

**CLINICAL IMMUNOLOGICAL AND IMMUNOGENETICAL  
ASPECTS OF NEUROLOGICAL DISEASES**

**Ágnes Péterfalvi M.D.**

**PhD Theses**

**Department of Neurology  
University of Pécs, Hungary**

*Leader of project, principal investigator: Associate Prof. Zsolt Illés M.D., Ph.D.*

*Leader of program: Prof. Sámuel Komoly M.D., DSc.*

*Leader of Doctoral School: Prof. Judit Nagy M.D., DSc.*

**Pécs**

**2008**



## I. INTRODUCTION

The term *immunity* is derived from the Latin word *immunitas*, which referred to the protection from legal prosecution offered to Roman senators during their tenures in office. Today, in life sciences not only does *immunity* cover recognition and destruction of infectious agents, noninfectious foreign substances and tumor cells, but also the maintenance of healthy tissues, leaving them intact. Defense against foreign cells and substances, viruses and tumor cells is mediated by the early, rapid, non-specific reactions of innate (also called natural or native) immunity and the later, specific responses of adaptive immunity, the two functional arms of the immune system.

**Natural killer (NK)** cells are a principal component of the innate immune system, able to rapidly produce abundant cytokines, mainly interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), and lyse target cells by means of cytotoxicity. They express CD56 (cluster of differentiation) on their surface. **Perforin** (pore forming in target cell membranes leading to cell lysis) and **Fas/Fas-ligand (FasL)** (inducing apoptosis) pathways are the two major mechanisms of cellular cytotoxicity.

**T lymphocytes** are one of the major cellular components of the adaptive immune system. Specific recognition of different antigenic determinants is mediated by their **T cell receptor (TCR, CD3)**. T cell receptors comprise an essentially unlimited repertoire of variants, each variant expressed on a different cell, which can altogether recognize virtually any molecule. The TCR is a heterodimer consisting of an  $\alpha$  and a  $\beta$  transmembrane polypeptide chain, each consisting of one variable (V) domain and one constant (C) domain. The V regions of the TCR  $\alpha$  and  $\beta$  chains contain the hypervariable or complementarity-determining regions (CDRs), which specifically recognize peptide-MHC (major histocompatibility complex) complexes. In the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of the TCR, the third hypervariable regions are composed of sequences encoded by V and J (joining) gene segments (in the  $\alpha$  chain) or V, D (diversity), and J segments (in the  $\beta$  chain). T cells may be CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, killing infected cells. CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cells activate other cells of the immune system, which kill microorganisms or secrete antibodies. Immune cells secrete cytokines that mediate many functions of these cells. **T helper type 1 (Th1) or pro-inflammatory cytokines** – IFN- $\gamma$ , interleukin (IL)-12 – enhance cellular immune responses, cell-mediated cytotoxicity, and activate macrophages. **T helper type 2 (Th2) cytokines** called anti-inflammatory cytokines – IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 – generate humoral immune response, and antibody production. Recently, other pro-inflammatory cytokines, **IL-23 and IL-17** have been indicated to play an important role in the establishment of autoimmune diseases, and T cells producing IL-17 have been dubbed Th17 cells. One of the Th17 differentiation pathways is IL-23-dependent and IL-23 is necessary for the survival and expansion of Th17 cells; this effect is mediated through the IL-23 receptor (IL-23R) signaling pathway. For the full activation of T cells, besides the antigen-specific stimulation through the TCR, a second signal called co-stimulation is necessary. The termination of activation is a very important mechanism in autoimmune tolerance, protection against autoimmune diseases. This termination is mainly mediated by **CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)** expressed on the surface of T cells upon activation, which intervenes in the co-stimulatory pathway.

A small subset of T cells, called  **$\gamma\delta$ T cells** have  $\gamma\delta$ TCRs consisting of a  $\gamma$ -chain combined with a  $\delta$ -chain, composing a distinct T cell population from  $\alpha\beta$ T cells.  $\gamma\delta$ T cells are proposed to bridge the innate and adaptive immune responses, since they are able to produce great amounts of IFN- $\gamma$  in a short period of time, which is characteristic to cells of the innate immune system. The V $\delta$ 2 subset, expressing a  $\delta$ 2TCR variable chain, represents the majority of adult  $\gamma\delta$ T cells mainly with a cytotoxic property.

A small percentage of  $\alpha\beta$ T cells express molecules specific to NK cells, such as CD56 in addition to the TCR (CD3), termed **natural killer T**, *ie.* NKT cells. This population, which has been suggested to play an important role in tumor rejection, protection against autoimmunity and infectious agents, also bridges the innate and the adaptive immune responses. NKT-like cells represent a small lymphocyte subpopulation that has important immunoregulatory functions. NKT cells are categorized into several distinct subsets principally based on their consistent TCR repertoire. NKT cells expressing an invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR  $\alpha$ -chain are referred to as **invariant NKT (iNKT) cells**. Emerging data indicate the functional diversity of human iNKT cells and their involvement in tumor immunity and autoimmunity. Invariant V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 TCR expressing cells have been named **mucosal-associated invariant T (MAIT) cells** relating to their preferential location, the gut lamina propria. MAIT cells express a restricted V $\beta$ 2 and V $\beta$ 13 driven by the selecting antigen. Their anti-inflammatory role has been proposed, for the invariant V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 TCR of MAIT cells was found to be present in autoimmune lesions of both the central and peripheral nervous system, which correlated with the expression of IL-4.

