

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



LAJKÓ ADRIENN

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

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

OGYDHT PÉCS

2020

I. Bevezetés

A reprodukzív immunológia az orvostudomány azon területe, mely az immunrendszer és a reprodukciós rendszer közötti kapcsolattal (mint például a magzattal szembeni anyai immuntolerancia) foglalkozik.

A terhesség tulajdonképpen egy „immunológiai paradoxon”, 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 toleranciamechanizmus révén elfogadja, elősegítve így az egészséges magzat zavartalan fejlődését, majd világra jövetelét. Abban az esetben, ha a tolerancia nem megfelelően alakul ki, számos komplikációhoz vezethet, sőt vetélés is létrejöhet.¹

A várandósság immunológiai hátterének megértése és feltérképezése klinikai szempontból igen fontos. A fertilitást az immunrendszer nagyban képes befolyásolni mind nők, mind férfiak esetében.² Az immunrendszer diszregulációja akár az ismételt vetélések okozója is lehet.³ A nők termékenységét számos immunológiai eredetű betegség képes csökkenteni, ilyenek az autoimmun betegségek, az immunhiányos betegségek és például az asztma.⁴ Továbbá a terhes anya immunrendszere és a fertőző ágensek közötti kölcsönhatás is befolyásolhatja a fertilitást.⁵

Az immun checkpoint molekulák az immunrendszerünk regulátorai. A fertőzésekkel, daganatokkal szembeni védekezést, s a szervezetben kialakuló autoimmun folyamatokat szabályozzák. Ezért is nélkülözhetetlen a szerepük az anyai immuntolerancia kialakításában és fenntartásában.⁶⁻⁸ 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/Galektin-9**, MHC-II/LAG-3 és SIRPa/CD47. A doktori értekezés során a TIM-3/Gal-9 és PD-1/PD-L1 útvonalakat vizsgáltuk.

TIM-3 molekula

A TIM-3 molekulát először, mint IFN- γ termelő CD4⁺ T helper-sejtek (Th1) és CD8⁺ citotoxikus T-sejtek (Tc1) felszínén termelődő immunglobulint írták le.⁹ 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).¹⁰

A TIM-3 és Gal-9 molekulák interakciója gátolja az NK-sejtek citotoxikus aktivitását és a Th1- és Th17-sejtek INF- γ szekrécióját. Ezen kívül szabályozza a T-sejtek toleranciájának kialakítását és Th1-es immunsejtek aktivációját egerekben és emberekben.^{11, 12, 13} Felel a Th1/Th2 egyensúly kialakításáért.¹⁴ 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.¹⁵

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.^{16,17}

PD-1 molekula

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).¹⁸ A PD-1 molekula két ismert ligandja a B7 család tagjai: PD-L1 (B7-H1) és a PD-L2 (B7-DC). A PD-L1 molekula gátolja a gyulladássos 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.^{19,20} Ezzel ellentétben a PD-L2

expressziója a makrofágokra és a dendritikus sejtekre korlátozódik.²¹ mRNS szinten kimutatható a szívben, a placentában, a tüdőben és a májban is.²²

A PD-1 receptor mindkét ligandja expresszálódik az anyai-magzati határfelületen.²³ A PD-L2 expressziója megfigyelhető az egér decidua összes rétegében, míg a PD-L1 kifejeződése a decidua basalis rétegére korlátozódik.²³

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.^{10,23}

PACAP molekula

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. Képes befolyásolni a fertilitást, az implantációt, a reprodukciós viselkedést, a spermatogenezist és a placenta funkcióját.²⁴⁻²⁶ A PACAP molekula képes késleltetni a pubertást és befolyásolni a folliculusok érését a petefészekben,²⁷ valamint irányítja a petefészek hormontermelését,²⁸ továbbá hatással van a sejtek meiotikus osztódására és fontos lokális regulátora a folliculáris fejlődésnek.²⁹

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: mifepriszon hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra

Célul tűztük ki a TIM-3/Gal-9 útvonal vizsgálatát mifepriszon 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 mifepriszon 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 decíduális 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. Módszerek

Kísérleteink során a következő módszereket alkalmaztuk:

- BALB/c, CD1 és PACAP-hiányos egerek pároztatása
- BALB/c egerek 24 órás mifepriszton (RU-486) kezelése
- Vemhes BALB/c, CD1 és PACAP-hiányos egerek decíduájának és lépének izolálása
- Mononukleáris sejtek izolálása decíduális szövetből és lépéből
- A sejtek fenotípusos jelölése áramlási citometriás méréshez
- FoxP3-at expresszáló sejtek fenotípusos jelölése
- CD107a aktivációs marker mérése
- Áramlási citometria
- Gal-9 immunhisztokémiai detektálása egér placentában
- Statisztikai analízis SPSS szoftverrel

IV. Eredmények

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

Vizsgálataink során leírtuk, hogy a Gal-9 a placenta spongiotrofoblaszt rétegében expresszálódik, mely elválasztja az anyai decíduális réteget a labirintus rétegtől.

