Expression Software Tool (REST) 2009 [27].

## 2.11. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the reliable and preferred statistical software SPSS version 20. Package and the statistical comparisons were made by using the Student's t-tests. Distinctly, notable differences were determined significant if the p value was equal to or less than 0.05.

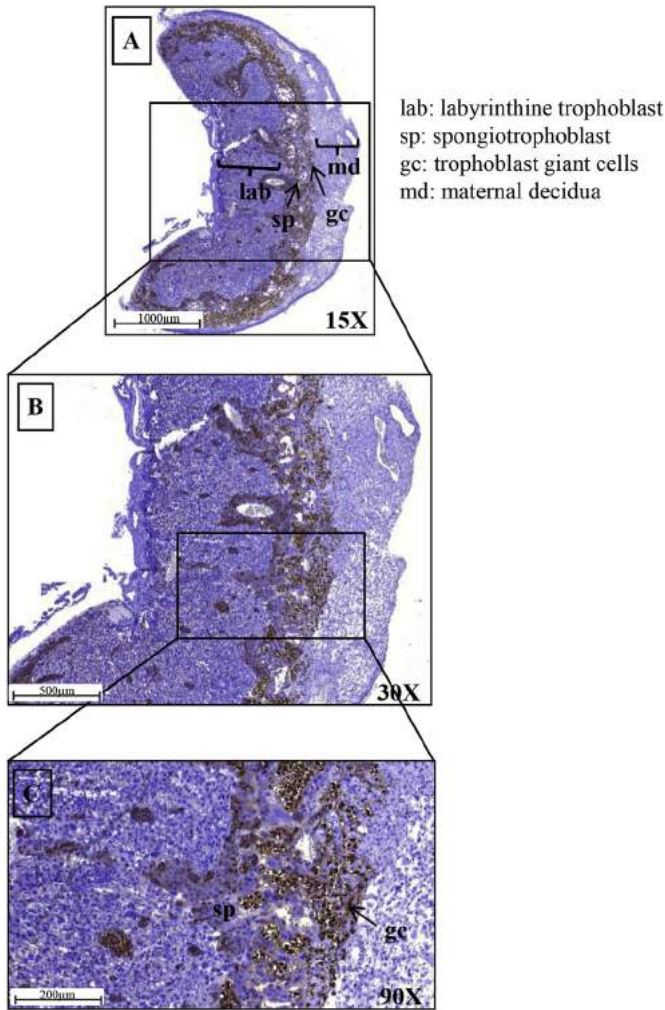
## 3. Results

### 3.1. Immunohistochemistry of pregnant mouse placentae.

We investigated the Gal-9 protein expression at the murine fetomaternal interface on gd 14.5 using immunohistochemistry. As a result, our stainings highlight that we can now effectively detect the Gal-9 molecule in the placenta spongiotrophoblast layer (Fig. 1).

### 3.2. Gal-9 expression by Treg cells and the proportion of Gal-9+ Th cell population in spleen and decidua.

We analyzed the surface Gal-9 expression by splenic and decidual regulatory T cells, in pregnant mice. We discovered a



**Fig. 1. Immunohistochemical staining of pregnant mouse placentae.** IHC was performed on pregnant mouse placentae with anti-Gal-9 antibody and demonstrating the presence and localization of Gal-9 within the spongiotrophoblast layer and in giant cells. Obtaining quantitative data from histological sections represent a more intense staining by trophoblast giant cells compared to spongiotrophoblast layer. The images were captures utilizing the Panoramic DESK scanner (3DHISTECH Ltd., Hungary). In acquiring the analysis, the Panoramic viewer software was implemented (3DHISTECH Ltd., Hungary).

significantly increase in Gal-9 expression by the decidual Treg cells when compared to the splenic Treg cells (Fig. 2/A).

We could not determine statistical differences in the frequency of Gal-9 positive Th cells in decidua and spleen (Fig. 2/B).

**3.3. Phenotype analysis of splenic and decidual mononuclear cells from pregnant mice in 2 weeks of gestational age.**

In our study, we investigated the percentage of CD4+, CD8+ T cells subpopulations,  $\gamma/\delta$  T cells, Treg cells, NK and NKT cells in the spleen and in the decidua of pregnant mice. We observed a significant increase in decidual  $\gamma/\delta$  T, NK and NKT cells frequency compared to the periphery while the decidual CD4+, CD8+ T and Treg cells frequency significantly decreased when compared to the periphery (Fig. 3).

**3.4. Differential TIM-3 and PD-1 expression by splenic and decidual mononuclear cell subsets.**

We measured the surface expression of TIM-3 on different lymphocyte subsets by flow cytometry. We observed a significantly decreased TIM-3 expression by decidual NKT cells compared to the periphery. TIM-3 expression showed no statistical difference between the spleen and the decidua by NK and  $\gamma/\delta$  T cells (Fig. 4/A).

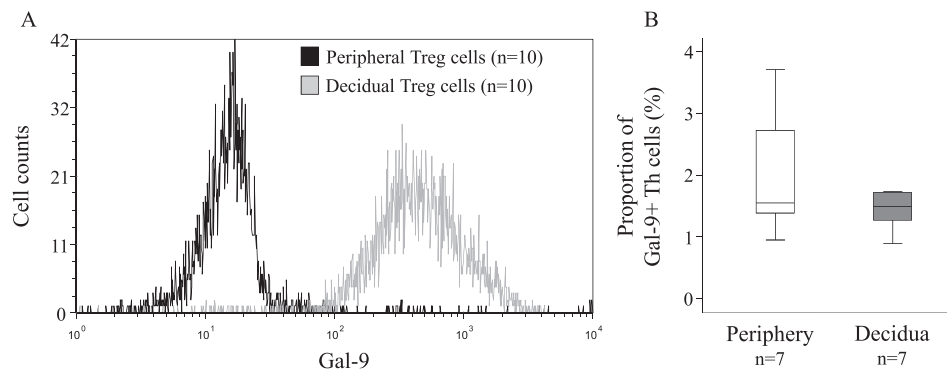
Furthermore, we also noted a significant increase in receptor density within the decidual NK, NKT and  $\gamma/\delta$  T cells when compared with the periphery (Fig. 4/B).

During our investigation of the PD-1 expression by NK cells,  $\gamma/\delta$  T and NKT cells in pregnant mice we discovered that all analyzed cell populations demonstrated an increase in PD-1 expression within the decidua compared to the periphery (Fig. 4/C).

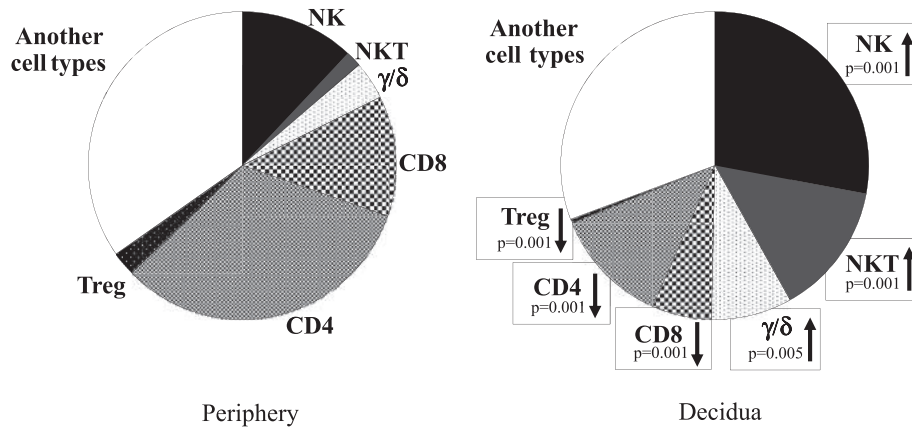
As a result of our investigation of the peripheral and decidual TIM-3/PD1 double positive cells we found a significant decrease in decidual NKT and  $\gamma/\delta$  T cells proportion compared with the periphery. Lastly, we could not detect TIM-3/PD-1 double positive NK cells in the examined tissues (Fig. 4/D).

**3.5. Cytotoxic activity of different immune cell subsets in the spleen and in the decidua of pregnant mice.**

The cytotoxic activity was evaluated by measuring the CD107a expression by the investigated cell subsets. We analyzed the CD107a expression by TIM-3+ cell subsets and our results demonstrated a significantly decreased CD107a expression by the decidual TIM-3+ NK and TIM-3+  $\gamma/\delta$  T cells compared to the



**Fig. 2. Gal-9 expression by peripheral and decidual Treg cells and the proportion of Gal-9+ Th cell population in spleen and decidua.** A: The expression of Galectin-9 by regulatory T cells T in spleen and decidua in pregnant mice. The histograms represent the density of Gal-9 in splenic and decidual Treg cells. B: The frequency of Gal-9 positive Th cells in pregnant mice spleen and decidua. The solid bars represent medians, the boxes indicate the interquartile ranges and the lines show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for P-values  $\leq 0.05$ .



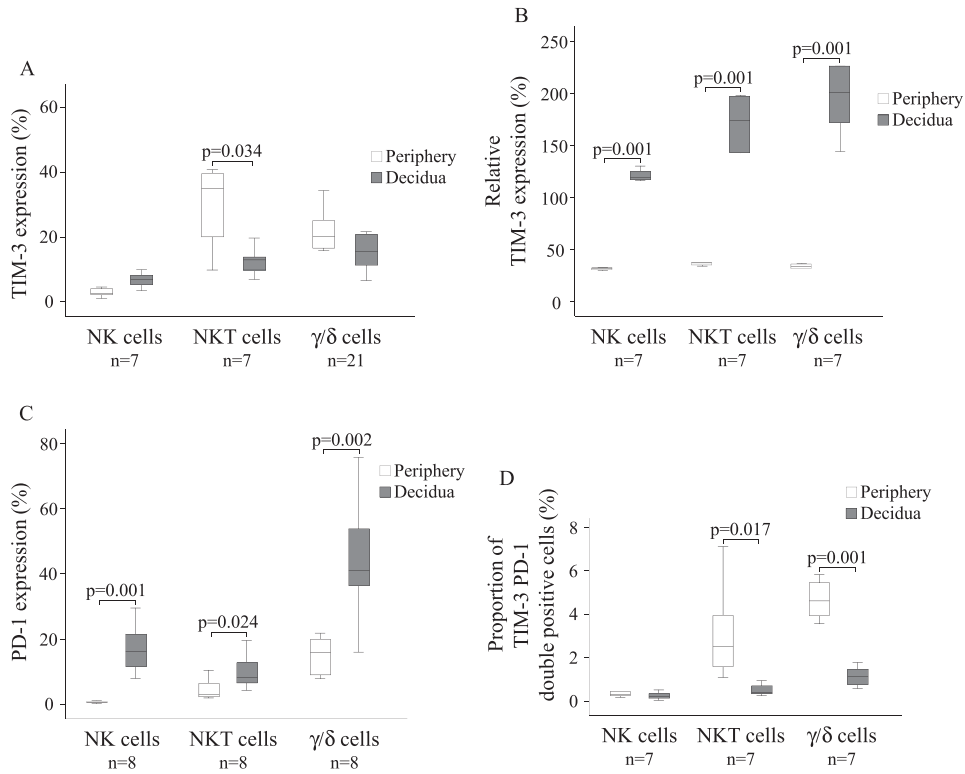
**Fig. 3. Phenotype analysis of splenic and decidual mononuclear cells.** Distribution of splenic and decidual mononuclear cell subsets in pregnant mice. The pie charts slices represent each subpopulations rate of 8 determinations, respectively. Differences were considered statistically significant for P-values  $\leq 0.05$ .

periphery (Fig 5/A). We observed an increasing tendency in the CD107a expression by decidual TIM-3 positive NKT cell which did not attain the level of statistical significance (Fig. 5/A).

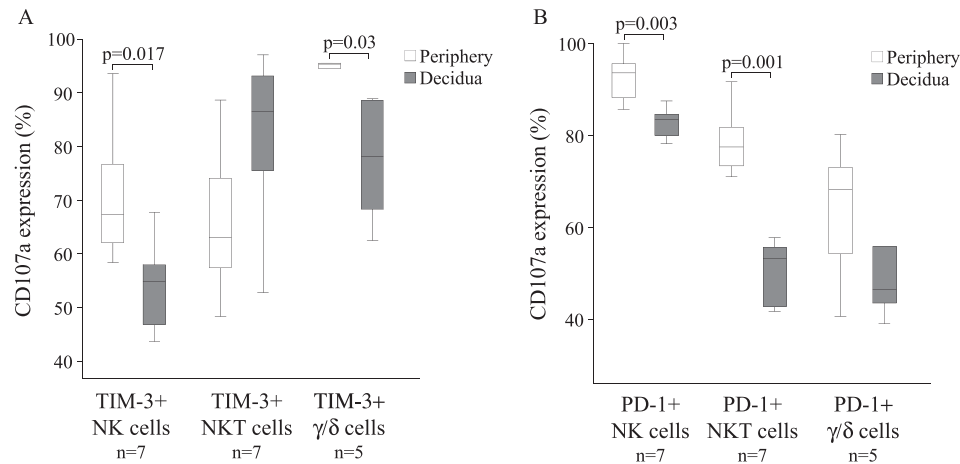
Moreover, we analyzed the CD107a expression by the PD-1+ cell populations. Decidual PD-1 positive NK and NKT cells showed significantly decreased cytotoxicity compared to the periphery (Fig. 5/B). Additionally, we discovered a decreased tendency in the cytotoxic activity by decidual PD-1 positive  $\gamma/\delta$  T cell which did not reach the level of statistical significance (Fig. 5/B).

**3.6. Expression analyses of mice placentas and resorbed embryos Gal-9 mRNA with Quantitative Real Time PCR**

To determine the relative expression of LGALS9 in placental tissue and resorbed embryos qRT-PCR analysis was performed with normalization to GAPDH as a housekeeping gene. We tested four resorbed embryos in three different mice, and all resorbed embryos showed a LGALS9 relative expression level of 0.04 compared to normal placental tissue of the same mouse.



**Fig. 4. TIM-3 and PD-1 molecule expression by splenic and decidual mononuclear cell subsets.** A: The expression of TIM-3 by NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells in spleen and decidua in pregnant mice. B: The density of TIM-3 receptor in splenic and decidual NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells in pregnant mice. C: The expression of PD-1 by NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells in spleen and decidua in pregnant mice. D: The frequency of TIM-3/PD-1 double positive NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells in pregnant mice spleen and decidua. The solid bars represent medians, the boxes indicate the interquartile ranges and the lines show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for P-values  $\leq 0.05$ .



**Fig. 5. Cytotoxicity of TIM-3 positive and PD-1 positive immune cell subsets in the spleen and in the decidua of pregnant mice.** A: The expression of CD107a by TIM-3 positive NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells in pregnant mice spleen and decidua. B: The expression of CD107a by PD-1 positive NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells in pregnant mice spleen and decidua. The solid bars represent medians, the boxes indicate the interquartile ranges and the lines show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for P-values  $\leq 0.05$ .

#### 4. Discussion

Immunoregulation typically manifests itself in the activation of negative pathways leading to the exhaustion of specific immune responses and cellular interactions. Co-inhibitory cell surface receptors (such as PD-1 and TIM-3) represent one of the primary tools for this purpose. PD-1 and TIM-3 have demonstrated their presence on a variety of immune cells emphasizing general involvement of these molecules in immunosuppression such as fetomaternal tolerance. Notably, the expression of their ligands is not restricted to a certain cell lineage but has been described in different tissues underlines their importance in regulating local immune responses *in vivo*.

Decidual expression of the ligands of PD-1 (PDL1 and PDL2) has been earlier described [28] but we report for the first time on Gal-9 expression in mouse placenta. Gal-9 was found to be present in the spongiosotrophoblast layer of the haemochorial placenta, which separates the labyrinth layer from the decidua (Fig. 6). Labyrinth cells have been shown to be MHC class I and II negative, however, spongiosotrophoblast expresses polymorphic paternally derived MHC class I molecules representing the fetal compartment of mouse placenta which is in direct contact with maternal decidua

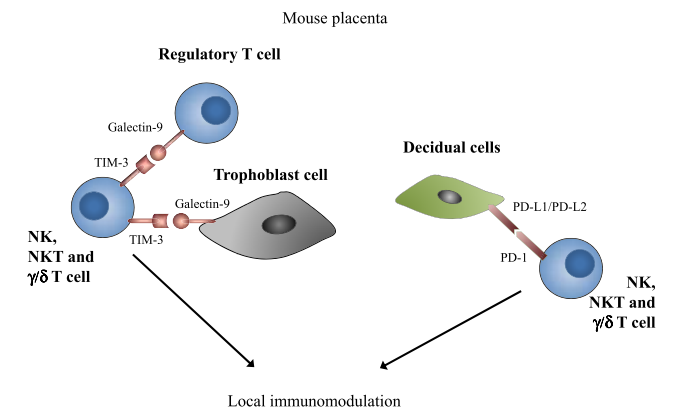
enabling immune recognition of the embryo [29–31]. The other possibility of the local presence of Gal-9 is its occurrence on the maternal side. Gal-9 cell surface expression is one of the immunosuppressive tools of regulatory T cells [32]. Within the scope of our research, we discovered significantly enhanced Gal-9 expression by decidual regulatory T cells compared to the periphery. Moreover, there is a secreted form of Gal-9 produced by Gal-9 positive Th cells [33]. Although there is a decrease in the ratio of CD4 helper T cells in the decidua, the Gal-9 secreting subpopulation is still represented locally without any changes. According to our hypothesis, these dominant presence of the ligands PDL1, PDL2 and Gal-9 at the fetomaternal interface suggest subsequent local immunomodulatory potential following maternal immunoactivation.