Key information:

**iNKT:** invariant natural killer T cells expressing an invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR  $\alpha$ -chain, playing a substantial role in protection against tumors and autoimmunity

**MAIT:** mucosal-associated invariant T cells expressing an invariant V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 TCR

**NK cells:** natural killer cells: CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>

**T cells:** CD3<sup>+</sup>

**NKT-like cells:** natural killer T-like cells: CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>

**LAR:** leukocyte antisedimentation rate: detects activation of leukocytes

**CTLA-4:** cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4: termination of T cell activation

**IL-23R:** interleukin-23-receptor: mediates Th17 cell differentiation. Th17 cells (producing IL-17) play an important role in the establishment of autoimmune diseases

**Multiple sclerosis (MS)** is a chronic, progressive, demyelinating disease of the central nervous system, with a wide range of varying neurological symptoms. There are about 2-3 million people suffering from MS in the world, in Hungary the number of MS patients is approximately 6,000-10,000. Despite a large body of research, the exact etiology of MS remains unclear. Four different pathological subtypes of MS exist, suggesting the heterogeneous nature of MS pathogenesis. According to the current, autoimmune hypothesis, the demyelination of plaques is mediated by mainly autoimmune CD4<sup>+</sup> Th1 cells recognizing central nervous system (CNS) autoantigens due to delayed-type or type IV hypersensitivity. MS is a complex genetic disease mediated by interaction of several genes and environmental factors. It is assumed today that a tremendous number of different genes play a role in the risk of catching the disease (polygenetic inheritance).

**Stroke** – cerebrovascular accident – has a high incidence worldwide, in addition to being the third leading cause of death, many survivors of stroke have to adjust to a life with varying degrees of disability. In Hungary approximately 40,000 patients are admitted to hospital with the diagnosis of stroke and stroke mortality is extremely high in Central-Eastern European countries. While direct neurological deficits cause early deaths, infectious complications, particularly pneumonia and urinary tract infections, prevail in the postacute phase of stroke contributing to the poor outcome, which may suggest early alteration of immune responses. Recently, a loss of T cells in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke within 12 hours from onset of stroke symptoms, was revealed, which gradually normalized.

## II. AIMS OF THE STUDIES

Here, we investigated molecular bases of neurological diseases focusing mainly on molecules and mechanisms involved in regulating autoimmune tolerance *ie.* protecting against autoimmune diseases. We were particularly interested in the role of innate T cells in immune responses within the CNS and the neurogenetical background of CNS autoimmune diseases, particularly multiple sclerosis.

### A. The role of innate T cells in diseases affecting the central nervous system

In the recent years, phenotypically and functionally similar iNKT and MAIT cells have been suggested to participate in immunoregulation of autoimmunity and immune surveillance of tumors.

We have recently found that V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q iNKT cells were absent in CNS plaques of MS, while conventional T cells expressing non-invariant V $\alpha$ 24<sup>+</sup> TCR were present. It was not clear whether this selective absence of iNKT cells was related to the disease or the special immunoregulation and antigens within the CNS. Therefore, we addressed:

1. Do iNKT cells infiltrate tumors within the CNS similarly to tumors outside the CNS?
2. Can we detect other invariant T cells in tumors with a special emphasis on MAIT cells, which may possess similar functions to iNKT cells?
3. If MAIT cells are present in tumors, what is the inflammatory environment? MAIT cells have been suggested to produce Th2 cytokines, but the similarity to iNKT cells and recent murine data suggested that the MAIT subset may be functionally heterogeneous as well.
4. What is the relation of MAIT and NKT-like cells in tumors? Do MAIT cells express CD56?
5. Do CD56<sup>+</sup> MAIT cells participate in anti-tumor immune responses?

Atherosclerosis and acute ischemic stroke are accompanied by immune responses. We may suspect that early changes in immune functions may be related to post-stroke infections resulting in poor outcome and high mortality of stroke. Therefore, we examined innate T cells and NKT-like cells in the early phase of acute ischemic stroke. We also explored activation of leukocytes and its relation to post-stroke infections:

6. Are innate T cells including CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT-like cells affected by acute ischemic events?
7. What is the relation of leukocyte activation to post-stroke infections?
8. Does post-stroke leukocyte activation depend on the duration of ischemia and the extent of infarct?
9. Can we use simple bed-side tests to predict outcome and susceptibility for post-stroke infections?

### B. Association of multiple sclerosis with polymorphisms of genes involved in shaping immune responses and regulating autoimmune tolerance

CTLA-4 is an important molecule to terminate immune responses and thus to prevent autoimmunity. Data about association of MS with *CTLA4* polymorphisms are conflicting. By using a large number of patients, here we examined:

10. Are polymorphisms of the *CTLA4* gene associated with multiple sclerosis?
11. Do polymorphisms of the *CTLA4* gene influence expression of co-stimulatory molecules important in terminating or shaping immune responses?

