

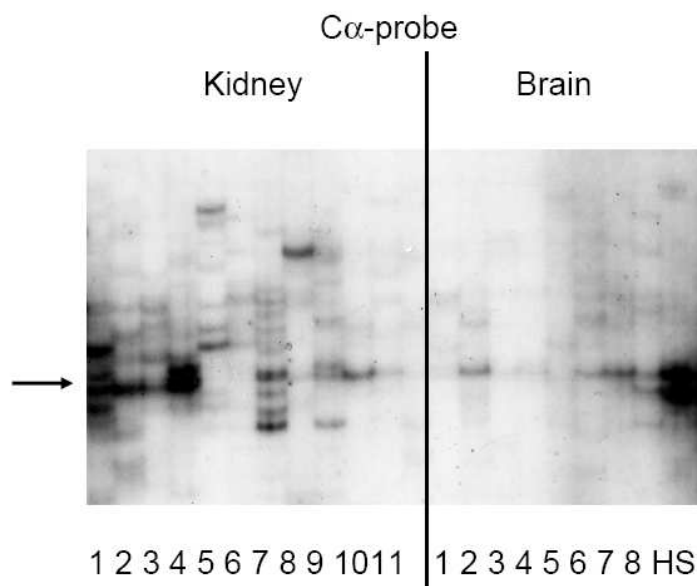
## 1. Invariáns T sejt receptor tumorokban: NKT sejtek

A pályázati terv egyik legfontosabb háttére az a korábbi megfigyelésünk volt, hogy központi idegrendszeri plakkokban az NKT sejtek invariáns receptora (Va24-JaQ) nem mutatható ki, ugyanakkor Va24 T sejt receptort (TCR) expresszáló sejtek a plakkokban jelen vannak<sup>1</sup>. Ez arra utalt, hogy a központi idegrendszeri SM plakkokban az NKT sejtek szelektív deficienciája mutatható ki. Azonban ennek hátterében állhat a KPI speciális immunkörnyezete is, tehát lehet nem a betegségre specifikus jelenség.

Emiatt, a pályázati tervnek megfelelően megvizsgáltuk az NKT sejtek jelenlétét 19 daganatban: 8 agydaganatban (glioblastoma és malignus meningeoma), valamint 11 világossejtes veserákban. A betegek a vizsgálatot megelőzően nem részesültek immunosuppresszív vagy irradiációs kezelésben, a daganatmintákat biopsziával vagy operáció során nyertük<sup>2,3</sup>.

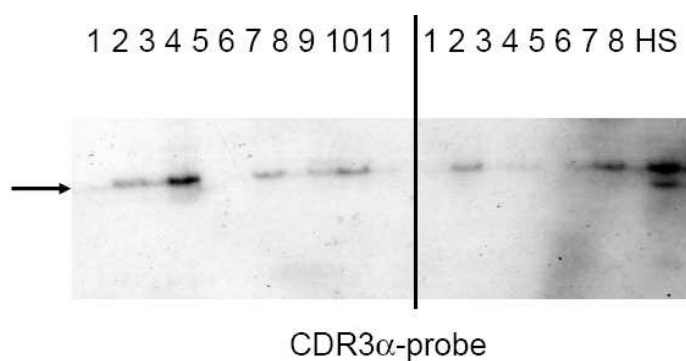
Ezt követően RT-PCR SSCP klonalitás analízist alkalmaztunk. Ennek lényege a TCR alfa lánc hipervariábilis (aCDR3) régiójának amplifikálása Va24- és Ca-specifikus primerek segítségével, majd az amplifikált Va24-CDR3 régiók SSCP elektroforézise. Az elektroforézis kapcsán az egymástól különböző, Va24 TCR-t expresszáló klónok CDR3 régiói egymástól szeparálódnak, majd ezek különböző probe-okkal történő hibridizációval vizualizálhatók. Ca-specifikus probe a teljes Va24 repertoárt (az összes különböző aCDR3-at) vizualizálja sávok formájában, JaQ-specifikus probe leszűkíti a repertoárt, az invariáns NKT aCDR3-ra tervezett, klonotípus probe pedig csak az invariáns NKT szekvenciát jelzi (**1. ábra**). A módszer előnye, hogy az NKT sejtek dominanciája e molekuláris biológiai módszerrel a repertoárban megítélhető. A Ca probe-bal történő hibridizáció esetén ugyanis a 19 tumor mintát egymás mellett futtatva az invariáns NKT aCDR3 (klonotípus) azonos pozícióban fut minden mintában, tehát jól azonosítható, ugyanakkor az egyes mintákon belül vizsgálható, hogy ennek a csíknak milyen a dominanciája az adott tumort infiltráló Va24 T sejtek között: a domináns klónokat reprezentáló klonotípusok csík formájában jól elkülönülnek, ha nincs domináns klón, kenet látható (**1. ábra**).

1. ábra



Amennyiben a membránt az NKT sejtek invariáns aCDR3 régiójára tervezett klonotípus probe-bal hibridizáljuk, az NKT sejt receptort reprezentáló klonotípus az egymás mellett futtatott 19 tumor mintában jól látható (**2. ábra**).

2. ábra



Az SSCP klonalitás analízis a V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariáns TCR-t a vesedaganatok 72 %-ában (7/11), míg az agydaganatok 88 %-ában (4/6) azonosította. Ez ellentéte az autoimmun központi idegrendszeri infiltrátumoknak, ahol NKT sejt receptort korábban elvétve tudtunk kimutatni. Ez arra utalhat, hogy az autoimmun központi idegrendszeri NKT deficiencia nem központi idegrendszer specifikus, hanem a sclerosis multiplexre jellemző jelenség. Az adatok azt is jelzik, hogy a központi idegrendszeri daganatot infiltráló Va24 T sejt repertoárban kevesebb a domináns T sejt klón, így az NKT sejtek viszonylagos dominanciája kifejezettebb (1. ábra).

