

A $\gamma\delta$ T SEJTEK FUNKCIÓJA ÉS RECEPTOR MINTÁZATA
EGÉSZSÉGES HUMÁN TERHESSÉG SORÁN

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Nörenberg Jasper Maximilian

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ELMÉLETI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA



Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Reglódi Dóra, PhD, habil.,
DSc
Programvezető: Dr. Mikó Éva, PhD, habil.
Témavezető: Dr. Barakonyi Alíz, PhD, habil.

Pécs 2024

1 Bevezetés

A 20. század közepén Medawar fedezte fel a hasonlóságot a beágyazódott embrió és egy allograft transzplantátum között. Az ún. szemiallogén magzat fogalmát vetette fel és azt feltételezte, hogy a túléléshez az utódnak rejtve kell maradnia az anyai immunrendszer elől. Azóta a kutatások rávilágítottak, hogy folyamatos immunológiai kommunikáció szükséges anya és magzata között a terhesség során.

A korábbi hipotézissel ellentétben tehát az anyai immunrendszer képes felismerni az embriót és szemben a szervátültetésekkel, kifejezetten előnyös, ha a magzat HLA fenotípusa különbözik az anyáétól. Terhesség során a méhlepény egyfajta pufferzónaként működik, amely a legtöbb helyen megakadályozza a magzati antigének és az anyai sejtek közvetlen érintkezését. Vannak azonban fetomaternalis érintkezési felületek, ahol a kialakuló anyai immunreakciók támogatják többek között az implantációt, később biztosítják a szükséges toleranciát, védelmet nyújtanak a kórokozókkal szemben, ill. hozzájárulnak a szülés beindulásához.

Fontos megjegyezni, hogy azok az embrionális vagy magzati sejtek, amelyek HLA I és II osztályú molekulákat expresszálnak, nem érintkeznek közvetlenül az anyai szövetekkel. Kivételt képez ez alól a HLA-C, ami az egyetlen magzati, a fetomaternalis érintkezési felületen is detektálható klasszikus HLA molekula. A klasszikus HLA I osztályú antigének, nevezetesen a HLA-A, HLA-B és HLA-C, kulcsfontosságú szerepet játszanak az immunrendszer azon

képességében, hogy az megkülönböztethesse a saját molekulákat az idegenektől. Mielőtt azonban a blastocysta beágyazódna a decíduába, egy trophoblastnak nevezett külső réteget képez, melynek sejtjei a HLA-C molekulán kívül, non-polymorph, úgynevezett nem-klasszikus HLA antigéneket fejeznek ki. A trophoblast ezen egyedi jellemzője kulcsfontosságú az immunválasz szempontjából a terhesség alatt.

A mai elképzelés szerint a nem-klasszikus HLA antigének expressziója megvédi a trophoblastot az anyai immunrendszerrel szemben. Idővel arra is fény derült, hogy a magzati sejteken kifejeződő apai HLA-C molekula felismerése támogatja az effektor immunsejtek toborzását és aktivációját, amelyek elősegíthetik a placentációhoz szükséges szöveti transzformációt.

A terhesség egy olyan dinamikus változó időszak, amikor elengedhetetlen az immunreakciók pontos összehangolása. Míg a várandósság korai szakaszában a veleszületett immunsejtek fordulnak elő a legnagyobb arányban a decíduában, a terminushoz közeledve az adaptív immunsejtek válnak dominánssá. A $\gamma\delta T$ sejtek, amelyek mind veleszületett, mind adaptív immunfunkciókat képesek ellátni, ideális közvetítők az átmenet során. Jól ismert a szervezet barrier integritásának felügyeletében betöltött központi szerepük is. Korábbi tanulmányok alapján a deciduális $CD3^+$ sejtek között magasabb a $\gamma\delta T$ sejtek aránya (10% - 30%) a perifériás vérrel összehasonlítva, ahol mindössze 1 - 10%.

A perifériás vérben keringő $\gamma\delta T$ sejtek túlnyomórészt $V\delta 2^+$ sejtek, amelyek a placenta intervillózus terében kapcsolatba

kerülhetnek a syncytiotrophoblasttal (ST). Mivel azonban az ST egyáltalán nem expresszál MHC molekulákat, a $\gamma\delta$ T sejtek és a magzati szövetek között nem tud létrejönni a klasszikus MHC - TCR kapcsolódás által mediált kölcsönhatás. A $\gamma\delta$ T sejtek azonban képesek egyéb mechanizmusok révén, MHC-restrikció nélkül is antigéneket felismerni és ezáltal akár a trophoblast sejtekkel is kommunikálni.