A novel functional Th cell subpopulation (Th17) has recently been described as the main autoimmune T cell subset. One of the Th17 differentiation pathways is IL-23-dependent. IL-23 is necessary for the survival and expansion of Th17 cells mediated via the IL-23 receptor (IL-23R) signaling pathway. Association of polymorphisms of *IL23R* gene has recently been suggested in autoimmune inflammatory bowel disease. Therefore, we examined:

12. Are polymorphisms of the *IL23R* gene associated with multiple sclerosis?
13. Is *IL23R* a shared autoimmunity gene?

MS is a complex genetic disease mediated by interaction of several genes and environmental factors. In addition, regulation of gene expression is controlled through the combinatorial action of multiple transcription factors. Therefore, we performed a gene network analysis to examine complex autoimmune processes underlying the pathogenesis of MS:

14. Are there gene expression networks disregulated in multiple sclerosis?

### III. EXPERIMENTS

#### A. THE ROLE OF INNATE T CELLS IN DISEASES AFFECTING THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

##### 1. Invariant $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$ TCR is expressed in human kidney and brain tumors indicating infiltration by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells

The anti-tumor response of human iNKT cells is well established. A novel T cell subset, mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, possess similar regulatory properties to iNKT cells in autoimmune models and disease, but data about other functions of human MAIT cells are very limited, partly due to the absence of clonotypic antibodies. In addition, the selective absence of iNKT cells has previously been indicated in MS plaques in contrast to autoimmune inflammatory demyelinating lesions of the peripheral nervous system and MAIT cells. To address whether such deficiency of iNKT cells is related to the CNS environment or MS, we examined the presence of four known T cells with invariant  $\alpha$ TCRs including that of iNKT cells in tumors within and outside of the CNS. The presence of sequences of  $V\alpha 24$ - $J\alpha Q$  (iNKT),  $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$  (MAIT),  $V\alpha 4$ - $J\alpha 29$  and  $V\alpha 19$ - $J\alpha 48$  TCRs was investigated in 19 biopsy samples of human kidney cancers and brain tumors by using RT-PCR SSCP (single-strand conformation polymorphism) clonality assay, identifying the amplified and electrophoretically separated particular sequences by hybridization with specific probes.

The MAIT clonotype was identified and co-expressed with iNKT clonotype in half of the tumors. In contrast, invariant  $V\alpha 4$  and  $V\alpha 19$  T cell clonotypes were not present in tumors.  $V\beta$  expression of  $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$  MAIT cells with a restricted  $V\beta 2$  and  $V\beta 13$  TCR usage was further analyzed in tumor samples containing MAIT cells, as well as their antigen-presenting molecule, MR1 expression and pro- and anti-inflammatory cytokine environment. All kidney tumors with MAIT  $\alpha$ TCR also expressed  $V\beta 2$  and  $V\beta 13$ , in contrast to brain tumors, suggesting that MAIT cells in CNS tumors may express other  $V\beta$  chains as well. All tumors positive for MAIT invariant TCR express the antigen presenting molecule MR1, indicating that MAIT cells can be locally re-activated. Indeed, a high percentage of infiltrating T cells was  $CD8^+$  and expressed HLA-DR suggesting activation. The clonal presence of MAIT cells in tumors correlated with the expression of pro-inflammatory cytokines but no IL-4, IL-5 and IL-10, suggesting that a pro-inflammatory subset of human MAIT cells may exist. We also

examined CD56 expression of MAIT cells both in tumor samples and in the peripheral blood of tumor patients. Although the MAIT  $\alpha$ TCR was identified in both peripheral CD56<sup>+</sup> and CD56<sup>-</sup> subsets, tumor infiltrating lymphocytes were CD56 negative.

Our data imply that a CD56<sup>-</sup> subset of MAIT cells may participate in pro-inflammatory tumor immune responses similarly to iNKT cells. In addition, MAIT cells may have a pro-inflammatory T cell subset, similarly to human iNKT and murine MAIT cells. Our data also suggest that the selective absence of iNKT cells in CNS plaques of MS may be specific to the disease and not related to the CNS environment.

## **2. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke**

While direct neurological deficits cause early deaths, infectious complications prevail in the postacute phase of stroke contributing to the poor outcome. The increased susceptibility to infections after stroke may suggest early alteration of immune responses, thus immunodepression induced by stroke has been proposed. The few animal and human studies all addressed the rapid changes in the adaptive arm of the immune system, mainly T cells. We analyzed rapid changes in immunological functions of cells of the innate immunity or lymphocytes bridging the innate and the adaptive arms of the immune system, all capable of shaping subsequent immune responses through rapid production of cytokines, and/or cytotoxicity. The analyzed cell subsets were V $\delta$ 2 T cells, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> natural killer T (NKT)-like cells and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Their frequencies, cytokine production, intracellular perforin and surface Fas ligand (FasL) expression were measured in 28 patients' peripheral blood obtained within 6 hours and also after 72 hours of ischemic stroke, by flow cytometry including cytometric bead array. NK cytotoxicity was also sequentially determined applying a non-radioactive, colorimetric cytotoxicity assay. The paired samples were compared both with each other and with 20 healthy controls.