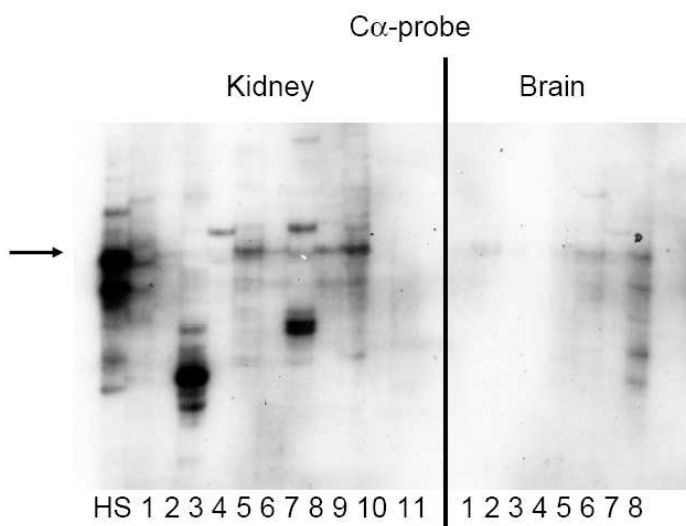
## 2. Invariáns T sejt receptor tumorokban: MAIT sejtek

Az utóbbi években egy új invariáns T sejt populáció, a MAIT sejtek kerültek leírásra, mely az NKT sejtekhez funkcionálisan egérkísérletekben nagyon hasonló<sup>4-7</sup>. Ezért megvizsgáltuk, hogy a tumorokat infiltráló NKT sejtek mellett vajon MAIT sejtek is azonosíthatók-e. Humán MAIT sejtekre vonatkozóan nagyon kevés adat áll rendelkezésre, és tumorimmunitásban játszott szerepüket sem állatkísérletes, sem humán vizsgálatokban nem elemezték.

Az NKT sejtekhez hasonlóan az invariáns MAIT receptort is RT-PCR SSCP módszerrel vizsgáltuk, a MAIT aCDR3 régióra tervezett primerekkel, és probe-okkal.

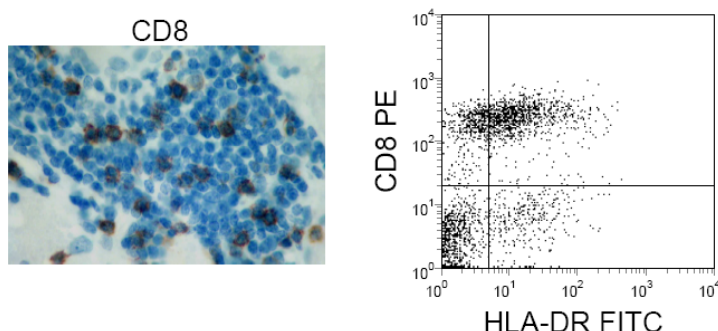
V $\alpha$ 7.2 klonotípust (RT-PCR) a vesedaganatok 81 %-ában és az agydaganatok 75 %-ában mutattunk ki, heterogén  $\alpha$ CDR3-t expresszáló T sejt receptorokkal. Invariáns V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 receptor (MAIT sejtek, SSCP analízis) a vesetumorok 54 %-ában (8/11) és az agydaganatok 62 %-ában (6/8) volt jelen, vagyis a V $\alpha$ 24+ NKT sejtekhez hasonlóan elsősorban a KPI infiltráció a jellemző. Hasonlóan az NKT sejtekhez, itt is azt észleltük, hogy a MAIT sejtek relatív dominanciája a Va7.2 infiltráló repertoáron belül a központi idegrendszeren belül nagyobb (3. ábra).

3. ábra



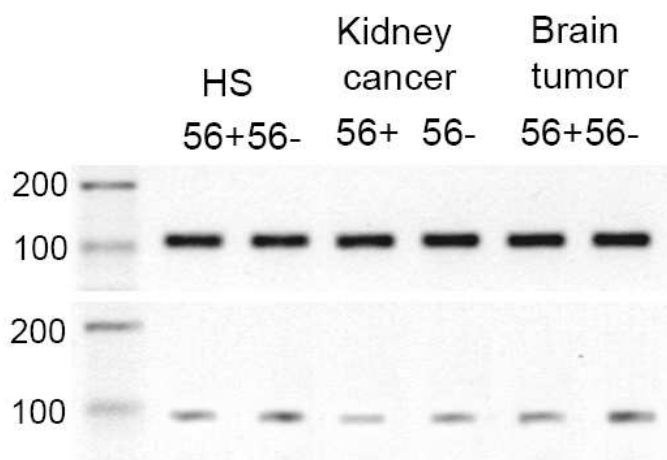
A MAIT és NKT receptorok jelenléte miatt megvizsgáltuk a tumorokat infiltráló sejtek fenotípusát. Több adat utal arra, hogy NKT és MAIT sejtek CD56 molekulát expresszálnak<sup>8,9</sup>. Jelen tanulmány egyik célja a CD56+ T sejtek vizsgálata volt sclerosis multiplexben részben az NKT sejt vonatkozások miatt (*lásd alább*). Ezért immunhisztokémiával megvizsgáltuk a CD3+, CD4+, CD8+ T sejtek jelenlétét a vizsgált tumorokban, és analizáltuk a CD56 expressziót is. Ezt követően a tumort infiltráló limfocitákat (TIL) izoláltuk, és flow cytometriával (FACS) vizsgáltuk a koreceptor expressziót és aktiváltságot. Az adatok arra utalnak, hogy a MAIT és NKT sejt receptorokat expresszáló tumorokat elsősorban aktivált (HLA-DR+) CD8+ T sejtek infiltrálják (**4. ábra**). A MAIT sejtek elsősorban CD8+ T sejtek.

#### 4. ábra



Azonban, az NKT és MAIT invariáns receptor jelenléte valamint a CD8+ TIL ellenére nem találtunk sem a vese, sem az agydaganatokban CD56+ T sejteket, bár az agyszövet a vártnak megfelelően intenzíven festődött CD56 ellenanyaggal (pozitív kontroll). Két lehetőség merült fel: a daganatokat CD56-negatív MAIT és NKT sejtek infiltrálják, vagy a daganatos betegekben e sejtek CD56 expressziója megváltozik. Ezért megvizsgáltuk a MAIT sejtek CD56 expresszióját a perifériás vérben. Mivel MAIT sejtekre ellenanyag nem áll rendelkezésre, ezért a perifériás vérből a CD56+ és CD56- sejteket izoláltuk mágneses szortolással, RNS-t izoláltunk, majd egy klonotípus PCR-t állítottunk be a Va7.2 sense és az invariáns MAIT a-CDR3-ra tervezett anti-sense primer segítségével. Az eredmények azt jelzik, hogy a perifériás vérben egészséges kontrollokhoz hasonlóan a vese- és agydagantós betegekben is mindkét csoportban kimutatható a MAIT TCR. Vagyis a MAIT sejtek CD56 expressziója nem változik, de a daganatokat a CD56-negatív MAIT sejtek infiltrálják (**5. ábra**).