Mind a villosus, mind az extravillosus trophoblast (EVT) kifejezi a CD1d molekulát, amely elméletileg lehetővé teszi a $\gamma\delta$ TCR-n keresztüli antigénfelismerést. A $\gamma\delta$ T sejtek és a fetomaternalis határfelület mikro környezetében jelenlévő további sejtek közötti kommunikációt azonban úgy tűnik más szignálok határozzák meg. Korábban nem vizsgálták azokat a fontos decíduális $\gamma\delta$ T sejt receptorokat, amelyek az EVT egyedi HLA-profilját ismerik fel (pl. KIR, NKG2A/C vagy LILR). Az ilyen kulcsfontosságú receptorok expressziós mintázatának megismerése betekintést nyújthat a decíduális $\gamma\delta$ T sejtek, az EVT és további immunsejtek eddig nem ismert kölcsönhatásaiba.

2 Célkitűzések

A várandósság során zajló alapvető immunregulációs folyamatok részletei a mai napig kutatások tárgyát képezik. A vizsgálataink során a célunk az volt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a $\gamma\delta T$ sejtek immunmodulációban betöltött szerepébe egészséges várandósság során.

A tanulmányunk két fázisra osztható:

- I. *A perifériás vér $\gamma\delta T$ sejtjeinek vizsgálata egészséges terhesség 1., 2. és 3. trimesztere során:*
 - a. A perifériás vér $\gamma\delta T$ sejtjeinek citotoxikus potenciáljának meghatározása
 - b. A $CD56^+$ fenotípus és a mért citotoxikus potenciál közötti korreláció elemzése
- II. *A deciduális $\gamma\delta T$ sejtek vizsgálata egészséges humán terhesség 1. trimeszterében:*
 - a. A trophoblast egyedi HLA mintázatának felismerési képességére irányuló vizsgálatok
 - b. A deciduális $\gamma\delta T$ sejtek lehetséges funkcióinak vizsgálata (kórokozók eliminációja, implantáció támogatása)

3 Módszerek

A perifériás vérből és a decíduális mintákból mononukleáris sejteket izoláltunk (PBMC és DMC). A sejteket a későbbi áramlási citometriai mérésekhez fagyasztva tároltuk, vagy izolálást követően sejttenyésztésen alapuló ko-inkubációs kísérletekhez használtuk fel.

A **vizsgálatunk első fázisában** nem terhes nők ill. 1., 2. vagy 3. trimeszterbeli egészséges terhes nők perifériás vérből szeparált PBMC-t áramlási citometria segítségével vizsgáltuk az alábbi markerek felhasználásával: $\gamma\delta$ -TCR, CD3, CD4, CD8, CD56, PD-1, CD107a.

A **vizsgálat második fázisában** 1. trimeszterbeli, tervezett művi abortuszon átesett egészséges terhes nők perifériás vérmintáit, illetve decíduális szövetmintáit dolgoztuk fel. Az elvégzett áramlási citometriai mérések során PBMC és DMC jelöléseket végeztünk az alábbi markerek felhasználásával: Perforin, V δ 2, TCR $\gamma\delta$, NKG2C, CD56, V δ 1, CD69, NKG2A, CD45, ILT2, KIR2DL4.

A második fázis sejtkultúras kísérleteihez a $\gamma\delta$ T sejteket „érintetlen” formában izoláltuk. Három humán choriocarcinoma sejtvonalat (JAR) használtunk modellünkben: egy standard JAR (HLA Γ) és két transzfektált JAR sejtvonalat: JARE (HLA-E⁺) és JARG_{1m} (HLA-G⁺). A frissen izolált $\gamma\delta$ T sejteket a sejtvonalakkal ill. szolubilis HLA-E, vagy HLA-G molekulákkal inkubáltuk egy éjszakán át. A felülúszót leszívtuk és áramlási citometriai bead-assay segítségével megmértük az alábbi citokinek szintjét: IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF- α , sFas, sFasL, IFN- γ , granulysin, granzyme A, granzyme B, perforin, angiopoietin-2,

BMP-9, EGF, endoglin, endothelin-1, FGF-1, FGF-2, follistatin, G-CSF, HB-EGF, HGF, IL-8, leptin, PLGF, VEGF-A, VEGF-C és VEGF-D.