Percentages of V $\delta$ 2, NKT-like and NK cells at 6 and 72 hours after stroke were constant and similar to percentages in healthy subjects. In contrast, pro-inflammatory intracellular IFN- $\gamma$  expression by V $\delta$ 2 T cells, NKT-like cells and NK cells and IFN- $\gamma$  production by isolated NK cells in culture were low at 6 hours and reached the level of healthy subjects' by 72 hours after stroke. Anti-inflammatory IL-4, IL-5 and IL-10 production of NKT-like and NK cells was not altered. Intracellular perforin expression by V $\delta$ 2 T cells, NKT-like cells and NK cells, and NK cytotoxicity were low at 6 hours and reached the level of healthy subjects by 72 hours.

According to our results, pro-inflammatory and cytotoxic but not anti-inflammatory responses of NK, NKT-like and V $\delta$ 2 T cells become acutely deficient in ischemic stroke, which may contribute to an increased susceptibility to infections.

## **3. Deficient leukocyte antisedimentation is related to post-stroke infections and outcome**

Patients with stroke are more susceptible to infections suggesting possible deficiencies of early immune responses, particularly of leukocytes. Here, we examined whether post-ischemic activation of leukocytes is related to duration of ischemia and extent of infarct. We also addressed, if dysregulated leukocyte activation might be related to post-stroke infection and worsen outcome. We used leukocyte antisedimentation rate (LAR) to detect activation of leukocytes and correlated LAR with clinical and laboratory parameters. LAR test is performed similarly to Westergreen test, determination of leukocyte counts is also needed for calculation of LAR. An additional aim was to test simple bed-side investigations in predicting outcome and susceptibility for post-stroke infections early.

LAR, a simple test to detect activation of leukocytes was serially examined and correlated with blood level of S100 $\beta$  related to extent of infarct, procalcitonin indicating infection and outcome in patients with acute ischemic events. Venous blood samples were taken from 61 healthy volunteers and 49 patients with acute ischemic events: 38 patients with acute ischemic stroke, AIS, and 11 patients with transient ischemic attack, TIA where symptoms disappear in 24 hours and cranial CT scan does not indicate infarct. Sampling was done within 6 hours, at 24 and 72 hours after onset of symptoms. LAR was significantly higher in acute ischemic events within 6 hours after onset of stroke regardless of post-stroke infections. In addition, elevation of LAR was delayed and attenuated in TIA in contrast to AIS and we also observed a positive correlation between LAR and S100 $\beta$  at 72 hours after the onset of ischemic stroke both indicating that the extent of tissue injury correlates with the magnitude of innate immune responses. Importantly, a deficiency in early elevation of LAR was associated with post-stroke infections and a poor outcome measured by Glasgow Outcome Scale in AIS.

We conclude that an early activation of leukocytes indicated by elevation of LAR is characteristic of acute ischemic cerebrovascular events. A delayed and ameliorated leukocyte activation represented by LAR is characteristic to TIA in contrast to definitive stroke. Our data suggest that acute activation of leukocytes, which has been regarded detrimental so far, serves also to prevent post-stroke infections. Our data imply that concept about the post-ischemic role of leukocytes should be changed and dissected: recruitment of leukocytes in the CNS may be damaging but should be separated from the systemic activation, which may prevent post-stroke infections. A disregulated early immune response or deficient leukocyte activation may result in an increased susceptibility to infections in some patients with stroke.

## **B. ASSOCIATION OF MULTIPLE SCLEROSIS WITH POLYMORPHISMS OF GENES INVOLVED IN SHAPING IMMUNE RESPONSES AND REGULATING AUTOIMMUNE TOLERANCE**

### **4. Multiple sclerosis and the *CTLA4* autoimmunity polymorphism CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland**

For the full activation of T cells, besides the antigen-specific stimulation through TCR, a second signal called co-stimulation is necessary. Both APC and T cells will be activated during co-stimulation, a sequence of ligand-receptor interactions on the surface of both cells. Such interactions are required also for the termination of activation, a mechanism important in autoimmune tolerance. This termination is mainly mediated by CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) expressed on the surface of T cells upon activation.

Polymorphisms in the *CTLA4* gene region have been associated with susceptibility to autoimmune diseases. The recently described single nucleotide polymorphism CT60, located in the 3' untranslated region (3'UTR) of *CTLA4* is associated with Graves' disease, thyroiditis, autoimmune diabetes and other autoimmune diseases, however, its role in multiple sclerosis (MS) susceptibility has been controversial. Therefore, we conducted a case-control association study in a large number of German, Hungarian and Polish MS patients and regional control individuals for the *CTLA4* CT60 and +49A/G polymorphisms by using PCR methodology. We also performed haplotype analysis. Besides, we examined functional consequences *ie.* genotype differences in the expression of CTLA-4 and ICOS (inducible co-stimulatory molecule). ICOS is also important in autoimmune tolerance due to its role in Th2-mediated anti-inflammatory responses and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS is related to locus containing genes for both CTLA-4 and ICOS. Splice variants of CTLA-4 modify expression of ICOS in such models.