#### 5. ábra



Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az infiltráló MAIT sejtek lokális aktiválódására lehetőség van-e azáltal, hogy antigén prezentáló molekulájuk, a MR1 kimutatható-e tumorokban<sup>4,10</sup>. Illetve, amennyiben jelen van, milyen citokin környezetben fordulnak elő a MAIT sejtek. Ez több

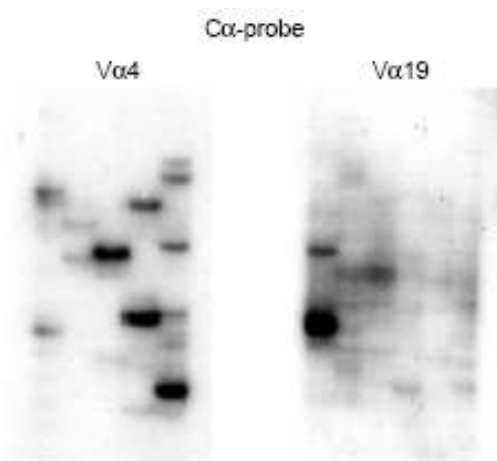
szempontból is fontos volt: 1. A MAIT sejteket Th2 citokint termelő csoportnak tartják<sup>5-7,11</sup>; 2. Azonban egérkísérletek ebben az évben felvetették funkcionális heterogenitásukat az NKT sejtekhez hasonlóan<sup>12</sup>; 3. A MAIT sejtek NKT sejtekhez hasonlóak, és az NKT sejtek funkcionális heterogenitása emberben is ismert<sup>13</sup>; 4. Az NKT sejtek anti-tumor aktivitása Th1 és gyulladásgátló citokint termeléssel függ össze, de MAIT sejtek tumorimmunitásban játszott szerepére nincs adat<sup>13</sup>. Ezért RT-PCR-rel vizsgáltuk gyulladáskeltő (TNF $\alpha$ , IL-12, IFN $\gamma$ , IL-17) és gyulladásgátló (IL-4, IL-5, IL-10) citokinek és MR1 expresszióját. Az adatok azt jelzik, hogy a MAIT invariáns receptort expresszáló tumorok MR1 RNS-t is expresszálnak, vagyis MAIT sejtek in situ aktivációjára a tumorokban lehetőség van. Ezen felül, három vese- és három agydaganatban a MAIT receptor olyan citokint környezetben fordult elő, amelyben gyulladásgátló citokint nem expresszálódott, ami arra utalhat, hogy a humán MAIT sejtek is rendelkezhetnek gyulladásgátló citokint termelő alcsoporttal az NKT és egér MAIT sejtekhez hasonlóan. A citokint környezet emellett az agyi immunkörnyezet különbségére is felhívta a figyelmet: míg a vese- és agydaganatokban a gyulladáskeltő TNF $\alpha$  és IL-12 azonos módon (10/11 és 8/8) expresszálódott, csak egyetlen agydaganatban lehetett Th1 és Th17 citokint kimutatni, szemben a 10/11 veserákkal.

A MAIT sejteket nemcsak az invariáns TCR alfa-lánc, hanem a Vb2 és Vb13 expresszió is jellemzi<sup>7,9</sup>. Ezért vizsgáltuk e béta-láncok expresszióját is a vese- és agydaganatokban. Míg az összes, MAIT invariáns láncot expresszáló vesedaganatban ki lehetett mutatni a Vb2 és Vb13 b-láncot, az olyan agydaganatok felében, ahol az alfa lánc jelen volt, Vb2 és Vb13 nem expresszálódott. Ez arra utalhat, hogy az agydaganatokat egyéb Vb láncokat expresszáló MAIT sejtek is infiltrálják.

### 3. Egyéb invariáns T sejt receptorok tumorokban: Va4 és Va19 T sejtek

Az NKT és MAIT sejtek mellett két további invariáns TCR-t expresszáló alcsoportot sugalltak korábbi adatok, az invariáns Va4 és Va19 invariáns T sejteket<sup>14</sup>. Ezért, beállítottuk az RT-PCR SSCP analízist e két T sejt populációra vonatkozóan is. V $\alpha$ 19+ T sejt receptort RT-PCR-rel a vesedaganatok 45%-ában észleltünk, agydaganatban azonban nem találtunk. V $\alpha$ 4+ TCR a vesedaganatok 54 %-át jellemezte, agydaganatban szintén nem fordult elő. Invariáns V $\alpha$ 19 és V $\alpha$ 4 TCR szekvenciákat SSCP módszerrel egyik daganatban sem tudtunk kimutatni (6. ábra).

### 6. ábra



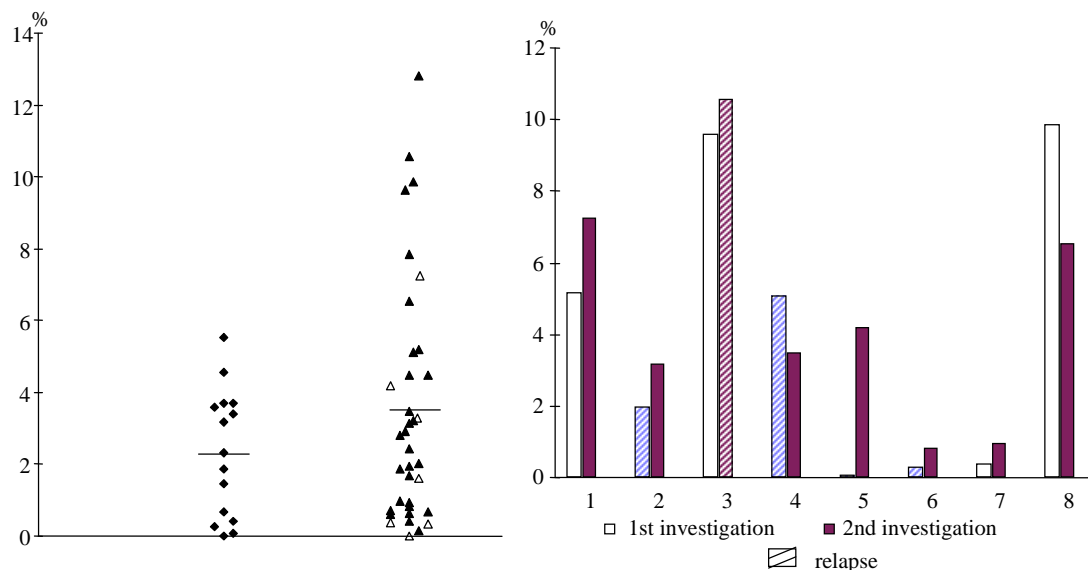
**Összefoglalva**, a tumorokat infiltráló invariáns T sejteket NKT és MAIT sejteket. Elsőként mutattuk ki az új invariáns T sejteket (MAIT) jelenlét agydaganatokban, és adataink szintén elsőként arra utalnak, hogy feltehetően az NKT sejtekhez hasonlóan a humán MAIT sejteket is Th1 illetve Th2 alcsoportokkal rendelkeznek, és ez utóbbinak a tumorimmunitásban jelentős szerepe lehet. Adataink arra is utalnak, hogy az NKT és MAIT sejteket CD56-negatív altípusa infiltrálja a központi idegrendszeri és idegrendszeren kívüli daganatokat. Az NKT sejteket jelenléte központi idegrendszeri daganatokban arra utal, hogy az SM plakkokban észlelt deficiencia a betegségre jellemző jelenség.