Among the lymphocyte subpopulations recruited in the mouse decidua we found predominantly innate immune cells (NK cells,  $\gamma/\delta$  T cells and NKT cells) and a reduced number of CD4+ and CD8+ T lymphocytes compared to the periphery. These data are consistent with previous studies on decidual lymphocyte enrichment in the mouse [34–36]. Therefore, we focused on the characteristics of co-inhibitory receptor expressing NK cells,  $\gamma/\delta$  T cells and NKT cells (Fig. 6).

During the analysis of the PD-1 expression by lymphocytes in the periphery and in the decidua, decidual lymphocytes show a notable increased PD-1 expression in all investigated subpopulations. Cytotoxicity of the lymphocytes was measured by analyzing the expression of the degranulation marker CD107a on the cell surface. Lytic activity of PD-1 positive NK, NKT and  $\gamma/\delta$  T cells was decreased in the decidua, suggesting the involvement of these lymphocytes in fetomaternal tolerance as a potential result of the PD-1 receptor mediated pathway.

While TIM-3 expression of NK cells and  $\gamma/\delta$  T cells is similar both in the periphery and in the decidua, the relative TIM-3 expression is increased locally (higher receptor density on single cell level) indicating decidual TIM-3 expressing cells are more mature and fully functional [15]. However, cytotoxic capacity of decidual TIM-3 expressing NK cells and  $\gamma/\delta$  T cells is reduced when compared to the periphery which might be due to their upregulated relative TIM-3 expression on one hand and a much stronger local presence of its ligand Gal-9 on the other hand. Their binding could lead to the subsequent inhibition of effector functions observed here as a reduced cytotoxicity.

Investigating decidual NKT cells, this subpopulation showed a



**Fig. 6. Feto-maternal crosstalk via co-inhibitory molecules and their ligands.** The figure represents one possible pathway of decidual NK,  $\gamma/\delta$  T and NKT cells involved in local immunomodulation in late mouse pregnancy. TIM-3 and PD-1 molecules are expressed by decidual NK, NKT and  $\gamma/\delta$  T cells, while PDL1/PDL2 is expressed by the decidua and Galectin-9 is expressed by Tregs and by the trophoblast.

reduced TIM-3 expression with increased relative receptor expression when compared to the periphery. Cytotoxicity of these cell population increased locally, although not significantly. According to these data, there is a smaller TIM-3+ NKT cell subset in the decidua with stronger lytic capacity. Subsequently, on decidual NKT cells TIM-3 appears to promote cellular cytotoxicity than to suppress NKT cell activity hereby contributing to the mild inflammation required for successful pregnancy.

In analyzing the co-expression of PD-1 and TIM-3 by lymphocytes we found a very small percentage of cells involved simultaneously in both inhibitory pathways. Moreover, the percentage of double positive NKT cells and  $\gamma/\delta$  T cells further decreases in the decidua. Accordingly, these findings emphasize lymphocytes could be either PD-1 or TIM-3 committed, indicating separate action of these two co-inhibitory receptors at a cellular level leading to additive inhibitory effects considering whole lymphocytes populations.

Maternal immune responses triggered by the recognition of different fetal antigens mainly compose of tolerogenic mechanisms but there is also a small inflammatory component both for fetal (successful placentation and vascular remodeling) and for maternal advantages (immune protection against pathogens). These actions are mostly carried out by innate immune cells enriched in the decidua. We investigated the potential role of co-inhibitory molecules PD-1 and TIM-3 in maternal immune responses, since it has been shown their ligands are present at the fetomaternal interface (Fig. 6). Our research concludes PD-1 and TIM-3 expressing decidual lymphocytes were found to be more dominant than in the periphery. While PD-1 positive lymphocytes show reduced cytotoxicity, lytic activity of TIM-3 expressing cells varies with cell type suggesting opposite roles of TIM-3 on different lymphocyte subsets.

Our results were obtained from mice at gestation day 14.5 which is rather late in mouse pregnancy so even more significant Gal-9/TIM-3, PDL1-PDL2/PD-1 related changes could be observed earlier in pregnancy, which needs further investigations.

Comprehensively speaking, our data indicates a very complex, tissue and cell type specific immunoregulatory mechanism by the investigated co-inhibitory receptors at the fetomaternal interface proposing further investigations of their exact role in maternal immune responses.

### Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from Hungarian National Research Fund (OTKA K104960 and PD112465) and the Janos Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to L. Szereday.

### References

- [1] L. Monney, C.A. Sabatos, J.L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, et al., Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease [Internet] [cited 2013 Mar 12], *Nature* 415 (6871) (2002 Jan 31) 536–541. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823861>.
- [2] A.C. Anderson, D.E. Anderson, L. Bregoli, W.D. Hastings, N. Kassam, C. Lei, et al., Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells [Internet] [cited 2013 Mar 12], *Science* 318 (5853) (2007 Nov 16) 1141–1143. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006747>.
- [3] S. Nakae, M. Iikura, H. Suto, H. Akiba, D.T. Umetsu, R.H. Dekruyff, et al., TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells [Internet] [cited 2014 Feb 4], *Blood* 110 (7) (2007 Oct 1) 2565–2568. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1988955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [4] J. Lee, E.W. Su, C. Zhu, S. Hainline, J. Phuah, J.A. Morocco, et al., Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways [Internet] [cited 2013 Mar 6], *Mol. Cell Biol.* 31 (19) (2011 Oct) 3963–3974. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3187355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [5] L. Chabtni, B. Mfarrej, M. Mounayar, B. Zhu, I. Batal, P.J. Dakle, et al., TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance, *J. Immunol.* 190 (1) (2013 Jan) 88–96.
- [6] N.G. Than, R. Romero, C.J. Kim, M.R. McGowen, Z. Papp, D.E. Wildman, Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface [Internet] [cited 2015 Feb 18], *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (1) (2012 Jan) 23–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3640805&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [7] E.L. Naka, V.C. Ponciano, M.A. Cenedeze, A. Pacheco-Silva, N.O.S. Câmara, Detection of the Tim-3 ligand, galectin-9, inside the allograft during a rejection episode [Internet] [cited 2013 Mar 12], *Int. Immunopharmacol.* 9 (6) (2009 Jun) 658–662. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100864>.
- [8] M. Moritoki, T. Kadowaki, T. Niki, D. Nakano, G. Soma, H. Mori, et al., Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis independently of Tim-3 [Internet] [cited 2014 Feb 4], *PLoS One* 8 (4) (2013 Jan) e60807. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3621869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [9] C.A. Sabatos, S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sánchez-Fueyo, X.X. Zheng, et al., Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance [Internet] [cited 2013 Mar 12], *Nat. Immunol.* 4 (11) (2003 Nov) 1102–1110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556006>.
- [10] C. Zhu, A.C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S.J. Khoury, et al., The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity [Internet] [cited 2014 Feb 4], *Nat. Immunol.* 6 (12) (2005 Dec) 1245–1252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286920>.
- [11] M. Seki, S. Oomizu, K.-M. Sakata, A. Sakata, T. Arikawa, K. Watanabe, et al., Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis [Internet] [cited 2013 Mar 12], *Clin. Immunol.* 127 (1) (2008 Apr) 78–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282810>.
- [12] Z.-H. Tang, S. Liang, J. Potter, X. Jiang, H.-Q. Mao, Z. Li, Tim-3/galectin-9 regulate the homeostasis of hepatic NKT cells in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease [Internet] [cited 2014 Feb 4], *J. Immunol.* 190 (4) (2013 Feb 15) 1788–1796. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3563933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [13] W.D. Hastings, D.E. Anderson, N. Kassam, K. Koguchi, E.A. Greenfield, S.C. Kent, et al., TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines [Internet] [cited 2015 Jan 30], *Eur. J. Immunol.* 39 (9) (2009 Sep) 2492–2501. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2759376&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [14] Y. Ju, N. Hou, J. Meng, X. Wang, X. Zhang, D. Zhao, et al., T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B [Internet] [cited 2015 Feb 9], *J. Hepatol.* 52 (3) (2010 Mar) 322–329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133006>.
- [15] L.C. Ndhlovu, S. Lopez-Vergès, J.D. Barbour, R.B. Jones, A.R. Jha, B.R. Long, et al., Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity [Internet] [cited 2015 Feb 9], *Blood* 119 (16) (2012 Apr 19) 3734–3743. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [16] M.K. Gleason, T.R. Lenvik, V. McCullar, M. Felices, M.S. O'Brien, S.A. Cooley, et al., Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9 [Internet] [cited 2015 Feb 9], *Blood* 119 (13) (2012 Mar 29) 3064–3072. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [17] C.A.M. Finney, K. Ayi, J.D. Wasmuth, P.M. Sheth, R. Kaul, M.R. Loutfy, et al., HIV infection deregulates innate immunity to malaria despite combination antiretroviral therapy [Internet] [cited 2015 Feb 9], *AIDS* 27 (3) (2013 Jan 28) 325–335. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291537>.
- [18] C.A.M. Finney, K. Ayi, J.D. Wasmuth, P.M. Sheth, R. Kaul, M. Loutfy, et al., HIV infection deregulates Tim-3 expression on innate cells: combination antiretroviral therapy results in partial restoration [Internet] [cited 2015 Feb 9], *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 63 (2) (2013 Jun 1) 161–167. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23314411>.
- [19] M.E. Keir, M.J. Butte, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [Internet] [cited 2014 May 27], *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008 Jan) 677–704. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173375>.
- [20] M.N. Wykes, J.M. Horne-Debets, C.-Y. Leow, D.S. Karunaratne, Malaria drives T cells to exhaustion [Internet] [cited 2014 Jun 10], *Front. Microbiol.* 5 (2014 Jan) 249. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4034037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.



- [21] H. Dong, G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [Internet] [cited 2014 Jun 10], *Nat. Med.* 5 (12) (1999 Dec) 1365–1369. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581077>.
- [22] G.J. Freeman, A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation [Internet] [cited 2014 Jun 3], *J. Exp. Med.* 192 (7) (2000 Oct 2) 1027–1034. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [23] Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, et al., PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [Internet] [cited 2014 Jun 3], *Nat. Immunol.* 2 (3) (2001 Mar) 261–268. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224527>.
- [24] A.H. Sharpe, E.J. Wherry, R. Ahmed, G.J. Freeman, The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection [Internet] [cited 2014 Jun 4], *Nat. Immunol.* 8 (3) (2007 Mar) 239–245. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304234>.
- [25] E.J. Wherry, T cell exhaustion [Internet] [cited 2015 Jan 14], *Nat. Immunol.* 12 (6) (2011 Jun) 492–499. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739672>.
- [26] J. Leitner, A. Rieger, W.F. Pickl, G. Zlabinger, K. Grabmeier-Pfistershammer, P. Steinberger, TIM-3 does not act as a receptor for galectin-9 [Internet] [cited 2015 Feb 9], *PLoS Pathog.* 9 (3) (2013 Mar) e1003253. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3605152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [27] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [Internet] [cited 2014 Feb 4], *Nucleic Acids Res.* 30 (9) (2002 May 1) e36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=113859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [28] I. Guleria, A. Khosroshahi, M.J. Ansari, A. Habicht, M. Azuma, H. Yagita, et al., A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance [Internet] [cited 2015 Feb 10], *J. Exp. Med.* 202 (2) (2005 Jul 18) 231–237. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [29] R.W. Redline, C.Y. Lu, Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship [Internet] [cited 2015 Feb 10], *Lab. Invest* 61 (1) (1989 Jul) 27–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2473277>.
- [30] A. Moffett, C. Loke, Immunology of placentation in eutherian mammals [Internet] [cited 2015 Feb 10], *Nat. Rev. Immunol.* 6 (8) (2006 Aug) 584–594. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16868549>.
- [31] F.A. Zuckermann, J.R. Head, Expression of MHC antigens on murine trophoblast and their modulation by interferon [Internet] [cited 2015 Feb 10], *J. Immunol.* 137 (3) (1986 Aug 1) 846–853. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2424987>.
- [32] F. Wang, L. Wan, C. Zhang, X. Zheng, J. Li, Z.K. Chen, Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells [Internet] [cited 2015 Jan 29], *Immunobiology* 214 (5) (2009 Jan) 342–349. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362679>.
- [33] S. Oomizu, T. Arikawa, T. Niki, T. Kadowaki, M. Ueno, N. Nishi, et al., Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion [Internet] [cited 2014 Dec 9], *PLoS One* 7 (11) (2012 Jan) e48574. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3492452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [34] L. Mincheva-Nilsson, Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions [Internet] [cited 2015 Feb 10], *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (2003 Dec 2) 120. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=305336&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [35] S.M. Blois, B.F. Klapp, G. Barrientos, Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells [Internet] [cited 2015 Feb 10], *J. Reprod. Immunol.* 88 (2) (2011 Mar) 86–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21227511>.
- [36] K. Ito, M. Karasawa, T. Kawano, T. Akasaka, H. Koseki, Y. Akutsu, et al., Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion [Internet] [cited 2015 Feb 10], *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2) (2000 Jan 18) 740–744. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15400&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

RESEARCH ARTICLE

# The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy

Adrienn Lajko<sup>1</sup>, Matyas Meggyes<sup>1,2</sup>, Beata Polgar<sup>1,2</sup>, Laszlo Szereday<sup>1,2\*</sup>

**1** University of Pecs, Medical School, Department of Medical Microbiology and Immunology, Pecs, Hungary, **2** Janos Szentagothai Research Centre, Pecs, Hungary

\* [szereday.laszlo@pte.hu](mailto:szereday.laszlo@pte.hu)



## Abstract

The abortifacient Mifepristone (RU486) has proven to be a safe, effective, acceptable option for millions of women seeking abortion during the first and second trimester of pregnancy although its precise mechanism of action is not well understood. The main objective of this study was to investigate the impact of low dose Mifepristone administration on placental Galectin-9 (Gal-9) expression, as well as its effect on the cell surface expression of Gal-9, TIM-3 and CD107a molecules by different T and NK cell subsets. A model of Mifepristone-induced immunological changes was established in syngeneic pregnant BALB/c mice. RU486-induced alteration in placental Gal-9 expression was determined by immunohistochemistry. For immunophenotypic analysis, mid-pregnancy decidual lymphocytes and peripheral mononuclear cells were obtained from Mifepristone treated and control mice at the 14.5 day of gestation. TIM-3 and Gal-9 expression by peripheral and decidual immune cells were examined by flow cytometry. Our results revealed a dramatically decreased intracellular Gal-9 expression in the spongiotrophoblast layer of the haemochorial placenta in Mifepristone treated pregnant mice. Although low dose RU486 treatment did not cause considerable change in the phenotypic distribution of decidual and peripheral immune cells, it altered the Gal-9 and TIM-3 expression by different NK and T cell subsets. In addition, the treatment significantly decreased the CD107a expression by decidual TIM-3+ NK cells, but increased its expression by decidual NKT cell compared to the peripheral counterparts. These findings suggest that low dose Mifepristone administration might induce immune alterations in both progesterone dependent and independent way.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Lajko A, Meggyes M, Polgar B, Szereday L (2018) The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. *PLoS ONE* 13(3): e0194870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870>

**Editor:** Colette Kanellopoulos-Langevin, Xavier Bichat Medical School, INSERM-CNRS - Université Paris Diderot, FRANCE

**Received:** July 12, 2017

**Accepted:** March 12, 2018

**Published:** March 22, 2018

**Copyright:** © 2018 Lajko et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from Hungarian National Research Fund (OTKA K104960 and K119529), TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 and the Janos Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to L. Szereday.

## Introduction

Unintended pregnancy is a major globe tragedy for millions of women representing significant direct and indirect costs to health care, no matter for individuals or society. The World Health Organization (WHO) estimates that approximately 40–60 million abortions were induced worldwide each year [1]. During the first and second trimester, medical or surgical abortion is one of the oldest, most commonly practiced and most controversial procedure performed worldwide.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Since its approval in France in 1988, the abortifacient Mifepristone (RU486) has proven to be a safe, effective, acceptable option for millions of women seeking abortion during the first several weeks of pregnancy [2]. Mifepristone also proved to be a safe and effective method for pregnancy termination during the second-trimester (mainly between the 13 and 20 weeks) with a combination of the synthetic prostaglandin E1 analog Misoprostol [3,4]. Second-trimester medical abortions constitute 10–15% of all induced abortions worldwide [3]. Administration of Mifepristone followed by prostaglandin and misoprostol has been used successfully in the medical termination of pregnancy for over 27 years, and the method is registered in 50 countries [5]. Although it is well tolerated, there still remain a few adverse reactions and side effects, like abdominal pain, nausea, vomiting and diarrhea, and it may also cause complications of hemorrhage and sepsis.

Until now, the exact mechanism of action of Mifepristone is not well investigated and has to be fully elucidated, therefore the development of an animal model that captures the effects of Mifepristone-induced immunological changes during pregnancy may help to expand our understanding of the biological and cellular basis of the abortion process.

Previous data reported that RU486 significantly reduced the quantity and function of Treg cells in the fetal-maternal interface before the onset of induced abortion [6]. Li et al. demonstrated that RU486 blocked the Th2 and Treg predominance in pregnancy and promoted Th1 and Th17 skews in mice at the maternal–fetal interface, which contributes to the termination of pregnancy [7]. Similar findings show a high level of Th1 type cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2) was found in RU486-induced abortion mice, while the Th2 type cytokine (IL-4, IL-10) levels were not influenced significantly [8]. Bogdan et al. showed that in decidual NK cells perforin co-localizes with PIBF in the granules, and that while in RU486-treated mice (0.8 mg/kg) PIBF positive NK cell counts decreased by approximately 50%, the ratio of perforin positive cells increased within the PIBF positive population [9].