4 Eredmények

4.1 Első fázis

4.1.1 A perifériás $\gamma\delta$ T sejtek egy kis alcsoportja CD56 pozitivitást mutat

A CD3⁺ limfociták között detektáltunk egy kisebb, $\gamma\delta$ TCR és CD56 kettős pozitív alpopulációt. Megvizsgáltuk a CD56⁺ sejtek arányát a $\gamma\delta$ T sejtek között és eredményeink alapján a $\gamma\delta$ T sejtek igen alacsony hányada mutat CD56 pozitivitást nemterhes nők ill. 1. trimeszterbeli egészséges terhes nők perifériás vérében. Ezzel szemben, míg a non- $\gamma\delta$ T sejteken belül szignifikánsan csökkent a CD56⁺ sejtek aránya a 2. és 3. trimeszterben, a $\gamma\delta$ T sejteken belül a CD56 receptort is kifejező sejtek aránya szignifikáns emelkedést mutatott a 2. trimeszterben, amit kismértékű csökkenés követett a 3. trimeszterben.

4.1.2 A CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek túlnyomórészt CD4⁻/CD8⁻ fenotípusúak

Annak megállapítása érdekében, hogy a CD56 expresszió hatással van-e a $\gamma\delta$ T sejtek funkciójára, elemeztük a CD56⁺ és a CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejtek CD4 és CD8 expresszióját. Itt szignifikáns különbségeket találtunk a kettős negatív (CD4⁻/CD8⁻) és a CD4⁺ sejtek előfordulásában a két vizsgált alcsoport között minden vizsgált csoportban (nem terhes csoport ill. a terhesség mindhárom trimeszterében), ahol a CD4⁻/CD8⁻ fenotípus gyakoribb volt a CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek esetében, míg a CD4⁺ sejtek aránya a CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejtek között mutatkozott magasabbnak.

A CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek között a CD4⁺ sejtek előfordulása szignifikánsan magasabb volt az 1. és a 3. trimeszterben a 2. trimeszterhez, illetve a nem terhes kontroll csoporthoz képest. A CD8⁺ sejtek aránya magasabb volt a CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtekben a CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejtekhez képest a nem terhes mintákban, valamint az 1. és a 2. trimeszterben a terhesség során. Továbbá, mindkét $\gamma\delta$ T sejt alcsoportban alacsonyabb volt a CD8⁺ sejtek aránya az 1. trimeszterben a nem terhes kontrollhoz képest.

4.1.3 A CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek erős citotoxikus potenciállal rendelkeznek

A $\gamma\delta$ T sejtek citotoxikus potenciálját a CD107a molekula aktivációt követő sejt felszíni expressziójának detektálásával határoztuk meg. Habár a CD107a⁺ sejtek aránya magasabb volt a CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtekben, mint a CD56⁻ alcsoportban minden vizsgált populációban, ez az arány nem változott jelentősen a terhesség során. Ezzel szemben a CD107a⁺ sejtek aránya szignifikáns emelkedést mutatott terhességben a CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejt alcsoporton belül, a nem terhes kontrollcsoporthoz képest.

A citotoxikus potenciál pontosabb értékelése érdekében a CD107a expresszió átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) is meghatároztuk a CD107a⁺ sejteken. A CD107a expresszió mértéke minden vizsgálati csoportban magasabb volt a CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek esetében a CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejtekhez képest. A CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtekben a CD107a-MFI értéke csökkent terhesség során, a nem terhes kontrollhoz képest. A terhesség során a legalacsonyabb CD107a-MFI-t az 1. trimeszterben mértünk; ezt követően fokozatos emelkedés volt megfigyelhető a 3. trimeszterig. A

CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejtek alacsony CD107a expressziós intenzitása nem változott terhesség során.

4.1.4 A PD-1⁺ sejtek aránya magasabb a CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejt alpopulációban

A következő lépésben a PD-1, egy inhibitoros „immune checkpoint” molekula expressziójának mértékét határoztuk meg a CD56⁺ és a CD56⁻ $\gamma\delta$ T sejt alpopulációkon. A PD-1 molekula ugyanis potenciális regulátora lehet a cytotoxikus funkciónak. Vizsgálataink során a PD1⁺ sejtek előfordulási gyakorisága lényegesen magasabb volt a CD56⁺ $\gamma\delta$ T alcsoporton belül az összes vizsgált csoportban. A CD56⁺ $\gamma\delta$ T alcsoportban a PD-1⁺ sejtek előfordulási gyakorisága az első trimeszterben megemelkedett, majd a 2. és 3. trimeszterben visszaesett a nem terhes szintre. A CD56⁻ $\gamma\delta$ T alcsoporton belül a PD-1⁺ sejtek előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az 1. és 2. trimeszterben a nem terhes kontroll csoporthoz viszonyítva. A PD-1 expressziós intenzitásában (MFI) nem észleltünk szignifikáns különbségeket.