A kéziratot publikálásra leadtuk (*Am J Pathol*).

#### 4. CD56+ NKT és NK sejtek vizsgálata

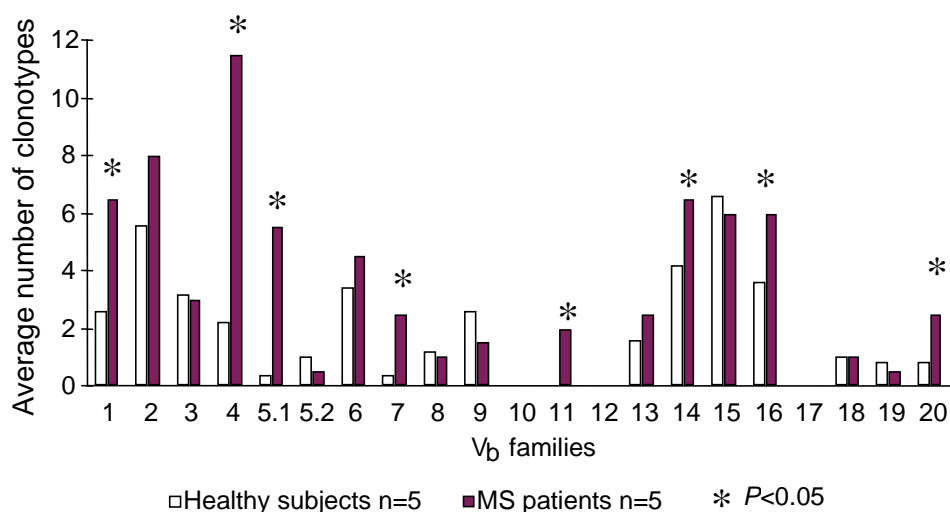
A vizsgálati tervnek megfelelően sclerosis multiplexben is vizsgáltuk a CD56+CD3+ NKT sejteket. Harminchat SM és 15 egészséges vérmintában meghatároztuk a CD56+CD3+ NKT és a CD56+CD3- NK sejtek százalékos arányát, azonban szignifikáns különbséget egyik populáció esetében sem észleltünk, relapszus során sem. Az NKT sejtek esetében azonban alacsony és magas CD56 expressziójú alcsoport különíthető el, ezért nyolc betegnél több alkalommal vizsgáltuk a CD3+CD56+ T sejtek arányát. Egy beteg kivételével az NKT sejt frekvencia közelítő értékeket adott az ismételt mintákban, és megerősítette az alacsony és magas expressziójú betegcsoportok lehetőségét (7. ábra).

7. ábra



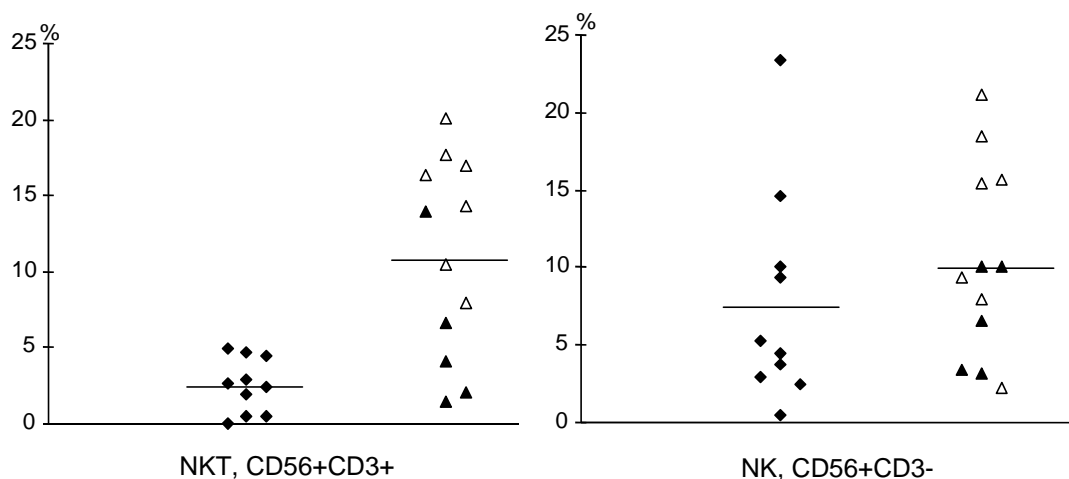
Ezt követően megvizsgáltuk a CD56+CD3+ NKT sejtek klonalitását. Szortoltuk a CD56+CD3+ populációt 5 egészséges és 5 SM betegtől, majd RNS izolálást, cDNS szintézist követően 21 TCR V $\beta$  régiót amplifikáltunk. Az egyes ampikonokat egymás mellett futtatva SSCP gélelektroforézist alkalmaztunk, majd a membránt C $\beta$ -specifikus probe-bal hibridizáltuk<sup>15</sup>. E technika gyakorlatilag a teljes CD56+CD3+ T sejt repertoár klonalitását vizualizálja sávok formájában. A klónokat e repertoárban a V $\beta$  expresszióinak megfelelően számoltuk le. Az eredmények a CD56+CD3+ NKT sejtek klonális expanzióját jelzik sclerosis multiplexben, annak ellenére, hogy az összfrekvencia számban különbség nem volt (8. ábra).

8. ábra



Mivel adataink a CD3+CD56+ T sejtek klonális expanszióját jelezték SM-ben, vizsgáltuk a CD56+ NK és NKT populáció FasL expresszióját, mely az aktiváltsági állapotot jelezheti, illetve a citotoxikus funkcióra adhat felvilágosítást<sup>16</sup>. Két módon történtek vizsgálatok: elemeztük, az NK és NKT sejtek hány százaléka expresszál FasL-ot, illetve a FasL-ot expresszáló mononukleáris sejtek hány százaléka NK és NKT sejt. A FasL-ot expresszáló NK és NKT sejtek aránya SM-ben szignifikánsan magasabb volt (**9. ábra**).