Several previous research studies have established that Gal-9/Tim-3 pathway play an essential role in immunoregulation and induction of tolerance [10–13]. TIM-3 expression was verified in a variety of immune cells, including Th1, Th17, NK and NKT cells, Tregs, and also on antigen presenting immune cells [14]. TIM-3 molecule has been implicated in both activation and inhibition of immune response [15,16]. It was presented that expression of TIM-3 on Th1 cells provides a key checkpoint that serves to dampen proinflammatory Th1-dependent T-cell response and may contribute to the maintenance of healthy pregnancy, but its *in vivo* expression and function after Mifepristone treatment is still unknown [12].

Among the several identified receptors of Gal-9, TIM-3 has been studied most extensively. There are evidence that engagement of TIM-3 by its ligand Gal-9 leads to the apoptosis of Th1 and Th17 cells and induce T cell tolerance both in mice and humans [17–19]. Thus, engagement of TIM-3 by Gal-9 may function as a negative immune-regulator abrogating the Th1- and Th17-driven immune response and therefore modulate the Th1/Th2 cytokine balance. In this regard, it is supposed that Gal-9/TIM-3 interaction could play an important role in the regulation of maternal immune tolerance towards the fetus and may be a potent regulator of the innate and adaptive immune response. Since the influence of Mifepristone treatment on Gal-9/TIM-3 pathway is still unknown, exploring the relationship between Gal-9/TIM-3 pathway and Mifepristone-induced changes during pregnancy may provide a better understanding of the pathogenesis of immunological changes during immune-mediated abortions.

In the present study, we examined the alterations of the Gal-9/TIM-3 pathway that might play an important role in the immunological changes caused by Mifepristone treatment. The aim of our study was to characterize the Mifepristone-induced changes on the placental Gal-9 production and the immunological alterations at the materno-fetal interface and in the periphery by using a syngeneic pregnant mouse model.

## Material and methods

### Animal model

BALB/c mice were provided by the Experimental Central Animal Laboratory of the University of Pecs. Animal housing, care and application of experimental procedures were in accordance with institutional guidelines under approved protocols (No. BA02/ 2000-7/2015, University of Pecs). All animals were caged in a temperature- and light controlled environment with 12 hours light and 12 hours dark cycle, and received ad libitum water and food for maintenance. 2 month-old female mice were mated with fertile male mice overnight to establish pregnancy. Successful mating was confirmed by the presence of copulatory (vaginal) plug in the next morning and it was designated as the day 0.5 of pregnancy.

### Mifepristone (RU486) treatment

29 pregnant mice were assigned to the Mifepristone-treated group and 30 non-treated pregnant mice were selected as controls. In our experimental model, Mifepristone was applied at a dosage of 0.8 mg/kg to trigger immunological changes with the minimal impairment of the decidua. RU486 (Sigma-Aldrich) was applied on gestational day (gd) 14.5 by a single intraperitoneal injection at the dosage of 0.8 mg/kg body weight, freshly dissolved in 200 $\mu$ l phosphate-buffered saline (PBS) before use. In the normal pregnancy control group, mice received an intraperitoneal injection of 200 $\mu$ l sterile PBS on day 14.5 of pregnancy. Mifepristone treated and control pregnant females were killed by cervical dislocation next morning (on the gd 15.5), their spleen and the uterine horns were removed aseptically and were processed as indicated below.

### Immunohistochemistry

Placental tissue was removed from uterine horns and fixed with 4% paraffin for more than 24 hours. Next, the samples were embedded in paraffin and 4 $\mu$ m thick sections were prepared. After deparaffinization in xylol for 3x5 minutes, samples were rehydrated in degraded alcohol series (96%, 80%, 70%, 50%) for 3 minutes each. Then tissue sections were washed in distilled water (dH<sub>2</sub>O) and antigen retrieval was performed for 20 minutes in boiling 1x Target Retrieval Solution (TRS) (1:10; pH 6.0–6.2; Dako). Next, the samples were cooled down to RT, washed twice with dH<sub>2</sub>O and endogenous peroxidase was blocked for 15 minutes in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Then samples were washed 3x5 minutes with 50mM Tris buffer saline (TBS) supplemented with 0.05% Tween pH7.4 (TBST) and pre-blocked with 3% BSA (Sigma-Aldrich) for 20 minutes. Following washing with TBST for 2x5 minutes slides were incubated with biotinylated goat anti-mouse Gal-9 antibody (1:10; R&D Systems) for 1 hour at RT. After washing three times in TBST, samples were incubated with Streptavidin-Biotinylated Horseradish Peroxidase Complex (1:100; GE Healthcare) for 30 minutes at RT. Following the washing procedure, the signal was detected with Liquid DAB+Substrate Chromogen System (Dako) for 5 to 30 minutes at RT. Hematoxylin counterstain was performed for 3 minutes at RT then slides were covered with mounting medium (Dako).

### Isolation of mononuclear cells from the spleen

Spleens were homogenized thoroughly with a syringe plunger, and single-cell suspensions were prepared using a 70 $\mu$ m nylon cell strainer (BD-Biosciences). Subsequently, cells were washed in PBS. The supernatant was aspirated and the pellet was resuspended in PBS and filtered again via 40 $\mu$ m nylon cell strainer (BD-Biosciences). Then, mononuclear cells were separated by Ficoll-Paque Premium 1.084 gradient (GE Healthcare). Isolated cells were collected

and resuspended in RPMI1640 (Lonza) medium supplemented with penicillin ( $1 \times 10^5$  U/L, Lonza), streptomycin (0.05 g/L, Lonza) and 10% fetal bovine serum (FBS)(Gibco).

### Isolation of mononuclear cells from the decidua

Decidual mononuclear cells from the materno-fetal interface were isolated according to the method described previously [20]. Briefly, the endometrial tissue surrounding the conceptuses was pulled away from the uterine horns. Then the decidua was separated from the placenta disc under a dissecting microscope, sliced with scissors and digested with type IV collagenase (Sigma-Aldrich) in 37°C for 30 minutes. The suspensions were homogenized with a syringe plunger, and single-cell suspensions were prepared using a 70µm nylon cell strainer. Subsequently, cells were washed in RPMI1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin and 10% FBS. The supernatant was aspirated, the pellet was resuspended in PBS and filtered via 40µm nylon cell strainer. Finally, the isolated cells were resuspended in RPMI1640 + 10% FBS.

### Labeling of lymphocytes and flow cytometric analysis

For surface labeling isolated lymphocytes ( $10^6$  cells/100µl PBS/tube) were incubated for 30 min at room temperature (RT) with the fluorochrome-labelled monoclonal antibodies indicated below. After washing with PBS cells were resuspended in 300µl PBS containing 1% paraformaldehyde and stored at 4°C in the dark until fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Before sample analysis, the setting of the flow cytometer was checked using Cytometer Setup and Tracking beads (CS&T beads, BD-Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Compensation beads were used with single stains of each antibody in order to determine the compensation settings, and were applied in FACSDiva™ V6 software (BD-Biosciences) before data collection. Labeled cells were analyzed with FACSCantoII™ flow cytometer by collecting 100,000 events in the lymphogate in the case of the spleen. In the case of decidua 10,000 events were collected in the lymphogate after CD45 staining. FACSDiva™ V6 software was used for data acquisition and analysis.

### Antibodies

The following monoclonal antibodies were used during the assay: Brilliant violet (BV)510-conjugated anti-mouse CD3 (BD-Biosciences), BV510-conjugated anti-mouse  $\gamma/\delta$ TCR (BD-Biosciences) recognizing delta chain, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CD4 (BD-Biosciences), FITC-conjugated anti-mouse CD107a (BD-Biosciences), FITC-conjugated anti-mouse CD49b (BD-Biosciences), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse TIM-3 (R&D Systems), PE-conjugated anti-mouse Gal-9 (Biolegend), PE-conjugated anti-mouse CD49b (BD-Biosciences), peridinin chlorophyll a protein (PerCP)-conjugated anti-mouse CD45 (Exbio), PE-Cy7-conjugated anti-mouse CD25 (BD-Biosciences), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse TIM-3 (R&D Systems), APC-conjugated anti-mouse FoxP3 (eBioscience) and APC-H7-conjugated anti-mouse CD8 (BD-Biosciences). Control antibodies included isotype-matched rat and hamster antibodies.

### FoxP3 staining

Following surface labeling, intracellular staining of FoxP3 was performed using the FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) in accordance with the manufacture's protocol. Briefly, isolated cells were permeabilized in 1ml fixation/permeabilization buffer (Concentrate/Diluent 1:4 eBioscience) for 1 hour at 4°C. Then the samples were washed twice in the buffer and

stained with APC-conjugated anti-mouse FoxP3 monoclonal antibody for 1 hour at 4°C. FACS analysis was performed by FACSCantoII™ flow cytometer with the BD FACSDiva™ software for data acquisition and analysis.

### Detection of CD107a expression

The CD107a assay was set up based on a publication by Alter et al. [21]. To determine CD107a expression by immune cells, mononuclear cells were incubated for 4h at 37°C with FITC-conjugated anti-mouse CD107a antibody in RPMI1640 containing 10% FBS, penicillin, streptomycin, ionomycin (Sigma-Aldrich) and phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich). Next, the cells were washed with PBS and incubated with anti-CD3-BV510, anti- $\gamma/\delta$ -BV510, anti-CD49b-PE, anti-CD45-PerCP and anti-TIM-3-APC antibodies for 30 minutes at RT in the dark. Then the cells were washed in PBS, fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) and evaluated by FACS.

### Quantification of immunohistochemistry

The stained slides were evaluated by two independent researchers, who were blinded to treatment groups. Sections stained by immunohistochemistry were analyzed for the percentages of Gal-9 positive cells. During analysis, a total of 100 cells/slide were evaluated at 350× magnification.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using statistical software SPSS version 20 package. Multiple comparisons were made using one-way ANOVA with Bonferroni correction. Differences were considered significant if the p value was equal to or less than 0.05.

## Results

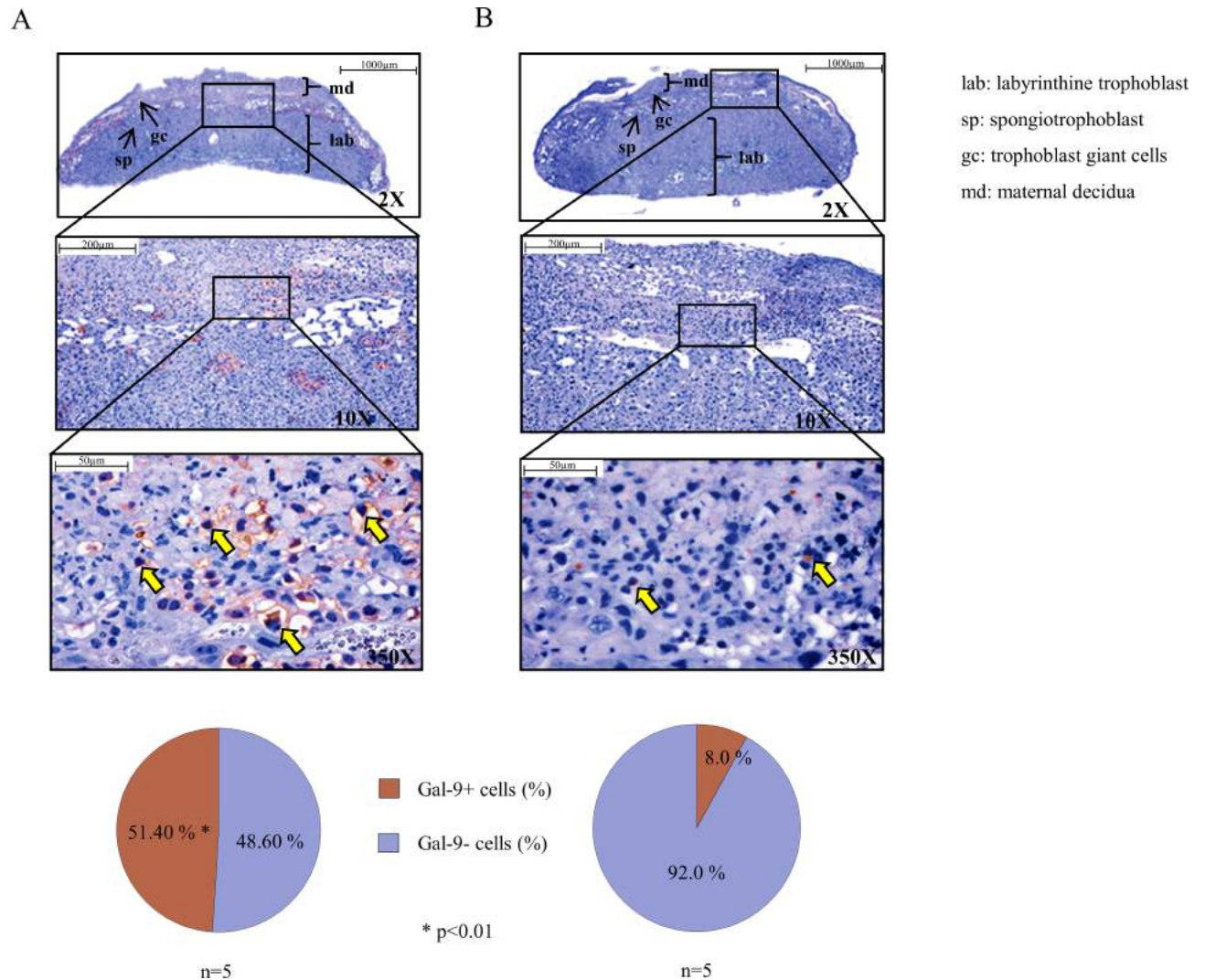
### Immunohistochemistry of pregnant mouse placentae from untreated control and RU486 treated pregnant mice

Immunohistochemistry on isolated healthy pregnant mouse placentae with anti-Gal-9 antibody demonstrated a strong expression of Gal-9 (yellow arrow) at the spongiotrophoblast layer and in the cytoplasm of giant cells (Fig 1A). Histological sections represented a more intense staining by trophoblast giant cells compared to spongiotrophoblast layer (Fig 1A). Evaluation of the number of positively stained cells showed a significant decrease of Gal-9 positive cells in the placentae of RU486 treated pregnant mice compared to the placentae of healthy, non-treated pregnant mice (Fig 1B).

### Immunophenotypic analysis of decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice

In our study, we investigated the percentage of CD4+T, CD8+T,  $\gamma/\delta$ T, Treg, NK and NKT cells using the lymphocyte gate in the spleen (periphery) and in the decidua (locally) of untreated and RU486 treated pregnant mice.

RU486 treatment did not cause a statistically significant change in the phenotype distribution of immune cells both in the decidua and in the periphery when compared to untreated mice (Table 1). Albeit previous literature data presented contradictory results about the impact of RU486 on the distribution of decidual NK cells [22][23] our results were in accordance with the earlier human immunohistochemistry results by Milne et al. [24] who found that simultaneous administration of Mifepristone and the prostaglandin E analog did not affect the number of NK cells in the decidua.



**Fig 1. Representative Gal-9 immunohistochemical staining of pregnant mouse placentae from untreated control and RU486 treated pregnant mice.** IHC was performed on the placenta-sections of healthy control (Fig 1A) and RU486 treated (Fig 1B) mice. Yellow arrows indicate Gal-9 positive cells (magnification 350x). The lower circle graphs show the percentage of cytoplasmic Gal-9 positive cells (data are shown as mean). Differences were considered statistically significant for p-values  $\leq 0.05$ . The images were captured utilizing the Panoramic DESK scanner (3DHISTECH Ltd.) and analysis was performed by the Panoramic viewer software (3DHISTECH Ltd.).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870.g001>

### Cell surface Gal-9 expression by decidual and peripheral mononuclear cells isolated from untreated control and RU486 treated pregnant mice

Flow cytometry was used to analyze the cell surface expression of Gal-9 by NK, NKT,  $\gamma/\delta$ T, CD4+T and Treg cells at the materno-fetal interface as well as in the periphery.

In untreated pregnant mice Gal-9 expression by decidual Treg and CD4+T cells was significantly increased (Figs 2D and 3A), while decidual NK cells showed a significantly decreased Gal-9 expression compared to peripheral NK cells (Fig 2A). Gal-9 positivity of decidual NKT and  $\gamma/\delta$  T cells showed no significant difference compared to their peripheral counterparts (Fig 2B and 2C). In RU486 treated mice Gal-9 expression was significantly increased by almost all investigated decidual subpopulations when compared to the periphery except NK cells (Figs 2A, 2B, 2C, 2D and 3A). After RU486 administration Gal-9 expression by decidual Treg

**Table 1. Phenotype analysis of decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice.**

	Periphery (n = 12)		Decidua (n = 12)	
	Untreated mice	Mifepristone treated mice	Untreated mice	Mifepristone treated mice
CD4+ T cells	35.90±2.06	40.70±1.85	10.00±1.50	8.36±1.30
CD8+ T cells	13.61±0.89	13.43±0.88	4.85±0.72	3.46±0.92
Treg cells	2.67±0.23	2.71±0.36	0.39±0.05	1.07±0.28
γ/δT cells	4.57±0.56	3.78±0.48	14.56±2.93	16.55±2.61
NKT cells	1.76±0.16	1.80±0.26	14.38±1.34	17.77±4.00
NK cells	12.36±0.51	11.14±0.85	28.16±1.37	24.77±1.18

Multiple comparisons were made using one-way ANOVA with Bonferroni correction. The results were expressed as the mean value±standard error of the mean (SEM). Differences were considered significant when the value of p was equal to or less than 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870.t001>

and CD4+T cells were significantly increased in comparison to the decidua of untreated control mice (Figs 2D and 3A), while its expression was significantly decreased in the periphery after RU486 treatment by NK cells compared to untreated mice (Fig 2A).