However, we found no significant association of these polymorphisms or respective haplotypes with MS, even when our data were extended with previously published results in a metaanalysis thus evaluating 1228 MS and 1440 controls. No association of *CT60* genotypes with T cell expression of ICOS and CTLA-4 after *in vitro* stimulation was detected. In summary, our data using a large number of cases and controls contradict to a major effect of *CTLA4* in MS susceptibility.

### **5. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis**

Besides Th1 type cytokines, other pro-inflammatory cytokines, IL-23 and IL-17 have been indicated to play an important role in the establishment of autoimmune diseases, and T cells producing IL-17 have been dubbed Th17 cells. One of the Th17 differentiation pathways is IL-23-dependent and IL-23 is necessary for the survival and expansion of Th17 cells; this effect is mediated through the IL-23 receptor (IL-23R) signaling pathway. The IL-23/IL-17 cytokine axis has been suggested to play an important role in the development of several autoimmune diseases including multiple sclerosis.

We compared the prevalence of C2370A single nucleotide polymorphism (SNP) in the 3' untranslated region (3'UTR) of the IL-23 receptor gene (*IL23R*) of 223 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) to 200 healthy controls by PCR technique. The A2370A genotype was significantly over-represented among patients with RRMS (10.8%) and RRMS exhibiting oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid (12.9%) when compared to healthy subjects (5.50%). Multiple regression analysis revealed that presence of AA genotype provides a two-fold risk for the development of multiple sclerosis (OR=2.072, 95% CI: 0.988-4.347,  $p<0.05$ ) and presence of oligoclonal bands in the CSF (OR=2.554,  $p=0.03$ ). We did not find significant differences when female patients or HLA-DRB1\*1501 positive/negative patients were separately analyzed and compared to controls. Nor did we find association in secondary progressive cases, although the sample size was small ( $n=45$ ).

Besides suggesting association with MS, these data indicate that *IL23R* represents a novel shared susceptibility gene as its association with several autoimmune diseases including inflammatory bowel disease (IBD) and psoriasis has recently been verified.

### **6. Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis**

Although several data indicated altered gene expression profile in MS using microarrays, transcriptional networks, which can regulate a number of genes, have not been examined in MS. In addition, genetic differences may also contribute to altered expression of genes. The concordance rate of monozygotic twins is approximately 30 %, while it is less than 5 % for dizygotic twins, suggesting the involvement of not a single but multiple susceptibility genes in the pathogenesis of MS. In addition, regulation of these multiple susceptibility gene expressions is controlled again through the combinatorial action of multiple transcriptional factors. Therefore, gene network analysis is necessary to evaluate the complex autoimmune processes underlying the pathogenesis of MS.

Therefore, we studied gene expression profile of purified CD3<sup>+</sup> T cells isolated from Hungarian monozygotic MS twins by DNA microarray analysis and performed gene network analysis. Three pairs were concordant, while one pair was discordant for MS. By comparing the three concordant and one discordant pairs, we identified 20 differentially expressed genes (DEG) between the MS patient and the genetically identical healthy subject. Molecular network of 20 DEG analyzed by KeyMolnet, a comprehensive information platform, indicated the close relationship with transcriptional regulation by the Ets transcription factor family and the nuclear factor NF- $\kappa$ B.



This novel bioinformatic approach proposes the logical hypothesis that aberrant regulation of the complex transcriptional regulatory network contributes to development of pathogenic T cells in MS.