### 9. ábra



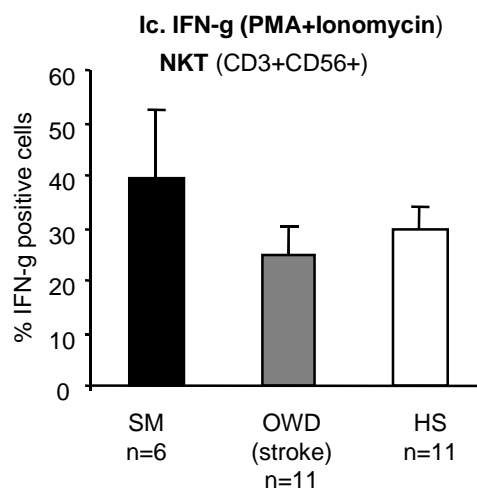
A citotoxikus molekulák mellett megvizsgáltuk a CD3+CD56+ T és NK sejtek citokin termelését is. Tizenegy SM és 7 kontroll személyből szortolt CD56+CD3+ és CD56+CD3- sejtek IL-2, IFN $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 és IL-10 termelését elemeztük stimulálást követően, illetve 6 beteg, 11 egészséges kontroll és 11 OND (stroke) beteg esetében intracelluláris IFN- $\gamma$  méréseket is végeztünk (**10. ábra**). Az NK sejtek IL-6 termelése mutatott szignifikáns emelkedést SM betegekben, egyéb Th2 és Th1 citokin termelésben eltérés nem volt.

### 10. ábra

#### Felülúszó, CBA, stimulálást követően (PMA+Ionomycin)

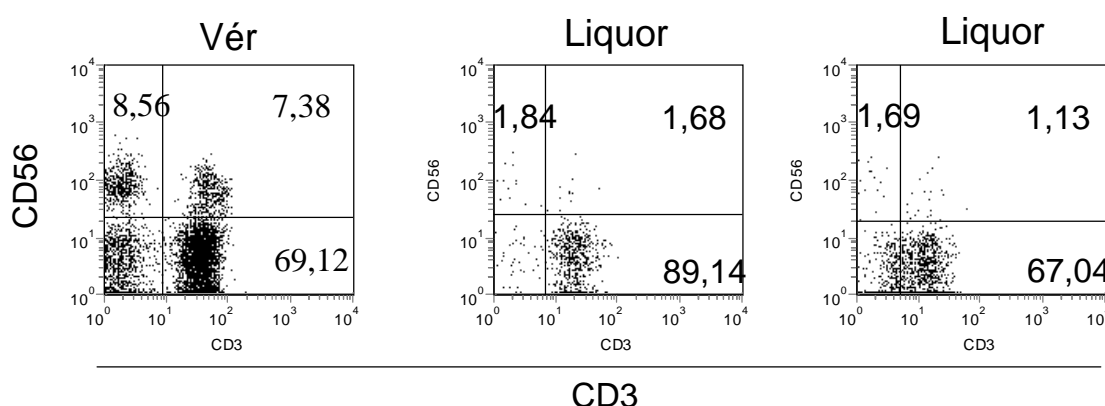
|                 | NK (CD56+CD3-) |                 | NKT (CD56+CD3+) |                 |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                 | SM<br>n=11     | Kontroll<br>n=7 | SM<br>n=11      | Kontroll<br>n=7 |
| gyulladás-keltő |                |                 |                 |                 |
| IL-2            | 17,58±11,7     | 11,81±6,74      | 150,21±86,09    | 310,98±115,71   |
| IFN- $\gamma$   | 65,70±34,38    | 282,77±216,87   | 538,68±268,75   | 1112,08±282,98  |
| IL-6            | 7,18±2,52*     | 1,54±0,02       | 1,66±0,04       | 1,77±0,08       |
| TNF- $\alpha$   | 51,22±23,39    | 133,69±105,22   | 387,74±238,6    | 594,33±220,87   |
| gyulladás-gátló |                |                 |                 |                 |
| IL-4            | 1,74±0,06      | 1,62±0,02       | 2,42±0,31       | 3,34±0,55       |
| IL-10           | 1,71±0,02      | 1,65±0,03       | 1,99±0,19       | 1,98±0,12       |

\*p<0,05, mean±SE



Mivel az eredmények a CD3+CD56+ NKT sejtek krónikus aktiválódását, expanszióját és FasL termelését jelezték sclerosis multiplexben, megvizsgáltuk e sejtek jelenlétét a központi idegrendszeri kompartmentben, a liquorban is. CD3+CD56+ NKT és CD56+ NK sejtek az SM betegek liquorában is jelen vannak (**11. ábra**).

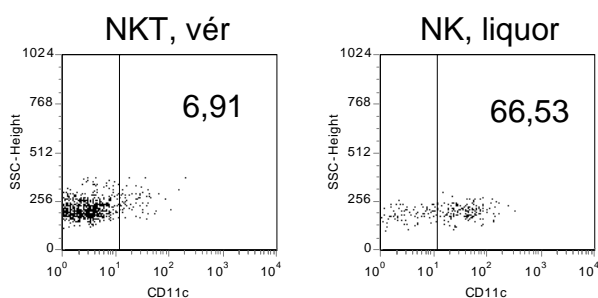
11. ábra



A CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NKT sejtek további fenotípus elemzésében megvizsgáltuk, hogy CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T sejtek száma emelkedett-e, és expresszálnak-e FasL-ot. Ez az alcsoport a CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NKT sejtek részét képezi, és specifikus klónokat tartalmaz irodalmi adatok alapján, mely oligodendrociták lízisére is képes. Tizenhét SM és tíz egészséges kontroll vérére összehasonlítva, SM betegekben a CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T sejtek száma szignifikánsan magasabb ( $1,54 \pm 1,33$  vs  $0,63 \pm 0,53$ ,  $p < 0,05$ ). Szintén szignifikánsan magasabb a FasL-ot expresszáló CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T sejtek száma az SM betegek vérében ( $29,97 \pm 25,7$  vs  $10,88 \pm 8,95$ ,  $p < 0,05$ ). Vagyis a CD56<sup>+</sup> NKT populáción belül a CD4<sup>+</sup> sejtek aktiváltak, FasL-ot expresszálnak és expandáltak.

Szintén vizsgáltuk az NK és NKT sejtek CD11c expresszióját, mely NK sejteken megjelenhet, és alacsony expressziója Th2, magas expressziója Th1 citokin expresszióval függhet össze<sup>17</sup>. Nyolc SM beteg vérére és hat SM beteg liquorát elemeztük. Előzetes adataink arra utalnak, hogy a CD11c az NKT sejteken is expresszálódik, és a CD11c<sup>+</sup> NK sejtek a liquorban is jelen vannak (12. ábra). Ezirányban további kísérletek zajlanak.