### The proportion of Gal-9+ T-helper cell population in decidua and periphery of untreated control and RU486 treated pregnant mice

It was published by Oomizu et al., that CD4+ T-helper (Th) lymphocytes expressing Gal-9 on their cell surface possess immunosuppressive potential by regulating the Th17/Treg balance [25]. In order to examine the impact of Mifepristone administration on the distribution of this T cell-subset, we investigated the percentage of Gal-9+ Th cells in the decidua and in the periphery from untreated control and RU486 treated pregnant mice. We observed a significant increase in the frequency of decidual Gal-9+ Th cells obtained from RU486 treated mice when compared to the periphery of treated mice or to the control untreated decidua (Fig 3B).

### TIM-3 expression by decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice

Next, we analyzed, how the expression of TIM-3 receptor is changed by NK, NKT, γ/δT and CD4+T cells at the materno-fetal interface as well as in the periphery of untreated control and Mifepristone treated pregnant mice.

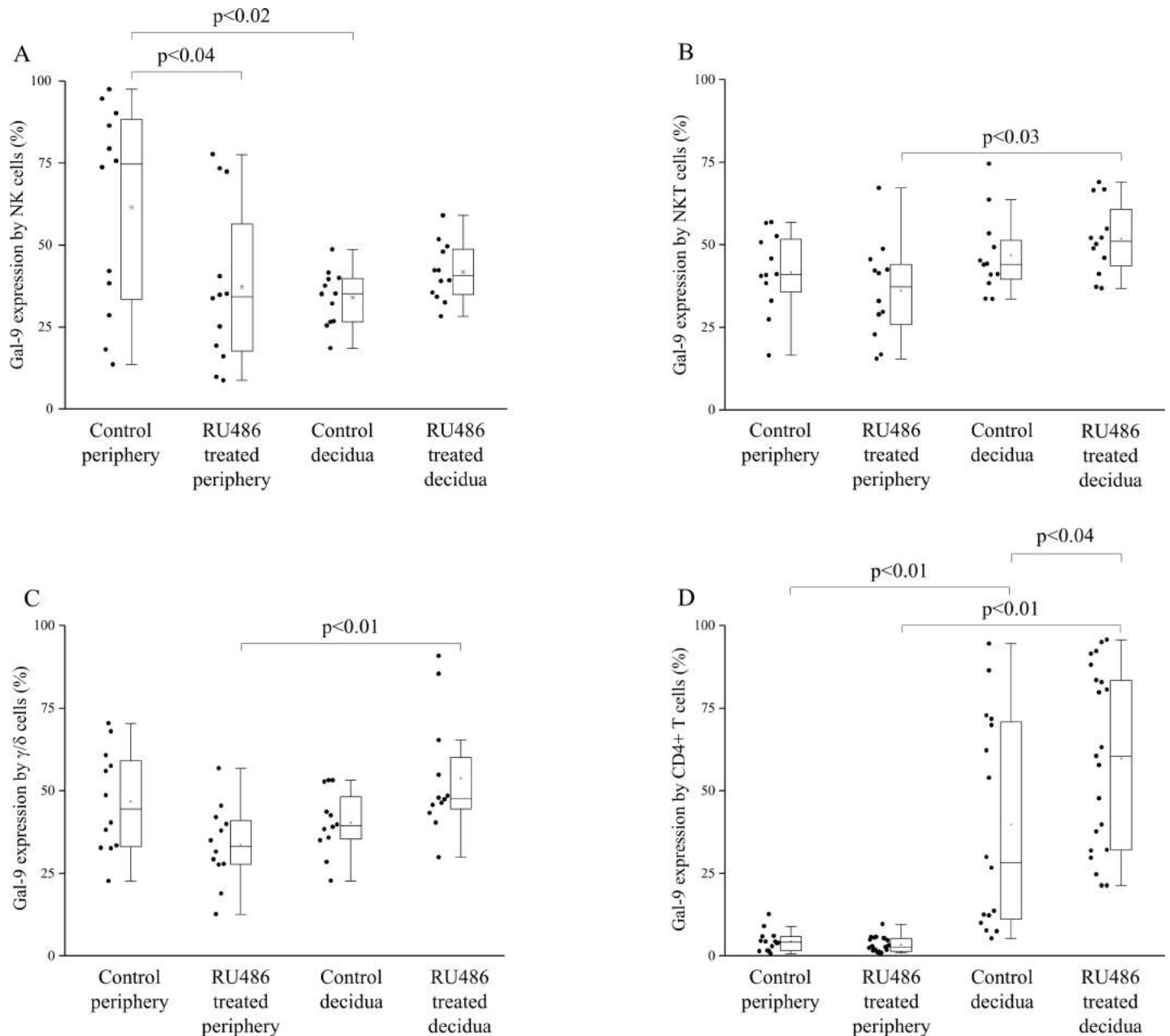
We found that both in control and RU486 treated mice group TIM-3 expression by CD4+T cells was significantly increased in the decidua compared to the periphery (Fig 4D). Contrary, TIM-3 expression by decidual NKT cells of untreated mice was significantly decreased when compared to the periphery (Fig 4B).

Following RU486 administration TIM-3 receptor expression by CD4+T cells was significantly increased at the materno-fetal interface compared to untreated mice (Fig 4D). In RU486 treated mice TIM-3 expression by NK cells was significantly increased in the decidua compared to the periphery (Fig 4A).

### CD107a expression by NK, NKT and γ/δ T cells in the decidua and in the periphery from untreated control and RU486 treated pregnant mice

Investigating the expression of CD107a, which is known as a marker of cytotoxic potential by decidual immune cells obtained from the materno-fetal interface we found a significantly higher CD107a expression by decidual γ/δT cells compared to the periphery of untreated





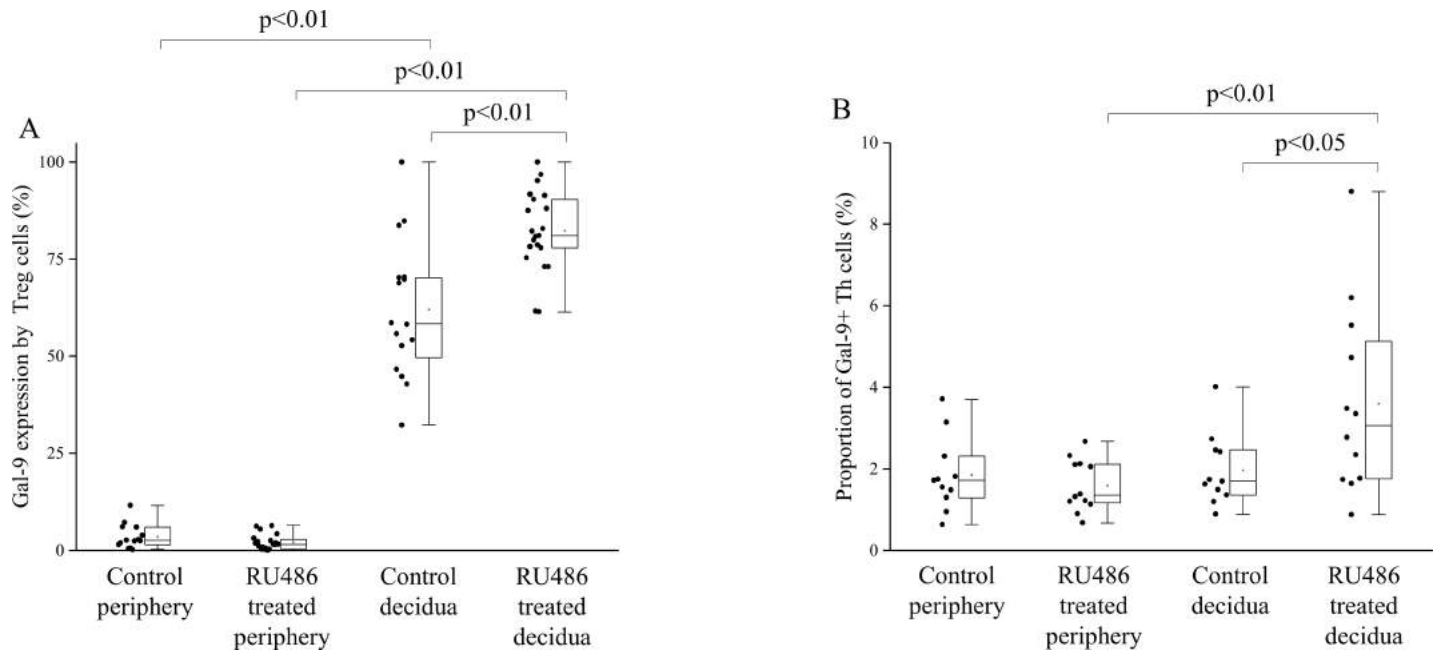
**Fig 2. Gal-9 expression by decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice.** Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range, and individual data values for the cell surface expression of Gal-9 by NK cells, NKT cells,  $\gamma/\delta$ T, CD4+ T cells in periphery and decidua of untreated and RU486 treated pregnant mice. The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for p-values  $\leq 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870.g002>

control mice (Fig 5C). In all other examined NK and T cell populations the CD107a positivity did not change.

In RU486 treated mice only decidual  $\gamma/\delta$ T cells showed significantly higher cytotoxic potential than their peripheral counterparts (Fig 5C).

In addition, we analyzed the CD107a expression within the TIM-3+ lymphocyte subsets. In untreated pregnant mice our results demonstrated a significantly decreased CD107a



**Fig 3. Gal-9 expression by Tregs and the proportion of Gal-9+ Th cell population in decidua and periphery from untreated control and RU486 treated pregnant mice.** Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range, and individual data values for the cell surface expression of Gal-9 by Treg cells and the frequency of Gal-9 positive Th cells in decidua and periphery from untreated control and RU486 treated pregnant mice. The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for p-values  $\leq 0.05$ .

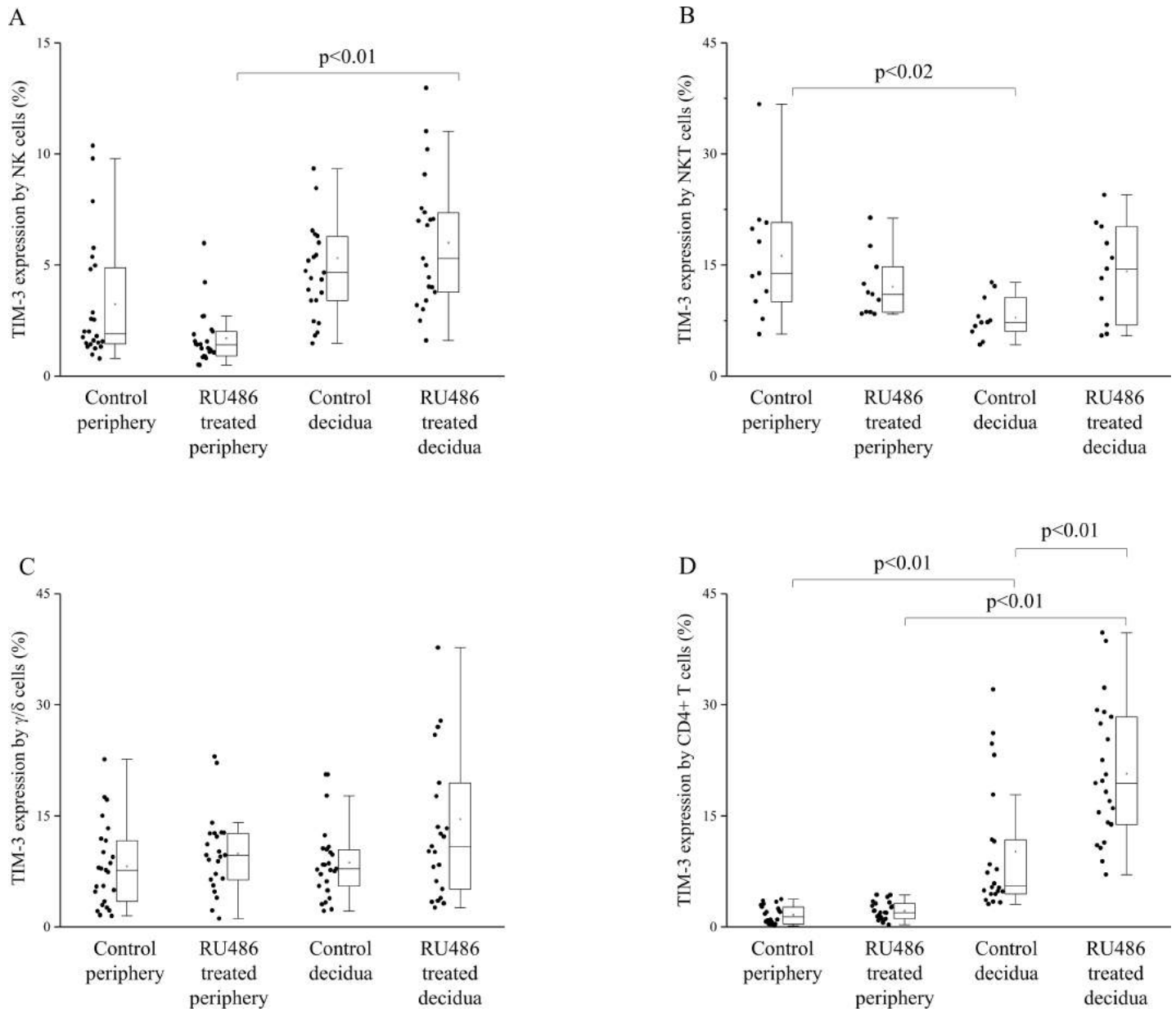
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870.g003>

expression by decidual TIM-3+  $\gamma/\delta$ T cells together with a significant increase in CD107a expression by NKT cells compared to the periphery (Fig 5F and 5E). Furthermore, in RU486 treated mice TIM-3+ decidual NKT cells showed significantly higher while NK cells showed significantly lower cytotoxic potential than their peripheral counterparts (Fig 5E and 5D).

## Discussion

Accumulating evidence has demonstrated that subpopulations of NK and T cells play a central role in the establishment and maintenance of materno-fetal immunotolerance and alteration in their physiological distribution or function might be associated with pregnancy complications. The exact mechanism underlying the fine regulation of these cells during Mifepristone (RU486) treatment is still under investigation.

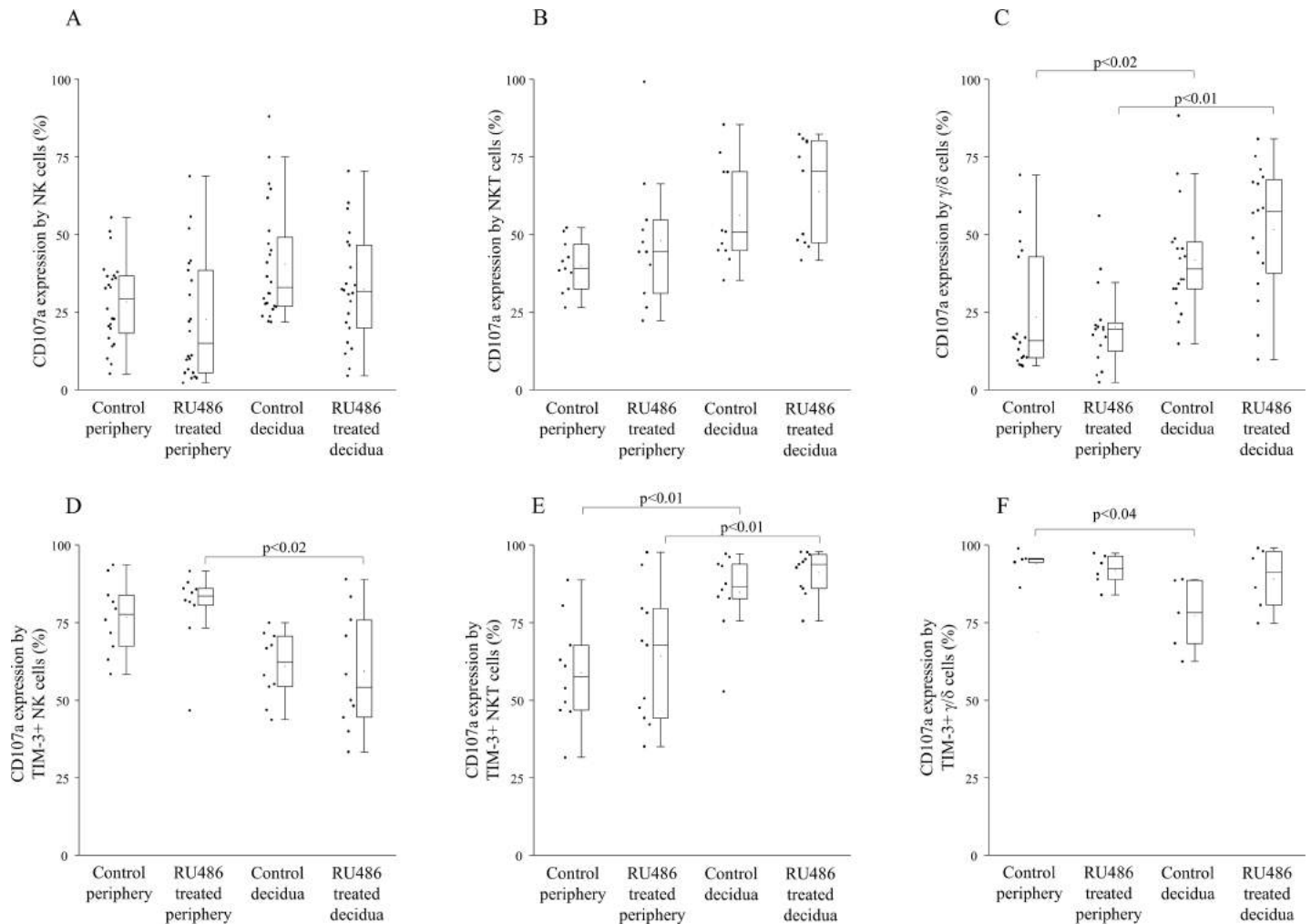
Mifepristone has high affinity both for progesterone and glucocorticoid receptors. A number of studies suggest that Mifepristone may be involved in modulation of materno-fetal immune response. *In vitro* human experiments demonstrated that RU486 significantly inhibits the proliferation of lymphocytes [26], increases the cytotoxicity of peripheral NK cells [27] and blocks the immunosuppressive effect of progesterone mediated by Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) [28]. In addition it was shown that at a dose of 0.3–2 mg/kg RU486 could terminate early pregnancy in mice with an abortion rate of 60–100% [29,30] causing progesterone withdrawal, decreasing the number of PIBF expressing cells, enhancing the perforin expression of decidual NK cells and inducing increased peripheral NK activity [9,31]. On the other hand, late administration of Mifepristone (on gd 14–19) is able to induce preterm labor in mice at a dose of 0.4–12.5 mg/kg with a pregnancy termination rate of 66–100%.