## V. SUMMARY OF THESESES

1. MAIT and NKT cells are the only known invariant T cells infiltrating brain and kidney tumors.
2. Since NKT cells are present in CNS tumors, their absence in MS plaques is disease-specific and not related to the CNS environment.
3. MAIT cells may have a pro-inflammatory subset, which infiltrates tumors.
4. Brain and kidney tumors differ in infiltrating T cell and MAIT cell subsets: brain tumor infiltrating MAIT cells may express additional TCR $\beta$  to V $\beta$ 2 and V $\beta$ 13.
5. MAIT and NKT cells in tumors do not express CD56 although both CD56<sup>+</sup> and CD56<sup>-</sup> subsets are present in the peripheral blood even in patients with cancer.
6. The percentages of particular innate lymphocytes, V $\delta$ 2, NKT-like and NK cells do not change in the acute phase of ischemic stroke in contrast to the reported decrease of adaptive T cells.
7. In contrast to unaltered frequency, an acute functional deficiency of innate lymphocytes occurs in the acute phase of ischemic stroke, within 6 hours: pro-inflammatory cytokine production, expression of perforin and NK cytotoxicity are decreased, while there is no change in production of Th2 cytokines and Th2-related ICOS expression. We may hypothesize that such early deficiency or its disregulated normalization may substantially influence susceptibility to infections similarly to animal models of cerebral ischemia.
8. Activation of leukocytes represented by elevation in LAR happens within hours after onset of ischemic stroke.
9. Although LAR was elevated in TIA compared to healthy subjects, it was delayed and ameliorated compared to definitive ischemic stroke.
10. Decreased activation of leukocytes reflected by a deficient elevation of LAR may predispose to post-stroke infections and predict worse outcome.
11. Concept about uniformly harmful post-ischemic role of leukocytes should be changed and dissected: recruitment of leukocytes to the ischemic brain may be damaging by amplifying brain injury. However, systemic activation of leukocytes plays an important role in preventing post-stroke infections.
12. A positive correlation exists between LAR and S100 $\beta$  on the 3<sup>rd</sup> post-stroke day indicating a relationship between extent of infarct and innate immune responses.
13. There is no significant effect – if at all – of the *CT60*\*G allele on susceptibility to MS compared to other autoimmune diseases. No genotype-dependent expression differences in CTLA-4 and ICOS by T cells were found. Taken together, our data, together with previously published studies, suggest lack of association of this common autoimmune gene with multiple sclerosis.
14. A genetic association exists between RRMS and the C2370A polymorphism (AA) of the *IL23R* gene: the susceptible genotype provides a two-fold risk for developing MS.
15. *IL23R* may represent a novel shared autoimmunity gene.
16. Aberrant regulation of the complex transcriptional regulatory network contributes to the development of pathogenic T cells in MS.

## V. ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful first of all to my tutor **Zsolt Illés** for leading me through the wonders and obstacles of all the research work whose results are here laid down, for teaching, explaining, consulting, and giving me not only knowledge, analytical thinking and practical experience but also a new way of viewing life around me.

I am grateful to **László Szereday** whom I consider my honorary tutor, for all the help he has given me, for always being there when I was in need, for teaching, explaining, listening, being patient, supporting and forming me, my points of view and attitude towards research and life.

I thank Prof. Sámuel Komoly and Prof. Júlia Szekeres-Barthó for the support, attention and useful advices I have got from them.

I thank everybody who contributed to my work with his/her help, support, teaching or advices, I especially thank Éva Mikó and József Pál. I also thank collaborators and staff in the Department of Neurology and in the Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs.

I am grateful to my parents, brother and friends for supporting, helping, understanding and tolerating me not only in the past and during this work but all the time, all through my life.

## VI. BIBLIOGRAPHY

### ARTICLES RELATED TO THESESES

Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaki T, Pal J, Banati M, Javorhazi A, Szekeres-Bartho J, Szereday L, Illes Z. Invariant  $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$  TCR is expressed in human kidney and brain tumors indicating infiltration by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells.

**Int Immunol**, October 16, 2008 [Epub ahead of print]

(*Impact factor: 4.01*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Deficient leukocyte antisedimentation is related to post-stroke infections and outcome.

**J Clin Pathol**, 2008;61:1209-13.

(*Impact factor: 2.24*)

Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, Magyar L, Farago B, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis.

**Neurosci Lett**, 2008;431:36-8.

(*Impact factor: 2.09*)

Satoh J, Illes Z, Peterfalvi A, Tabunoki H, Rozsa C, Yamamura T. Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis.

**Neurosci Lett**, 2007;422:30-3.

(*Impact factor: 2.09*)

Greve B, Simonenko R, Illes Z, Peterfalvi A, Mycko MP, Rozsa C, Selmaj KW, Bauer P, Berger K, Weissert R. Multiple sclerosis and the *CTLA4* autoimmunity polymorphism CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland.

**Mult Scler**, 2008;14:153-8.  
(*Impact factor: 2.77*)

Peterfalvi A, Molnar T, Pusch G, Szereday L, Illes Z. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke.  
(*revision resubmitted to Stroke, impact factor: 5.39*)

**Impact factor of published papers related to Theses:** 13.2  
**Impact factor of a revised and resubmitted paper under reviewing:** 5.39

## CONGRESS ABSTRACTS RELATED TO THESES

Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaki T, Banati M, Szereday L, Illes Z. Brain and kidney tumors are infiltrated by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. 8th Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies, Boston, MA, USA, June 5-9, 2008  
**Clin Immunol**, 2008, 127 (Suppl):S144  
(*Impact factor: 3.60*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Banati M, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Early activation of leukocytes indicated by a simple test of leukocyte antisedimentation rate (LAR) differentiates TIA from definitive stroke and is related to post-stroke infections resulting in poor outcome. 8th Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies, Boston, MA, USA, June 5-9, 2008  
**Clin Immunol**, 2008, 127 (Suppl):S153  
(*Impact factor:3.60*)

Banati M, Feldmann A, Peterfalvi A, Kosztolanyi P, Illes E, Herold R, Illes Z. Deficits of theory of mind in long-term multiple sclerosis: altered cognitive processing of social context. ECTRIMS, Prague, 2007.október 11-14.  
**Mult Scler**, 2007, 13(Suppl 2):S230  
(*Impact factor: 2.77*)