12. ábra



|        | PBMC             |             | Liquor           |             |
|--------|------------------|-------------|------------------|-------------|
|        | NK               | NKT         | NK               | NKT         |
|        | CD11c expresszió |             | CD11c expresszió |             |
| SM 171 | 69,69            | 9,84        |                  |             |
| SM 173 | 62,39            | 6,01        | 63,16            | 0           |
| SM 174 | 57,99            | 5,03        | 66,53            | 0           |
| SM 175 | 37,34            | 6,91        | 51,85            | 0           |
| SM 176 | 64,83            | 2,86        | 64,27            | 17,86       |
| SM 177 | 62,03            | 9,16        | 41,67            | 0           |
| SM 178 | 49,59            | 14,96       |                  |             |
| SM 179 | 76,02            | 23,28       | 60,32            | 7,14        |
| átlag  | <b>59,99</b>     | <b>9,76</b> | <b>57,97</b>     | <b>4,17</b> |
| stdev  | 12,01            | 6,57        | 9,47             | 7,29        |
| n      | 8                | 8           | 6                | 6           |
| SE     | <b>4,25</b>      | <b>2,32</b> | <b>3,87</b>      | <b>2,98</b> |

Végül, vizsgáltuk azt is, hogy a CD56<sup>+</sup> és CD56<sup>-</sup> szortolt alcsoportok tartalmaznak-e invariáns, Va24JaQ T sejt receptort, vagyis a CD1d-restricted invNKT sejtek expresszálnak-e CD56 molekulát. Kilenc egészséges és 3 SM beteg véréből végeztük a vizsgálatokat, ismételtten is vizsgáltunk alanyokat. Az invariáns Va24JaQ TCR expressziót a fent említett RT-PCR SSCP klonalitás technikával vizsgáltuk. 7/12 mintában az invariáns receptor a CD56<sup>+</sup> populációban volt csak jelen, 2/12 mintában csak a CD56<sup>-</sup> csoportban, 2/12 minta esetében mindkét csoportban ki lehetett mutatni.

**Összefoglalva**, a CD56+CD3+ NKT sejtek SM betegek vérében expandáltak, aktiváltak, fokozott mértékben expresszálnak FasL-ot, de Th1 citokineket nem. E sejtek tartalmaznak CD4+CD56+ T sejteket is, melyek szintén fokozott mértékben aktiváltak, valamint invVa24JaQ NKT sejteket is. E sejtek a liquorban megjelennek, és CD1c expresszióval is jellemezhetők.

Az adatok egy részének előkészítése zajlik publikációra, illetve további kísérletek zajlanak.

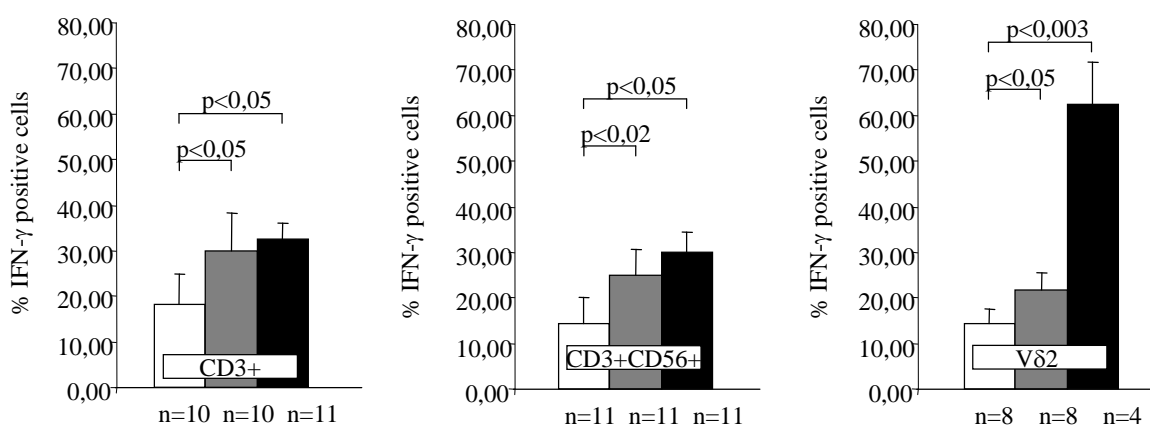
### 5. CD56+CD3+ és egyéb T sejt alcsoportok vizsgálata akut ischemiás stroke-ban

A sclerosis multiplexben végzett kísérletek során OND (egyéb neurológiai betegség) kontrollként stroke betegeket vizsgáltunk. Ekkor észleltük, hogy az IFN $\gamma$ -t expresszáló CD3+CD56+ T sejtek száma akut stroke-ban hat órán belül lecsökken, majd normalizálódik a 3. napra. Mivel akut immundeficiencia T sejtek vonatkozásában stroke-ban nem ismert, megvizsgáltuk azokat a T sejt populációkat, melyek gyorsan képesek citokin válaszra, illetve az adaptív/ősi immunrendszer határán helyezkednek el (gdT, iNKT, CD3+CD56+)<sup>18,19</sup>. A vizsgálatok további jelentőségét az adta, hogy részletes immunológiai vizsgálatok akut ischemiás stroke-ban ezidáig nem történtek.

Első lépésben megvizsgáltuk 15 betegben, hogy változik-e a CD3+, CD4+, CD3+CD56+, Vd2+, iNKT és CD56+NK sejtek száma a perifériás vérben az ischemiás stroke első tüneteit követő hat órában, majd 24 és 72 óra múlva. A sejtek számában változást nem észleltünk sem az egyes mintákat egymáshoz viszonyítva, sem 13 egészséges kontrollokhoz hasonlítva.

Majd megvizsgáltuk e sejtek citokin termelését szintén az első 6 órában, majd 24 és 72 óra múlva. Először a sejtek IFN $\gamma$  termelését vizsgáltuk in vitro PMA/Ionomycin stimulust követően intracelluláris FACS mérésekkel. A CD3+ T sejtek, a CD3+CD56+ NKT sejtek és a Vd2 T sejtek IFN $\gamma$  termelése szignifikánsan megemelkedett a 3. napra, és a 3. napi értékek feleltek meg egészséges betegekből nyert IFN $\gamma$  termelésnek-. Vagyis az ischemiás stroke akut fázisában e sejtek gyulladáskeltő citokin válasza deprimált (**13. ábra**).