**Fig 4. TIM-3 expression by decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice.** Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range, and individual data values for the expression of TIM-3 by NK cells, NKT cells,  $\gamma/\delta$ T and CD4 T cells in periphery and decidua in untreated and RU486 treated pregnant mice. The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for p-values  $\leq 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870.g004>

Recent publications show that Gal-9/TIM-3 interaction plays an important role in the regulation of maternal immune tolerance and may be a potent regulator of the innate and adaptive immune response [12][20][32]. Therefore we aimed to investigate the role of Gal-9/Tim-3 pathway after low dose Mifepristone treatment using BALB/c syngeneic mouse pregnancy model at a gd of 14.5. Previously it was found that Gal-9 is widely expressed in the female reproductive tract at the feto-maternal interface [12,33–37] and by Treg or CD4+T (Th) cells [20][38]. It was also confirmed that Gal-9+Th cells are veritable immunosuppressors, which play a vital role in the regulation of Th17/Treg balance by producing IL-10/TGF- $\beta$  [25].



**Fig 5. CD107a expression by different immune cell subsets and TIM-3 positive immune cell subsets in the periphery and in the decidua of untreated control and RU486 treated pregnant mice.** Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range, and individual data values for the expression of CD107a by NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$ T cells in the periphery and in the decidua of untreated control and RU486 treated pregnant mice (Fig 5A–5C). The expression of CD107a by TIM-3 positive NK cells, NKT cells and  $\gamma/\delta$ T cells in the periphery and in the decidua of untreated control and RU486 treated pregnant mice (Fig 5D–5F). The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for p-values  $\leq 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870.g005>

Our previous human experiments revealed that serum Gal-9 levels and cell-surface expression of Gal-9 by peripheral CD4+T cells were increased throughout pregnancy [12]. Here we demonstrated that a relatively high proportion of peripheral NK, NKT and  $\gamma/\delta$  T cells also showed Gal-9 positivity. Although Gal-9 expression by peripheral Treg cells was almost negligible, significantly higher percentage of Gal-9 positivity by decidual Treg cells was found in the decidua. Furthermore, we found that the expression of Gal-9 by NK cells was significantly decreased in the normal pregnant decidua compared to the periphery. 0.8mg/kg RU486-treatment resulted in a nearly complete disappearance of Gal-9 from the junctional zone of the placenta. Furthermore, the treatment significantly decreased the Gal-9 positivity of peripheral NK cells but significantly increased its expression by decidual Treg and CD4+T cells. In addition, the proportion of decidual Gal-9+Th cells with known suppressive capacity was significantly increased after Mifepristone administration.

Our data indicate that even a low dose Mifepristone treatment was effective enough to abrogate Gal-9 production of the placenta. The observed, increased Gal-9 expression by decidual Treg and CD4+Th cells suggest that local immunosuppressive mechanisms are also triggered 24 hours after the treatment, possibly to sustain impaired placental function. In addition, we suppose, that the accumulation of the Gal-9 secreting Gal-9+Th cells might be also involved to partly compensate the decreased placental Gal-9 expression at the materno-fetal interface. These mechanisms might inhibit the pro-inflammatory cytokine production of Th1 and Th17 cell by a Gal-9/TIM-3 dependent fashion [13] and aid the maintenance of the whole embryo-placenta unit.

On the basis of the above-mentioned results we hypothesize that beside the trophoblast and decidual cells, Gal-9+Th and Treg cells could serve as an alternative source of the locally secreted Gal-9 at the materno-fetal interface. During physiological conditions, the high local Gal-9 level could aid the development and suppressive function of Treg and Gal-9+Th cells, which might be involved in the inhibition of Th17 cell differentiation, downregulate the local Th1/Th17 cytokine production and induce apoptosis of Th1 CD4+T and activated CD8+T cells in the decidua. Additionally—to a lower extent—cytotoxic effector cells could be also able to produce this lectin both at the periphery and locally. We suggest that the membrane bound or secreted Gal-9 can engage the TIM-3 receptor on the surface of the immune effector cells and therefore it might directly or indirectly affect the innate and adaptive arm of the immune system at the materno-fetal interface.

After low dose Mifepristone treatment, the placental expression of Gal-9 might be seriously impaired. Since local Gal-9 level could be important for placental development and for the regulation of the maternal anti-fetal immune response, the disruption of Gal-9-regulated tolerance mechanisms can contribute to pregnancy complications [39] and lead to pregnancy termination or preterm labor. Harmful effects caused by low dose Mifepristone treatment could be physiologically compensated via the upregulation of Gal-9 expression by decidual Treg and CD4+Th cells and by the local accumulation and/or differentiation of Gal-9 secreting Treg and Gal-9+Th cells. We suggest that these compensatory mechanisms might sustain impaired placental function when only partial progesterone withdrawal is induced, but might become ineffective when higher dose of Mifepristone would be used. Administration of 2 mg/kg or higher dose of RU486 can cause complete blocking of progesterone receptors causing estrogen dominance, sensitizing the uterus to the activity of the prostaglandin, resulting in intrauterine fetal death or a definite premature labor at a late stage (gd 14–19) of murine pregnancy.

Beside the above-mentioned actions, it is well established, that during pregnancy RU486 can induce an immunological alteration in a Gal-9/TIM-3 independent way. The regulation of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm is one of the most important mechanisms by which progesterone exerts its pregnancy-protective effect [40]. Progesterone induces a Th1 to Th2-type immunity skew by inducing the expression of PIBF and Th2-type cytokines and suppressing the production of Th1 cytokines [41]. As a receptor antagonist, Mifepristone can inhibit the pregnancy-protective immunological effects of progesterone in a TIM-3 independent way by inhibiting the proliferation of lymphocytes [26] and inducing the production of prostaglandins, cyclooxygenases and proinflammatory cytokines *in vitro*. These effects—together with the dysregulated Gal-9/TIM-3 pathway—might alter the local cytokine milieu from an immunosuppressive/angiogenic environment towards a proinflammatory condition. This can disturb the precise regulation of the Th1/Th2/Th17/Treg balance and induce the activation of local inflammatory and cytotoxic immune response leading to pregnancy loss [42][43][44].

The limitations of our study is that (1) we used only one dose of Mifepristone (0.8 mg/kg) instead of a several different doses from low to high, (2) we tested the *in vivo* effect of RU486

only on gestational day 14.5 but not earlier (3) and analysis was performed just 24h after treatment. Based on the literature higher doses of Mifepristone (e.g. >2 mg/kg) would cause complete abortion after 48h as indicated in a paper by Lv et al.[30]. In our case these setting were not applicable since after complete abortion tissue destruction strongly limit to obtain enough decidual lymphocytes for flow cytometric analyses.

## Supporting information

**S1 Fig. Gating strategy to detect peripheral immune cell populations.** Shows the gating technique used to detect immune cell populations in the periphery.

(TIF)

**S2 Fig. Gating strategy to detect decidual immune cell populations.** Shows the gating technique used to detect decidual immune cell populations. CD45+ leukocytes were gated using SSC and FL-5 (PerCP) parameters. Endothelial cells which may fall inside the lymphogate were excluded by CD45 staining. Lymphogate was created based on physical characteristics typical of lymphoid cells using forward and side scatter parameters. All further analyses of decidual immune cells were performed on CD45+ cells only, by combining the lymphogate and CD45+ cell gate.

(TIF)

**S3 Fig. Representative histograms showing TIM-3, Galectin-9 and isotype control staining.** Representative histograms showing TIM-3, Galectin-9 and isotype control staining.

(TIF)

**S4 Fig. Representative dot plots showing TIM-3 staining by decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice.** Representative dot plots showing TIM-3 expression by NK cells, NKT cells,  $\gamma/\delta$ T and CD4 T cells in periphery and decidua of untreated and RU486 treated pregnant mice.

(TIF)

**S5 Fig. Representative dot plots showing Gal-9 staining by decidual and peripheral mononuclear cells from untreated control and RU486 treated pregnant mice.** Representative dot plots showing Gal-9 expression by NK cells, NKT cells,  $\gamma/\delta$ T and Treg cells in periphery and decidua of untreated and RU486 treated pregnant mice.

(TIF)

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Hungarian National Research Fund (OTKA K104960 and K119529), TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 and the Janos Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to L. Szereday. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Beata Polgar.

**Data curation:** Matyas Meggyes.

**Formal analysis:** Matyas Meggyes.

**Funding acquisition:** Laszlo Szereday.

**Investigation:** Adrienn Lajko, Matyas Meggyes.

**Methodology:** Laszlo Szereday.

**Project administration:** Laszlo Szereday.

**Writing – original draft:** Beata Polgar.

**Writing – review & editing:** Laszlo Szereday.

## References

1. Sedgh G, Bearak J, Singh S, Bankole A, Popinchalk A, Ganatra B, et al. Abortion incidence between 1990 and 2014: global, regional, and subregional levels and trends. *Lancet* (London, England). 2016; 388: 258–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30380-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30380-4)
2. Kapp N, Whyte P, Tang J, Jackson E, Brahma D. A review of evidence for safe abortion care. *Contraception*. 2013; 88: 350–63. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.10.027> PMID: 23261233
3. Nissi R, Santala M, Immonen E, Talvensaaari-Mattila A. Mifepristone and misoprostol is safe and effective method in the second-trimester pregnancy termination. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 294: 1243–1247. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4169-8> PMID: 27522599
4. Louie KS, Chong E, Tsereteli T, Avagyan G, Abrahamyan R, Winikoff B. Second trimester medical abortion with mifepristone followed by unlimited dosing of buccal misoprostol in Armenia. *Eur J Contracept Reprod Heal Care*. 2017; 22: 76–80. <https://doi.org/10.1080/13625187.2016.1258461>
5. Raymond EG, Shannon C, Weaver MA, Winikoff B. First-trimester medical abortion with mifepristone 200 mg and misoprostol: a systematic review. *Contraception*. 2013; 87: 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.06.011> PMID: 22898359
6. Mao G, Wang J, Kang Y, Tai P, Wen J, Zou Q, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology*. 2010; 151: 5477–88. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0426> PMID: 20844003
7. Li X, Wang B, Li Y, Wang L, Zhao X, Zhou X, et al. The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice. *J Ethnopharmacol*. 2013; 145: 241–253. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.059> PMID: 23178269
8. Zhong X, Shi W, Ma A, Wang X, Zhang J, Li X. Influence of *Radix scutellariae* on Th1/Th2 cytokine balance in RU486-induced abortion in mice. *Front Agric China*. Higher Education Press; 2007; 1: 96–100. <https://doi.org/10.1007/s11703-007-0018-7>
9. Bogdan A, Berta G, Szekeres-Bartho J. PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J Reprod Immunol*. 2017; 119: 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.12.001> PMID: 28043035
10. Boenisch IG, Najafian N, Akiba H, Yagita H, Zhu I, Batal PJ, et al. Induce Fetomaternal Tolerance TIM-3 Regulates Innate Immune Cells To Induce Fetomaternal Tolerance. *J Immunol Mater Suppl J Immunol by guest*. 2013; 190: 88–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202176>
11. Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2003; 4: 1093–101. <https://doi.org/10.1038/ni987> PMID: 14556005
12. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z, et al. 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; 9: e92371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092371> PMID: 24651720
13. Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol*. 2009; 39: 2492–501. <https://doi.org/10.1002/eji.200939274> PMID: 19676072
14. Zhao J, Lei Z, Liu Y, Li B, Zhang L, Fang H, et al. Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity. *J Immunol*. 2009; 182: 6618–24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803876> PMID: 19414817
15. van de Weyer PS, Muehlefeit M, Klose C, Bonventre J V, Walz G, Kuehn EW. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351: 571–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.079> PMID: 17069754
16. Lee J, Su EW, Zhu C, Hainline S, Phuah J, Moroco JA, et al. Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2011; 31: 3963–74. <https://doi.org/10.1128/MCB.05297-11> PMID: 21807895
17. Seki M, Oomizu S, Sakata K-MM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental

- autoimmune arthritis. *Clin Immunol.* 2008; 127: 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.01.006> PMID: 18282810
18. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1245–52. <https://doi.org/10.1038/ni1271> PMID: 16286920
  19. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sánchez-Fueyo A, Zheng XX, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2003; 4: 1102–10. <https://doi.org/10.1038/ni988> PMID: 14556006
  20. Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, Totsimon A, Illes Z, Szereday L, et al. Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta.* 2015; 36: 1153–60. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.07.124> PMID: 26278059
  21. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods.* 2004; 294: 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008> PMID: 15604012
  22. Lu S, Wu R, Wang Z. Expression of T-lymphocytes and cytokines in the decidua of mifepristone with misoprostol for terminating early pregnancy. [Chinese]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2001; 36: 625–627. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134529> PMID: 16134529
  23. Chen Y, Wang Y, Zhuang Y, Zhou F, Huang L. Mifepristone increases the cytotoxicity of uterine natural killer cells by acting as a glucocorticoid antagonist via ERK activation. *PLoS One.* 2012; 7: e36413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036413> PMID: 22563497
  24. Milne SA, Henderson TA, Kelly RW, Saunders PT, Baird DT, Critchley HOD. Leukocyte populations and steroid receptor expression in human first-trimester decidua; regulation by antiprogestin and prostaglandin E analog. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 4315–21. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2338> PMID: 15814773
  25. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, et al. Cell surface galectin-9 expressing th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion. *PLoS One.* 2012; 7: e48574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048574> PMID: 23144904
  26. Chien CH, Lai JN, Liao CF, Wang OY, Lu LM, Huang MI, et al. Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human T cells. *Hum Reprod.* 2009; 24: 1968–75. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep099> PMID: 19401324
  27. Hansen KA, Opsahl MS, Nieman LK, Baker JR, Klein TA. Natural killer cell activity from pregnant subjects is modulated by RU 486. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 166: 87–90. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733224> PMID: 1733224
  28. Szekeres-Bartho J, Chaouat G, Kinsky R. A progesterone-induced blocking factor corrects high resorption rates in mice treated with antiprogestosterone. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 163: 1320–2. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2220944> PMID: 2220944
  29. Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay G, Smart YC, Volgyi Z. The Antiabortive Effect of Progesterone-Induced Blocking Factor in Mice Is Manifested by Modulating NK Activity. *Cell Immunol.* 1997; 177: 194–199. <https://doi.org/10.1006/cimm.1997.1090> PMID: 9178647
  30. Lv F, Xu X, Zhang S, Wang L, Wang N, He B, et al. Repeated abortion affects subsequent pregnancy outcomes in BALB/c mice. *PLoS One. Public Library of Science;* 2012; 7: e48384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048384> PMID: 23119001
  31. Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, et al. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy.* 2005; 89: 118–25. <https://doi.org/10.1159/000087953> PMID: 16129958
  32. Hu X-H, Tang M-X, Mor G, Liao A-H. Tim-3: Expression on immune cells and roles at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol.* 2016; 118: 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.10.113> PMID: 27792886
  33. Popovici RM, Krause MS, Germeyer A, Strowitzki T, Von Wolff M. Galectin-9: A new endometrial epithelial marker for the mid- and late-secretory and decidual phases in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 6170–6176. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2529> PMID: 16105962
  34. Atsukawa M, Nakatsuka K, Kobayashi T, Shimizu M, Tamura H, Harimoto H, et al. Ribavirin downmodulates inducible costimulator on CD4+ T cells and their interleukin-10 secretion to assist in hepatitis C virus clearance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27: 823–31. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06882.x> PMID: 21871023
  35. Shimizu Y, Kabir-Salmani M, Azadbakht M, Sugihara K, Sakai K, Iwashita M. Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocr J.* 2008; 55: 879–87. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18506087> PMID: 18506087



36. Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, et al. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903568106>
37. Li Y-H, Zhou W-H, Tao Y, Wang S-C, Jiang Y-L, Zhang D, et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell Mol Immunol*. 2015; <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.126>
38. Sun J, Yang M, Ban Y, Gao W, Song B, Wang Y, et al. Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway. *PLoS One*. 2016; 11: e0147186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147186> PMID: 26789128
39. Heusschen R, Freitag N, Tirado-González I, Barrientos G, Moschansky P, Muñoz-Fernández R, et al. Profiling Lgals9 splice variant expression at the fetal-maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy. *Biol Reprod*. 2013; 88: 22. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105460> PMID: 23242525
40. Lee JH, Ulrich B, Cho J, Park J, Kim CH. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J Immunol*. 2011; 187: 1778–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003919> PMID: 21768398
41. Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol*. 2002; 168: 1087–94. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801642> PMID: 11801642
42. Piccinni M-P. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J Reprod Immunol*. 2010; 85: 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.01.006> PMID: 20334928
43. Liu Y-S, Wu L, Tong X-H, Wu L-M, He G-P, Zhou G-X, et al. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 65: 503–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00921.x> PMID: 21029245
44. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 63: 601–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x> PMID: 20455873



# Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice

Adrienn Lajko<sup>1</sup> | Matyas Meggyes<sup>1,2</sup> | Balazs Daniel Fulop<sup>3</sup> | Noemi Gede<sup>4</sup> |  
Dora Reglodi<sup>3</sup> | Laszlo Szereday<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical School, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>2</sup>Janos Szentagothai Research Center, Pecs, Hungary

<sup>3</sup>Medical School, Department of Anatomy, MTA-PTE PACAP Research Team, Centre for Neuroscience, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>4</sup>Medical School, Institute of Translational Medicine, University of Pecs, Pecs, Hungary

**Correspondence:** Laszlo Szereday, Medical School, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pecs, 7624, 12 Szigeti Street, Pecs, Hungary (szereday.laszlo@pte.hu).