Kutatásaink során igen magas Gal-9 expressziót mértünk a decíduális Treg-sejtek felszínén a perifériához képest. Habár a decíduában 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.

Az egér decíduában megtalálható limfocita szubpopulációk között domináltak a veleszületett immunsejtek (NK-, γ/δ T- és NKT-sejtek), ezzel szemben a CD4+ T- és CD8+ T-sejtek száma csökkent a perifériához képest.

Eredményeink szerint a decíduális limfociták PD-1 expressziója a perifériához képest nőtt az összes vizsgált szubpopulációban. A decíduális PD-1+ NK-, γ/δ 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.

Míg a decíduális és perifériás NK- és γ/δ T-sejtek TIM-3 expressziója hasonló értéket mutatott, addig ezen sejtek relatív TIM-3 expressziója emelkedett a decíduában a perifériához viszonyítva. A decíduális TIM-3+ NK- és γ/δ 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 gátlódhatnak az effektor immunfunkciók, így a CD107a expresszió csökkenésével járó citotoxicitás is.

A decíduális 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.

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

Mifeprisztin hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben

Jelen kísérleti eredményeink kimutatták, hogy vemhes egerekben a perifériás NK-, NKT- és γ/δ 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 mifeprisztin kezelés következtében pedig szinte teljesen eltűnt a Gal-9 expresszió a placenta junkcionális zónájában. A mifeprisztin 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.

Kutatásaink arra utalnak, hogy még a kis dózisu 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. Ezen folyamatok gátolhatják a Th1- és Th17-sejtek gyulladásoos citokin termelését a TIM-3/Gal-9 útvonalon keresztül³⁰ és így védik a placenta működését.

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 deciduális NKT-sejtek fokozott CD107a expressziót mutattak a perifériához képest. A mifepriszton kezelés minden vizsgált deciduális immunsejt esetében fokozta a TIM-3 expressziót a kezeletlen egerekhez viszonyítva, azonban csak a deciduális CD4+ T-sejtek esetében voltak az eltérések szignifikánsak.

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

Mind a PACAP-hiányos, mind a vad típusú egereknél szignifikánsan emelkedtek a deciduális γ/δ T-, NK- és NKT-sejtszámok, miközben a deciduális 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 deciduához képest. A PACAP-hiányos egerek esetében szignifikánsan nőtt a perifériás CD4+ T-sejtek száma, valamint a deciduális γ/δ T-sejtek frekvenciája is emelkedést mutatott a vad típushoz viszonyítva.

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 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 decíduájában a vad típusú egerek decíduájához képest.

A decíduális 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 γ/δ T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan csökkent a PACAP-hiányos egerek decíduájában a perifériához képest. Érdekes megfigyelés, hogy a perifériás γ/δ 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.

Az egyedüli PACAP-specifikus változást a perifériás γ/δ T-sejteknél tapasztaltuk, ahol a CD107a expresszió szignifikáns emelkedést mutatott a PACAP-hiányos egerekben a vad típusúhoz képest. Nem mértünk szignifikáns különbséget a fetomaternalis határon vizsgált többi sejtcsoport 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. Továbbá a PACAP-hiányos egerek decíduális Gal-9+ Th-sejtjeinek száma szignifikánsan emelkedett a vad típusúhoz képest.