**13. ábra**

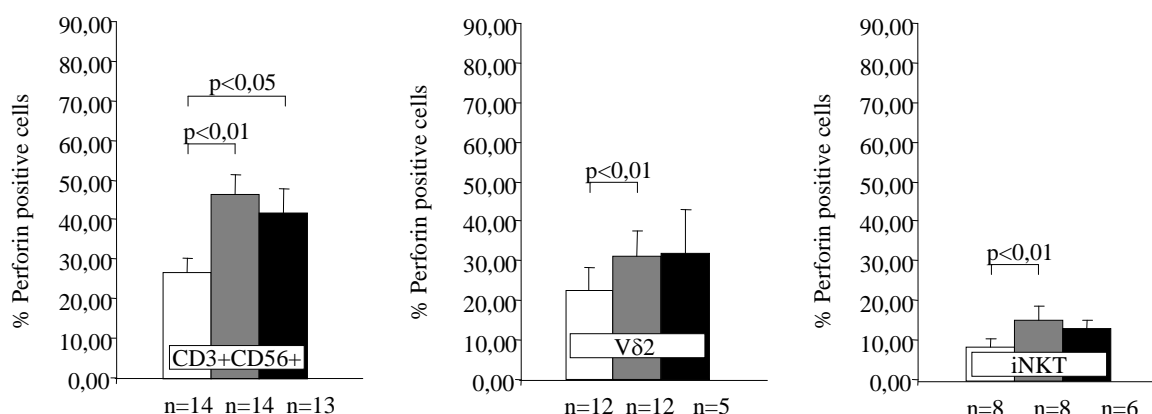


Megvizsgáltuk a CD3+CD56+ NKT és CD3+ T sejtek további gyulladáskeltő és gyulladásgátló citokintermelést is: a populációk szortolását, majd stimulálását követően CBA módszerrel a felülülőből vizsgáltuk 9 beteg esetében az IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN $\gamma$  és TNF $\alpha$  termelést akut, hat órán belüli stroke-ban, majd 72 óra múlva. Egyedül az IFN $\gamma$  termelés vonatkozásában tapasztaltuk az intracelluláris méréseknél észlelt akut deficitet, a Th2 citokinek esetében deficiencia nem volt. A Th2 funkciók további megközelítésére ICOS expressziót is vizsgáltunk flow cytometriával, ebben sem találtunk szignifikáns változást.

Ezt követően a fenti sejtcsoportok citotoxikus funkcióját vizsgáltuk a perforin expressziójának meghatározásával. Az IFN $\gamma$  termeléshez hasonlóan, a perforin intracelluláris expressziója is szignifikánsan alacsonyabb volt akut stroke-ban a CD3+CD56+ NKT, a Vd2 és az iNKT sejteken, (**14. ábra**).

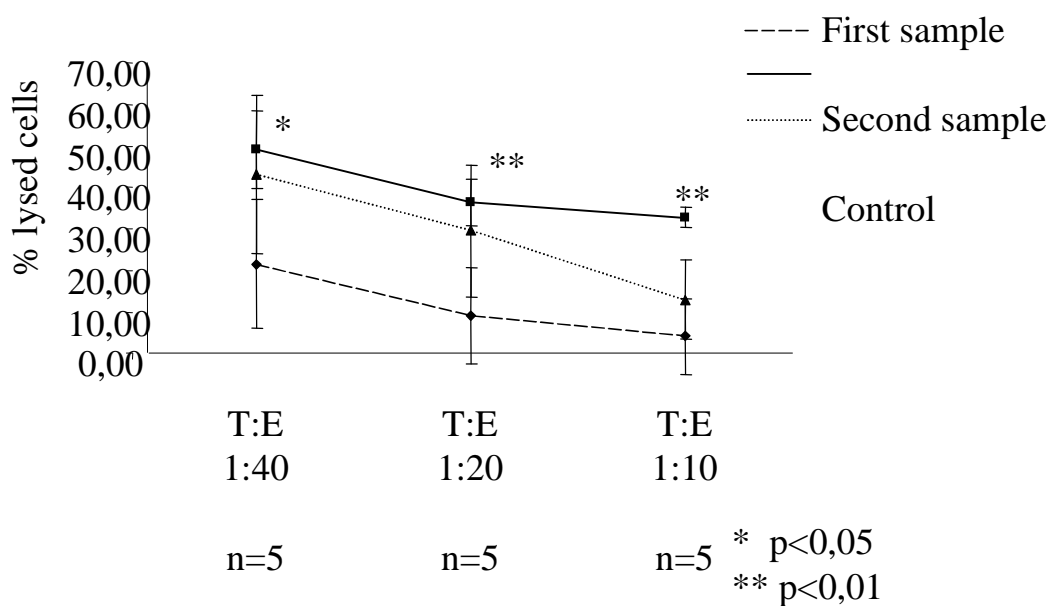


14. ábra



Az eredmények miatt megvizsgáltuk, változik-e a citotoxikus funkció akut ischémias stroke-ban. Öt betegnél hat órán belül, majd 24 és 72 óra múlva vizsgáltuk a perifériás citotoxicitást. A perforin változásához hasonlóan a funkcionális mérések is a citotoxicitás akut deficienciáját jelzik (15. ábra).

15. ábra



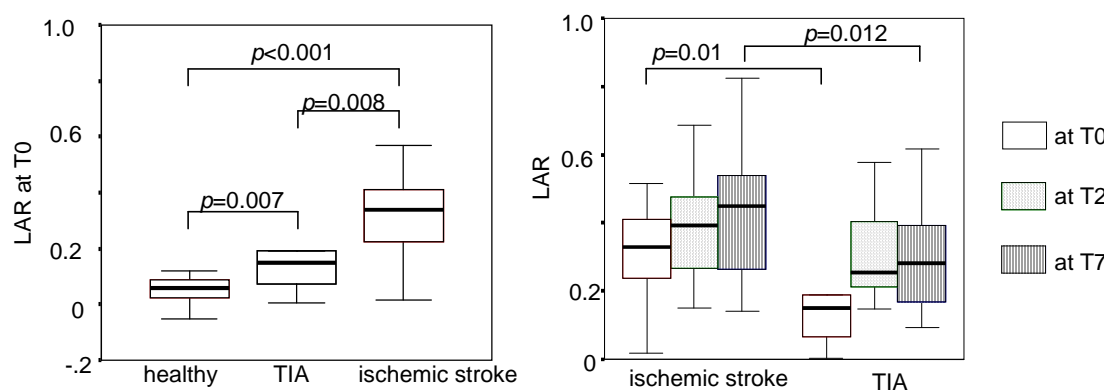
**Összefoglalva**, az ischaemiás stroke- akut fázisában, pár órán belül a CD3+CD56+, Vd és iNKT sejtek deficienciája észlelhető a gyulladáskeltő IFNg és a citotoxicitás vonatkozásában, mely a 3. napra normalizálódik. Th2 citokinek és ICOS vonatkozásában nincs ilyen eltérés. Ez felvetheti a lehetőséget, hogy a stroke-ot követő fokozott infekció veszély (post-stroke infekció) összefügg e jelenséggel. Ennek vizsgálatára prospektív vizsgálatot indítottunk, mely zajlik. Az adatokat jelenleg készítjük elő publikálásra.

A tumorokban, sclerosis multiplexben stroke-ban nyert adatok az immunválasz további komplexitását is jelzik: akut stroke-ban és tumorokban a fenti T sejt populációk aktiválása feltehetően fontos a gyulladáskeltő Th1 válasz, és az immunrendszer mobilizálása szempontjából. Az aktiválódás hiánya, az akut deficiencia normalizálásának elmaradása a post-stroke infekciókra hajlamosíthat. Ezzel szemben krónikus autoimmun betegségben e sejtcsoportok aktiválódása a gyulladással összefüggő patológiát erősítheti, így a kóros folyamatokban vesz részt.