4.1.5 A PD-1 és a CD107a ko-expressziója a $\gamma\delta$ T sejteken a CD56 expresszióval korrelál

A PD-1 molekulának a cytotoxikus $\gamma\delta$ T sejtekre gyakorolt potenciális gátló hatásának jobb megértése érdekében megvizsgáltuk a PD-1 expresszióját a két cytotoxikus CD107a⁺ $\gamma\delta$ T alcsoporton belül (CD56⁺/CD107a⁺ és CD56⁻/CD107a⁺). Itt a CD56⁻ $\gamma\delta$ T alcsoporttal összehasonlítva, a cytotoxikus CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek szignifikánsan magasabb hányada expresszálta a PD-

1-et a nem terhes csoportban és a 3. trimeszterben, míg az 1. trimeszterben ellentétes eredményt kaptunk. A PD-1⁺ sejtek prevalenciája a citotoxikus CD56⁺ γ δ T alcsoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a terhesség során, mint a nem terhes kontrollokban. Azonban terhesség során nem változott a PD-1⁺ sejtek aránya a citotoxikus CD56⁺ γ δ T alcsoporton belül. Érdekes módon és ellentétben a citotoxikus CD56⁺ γ δ T alcsoporttal, a citotoxikus CD56⁻ γ δ T alcsoportban szignifikáns növekedést mutatott a PD-1⁺ sejtek aránya az 1. trimeszterben.

Végül annak megállapítása érdekében, hogy a PD-1 expresszió összefügg-e a citotoxikus potenciál intenzitásával a PD-1⁺ ill. PD-1⁻ CD56⁺/CD107a⁺ és CD56⁻/CD107a⁺ γ δ T sejteken meghatároztuk a CD107a-MFI értékeket. A CD56⁺/CD107a⁺/PD-1⁺ γ δ T sejtek CD107a-MFI értéke magasabb volt az összes vizsgálati populációban a CD56⁺/CD107a⁺/PD-1⁻ populációhoz képest. Ugyanez a korreláció mutatkozott a CD56⁻/CD107a⁺/PD-1⁺ és a CD56⁻/CD107a⁺/PD-1⁻ γ δ T sejtek között is. Emellett a CD56⁻/CD107a⁺/PD-1⁺ alcsoporton belül a CD107a-MFI értéke a 1. trimeszterben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az összes többi populációban.

4.2 Második fázis

4.2.1 A perifériás és deciduális γ δ T sejtek heterogenitása kora terhességben

A deciduális és perifériás γ δ T sejtek jellemzésére és összehasonlítására a FlowJo™ downsampling pluginját használtuk, aminek segítségével az előzetesen kapuzott periférás

vagy decíduális $\gamma\delta$ T sejtek populációit egyesítettük. A tSNE algoritmus a decíduális ill. a perifériás $\gamma\delta$ T sejtek esetében minimális átfedést mutató különálló klasztereket eredményezett.

Az NK-sejtek és $\gamma\delta$ T sejtek biológiai hasonlósága miatt megvizsgáltuk a $\gamma\delta$ T sejtek CD56 expresszióját. Míg a perifériás $\gamma\delta$ T sejt klaszterekben csak CD56^{dim} expresszió volt észlelhető, a decíduális $\gamma\delta$ T klaszterekben mind a CD56^{dim}, mind a CD56^{bright} fenotípus megjelent. Mindemellett a CD56⁺ $\gamma\delta$ T sejtek nagyobb arányban fordultak elő a decíduában, mint a periférián.

A klasszikus $\gamma\delta$ T sejt alpopulációkat különböző fenotípussal jellemezhetjük. A V δ 1⁺ (CD45⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺V δ 1⁺V δ 2⁻) sejtek gyakoribbak voltak a decíduában, míg a V δ 2⁺ (CD45⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺V δ 1⁻V δ 2⁺) sejtek a perifériás $\gamma\delta$ T sejtek között mutattak halmazódást. Meglepő módon azonban a kettős-negatív (double negative: DN, CD45⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺V δ 1⁻V δ 2⁻) $\gamma\delta$ T sejtek voltak a leggyakoribbak mind a decíduában, mind a perifériás vérben.