## Funding information

EFOP, Grant/Award Number: 3.6.2-16-2017-00008; Neuroscience Centre of Pecs; National Research, Development and Innovation Office, Grant/Award Number: K115874, K119529 and K119759; National Excellence Program, Grant/Award Number: 2017-1.2.1-NKP-2017-00002; PTE ÁOK KA Research Grant, Grant/Award Number: KA-2018-07; PEPSYS, Grant/Award Number: GINOP-2.3.2-15-2016-00050; MTA-TKI, Grant/Award Number: 14016; Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, Grant/Award Number: 20765-3/2018/FEKUTSTRAT

**Problem:** PACAP is a neuropeptide having a major relevance in the nervous system and in several peripheral organs including those of the reproductive system. PACAP-deficient mice have several morphological, biochemical, behavioral defects, and show reduced fertility. Female reproductive functions such as fertility, mating behavior, maternal behaviors, and implantation alterations have been widely investigated, but no comparative immune analyses are available in pregnant wild-type (WT) and PACAP knockout (KO) mice.

**Methods of study:** Therefore, we performed a detailed immunophenotyping of decidual and peripheral immune cells and investigated the expression of two immune-checkpoint molecules by immune cells together with immunohistochemistry detecting Galectin-9 in placental tissues. We investigated the percentage of numerous immune cell populations in the periphery and in the decidua of pregnant mice.

**Results:** We demonstrated a significant increase in the frequency of decidual Gal-9+ Th cells obtained from PACAP KO mice compared to the decidua of WT mice. We could not determine statistical differences in TIM-3 and programmed cell death-1 expression by different immune cells in the decidua and in the periphery between WT and KO mice. In conclusion, we could not find any significant alteration either in the distribution or in the cytotoxicity of the investigated decidual immune cells which could elucidate any reproductive alterations in PACAP KO mice.

**Conclusion:** The only remarkable finding is the recruitment of Gal-9+ Th cells to the decidua promoting local immune homeostasis in PACAP KO mice, which nevertheless cannot explain the reduced fertility observed in these mice.

## KEYWORDS

fertility, Galectin-9, neuropeptide, PD-1, pregnancy, TIM-3

## 1 | INTRODUCTION

Considering allograft rejection as a basic feature of the immune system, human pregnancy is an immunological paradox where the semi-allogeneic fetus is not rejected. Multiple mechanisms are involved in peripheral and local tolerance induction that prevents fetal rejection

while maintaining competent immune surveillance and protection. In our study, we investigate a more complex regulatory mechanism involving a novel immune-checkpoint molecule and pathway.

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a neuropeptide encoded by the ADCYAP1 gene<sup>1</sup> and belongs to the glucagon/VIP/secretin family.<sup>2</sup> It has a major relevance in the nervous system

and in several peripheral organs including reproductive organs. PACAP is one of the peptides regulating germ cell development in the ovary and testis,<sup>3,4</sup> and it has several other regulatory functions in reproduction.<sup>5</sup> PACAP influences ovarian hormone production,<sup>6</sup> affects meiosis and is an important local regulator of follicular development.<sup>7</sup> PACAP-deficient mice display several abnormalities in several physiological and pathological processes, including reproductive functions.<sup>5,8</sup> It has long been known that PACAP-deficient mice have decreased reproductive rate and several mechanisms have been suggested. Decreased mating behavior<sup>9</sup> and impaired implantation<sup>10</sup> as well as disturbed maternal behavior<sup>9</sup> and increased postnatal mortality with altered perinatal neurobehavioral development<sup>11,12</sup> in PACAP knockout mice have been suggested to account for the decreased number of offspring. Several other effects of PACAP in reproductive functions have been suggested to play a role in the decreased reproductive rate described by several research groups. For example, PACAP plays a role in fertilization,<sup>13</sup> influences trophoblast cell growth, migration, and placental functions<sup>14</sup> and plays a role in the blood flow of the uteroplacental unit.<sup>15</sup> PACAP is a known modulator of innate and adaptive immune response.<sup>16</sup> However, it is not known whether PACAP plays a role in the maternal immune tolerance toward a fetus.

Immune-checkpoints are cell surface receptors, expressed on a variety of immune cells. These immune-checkpoints maintain the tolerance of the immune system to self-antigens under normal physiological conditions, and negatively regulate the immune response, in order to avoid immune injury. Studies suggest that each checkpoint induces immune inactivation through discrete cellular mechanisms. Immune-checkpoint receptor-ligand interactions are not limited to T cells. Checkpoint receptors are expressed on a variety of immune cells, including natural killer (NK) cells and cells derived from the myeloid lineage.<sup>17</sup> Checkpoint signaling in these cells is implicated in infection, prevention of autoimmunity, transplantation, and tumor immune evasion. Checkpoints CTLA-4, programmed cell death-1 (PD-1), T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3), LAG-3, and TIGIT are only a few of the down-regulators of immune functions.<sup>17</sup>

TIM-3 is a receptor, which is expressed in a variety of immune cells, including Th1, Th17, NK cells, NKT cells, regulatory T cells, dendritic cells, monocytes, macrophages, and mast cells.<sup>18</sup> TIM-3 is a potent regulator of both the adaptive and innate immune response. TIM-3 has regulatory effects in several signaling processes such as T-cell receptor-dependent signaling pathway and T-cell activation pathways.<sup>19</sup> Furthermore, it has a relevance in materno-fetal immunity.<sup>20</sup>

Galectin-9 (Gal-9) is a  $\beta$ -galactose binding protein and acts as the ligand for TIM-3.<sup>21</sup> Identification of Gal-9 as a ligand has established the TIM-3/Gal-9 pathway as an important regulator of Th1 immunity and tolerance induction.<sup>22,23</sup> The expression of Gal-9 is predominant in immune cells, endometrium/decidua,<sup>24</sup> and intestine.<sup>25,26</sup> TIM-3 serves as an inhibitory immune-checkpoint molecule that controls pro-inflammatory Th1 and possibly Th17 responses thereby preventing uncontrolled inflammation and immunopathology. This

negative regulation plays a role in controlling Th1 and Th17 balance, therefore can modulate peripheral tolerance during pregnancy.<sup>26</sup>

Programmed cell death-1 is another immune-checkpoint receptor and a member of the B7/CD28 family.<sup>27</sup> It is known to down-regulate T-cell functions. PD-1 expression was observed on CD4+ Th- and CD8+ T lymphocytes, B lymphocytes, Tregs, NK, NKT cells, DCs, and activated monocytes.<sup>28</sup> Known ligands of PD-1 include PD-L1 and PD-L2.<sup>29</sup> The binding of PD-1 on T cells with its ligand PD-L1 leads to decreased cytokine production and negatively regulates T-cell proliferation and cell lysis during immune responses to pathogens or cancer.<sup>30</sup>

These unique molecules can be involved in special regulatory mechanisms, and their thorough investigation could give us a better understanding of the activity of the immune system during pregnancy. Therefore, the aim of our study was to investigate the expression pattern of TIM-3, PD-1, and Gal-9 on different immune cell subsets in the periphery and at the materno-fetal interface in PACAP KO mice.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animal model

Generation of PACAP-deficient mice on CD-1 background was described earlier.<sup>31</sup> Two-month-old wild-type (WT) and homozygous knockout (KO) female mice were maintained on a 12-hour light/dark cycle at 20–22°C, 40%–60% humidity and were fed with standard feed pellets and tap water. The presence of vaginal plug was checked every morning to show whether mating occurred, and if present, the day was considered as gestation day (gd) 0.5. Gravid females were euthanized on gd 14.5 by cervical dislocation. The animal ethics committee of the University of Pecs approved all experiments, and the animals were handled in accordance with an approved protocol (BA02/2000-24/2011, University of Pecs, Hungary). Genotyping was performed using Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences used for detection of WT and KO DNA signatures of PACAP were identical with those used earlier.<sup>12,31</sup>

### 2.2 | Immunohistochemistry

Placental tissues were removed from uterine horns and fixed with 4% paraformaldehyde for more than 24 hours. Samples were then embedded in paraffin and 4- $\mu$ m-thick sections were prepared. After deparaffinization in xylol for 3  $\times$  5 minutes, samples were rehydrated in degraded alcohol series (96%, 80%, 70%, 50%) for 3 minutes each. Then, tissue sections were washed in distilled water (dH<sub>2</sub>O) and antigen retrieval was performed for 20 minutes in boiling 1 $\times$  Target Retrieval Solution (TRS; 1:10; pH 6.0–6.2; Dako, Santa Clara, CA, USA). Next, samples were cooled down to room temperature, washed twice with dH<sub>2</sub>O and endogenous peroxidase was blocked for 15 minutes in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Then samples were washed 3  $\times$  5 minutes with 50 mM Tris buffer saline (TBS) supplemented with 0.05%

Tween pH 7.4 (TBST) and pre-blocked with 3% BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 20 minutes. Following washing with TBST for 2 × 5 minutes, slides were incubated with biotinylated goat anti-mouse Gal-9 antibody (1:10; R&D Systems, Minneapolis, MI, USA) for 1 hour at room temperature. After washing three times in TBST, samples were incubated with Streptavidin-Biotinylated Horseradish Peroxidase Complex (1:100; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) for 30 minutes at room temperature. Following the washing procedure, the signal was detected with Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako) for 5-30 minutes at room temperature. Hematoxylin counterstain was performed for 3 minutes at room temperature; then, slides were covered with mounting medium (Dako).

### 2.3 | Peripheral mononuclear cell isolation from spleen

Spleens were homogenized thoroughly with a syringe plunger, and single-cell suspensions were prepared using a 70- $\mu$ m nylon cell strainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Subsequently, cells were washed in PBS. The supernatant was aspirated, and the pellet was resuspended in PBS and filtered again via 40  $\mu$ m nylon cell strainer (BD Biosciences). Then, mononuclear cells were separated by Ficoll Paque gradient (GE Healthcare). Isolated cells were collected and resuspended in RPMI1640 (Lonza, Basel, Switzerland) medium supplemented with penicillin (1 × 105U/L; Lonza), streptomycin (0.05 g/L; Lonza) and 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Waltham, MA, USA).

### 2.4 | Mononuclear cell isolation from decidua

Decidual mononuclear cells from the materno-fetal interface were isolated according to the method described previously.<sup>20</sup> Briefly, the endometrial tissue surrounding the conceptuses was pulled away from the uterine horns. Then, the decidua was separated from the placenta under a dissecting microscope, sliced with scissors and digested with type IV collagenase (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30 minutes. The suspensions were homogenized with a syringe plunger, and single-cell suspensions were prepared using a 70- $\mu$ m nylon cell strainer. Subsequently, cells were washed in RPMI1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin and 10% FBS. The supernatant was aspirated, the pellet was resuspended in PBS and filtered via 40  $\mu$ m nylon cell strainer. Finally, the isolated cells were resuspended in RPMI1640 + 10% FBS.

### 2.5 | Mononuclear cell surface staining, antibodies and flow cytometric analysis

Isolated mononuclear cells were resuspended in PBS (1 × 10<sup>6</sup> in 100  $\mu$ L PBS/tube) and incubated for 30 minutes at room temperature with fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. Immune cells were characterized (Figures S1 and S2) by surface staining using the antibodies shown in Table S1. The samples were protected from light. After washing, the cells were resuspended in 300  $\mu$ L PBS containing 1% paraformaldehyde and stored at 4°C in complete darkness until

fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Before sample analysis, settings of the flow cytometer were checked using Cytometer Setup and Tracking beads (CS&T beads; BD-Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Compensation beads were used with single stains of each antibody to determine the compensation settings and were applied in FACSDiva V6 software (BD Biosciences) before data collection. Labeled cells were analyzed with FACSCantoll flow cytometer by collecting 100 000 events in the lymphogate in the case of the spleen. In the case of decidua 10 000 events were collected in the lymphogate after CD45 staining. FACSDiva V6 software was used for data acquisition and FCS Express IV software (De Novo Software, Glendale, CA, USA) for data analysis.

### 2.6 | FoxP3 staining

Following surface labeling, intracellular staining of FoxP3 was performed using the FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience, Waltham, MA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Briefly, isolated cells were permeabilized in 1 mL fixation/permeabilization buffer (Concentrate/Diluent 1:4; eBioscience) for 1 hour at 4°C in dark. Then, the samples were washed twice in the buffer and stained with APC-conjugated anti-mouse FoxP3 monoclonal antibody for 1 hour at 4°C in dark. FACS analysis was performed by FACSCantoll flow cytometer with the BD FACSDiva software.

### 2.7 | CD107a degranulation assay

The CD107a assay was set up based on a publication by Alter et al.<sup>32</sup> To determine CD107a expression by immune cells, mononuclear cells were incubated for 4 hours at 37°C with FITC-conjugated anti-mouse CD107a antibody in RPMI1640 containing 10% FBS, penicillin, streptomycin, ionomycin (Sigma-Aldrich) and phorbol myristate acetate (PMA; Sigma-Aldrich). Next, the cells were washed with PBS and incubated with anti-CD3-BV510, anti- $\gamma/\delta$ -BV510, anti-CD49b-FITC, anti-CD45-PerCP and anti-CD8-APC-H7 antibodies for 30 minutes at room temperature in the dark. Then, the cells were washed in PBS, fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) and evaluated by FACS.

### 2.8 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using statistical software SPSS version 23 package (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA with Bonferroni's correction. Differences were considered significant if the *P* value was equal to or less than 0.05.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Immunohistochemistry of pregnant mouse placentae from wild-type and PACAP KO mice

Immunohistochemistry on healthy pregnant mouse placentae with anti-Gal-9 antibody demonstrated a strong expression of Gal-9 at the

spongiotrophoblast layer and in the cytoplasm of giant cells (Figure 1) in both WT and PACAP KO mice. Histological sections represented a more intense staining by trophoblast giant cells compared to spongiotrophoblast layer (Figure 1). Immunohistochemistry showed no significant difference in Gal-9 expression by the placentae of PACAP KO mice compared to the placentae of WT pregnant mice (Figure 1).

### 3.2 | Immunophenotypic analysis of decidual and peripheral mononuclear cells from pregnant wild-type and PACAP KO mice at 2 weeks of gestational age

We investigated the percentage of CD4+ T, CD8+ T cells,  $\gamma/\delta$  T cells, Treg cells, NK and NKT cells in the periphery and in the decidua of pregnant mice. In both groups, we observed a significant increase in decidual  $\gamma/\delta$  T, NK and NKT cells frequency at the materno-fetal interface while the frequency of decidual CD4+ T and CD8+T cells was significantly decreased when compared to the periphery (Table 1). These results are in line with the data obtained in BALB-c mice.<sup>20</sup> PACAP KO mice had a significantly elevated Treg frequency in the periphery compared to the decidua. PACAP KO mice had a significantly increased CD4+ T frequency in the periphery together with a higher number of  $\gamma/\delta$  T cell in the decidua compared to the WT mice (Table 1).