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

V. Tézisek

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 deciduális Treg-sejtek magasabb Gal-9 expressziót mutatnak a periférián lévő társaikhoz képest.
3. Habár a deciduában csökkent a CD4+ Th-sejtek aránya, a Gal-9 termelő szubpopuláció (Gal-9+ Th-sejt) a perifériához hasonlóan változatlan szinten van jelen.
4. A deciduális NK, NKT és γ/δ T-sejtek PD-1 expressziója a perifériához képest nőtt. A vizsgált deciduális PD-1 pozitív NK- és NKT-sejtek citotoxicitása csökkent a perifériához képest.
5. Míg a deciduális és perifériás NK- és γ/δ T-sejtek TIM-3 expressziója hasonló értéket mutatott, addig ezen sejtek relatív TIM-3 expressziója emelkedett a deciduában a perifériához viszonyítva. Továbbá a deciduális TIM-3 pozitív NK- és γ/δ T-sejtek citotoxikus aktivitása kisebb, mint a perifériás sejteké. A deciduális NKT-sejtek TIM-3 expressziója kisebb, mint a periférián, viszont magas az egy sejtre vonatkoztatott relatív TIM-3 receptor expressziójuk. Lokálisan a deciduában ugyan emelkedett citotoxicitásuk, viszont ez nem bizonyult szignifikánsnak a perifériához viszonyítva.
6. A PD-1 és TIM-3 kettős pozitív NKT- és γ/δ T-sejtek száma csökkent a deciduában a perifériához képest.
7. 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 sejtípustól függően változik, utalva arra, hogy a TIM-3 szerepe eltérő lehet különböző limfocita szubpopulációkon.

Mifeprisztin hatásának vizsgálata a TIM-3/Gal-9 útvonalra vemhes BALB/c egerekben

1. A kis dózisu (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 decíduális 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 decíduájában a perifériához és a kezeletlen egerek decíduájához képest.
4. Mifeprisztin kezelés következtében a decíduális NK- és CD4+ T-sejtek szignifikánsan több TIM-3 molekulát expresszálnak a felszínükön, mint a perifériás társaik.
5. A TIM-3 pozitív decíduális NK-sejtek csökkent citotoxicitási aktivitással rendelkeznek, míg a decíduális NKT-sejtek fokozott CD107a expressziót mutattak a perifériához képest.
6. A mifeprisztin kezelés minden vizsgált decíduális immunsejt esetében fokozta a TIM-3 expressziót a kezeletlen egerekhez viszonyítva, azonban csak a decíduális CD4+ T-sejt esetében voltak az eltérések szignifikánsak.

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 decíduális γ/δ T-, NK-, NKT-sejtek aránya, miközben a decíduális 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 decíduális γ/δ T-sejtek frekvenciája is emelkedést mutatott a vad típushoz 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 γ/δ T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan csökkent a PACAP-hiányos egerek deciduájában a perifériához képest.
7. A perifériás γ/δ T-sejtek TIM-3 expressziója szignifikánsan emelkedett a PACAP-hiányos egerekben a vad típus 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 γ/δ 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.

VI. 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 Alíznek 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.

VII. 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. Carp, H. J. A. & Selmi, C. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J. Autoimmun.* **38**, J266–J274 (2012).
3. Bonney, E. A. & Brown, S. A. To drive or be driven: The path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction* **147**, (2014).
4. Pantham, P., Abrahams, V. M. & Chamley, L. W. The role of anti-phospholipid antibodies in autoimmune reproductive failure. *Reproduction* **151**, R79–R90 (2016).
5. Bonney, E. A. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **43**, 679–698 (2016).
6. Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science (80-.)*. **348**, 56–61 (2015).
7. 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).
8. Williams, M. A. & Bevan, M. J. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 171–192 (2007).
9. 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).
10. Miko, E., Meggyes, M., Doba, K., Barakonyi, A. & Szereday, L. Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
11. Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 1245–1252 (2005).
12. 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).

13. 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).
14. 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).
15. 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).
16. 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).
17. Chabtini, L. *et al.* TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance. *J. Immunol.* **190**, 88–96 (2013).
18. 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).
19. Petroff, M. G. *et al.* B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. *Biol. Reprod.* **68**, 1496–504 (2003).
20. 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
21. Lewkowich, I. P. *et al.* PD-L2 modulates asthma severity by directly decreasing dendritic cell IL-12 production. *Mucosal Immunol.* **6**, 728–39 (2013).
22. 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).
23. Guleria, I. *et al.* A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J. Exp. Med.* **202**, 231–7 (2005).
24. 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).

25. Brubel, R. *et al.* Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide on Human Sperm Motility. *J. Mol. Neurosci.* **48**, 623–630 (2012).
26. Reglodi, D. *et al.* Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient Mice. *Reproduction* **155**, 129–139 (2018).
27. 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).
28. 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
29. 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
30. 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).

VIII. Publikációk

A tézishez kapcsolódó tudományos közlemények

Lajkó A., Meggyes M., Fülöp BD., Gede N., Reglódi 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., Reglódi 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⁺/V α 7.2⁺/CD161⁺⁺ T (MAIT) and CD8⁺/V α 7.2⁺/CD161^{lo} 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. Tavaszi 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 egérmodellben. 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. 46th 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