4.2.2 A decíduális $\gamma\delta$ T sejt alcsoportok HLA-E vagy HLA-G molekulákat felismerő receptorokat expresszálnak

Két áramlási citometriai panel segítségével vizsgáltuk az HLA-E, illetve HLA-G molekulákat felismerő receptorok (NKG2C, NKG2A és ILT2, KIR2DL4) előfordulását és expresszióját a $\gamma\delta$ T sejt populációkon a decíduában és a perifériás vérben. Az expresszió intenzitásának becslése érdekében meghatároztuk az összes vizsgált receptor expressziójának MFI értékét (a megfelelő FMO-ra normalizálva). Míg a decíduális DN $\gamma\delta$ T sejtek viszonylag magas expressziós szinteket mutattak az

összes vizsgált receptorra, a decíduális V δ 1⁺ sejtek az aktiváló NKG2C és az inhibitoros ILT2 receptorok esetében mutattak magasabb expressziós szinteket. Ezzel szemben a decíduális V δ 2⁺ sejtek szignifikánsan több NKG2A-t expresszáltak a sejt felszínükön.

Az NKG2C⁺ sejtek előfordulása általában magasabb volt a decíduális $\gamma\delta$ T sejtek között. Azonban ez a különbség csak a V δ 2⁺ és DN alcsoportokban érte el a szignifikancia szintjét. Továbbá az NKG2C pozitivitás gyakoribb volt a V δ 1⁺ alcsoportban, mint a V δ 2⁺ alcsoportban. Hasonlóan, az NKG2C inhibitoros ellenpárját, az NKG2A-t expresszáló sejtek gyakoribbak voltak a decíduában. Míg az NKG2A⁺ V δ 2⁺ sejtek aránya nem különbözött a decíduális minta és a perifériás vér között, a DN $\gamma\delta$ T sejtek jelentősen magasabb arányban expresszálták az NKG2A-t és az NKG2C-t a decíduában.

Az inhibitoros HLA-G-t kötő ILT2-t mindhárom $\gamma\delta$ T sejt csoport hasonló mértékben expresszálta a decíduális és a perifériás mintákban, habár az ILT2⁺ sejtek kevésbé voltak gyakoriak a V δ 2⁺ alcsoportokban és a decíduális DN $\gamma\delta$ T sejtek kevesebb ILT2-t expresszáltak, mint a perifériás vérben található társaik. A HLA-G-t kötő KIR2DL4 receptor tekintetében a $\gamma\delta$ T sejtek többség pozitívnak bizonyult.

4.2.3 A decíduális $\gamma\delta$ T sejtek trophoblastotrop citokineket termelnek

Vizsgálni kívántuk, hogy mennyiben befolyásolhatja a $\gamma\delta$ T sejtek funkcióját a HLA-E ill. a HLA-G felismerése, ezért mágnes gyöngyök segítségével, negatív szelekció alkalmazásával

szeparált, tisztított $\gamma\delta T$ sejteket kezeltünk szolubilis HLA-E-vel vagy HLA-G-vel (sHLA-E/sHLA-G). További kísérleteinkben pedig olyan humán choriocarcinoma sejt vonalakat (JAR) alkalmaztunk, amelyek transzfekciót követően csak HLA-E-t vagy csak HLA-G-t fejeznek ki, hogy a sejtfelszíni, membrán-kötött HLA-E vagy HLA-G (mHLA-E/mHLA-G) által kiváltott komplexebb $\gamma\delta T$ sejt - HLA interakciókat is vizsgálni tudjuk.

A vaszkuláris transzformáció, amely a trophoblast és a helyi immunkörnyezet interakciójának következtében indul be kulcsfontosságú az egészséges placentáció során. Ezért a fent bemutatott ko-inkubációs kísérletek során gyűjtött felülúszó folyadékok angiogenetikus és növekedési faktor tartalmát is vizsgáltuk. A perifériás és a deciduális $\gamma\delta T$ sejtek HLA molekulák jelenléte nélküli inkubációja jelentősen magasabb granulocita kolónia stimuláló faktor (G-CSF) termelést eredményezett a deciduális $\gamma\delta T$ sejtek esetében, mint a perifériás $\gamma\delta T$ sejtek jelenlétében. Továbbá, a deciduális $\gamma\delta T$ sejtek fibroblaszt növekedési faktor (FGF)-2-t is termeltek, míg a perifériás $\gamma\delta T$ sejtek kísérleteiben nem mértünk FGF-2-t. Másrészt, a perifériás $\gamma\delta T$ sejtek kis mennyiségű epidermális növekedési faktort (EGF) termeltek, ami azonban nem volt kimutatható a deciduális mintákban. Habár a legtöbb citokin termelését nem befolyásolta a HLA-E vagy a HLA-G molekula jelenléte vagy hiánya, az mHLA-G-vel inkubált $\gamma\delta T$ sejtek, eredetüktől függetlenül, fokozott mértékben termeltek leptint. Emellett emelkedett follistatin koncentrációt észleltünk a perifériás $\gamma\delta T$ sejtek mHLA-E-vel való inkubációját követően.