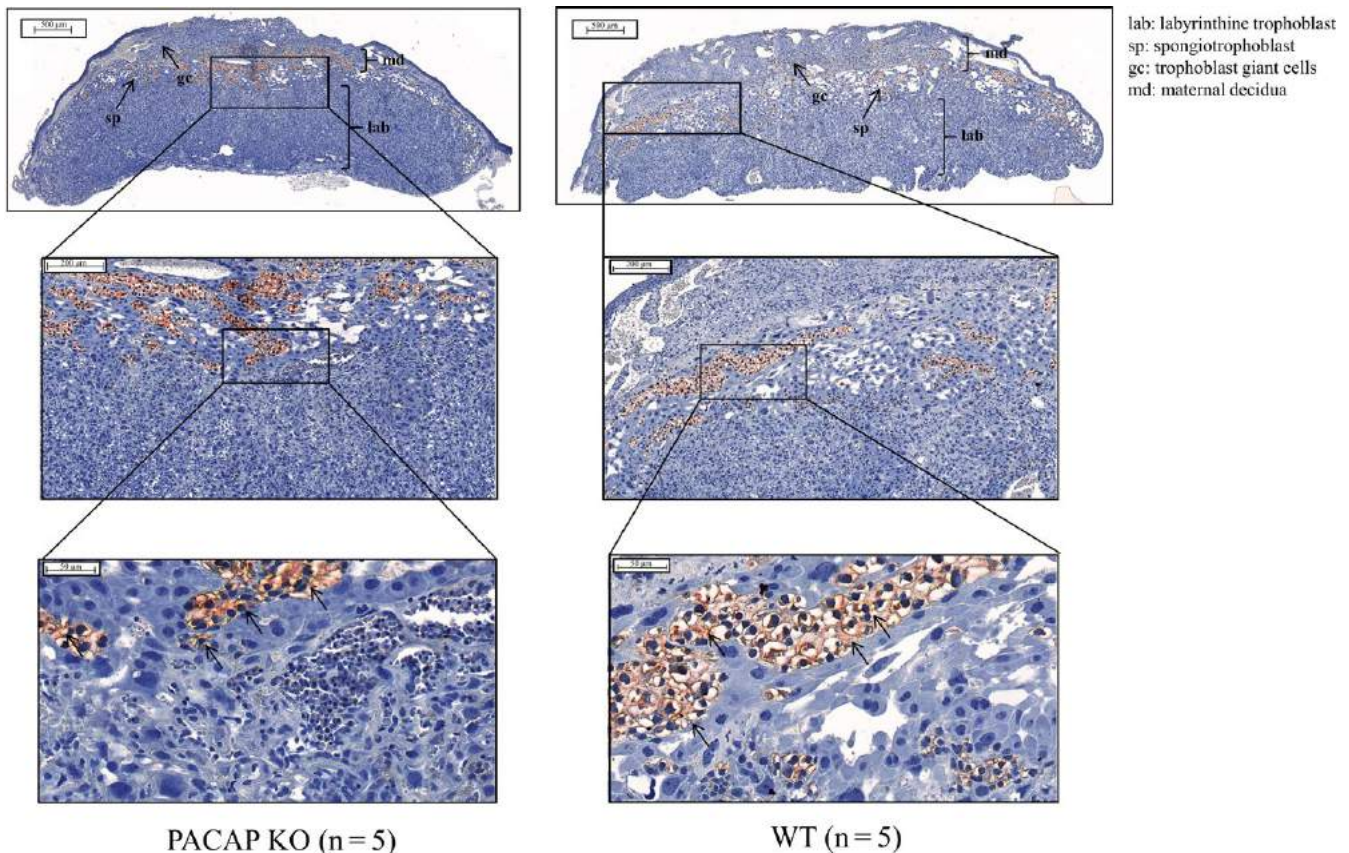
### 3.3 | The proportion of Gal-9+ Th cell population in decidua and periphery of pregnant wild-type and PACAP KO mice

CD4+ Th lymphocytes expressing Gal-9 on their cell surface possess immunosuppressive potential by regulating the Th17/Treg balance.<sup>33</sup> Therefore, we investigated the percentage of Gal-9+ Th cells in the decidua and in the periphery from pregnant WT and PACAP KO mice.

Our study is the first to demonstrate a significant increase in the frequency of decidual Gal-9+ Th cell obtained from PACAP KO mice compared to the decidua of WT mice (Table 1 and Figure 3D). We also observed that both WT and PACAP KO mice had a significantly elevated Gal-9+ Th cell frequency at the materno-fetal interface compared to the periphery (Figure 3D).

### 3.4 | TIM-3 and PD-1 expression by decidual and peripheral mononuclear cells from pregnant wild-type and PACAP KO mice

Flow cytometry was used to analyze the cell surface expression of TIM-3 by CD4+ T, CD8+ T,  $\gamma/\delta$  T, Treg, NK and NKT cells at the materno-fetal interface as well as in the periphery of pregnant WT



**FIGURE 1** Representative Gal-9 immunohistochemical staining of pregnant mouse placentae from wild-type (WT) and PACAP KO mice. IHC was performed on the placenta sections of WT (A) and PACAP KO (B) mice. Black arrows indicate Gal-9-positive cells. The images were captures utilizing the Panoramic DESK scanner (3DHISTECH Ltd.), and analysis was performed by the Panoramic viewer software (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary)

**TABLE 1** Immunophenotypic analysis of decidual and peripheral mononuclear cells from pregnant wild-type (WT) and PACAP KO mice in 2 wk of gestational age

	Periphery		Decidua	
	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)
CD4+ T cells	25.32 ± 3.23 <sup>#</sup>	30.66 ± 5.08 <sup>*,§</sup>	6.94 ± 2.76	8.00 ± 6.02
CD8+ T cells	7.93 ± 2.20 <sup>#</sup>	10.51 ± 3.48 <sup>*</sup>	2.32 ± 1.20	2.19 ± 1.45
γ/δ T cells	4.02 ± 1.77 <sup>#</sup>	3.85 ± 1.56 <sup>*</sup>	39.94 ± 19.2	57.90 ± 19.03 <sup>#</sup>
Treg cells	1.37 ± 0.67	1.67 ± 0.65 <sup>**</sup>	1.02 ± 1.07	0.81 ± 0.47
NK cells	9.40 ± 4.01 <sup>#</sup>	10.17 ± 5.03 <sup>*</sup>	24.78 ± 6.34	22.58 ± 7.23
NKT cells	0.72 ± 0.39 <sup>##</sup>	1.32 ± 0.87 <sup>*</sup>	6.24 ± 4.07	10.12 ± 8.34
Gal-9+ Th cells	1.35 ± 1.37 <sup>#</sup>	1.36 ± 0.76 <sup>*</sup>	4.93 ± 2.78	9.31 ± 5.31 <sup>##</sup>

Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test with Bonferroni's correction. The results were expressed as the mean value ± standard deviation (SD). Differences were considered significant when the value of *P* was equal to or less than 0.05.

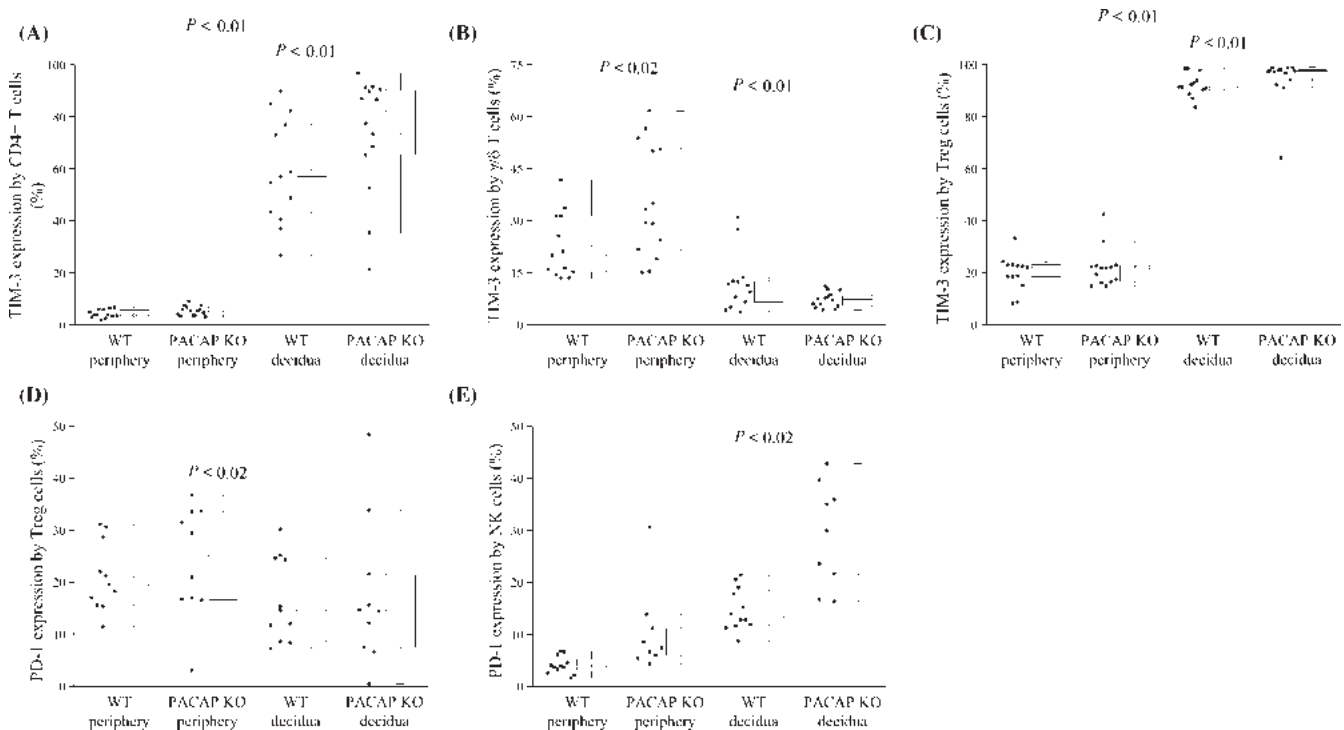
<sup>#</sup>*P* < 0.01 from WT decidua.

<sup>##</sup>*P* < 0.05 from WT decidua.

<sup>\*</sup>*P* < 0.01 from PACAP KO decidua.

<sup>\*\*</sup>*P* < 0.03 from PACAP KO decidua.

<sup>§</sup>*P* < 0.03 from WT periphery.



**FIGURE 2** T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and programmed cell death-1 (PD-1) expression by decidual and peripheral mononuclear cells from pregnant wild-type (WT) and PACAP KO mice. Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range and individual data values for the expression of TIM-3 by CD4+ T, γ/δ T and Treg cells and of PD-1 by Tregs and NK cells in periphery and decidua in pregnant WT and PACAP KO mice. The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for *P*-values ≤ 0.05

and PACAP KO mice. We found that both in WT and PACAP KO mice TIM-3 expression by CD4+ T and Treg cells was significantly increased in the decidua compared to cells obtained from the periphery (Figure 2A,C, Table 2). Furthermore, we also noted a significant

decrease in TIM-3 receptor expression in the decidua of PACAP KO mice by γ/δ T cells compared to the periphery (Figure 2B, Table 2), and it was also significantly increased in the periphery of PACAP KO mice compared to WT mice (Figure 2B, Table 2).

	Periphery		Decidua	
	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)
CD4+ T cells				
TIM-3	<b>4.22 ± 1.57<sup>#</sup></b>	<b>5.34 ± 1.82*</b>	59.48 ± 20.25	73.37 ± 22.86
PD-1	11.07 ± 3.90	12.04 ± 4.26	9.22 ± 4.73	8.29 ± 4.54
CD8+ T cells				
TIM-3	1.84 ± 0.88	2.45 ± 1.49	1.31 ± 1.60	8.21 ± 20.02
PD-1	5.65 ± 3.55	11.05 ± 11.45	1.12 ± 1.45	2.71 ± 2.42
$\gamma/\delta$ T cells				
TIM-3	22.54 ± 9.26	<b>35.29 ± 16.18<sup>*,§</sup></b>	12.01 ± 8.36	7.15 ± 2.23
PD-1	61.27 ± 10.03	69.04 ± 15.24	43.60 ± 16.56	45.32 ± 11.59
Treg cells				
TIM-3	<b>19.74 ± 6.63<sup>#</sup></b>	<b>21.81 ± 7.42*</b>	92.00 ± 4.44	94.23 ± 9.03
PD-1	<b>20.96 ± 6.58<sup>##</sup></b>	23.87 ± 10.74	16.51 ± 8.07	17.48 ± 14.12
NK cells				
TIM-3	1.92 ± 1.09	4.37 ± 1.65	4.67 ± 2.26	5.23 ± 1.65
PD-1	4.05 ± 1.68	<b>10.38 ± 8.12<sup>**</sup></b>	14.70 ± 4.07	29.03 ± 9.90
NKT cells				
TIM-3	21.56 ± 10.74	25.56 ± 15.01	26.72 ± 19.31	29.87 ± 10.69
PD-1	34.64 ± 9.92	37.57 ± 20.97	19.71 ± 9.59	30.13 ± 13.41

Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test with Bonferroni's correction. The results were expressed as the mean value ± standard deviation (SD). Differences were considered significant when the value of *P* was equal to or less than 0.05. Bold values indicates statistically significant values.

PD-1: programmed cell death-1; TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule-3.

<sup>#</sup>*P* < 0.01 from WT decidua.

<sup>##</sup>*P* < 0.05 from WT decidua.

\**P* < 0.01 from PACAP KO decidua.

\*\**P* < 0.03 from PACAP KO decidua.

<sup>§</sup>*P* < 0.03 from WT periphery.

We could not determine statistical differences in TIM-3 expression by CD8+ T cells, NK and NKT cells in the decidua and in the periphery (Table 2).

During our investigation of the PD-1 expression by CD4+ T, CD8+ T,  $\gamma/\delta$  T, Treg, NK and NKT cells in pregnant mice, we discovered that Tregs demonstrated a decrease in PD-1 expression in the decidua compared to the periphery in WT mice (Figure 2D, Table 2). In contrast to that NK cells in PACAP KO mice showed a significantly increased PD-1 expression in the decidua compared to the periphery (Figure 2E, Table 2).

We could not determine statistical differences in PD-1 expression by CD4+ T, CD8+ T,  $\gamma/\delta$  T and NKT cells in the decidua and in the periphery (Table 2).

### 3.5 | Cell surface Gal-9 expression by decidual and peripheral mononuclear cells isolated from pregnant wild-type and PACAP KO mice

We measured the surface expression of Gal-9 on different lymphocyte subsets by flow cytometry. While Gal-9 expression was

**TABLE 2** Immune-checkpoint receptor (TIM-3, PD-1) expression by decidual and peripheral mononuclear cells from wild-type (WT) and PACAP KO pregnant mice

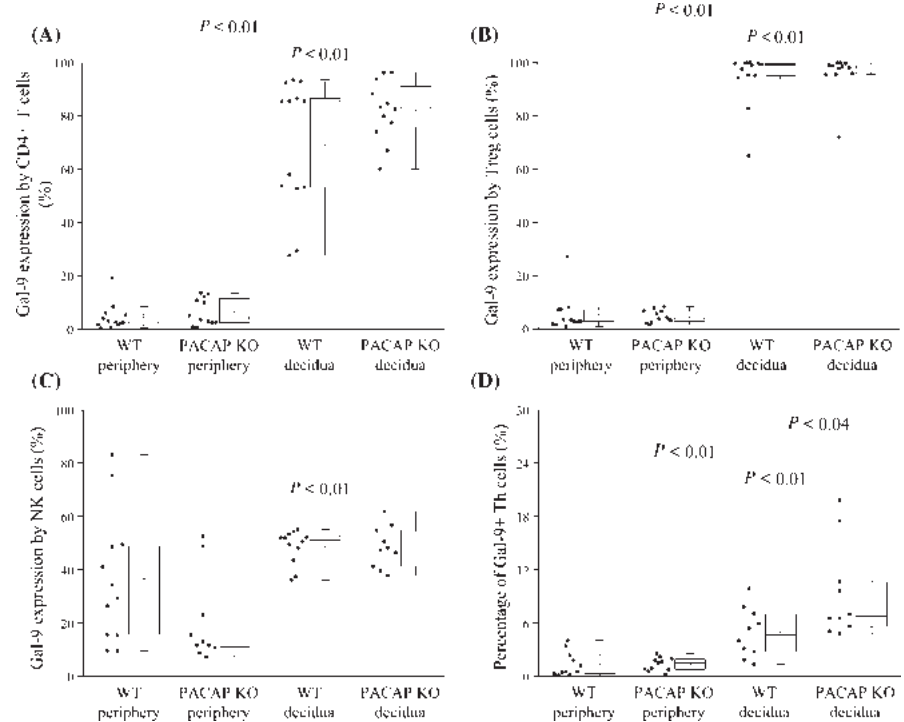
significantly increased by decidual CD4+ T and Treg when compared to the periphery in both animal groups (Figure 3A,B, Table 3), in PACAP KO mice NK cells showed an increased surface Gal-9 expression at the materno-fetal interface compared to the periphery (Figure 3C, Table 3).

### 3.6 | Cytotoxic activity of CD8+ T, $\gamma/\delta$ T, NK and NKT cells in the decidua and in the periphery from pregnant wild-type and PACAP KO mice

The cytotoxic activity was evaluated by measuring the CD107a expression by the investigated cell subsets (Table 4). Investigating the cytotoxic activity of CD8+ T,  $\gamma/\delta$  T, NK and NKT cells obtained from the materno-fetal interface we found a significantly higher CD107a expression by all decidual subpopulations compared to peripheral counterparts of WT and PACAP KO mice (Figure 4A,B,C,D).

Peripheral  $\gamma/\delta$  T cells from PACAP KO mice showed significantly higher cytotoxic activity compared to WT mice (Figure 4B).