Illes Z, Farago B, Peterfalvi A, Magyari L, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. ECTRIMS, Prague, 2007.október 11-14.  
**Mult Scler**, 2007, 13(Suppl 2):S202  
(*Impact factor: 2.77*)

Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaki T, Pal J, Szereday L, Illes Z. Invariant TCR of both NKT and mucosal-associated T cells is expressed in CNS tumors in contrast to MS plaques. ECTRIMS, Prague, 2007.október 11-14.  
**Mult Scler**, 2007, 13(Suppl 2):S155  
(*Impact factor: 2.77*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Increased level of C-reactive protein (CRP) at onset of acute ischemic stroke correlates with elevation of leukocyte antisedimentation rate and S100b and predicts outcome. 17th Meeting of the European Neurological Societies, Rhodes, Greece, 2007. június 16-20.  
**J Neurol**, 2007, 254 (Suppl 3):III/57.  
(*Impact factor: 2.98*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. A rapid elevation in leukocyte antisedimentation rate differentiates acute ischemic stroke from TIA earlier than S100beta. 17th Meeting of the European Neurological Societies, Rhodes, Greece, 2007. június 16-20.

**J Neurol**, 2007, 254 (Suppl 3):III/143.

(*Impact factor: 2.98*)

Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaki T, Pal J, Szereday L, Illes Z. Brain and kidney tumors are differentially infiltrated by subsets of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. 17th Meeting of the European Neurological Societies, Rhodes, Greece, 2007. június 16-20.

**J Neurol**, 2007, 254 (Suppl 3):III/77.

(*Impact factor: 2.98*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Increased level of C-reactive protein (CRP) at onset of acute ischemic stroke correlates with elevation of leukocyte antisedimentation rate and S100b and predicts outcome. 16th European Stroke Conference, Glasgow, UK, 2007. május 29-június 1.,

**Cerebrovasc Dis**, 2007, 23 (suppl 2):63.

(*Impact factor: 2.00*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. A rapid elevation in leukocyte antisedimentation rate differentiates acute ischemic stroke from TIA earlier than S100beta. 16th European Stroke Conference, Glasgow, UK, 2007. május 29-június 1.,

**Cerebrovasc Dis**, 2007, 23 (suppl 2):64.

(*Impact factor: 2.00*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Increased level of C-reactive protein (CRP) at onset of acute ischemic stroke correlates with elevation of leukocyte antisedimentation rate and S100b and predicts outcome. 29th International Danube Symposium, Würzburg, Germany, 2007. Június 2-5.

**J Neurol Transm**, 2007, 114:CXXIV.

(*Impact factor: 2.93*)

Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. A rapid elevation in leukocyte antisedimentation rate differentiates acute ischemic stroke from TIA earlier than S100beta. 29th International Danube Symposium, Würzburg, Germany, 2007. Június 2-5.

**J Neurol Transm**, 2007, 114:CXXIV.

(*Impact factor: 2.93*)

Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaki T, Pal J, Szereday L, Illes Z. Brain and kidney tumors are differentially infiltrated by subsets of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. 29th International Danube Symposium, Würzburg, Germany, 2007. Június 2-5.

**J Neurol Transm**, 2007, 114:CXXXI.

(*Impact factor: 2.93*)

Greve B, Simonenko R, Illes Z, Peterfalvi A, Mycko MP, Selmaj KW, Bauer P, Berger K, Weissert R.. Multiple sclerosis and the putative autoimmunity SNP CT60: an association

study in patients from Germany, Hungary and Poland. 8th International Conference of Neuroimmunology (ISNI 2006). Nagoya, Japan, October 15-19, 2006

**J Neuroimmunol**, 2006, 178 (Suppl 1):185

(Impact factor: 2.88)

Péterfalvi A and Illes Z. Rapid changes in adaptive immune responses in acute ischemic stroke. Pecs-Tübingen Neuroimmunology Days 2007, Pécs 2007. április 13-14.

Illes Z, Faragó B, Péterfalvi Á, Magyar L, Pozsonyi É, Rózsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:21

Illes Z, Greve B, Simonenko R, Péterfalvi Á, Hamdi N, Mycko MP, Selmaj KW, Rózsa C, Rajczy K, Bauer P, Berger K, Weissert R. Multiple sclerosis and the CTLA4 autoimmunity polymorphism CT60 in patients from Germany, Hungary and Poland. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:22

Péterfalvi A, Gömöri É, Magyarlaci T, Pál J, Jávornácz A, Szereday L, Illes Z. Expression of genes of invariant T cell receptor alpha chains, cytokines and antigen-presenting molecules in CNS and kidney tumors. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:35

Péterfalvi Á, Szereday L, Molnár T, Szapáry L, Pál J, Mikó É, Komoly S, Illés Z. [Acute changes of adaptive immun responses in ischemic stroke] Az adaptív immunválasz akut változásai ischaemiás stroke-ban. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:35

Molnár T, Péterfalvi Á, Szereday L, Szapáry L, Komoly S, Bogár L, Illés Z. A rapid elevation in leukocyte antisedimentation rate differentiates acute ischemic stroke from transient ischemic attack (TIA) earlier than S100b. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:32

Molnár T, Péterfalvi Á, Szereday L, Szapáry L, Komoly S, Bogár L, Illés Z. Increased level of C-reactive protein (CRP) at onset of acute ischemic stroke correlates with elevation of leukocyte antisedimentation rate and S100b and predicts outcome. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:33

Satoh J, Péterfalvi Á, Tabunoki H, Rózsa C, Yamamura T, Illés Z. T cell gene expression profiling of monozygotic twins suggests a role of aberrant transcriptional regulatory network in the pathogenesis of multiple sclerosis. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19.