4.2.4 A decíduális $\gamma\delta$ T sejtek citotoxikus mediátorokat termelnek

A $\gamma\delta$ T sejtek az első válaszadók a nyálkahártya patogénekkal szembeni védelmében és a test számos barrierfunkciót ellátó határfelületén jelen vannak. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a decíduális $\gamma\delta$ T sejt alcsoportok intracelluláris perforin expresszióját is, mely vizsgálat eredménye a sejtek citotoxikus potenciáljára enged következtetni.

A HLA-E-vel vagy HLA-G-vel való interakció során az NKG2C, NKG2A, ILT2 és KIR2DL4 receptorok potenciális regulátorai lehetnek az immunsejtek citotoxikus válaszában. Az NK receptorokat kifejező decíduális $\gamma\delta$ T sejtek intracelluláris perforin tartalmának analízise azt mutatta, hogy az NKG2C és az ILT2 expresszió jelentősen magasabb perforin szintekkel társult minden decíduális $\gamma\delta$ T sejt alcsoportban. Az NKG2A expresszió azonban csak a V δ 1+ és a DN $\gamma\delta$ T alcsoportban korrelált magasabb intracelluláris perforin szintekkel. A KIR2DL4 expresszió és a perforin tartalom között csak a DN $\gamma\delta$ T sejt alcsoportban volt kimutatható pozitív korreláció.

Végül megvizsgáltuk, hogy a HLA I molekulákat felismerő NK sejt receptor mintázatnak van-e hatása a cytotoxicitásra, sHLA-E/sHLA-G ill. mHLA-E/mHLA-G expozíció után elemeztük az NK sejtekre jellemző citokinek és cytotoxicitáshoz kapcsolódó szolubilis molekulák termelődésének mértékét. A perforin koncentráció nem változott a HLA molekulákkal való interakciót követően. A decíduális $\gamma\delta$ T sejtek viszont jelentős mennyiségben termeltek granulysin és interferon- γ (IFN- γ)-t.

5 Tézisek

1. A NKT-szerű ($CD3^+/CD56^+$) sejtek kb. fele expresszál $\gamma\delta T$ sejt receptort.
2. A $\gamma\delta T$ sejteken belül a $CD56^+$ populáció prevalenciája emelkedik a terhesség 2. és 3. trimeszterében.
3. A $CD56^+$ $\gamma\delta T$ sejteket túlnyomórészt $CD4^-/CD8^-$ vagy $CD8^+$ fenotípus jellemzi a terhesség alatt.
4. A perifériás $CD56^+$ $\gamma\delta T$ sejtek a $\gamma\delta T$ sejtek citotoxikus frakcióját képviselik.
5. A PD-1 molekula képes lehet a $\gamma\delta T$ sejtek citotoxicitásának szabályozására, mivel a $PD-1^+$ perifériás $\gamma\delta T$ sejtek prevalenciája megnő az első trimeszterben. Ez a tendencia dominánsabb az erősebb citotoxicitással rendelkező $CD56^+$ $\gamma\delta T$ sejtek esetében.
6. Érdekes módon azonban a teljes perifériás $\gamma\delta T$ sejt populáció esetében a citotoxikus potenciál és a PD-1 expresszió már nem korrelál.
7. $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$ és DN $\gamma\delta T$ sejtek jelen vannak a decíduában koraterhességben. A korábbi flow citometriás tanulmányok eddig nem írták le a legnagyobb DN $\gamma\delta T$ sejt populációt.
8. Mindhárom deciduális $\gamma\delta T$ sejt alcsoport kifejez HLA-E, illetve HLA-G molekulát felismerő NK sejt receptorokat.
9. A deciduális $\gamma\delta T$ sejtek HLA-E és HLA-G jelenlététől függetlenül termelnek G-CSF-et és FGF-2-t.
10. Az mHLA-G jelenlétének hatására a $\gamma\delta T$ sejtek nagyobb mértékben termelnek leptint.