**FIGURE 3** Gal-9 expression and the proportion of Gal-9+ Th cell population in decidua and periphery from pregnant wild-type (WT) and PACAP KO mice. Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range and individual data values for the cell surface expression of Gal-9 by CD4+ T, Treg and NK cells and the frequency of Gal-9 positive Th cells in decidua and periphery from pregnant WT and PACAP KO mice. The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for  $P$ -values  $\leq 0.05$



**TABLE 3** Gal-9 expression by decidual and splenic mononuclear cells from wild-type (WT) and PACAP KO pregnant mice

	Periphery		Decidua	
	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)
CD4+ T cells	4.35 ± 5.02 <sup>#</sup>	6.35 ± 5.06*	69.00 ± 24.18	82.01 ± 11.24
CD8+ T cells	14.95 ± 10.60	8.06 ± 7.74	11.08 ± 2.98	11.89 ± 5.43
$\gamma/\delta$ T cells	46.69 ± 20.68	46.06 ± 18.67	46.76 ± 16.80	43.38 ± 7.46
Treg cells	5.54 ± 6.91 <sup>#</sup>	4.61 ± 2.32*	94.46 ± 10.02	95.99 ± 7.72
NK cells	36.49 ± 24.36	20.31 ± 16.62*	48.71 ± 6.36	48.48 ± 7.74
NKT	62.80 ± 21.23	51.38 ± 20.22	57.19 ± 26.56	67.11 ± 11.71

Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test with Bonferroni's correction. The results were expressed as the mean value  $\pm$  standard deviation (SD). Differences were considered significant when the value of  $P$  was equal to or less than 0.05. Bold values indicates statistically significant values.

<sup>#</sup> $P < 0.01$  from WT decidua.

\* $P < 0.01$  from PACAP KO decidua.

## 4 | DISCUSSION

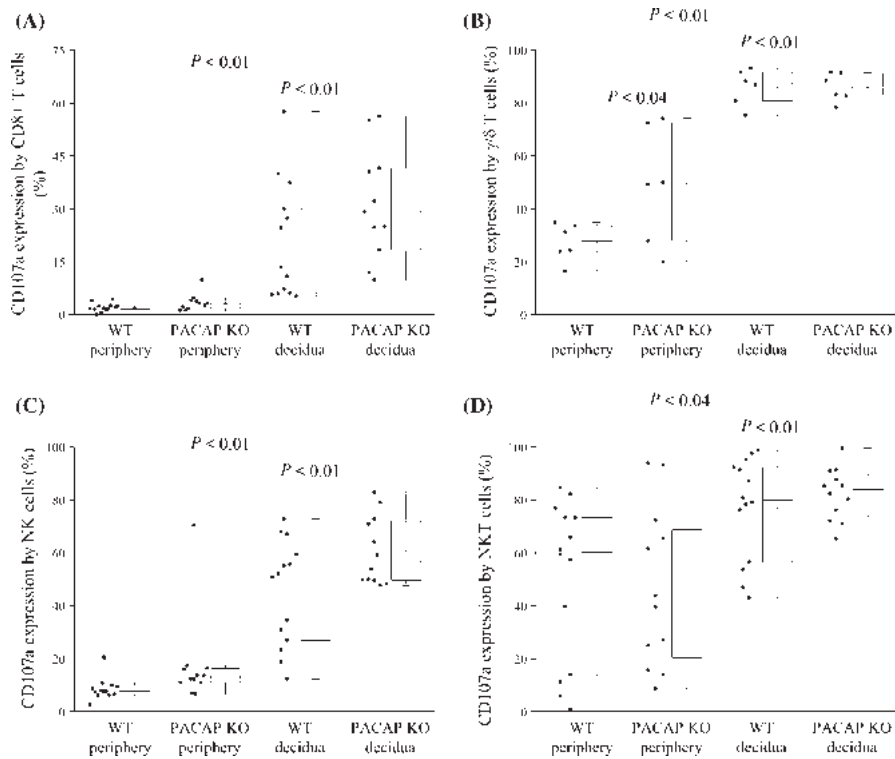
Mice lacking PACAP show impaired reproduction in females, where a study by Isaac and Sherwood<sup>10</sup> excluded the involvement of puberty onset, mating, ovulation or fertilization. Isaac et al<sup>10</sup> showed that impaired implantation is the defect probably responsible for the decreased fertility in PACAP KO female mice. Implantation occurred in most WT females (81%), but in significantly fewer PACAP KO mice (13.3%). When embryos were artificially implanted newborn mice, they occurred in the same numbers, regardless of genotype.<sup>10</sup>

Examining the possible role of PACAP in the regulation of female reproductive functions Shintani et al<sup>9</sup> published that PACAP KO

mice showed a reduction in fertility (the number of parturitions relative to the number of pairings) related to reduced mating frequency. Decreased fertility in PACAP KO females was characterized as the number of females that delivered live pups relative to the number of females that were paired.

PACAP may act through different pathways in the reproductive system, for example PACAP stimulates the corpus luteum and progesterone synthesis as well as their secretion in the ovary in a paracrine manner.<sup>10</sup> Serum progesterone and prolactin levels are significantly lower in PACAP KO female mice than in WT mice,<sup>10</sup> which could lead to reduced uterine receptivity during implantation. These results support an important role for PACAP in the establishment of pregnancy initiation and implantation but we do





**FIGURE 4** CD107a expression by different immune cells in the periphery and in the decidua of pregnant wild-type (WT) and PACAP KO mice. Box plot of the median, the 25th and 75th percentiles, range and individual data values for the expression of CD107a by CD8<sup>+</sup> T,  $\gamma/\delta$  T, NK and NKT cells in decidua and periphery from pregnant WT and PACAP KO mice. The middle line within the box represents the median, the middle dot within the box represents the mean, the boxes indicate the interquartile ranges and the whiskers show the most extreme observations. Differences were considered statistically significant for  $P$ -values  $\leq 0.05$

not know whether it plays any role in the immune regulation at the materno-fetal interface during pregnancy.

During pregnancy, local adaptation of the maternal immune system allows successful coexistence between the mother and the semi-allograft fetus expressing both maternal and paternal antigens. The first histologically apparent maternal immunologic adjustment to the embryo is a dramatic change in the relative proportions of leukocyte subpopulations in the uterus.

Both in PACAP KO and WT mice, a significant increase could be observed in decidual  $\gamma/\delta$  T, NK and NKT cell frequency at the materno-fetal interface, while the frequency of decidual CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was significantly decreased when compared to the periphery. PACAP KO mice had a significantly elevated Treg frequency in the periphery compared to the decidua. PACAP KO mice had a significantly increased CD4<sup>+</sup> T frequency in the periphery together with a higher number of  $\gamma/\delta$  T cells in the decidua compared to the WT mice.

Earlier we reported that Gal-9 is expressed by the mouse placenta in BALB-c mice.<sup>20</sup> In our present experiments, both PACAP KO and WT mice on CD-1 background showed the same Gal-9 positivity by the spongiotrophoblast layer of the hemochorial placenta. Gal-9 can also be expressed locally by the immune cells on the maternal side. Although there is a decrease in the ratio of CD4<sup>+</sup> T cells in the decidua both in PACAP KO and in WT mice, the percentage of the Gal-9 secreting subpopulation (Gal-9<sup>+</sup> Th cells) significantly increased locally at the materno-fetal interface compared

to the periphery. The only notable PACAP-specific alteration was related to CD4<sup>+</sup> T cells expressing cell surface Galectin-9 (Gal-9<sup>+</sup> Th cell). The present study is the first to report a significantly elevated Gal-9<sup>+</sup> Th cell frequency at the materno-fetal interface in pregnant PACAP KO mice compared to WT control mice.

Our previous murine experiment investigating the effects of late administration (on gd 14.5) of low dose Mifepristone during pregnancy showed that the placental expression of Gal-9 is seriously impaired but the frequency of decidual Gal-9<sup>+</sup> Th cells was significantly increased when compared to the untreated control decidua.<sup>34</sup> Although this treatment did not cause considerable change in the phenotypic distribution of decidual and peripheral immune cells, it altered the Gal-9 and TIM-3 expression by different NK and T-cell subsets.<sup>34</sup>

As a progesterone receptor antagonist, Mifepristone can inhibit the pregnancy-protective immunological effects of progesterone both in a TIM-3 dependent and independent way.

As serum progesterone levels are significantly lower in PACAP KO female mice than in WT mice during pregnancy,<sup>10</sup> the lack of progesterone and its effects on immune tolerance could be one logical explanation to our findings in connection with the high level of Gal-9<sup>+</sup> Th cells at the materno-fetal interface in pregnant PACAP KO mice.

Whether this hypothetical mechanism is true for the recruitment of Gal-9<sup>+</sup> Th cells in the decidua of PACAP KO mice or whether there is another mechanism remains to be determined.

**TABLE 4** CD107a expression by decidual and splenic mononuclear cells from wild-type (WT) and PACAP KO pregnant mice

	Periphery		Decidua	
	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)	WT (n = 13)	PACAP KO (n = 14)
CD8+ T cells	<b>2.00 ± 1.19<sup>#</sup></b>	<b>3.41 ± 2.41*</b>	20.87 ± 16.78	31.33 ± 15.73
$\gamma/\delta$ T cells	<b>27.37 ± 7.09<sup>#</sup></b>	<b>48.94 ± 22.20<sup>*§</sup></b>	85.97 ± 6.75	85.91 ± 5.42
NK cells	<b>9.39 ± 5.03<sup>#</sup></b>	<b>17.27 ± 17.05*</b>	44.79 ± 19.89	60.60 ± 12.84
NKT cells	<b>50.39 ± 30.19<sup>##</sup></b>	<b>46.68 ± 30.13*</b>	76.91 ± 19.25	82.23 ± 9.82

Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test with Bonferroni's correction. The results were expressed as the mean value ± standard deviation (SD). Differences were considered significant when the value of *P* was equal to or less than 0.05. Bold values indicates statistically significant values.

<sup>#</sup>*P* < 0.01 from WT decidua.

<sup>##</sup>*P* < 0.05 from WT decidua.

\**P* < 0.01 from PACAP KO decidua.

<sup>§</sup>*P* < 0.05 from WT periphery.

The active presence of Gal-9 producing cells at the materno-fetal interface suggests a local immunomodulatory role of TIM-3/Gal-9 pathway after maternal immunoactivation. According to our hypothesis, the dominant presence of the ligand Gal-9 at the materno-fetal interface suggests subsequent local immunomodulatory potential following maternal immunoactivation.

During the analysis of TIM-3 expression by immune cells in the decidua and in the periphery, decidual CD4+ T and Treg cells showed a significantly increased TIM-3 expression in both animal groups, while TIM-3 expression by  $\gamma/\delta$  T cells was significantly decreased in the decidua of PACAP KO mice compared to the periphery. Interestingly, TIM-3 expression by  $\gamma/\delta$  T cells was significantly increased in the periphery of PACAP KO mice compared to the WT mice.

These results suggest that CD4+ T and Treg cells are presumably under immune-checkpoint control by TIM-3 molecule. Analyzing another immune-checkpoint molecule revealed that PD-1 expression by NK cells is significantly increased in the decidua compared to the periphery in PACAP KO mice.

Cytotoxicity was measured by detection of the degranulation marker CD107a on the surface of the investigated immune cells. Analyzing data the only PACAP specific change is the significantly increased cytotoxicity by  $\gamma/\delta$  T cells in the periphery of PACAP KO mice compared to WT mice. Progesterone-dependent immuno-modulation in maternal tolerance of the fetus is well documented.<sup>35,36</sup> Serum progesterone levels are significantly lower in PACAP KO female mice than in WT mice during pregnancy,<sup>10</sup> this could be a possible explanation for this finding.

We could not detect any changes in the cytotoxic potential of the investigated cells at the materno-fetal interface between the two groups, suggesting no functional impairment or disturbance locally mediated by either TIM-3/Gal-9 or PD-1/PD-L1 pathways. These results are in line with the data obtained by immunohistochemistry showing no difference in the Gal-9 expression by trophoblast cells between WT and PACAP KO mice. In contrast to this, there is a significantly elevated Gal-9+ Th cell frequency in the decidua at the materno-fetal interface in PACAP KO mice

compared to WT controls, suggesting a possible control of the cytotoxicity of TIM-3 positive cells. Gal-9 binding to TIM-3 on the surface of different immune cells will control inappropriate activation of local inflammation and inhibit harmful cytotoxic mechanisms against self-antigens. This could be a scenario in the case of CD8+ T and NK cells, where there is a slight but not significant increase in the cytotoxicity in the decidua of PACAP KO mice compared to WT mice. According to our theory, the recruitment of Gal-9+ Th cells to the decidua in PACAP KO mice during pregnancy promote local immune homeostasis and function. Previous studies confirmed that Gal-9+ Th cells are real immunosuppressors which produce IL-10/TGF- $\beta$  and play a vital role in the regulation of Th17/Treg balance.<sup>33</sup> These cells can promote the differentiation of Treg cells and type-1 regulatory T cells, which further secrete a high amount of IL-10 and Gal-9 and as a consequence, effectively suppress local Th1-type immune response.<sup>33</sup>

There were some limitations in the present study. Firstly, our results were obtained from mice only at gestation day 14.5, which is rather late in mouse pregnancy so even more significant immune-checkpoint related changes could be observed earlier in pregnancy, which needs further investigations. Second, functional assays of the investigated cells should be performed in the future to investigate the relationship between TIM-3 positive immune cells and Gal-9+ Th cells.

Immune cells enriched in the decidua can modulate maternal immune responses activated by the recognition of fetal antigens toward a tolerogenic state, but the developing mild inflammatory environment is also very important not only for the fetus (placentation and vascular remodeling) but also for the mother (immune protection against pathogens) as well. We investigated the possible role of TIM-3, PD-1 and Gal-9 molecules in materno-fetal tolerance during pregnancy in PACAP KO mice.

In conclusion, despite the found alterations in the peripheral number and function of immune cells, we could not find any remarkable alteration either in the distribution or in the cytotoxicity of the investigated decidual immune cells which could elucidate any reproductive alterations in pregnant PACAP-deficient mice.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from National Research, Development and Innovation Office (NKFIH K119529, K115874 and K119759); 2017-1.2.1-NKP-2017-00002, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS," MTA-TKI 14016, EFOP-3.6.2-16-2017-00008 "The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics," Neuroscience Centre of Pecs, Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary (20765-3/2018/FEKUTSTRAT) and PTE ÁOK KA Research Grant; (KA-2018-07).

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## ORCID

Laszlo Szereday  <http://orcid.org/0000-0002-1208-2969>

## REFERENCES

- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, et al. Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1129(2):199-206.
- Rawlings SR, Hezareh M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland\*. *Endocr Rev*. 1996;17(1):4-29.
- Cecconi S, Rossi G, Barberi M, Scaldaferrri L, Canipari R. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on mouse preantral follicle development in vitro. *Endocrinology*. 2004;145(4):2071-2079.
- Reglodi D, Cseh S, Somoskoi B, et al. Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice. *Reproduction*. 2018;155(2):129-139.
- Reglodi D, Tamas A, Koppan M, Szogyi D, Welke L. Role of PACAP in female fertility and reproduction at gonadal level - recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:155.
- Kanasaki H, Oride A, Tselmeg M, Sukhbaatar U, Kyo S. Role of PACAP and its PACAP type I receptor in the central control of reproductive hormones. In: Reglodi D, Tamas A, eds. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP*. Springer Nature: New York. Vol; 2016:375-387.
- Canipari R, Di Paolo V, Barberi M, Cecconi S. PACAP in the reproductive system. In: Reglodi D, Tamas A, eds. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP*. Springer Nature: New York. Vol; 2016:405-420.
- Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, et al. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci*. 2012;48(3):482-492.
- Shintani N, Mori W, Hashimoto H, et al. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regul Pept*. 2002;109(1-3):45-48.
- Isaac ER, Sherwood NM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;280(1-2):13-19.
- Gray SL, Cummings KJ, Jirik FR, Sherwood NM. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol Endocrinol*. 2001;15(10):1739-1747.
- Farkas J, Sandor B, Tamas A, et al. Early neurobehavioral development of mice lacking endogenous PACAP. *J Mol Neurosci*. 2017;61(4):468-478.
- Tanii I, Aradate T, Matsuda K, Komiya A, Fuse H. PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization. *Reproduction*. 2011;141(2):163-171.
- Horvath G, Nemeth J, Brubel R, et al. Occurrence and functions of PACAP in the placenta. In: Reglodi D, Tamas A, eds. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP*. Springer Nature: New York; 2016:389-403.
- Steenstrup BR, Jørgensen JC, Alm P, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul Pept*. 1996;61(3):197-204.
- Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(3):229-237.
- Nirschl CJ, Drake CG. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(18):4917-4924.
- Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002;415(6871):536-541.
- Lee J, Su EW, Zhu C, et al. Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2011;31(19):3963-3974.
- Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, et al. Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta*. 2015;36(10):1153-1160.
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1245-1252.
- Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2003;4(11):1093-1101.
- Wang F, He W, Yuan J, et al. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts. *Transpl Immunol*. 2008;19(1):12-19.
- von Wolff M, Wang X, Gabius H-J, Strowitzki T. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(3):189-194.
- Than NG, Romero R, Kim CJ, McGowen MR, Papp Z, Wildman DE. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;23(1):23-31.
- Tang Z-H, Liang S, Potter J, Jiang X, Mao H-Q, Li Z. Tim-3/galectin-9 regulate the homeostasis of hepatic NKT cells in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Immunol*. 2013;190(4):1788-1796.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-1034.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-268.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8(3):239-245.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, et al. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(23):13355-13360.
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22.

33. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, et al. Cell surface galectin-9 expressing th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e48574.
34. Lajko A, Meggyes M, Polgar B, Szere day L. The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. Kanellopoulos-Langevin C, ed. *PLoS ONE*. 2018;13(3):e0194870.
35. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szere day L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(6):1037-1048.
36. Szekeres-Bartho J, Par G, Szere day L, Smart CY, Achatz I. Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1997;38(3):176-182.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Lajko A, Meggyes M, Fulop BD, Gede N, Reglodi D, Szere day L. Comparative analysis of decidual and peripheral immune cells and immune-checkpoint molecules during pregnancy in wild-type and PACAP-deficient mice. *Am J Reprod Immunol*. 2018;e13035. <https://doi.org/10.1111/aji.13035>