**Magy Immunol/Hun Immunol**, 2007, 6:39

Satoh J-I, Péterfalvi Á, Tabunoki H, Rózsa C, Yamamura T, Illés Z. [Aberrant transcriptional network may contribute to the pathomechanism of MS indicated by gene expression in T cells isolated from identical twins] Monozygota ikerpárok T sejtjeinek gén expressziós vizsgálata a sclerosis multiplex pathogenezisében aberráns jelátviteli hálózatra utal. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.

Illés Z, Greve B, Simonenko R, Péterfalvi Á, Hamdi N, Mycko MP, Selmaj KW, Rózsa C, Rajczy K, Bauer P, Berger K, Weissert R. [CTLA4 CT60 polymorphism and multiple sclerosis in German, Hungarian and Polish subjects] Sclerosis multiplex és a CTLA4 CT60 polimorfizmus német, magyar és lengyel betegekben. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.

Illés Z, Faragó B, Péterfalvi Á, Magyar L, Pozsonyi É, Rózsa C, Komoly S, Melegh B. [Association of the 3'UTR C2370A polymorphism in the IL23 receptor gene with MS] Az IL-23 receptor gén 3'UTR C2370A allélja relapszó-remittáló sclerosis multiplex-szel asszociált. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.

Péterfalvi Á, Gömöri É, Magyarlaci T, Pál J, Jávornácz A, Szereday L, Illés Z. [Expression of T cell receptors, cytokines and antigen presenting molecules in tumors of the CNS and kidney cancers] T sejt receptor, citokin and antigén prezentáló molekula gének expressziója központi idegrendszeri és vesedaganatokban. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.

Molnár T, Péterfalvi Á, Szereday L, Szapáry L, Komoly S, Bogár L, Illés Z. [Acute changes of innate immunity in ischemic stroke] Az ősi immunválasz akut változásai ischaemiás stroke-ban. A Magyar Stroke Társaság VIII. Konferenciája. Budapest, 2007. május 24-26.

Illés Z, Greve B, Simonenko R, Péterfalvi Á, Mycko MP, Selmaj KW, Bauer P, Berger K, Weissert R. Multiple sclerosis and the putative autoimmunity SNP CT60: an association study in patients from Germany, Hungary and Poland. CTLA-4. A joint meeting of the 2nd Basic and Clinical Immunogenomics and 3rd Immunoinformatics (Immunomics) Conferences October 8-12, 2006. Budapest, Hungary

Péterfalvi Á, Szereday L, Molnár T, Szapáry L, Illés Z. Stroke: neuroimmunológiai kórkép? Fiatal immunológusok országos kongresszusa. Pécs, 2006. november 18.

## **AWARDED LECTURES**

Péterfalvi Á, Szereday L, Molnár T, Szapáry L, Pál J, Mikó É, Illés Z. [Acute changes of adaptive immunity in ischemic stroke] Az adaptív immunválasz akut változásai ischaemiás stroke-ban. A Magyar Stroke Társaság VIII. Konferenciája. Budapest, 2007. május 24-26.

**2<sup>nd</sup> prize**

Péterfalvi Á, Illés Z. [Acute changes of innate immunity in ischemic stroke] Az immunválasz akut változásai ischaemiás stroke-ban. Neurobiológus doktoranduszok fóruma. Pécs, 2007. november 16.

**3<sup>rd</sup> prize**

## **ADDITIONAL CONGRESS ABSTRACTS**

Péterfalvi Á, Farkas O, Tamás A, Zsombok A, Reglődi D, Büki A, Lengvári I, Dóczi T.  
Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a rat model of  
diffuse axonal injury. 2nd Pannonian Symposium on CNS Injury, Pécs, 2003. május 8-10.  
**Clin Neurosci/Ideggy Szle**, 2003, 56(5-6):197.

## I. BEVEZETÉS

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

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

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

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

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

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

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



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

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

#### Fontos tudnivalók:

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

**MAIT:** mucosa-asszociált T sejtek, melyek invariáns V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 TCR-t expresszálnak

**NK sejtek:** természetes ölő sejtek: CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>

**T sejtek:** CD3<sup>+</sup>

**NKT-szerű sejtek:** natural killer T-szerű sejtek: CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>

**LAR:** leukocita antiszedimentációs ráta: a leukociták aktivációjával korrelál

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

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

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

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

## II. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### III. VIZSGÁLATOK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **6. Hibás transzkripció szabályozó hálózatok sclerosis multiplexben**

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

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

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

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

#### IV. TÉZISEK

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

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

## V. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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