6 Következtetések

Kutatási eredményeink segítenek megérteni a $\gamma\delta$ T sejtek fetomaternalis határfelületeken játszott immunregulációs szerepét humán terhességben. Vizsgálatunk első fázisában egészséges terhesség mindhárom trimeszterében, a perifériás vérből izolálható $CD56^+$ $\gamma\delta$ T sejt populációt vizsgálva jellemeztük a sejtcsoport $CD4/CD8$ fenotípusát, cytotoxikus karakterét és feltártunk egy potenciális szabályozási lehetőséget, mely a PD-1 receptor és annak a syncytiotrophoblaston kifejeződő ligandjával (PD-L1/PD-L2) történő interakciót követően valósulhat meg. Habár a PD-1 expresszió a $\gamma\delta$ T sejteken változatos a terhesség során, eredményeink azt mutatják, hogy a $\gamma\delta$ T sejteken belül a $CD56^+$ $\gamma\delta$ T sejtek citotoxicitását a receptor képes kontrollálni.

Koraterhességben a $\gamma\delta$ T sejtek különböző funkciókat töltenek be és számos receptor-interakcióra képesek a deciduában, ahol 3 fő $\gamma\delta$ T sejt alcsoportot azonosítottunk: a $V\delta1^+$, $V\delta2^+$ és DN $\gamma\delta$ T sejteket. A $V\delta1^-/V\delta2^-$ fenotípussal jellemezhető DN $\gamma\delta$ T sejtek feltételezhetően a $V\delta3^+$ sejtpopulációt reprezentálják. Eredményeink azt mutatják, hogy a deciduális $\gamma\delta$ T sejtek különböző NK receptorokat expresszálnak. Ezen receptorok segítségével kölcsönhatásba léphetnek a trophoblaszton kifejeződő nem-klasszikus HLA molekulákkal (például a HLA-E és HLA-G), amely interakciók képesek modulálni $\gamma\delta$ T sejtek a funkcióját.

A deciduális $\gamma\delta$ T sejtek hozzájárulhatnak az angiogenikus faktorok termeléséhez, segítve ezzel a trophoblast inváziót és a

megfelelő placentális környezet kialakítását. A HLA-G expresszió korrelál a leptin szekrécióval, amely interdependens szabályozási mechanizmusok jelenlétére utalhat. Annak ellenére, hogy intracelluláris perforin expressziót detektáltunk, nem sikerült a HLA-E vagy a HLA-G molekulák közvetlen immunreguláló hatását igazolni a $\gamma\delta$ T sejteken, amely inkább hosszabb távon megvalósuló hatások lehetőségét veti fel.

Összességében a $\gamma\delta$ T sejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak az immunológiai szabályozásban és a patogénnel szembeni védelem során a terhesség különböző szakaszaiban, kölcsönhatásba lépnek a magzati szövetekkel és reagálnak a környezeti hatásokra. Ezeknek az interakcióknak további feltérképezése hozzájárulhat bizonyos terhességi komplikációk megértéséhez és segítségünkre lehet a meddőség lehetséges terápiás célpontjainak kiterjesztésében is.

7 Publikációk

7.1 Tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

Összesített impakt faktor: **44.759**

Összesített hivatkozások: **28**

H-index: **3**

A disszertációhoz kapcsolódó cikkek (7.1.1) kumulatív impakt faktora: **16.087**

7.1.1 A disszertációhoz kapcsolódó cikkek

1. **Nörenberg J**, Vida P, Bösmeier I, Forro B, Nörenberg A, Buda A, Simon D, Erdo-Bonyar S, Jakso P, Kovacs K, Miko E, Berki T, Mezosi E, Barakonyi A. Decidual $\gamma\delta$ T cells of early human pregnancy produce angiogenic and immunomodulatory proteins while also possessing cytotoxic potential. *Front. Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2024.1382424, Impact factor: 7.300, Q1
2. **Nörenberg J**, Jakso P, Barakonyi A. Gamma/Delta T Cells in the Course of Healthy Human Pregnancy: Cytotoxic Potential and the Tendency of CD8 Expression Make CD56+ $\gamma\delta$ T Cells a Unique Lymphocyte Subset. *Front. Immunol.* 2021 Feb 2;11:596489. doi: 10.3389/fimmu.2020.596489. eCollection 2020. PMID: 33603738, Impact Factor: 8.787, Q1

7.1.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó cikkek

1. Simon D, Erdo-Bonyar S, Böröcz K, Balazs N, Badawy A, Bajnok A, **Nörenberg J**, Sereny-Litvai T, Varnagy A,

Kovacs K, Hantosi E, Mezosi E, Nemeth P, Berki T. Altered Levels of Natural Autoantibodies against Heat Shock Proteins in Pregnant Women with Hashimoto's Thyroiditis *Int. J. Mol. Sci.* 2024 Jan, 25(3), 1423; doi: 10.3390/ijms25031423

Impact factor 5.600, Q1

2. Erdo-Bonyar S, Simon D, Bajnok A, **Nörenberg J**, Litvai T, Varnagy A, Kovacs K, Hantosi E, Mezosi E, Berki T. Physiological Changes in the Levels of Anti-Cytokine Autoantibodies in Early Pregnancy Are Missing in Pregnant Women with Hashimoto's Thyroiditis. *J. Immunol. Res.* 2023 Aug 25:2023:5221658. doi: 10.1155/2023/5221658. eCollection 2023. PMID: 37663050

Impact factor: 4.100, Q1

3. Bajnok A, Sereny-Litvai T, Temesfoi V, **Nörenberg J**, Herczeg R, Kaposi A, Berki T, Mezosi E. An Optimized Flow Cytometric Method to Demonstrate the Differentiation Stage-Dependent Ca²⁺ Flux Responses of Peripheral Human B Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2023 May 22;24(10):9107. doi: 10.3390/ijms24109107. PMID: 37240453

Impact Factor: 5.600, Q1

4. Sereny-Litvai T, Bajnok A, Temesfoi V, **Nörenberg J**, Pham-Dobor G, Kaposi A, Varnagy A, Kovacs K, Pentek S, Koszegi T, Mezosi E, Berki T. B cells from anti-thyroid antibody positive, infertile women show hyper-reactivity to BCR stimulation. *Front Immunol.* 2022 Oct 25:13:1039166.

doi: 10.3389/fimmu.2022.1039166. eCollection 2022.
PMID: 36389812

Impact Factor: 7.300, Q1

5. **Nörenberg J**, Meggyes M, Jakso P, Miko E, Barakonyi A. TIM-3 and TIM-1 Could Regulate Decidual gamma-delta TCR Bright T Cells during Murine Pregnancy. *J. Immunol. Res.* 2019 May 20:2019:3836942. doi: 10.1155/2019/3836942. eCollection 2019. PMID: 31236420

Impact Factor: 3.327, Q1

6. Meggyes M, Szereday L, Jakso P, Bogar B, Bogdan A, **Nörenberg J**, Miko E, Barakonyi A. Expansion of CD4 phenotype among CD160 receptor-expressing lymphocytes in murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2017 Dec;78(6). doi: 10.1111/aji.12745. Epub 2017 Sep 16. PMID: 28921767

Impact Factor: 2.745, Q1

7.2 Tudományos Konferenciákon bemutatott előadások

1. Poszter prezentáció: Nörenberg J. et al. Exploring the interactions between decidual $\gamma\delta$ T cells and non-classical HLA molecules expressed by the extravillous trophoblast. 18th International Congress of Immunology (Fokváros, Dél-Afrika, 2023)
2. Szóbeli előadás: Nörenberg J. et al. Different $\gamma\delta$ T cell population and their possible role in the maintenance of pregnancy. 16th International Medical Postgraduate Conference at Charles University (Hradec Králové, Csehország, 2019)
3. Poszter prezentáció: Nörenberg J. et al. Flow cytometric analysis of gamma-delta T cells in spleen and placenta during murine pregnancy. 34th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (Vancouver, Kanada, 2019)
4. Poszter prezentáció: Nörenberg, J. et al. Characteristics of gamma/delta T cells at the feto-maternal interface of murine pregnancy. European Congress of Immunology (Amszterdam, Hollandia, 2018)

8 Köszönetnyilvánítás

Nagyon hálás vagyok a támogatásért, amelyet kollégáimtól és szeretteimtől kaptam ezen projekt során. Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Barakonyi Alíznek, aki felbecsülhetetlen mértékű segítséget nyújtott a kutatói pályafutásom során, valamint feleségemnek, Dr. Nörenberg Annának, aki örökké bátorító és inspiráló támaszom volt az elmúlt néhány évben. Továbbá szeretném kifejezni hálámat Prof. Dr. Mezősi Emese felé is a támogatásáért és mentorálásáért.

Ez a projekt nem valósulhatott volna meg a társszerzőim hozzájárulása nélkül, akiknek munkája és konstruktív visszajelzései kulcsfontosságúak voltak a sikerhez. Ezen felül hálás vagyok azoknak a bátor nőknek, akik részt vettek a tanulmányban saját személyes kihívásaik ellenére is.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak az állandó szeretetüket, megértésüket és támogatásukat.