## 6. Leukocita aktiváció akut stroke-ban és post-stroke infekciók

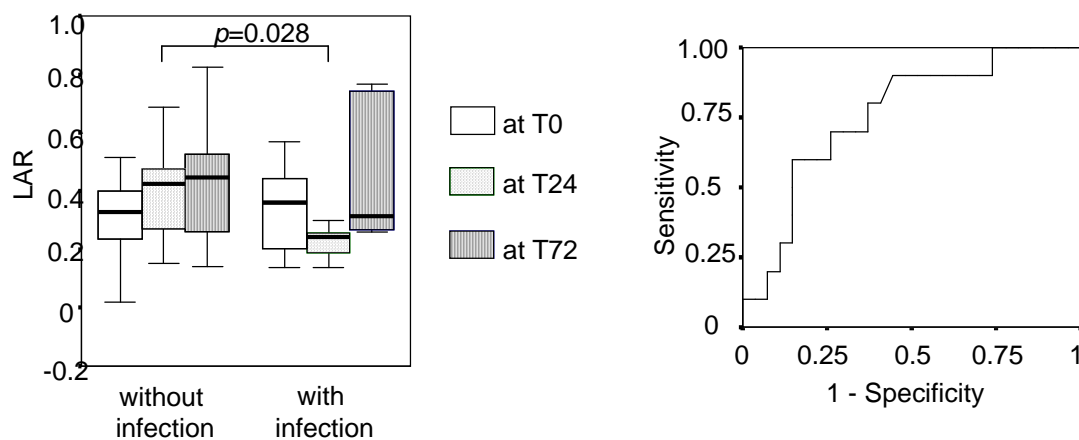
Az akut stroke-ban észlelt korai gyulladáskeltő és citotoxikus limfocita deficiencia miatt megvizsgáltuk a leukocita funkciót is egy egyszerű és gyorsan alkalmazható teszttel, a leukocita anti-szedimentációs rátával (LAR)<sup>20,21</sup>. A LAR a We csőben egy óra alatt felfelé vándorló leukocyták aránya, mely arányos a leukocyták aktivációjával, adhéziós tulajdonságaival<sup>22-24</sup>. Negyvenkilenc betegek és 61 kontrollt vizsgáltunk, a betegektől 6 órán belül elemeztünk LAR-t, majd 24 és 72 óra múlva. Két akut ischemias csoportot különítettünk el, a definitív stroke-ot (n=38) és a tranzienst ischemiat, amelyben a tünetek 24 órán belül megszűnnek, és a képalkotó vizsgálatok akut infarktust nem jeleznek (n=11). Hat órán belül a LAR szignifikánsan emelkedett volt TIA-ban és akut ischemias stroke-ban. Szignifikáns eltérés volt a TIA és stroke között is, és mindkettőben a LAR fokozatos emelkedését észleltük. Hasonló emelkedés volt azokban az esetekben is, ahol a post-stroke infekcióban szenvedő betegeket kizártuk, tehát nem a későbbi infekció volt felelős a LAR emelkedésért. (16. ábra).

16. ábra



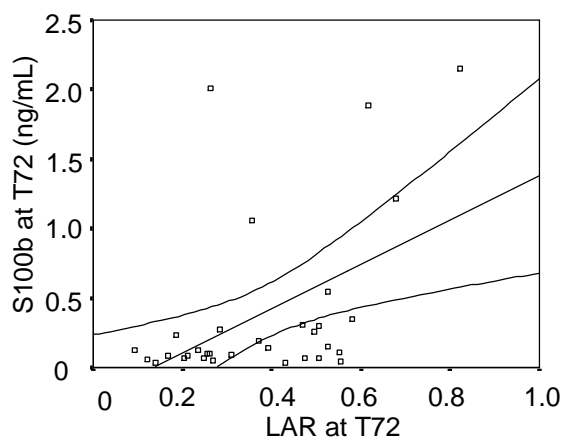
Majd megvizsgáltuk, hogy a LAR emelkedése változik-e azokban a betegeknél, ahol post-stroke infekció alakult ki a későbbiekben. Azt észleltük, hogy a stroke-ot követő 24 óra múlva a LAR szignifikánsan alacsonyabb azokban, akiknél infekció alakul ki a későbbiekben, és 72 óránál is alacsonyabbak az értékek. Vagyis a LAR emelkedésének deficienciája, kevesebb mint 25,6 LAR 24 óránál 81,5 % szenzitivitással és 60 % specifitással jelzi a post-stroke infekcióra való kockázatot (ROC analízis) (17. ábra).

17. ábra



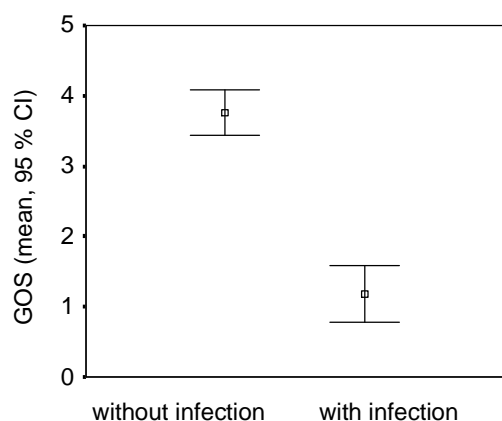
Azt is megvizsgáltuk, hogy a LAR emelkedése, vagyis a leukocita aktiváció összefügg-e a stroke kiterjedésével. Emiatt a vérekből meghatároztuk az S100b szintet, mely a stroke kiterjedésével korrelál<sup>25,26</sup>. A 3. napon mért LAR pozitívan korrelált az S100b mértékével (18. ábra).

18. ábra



**Összefoglalva**, az akut ischemias stroke-ban az infarktus méretétől függően (TIA vs definitív stroke és S100b mérések) leukocita aktiváció zajlik. Az aktiváció deficienciája post-stroke infekcióra, és ezzel összefüggésben rosszabb kimenetelre hajlamosít, melyet a kimeneteli skála értékek (Glasgow Outcome Scale, GOS) is tükröznek (**19. ábra**).

19. ábra



Az adatokat közlésre benyújtottuk (*Eur J Clin Invest*).

Stroke adataink tehát azt jelzik, hogy akut leukocita aktiváció zajlik néhány órán belül, mely a stroke első napjaiban egyre kifejezettebb. Azonban ezzel egyidőben limfocita alcsoportok gyulladáskeltő funkciója szupprimált, mely a stroke-ot követő 3. napra normalizálódik. A korai leukocita aktiváció deficitje a stroke-ot követő infekciókra hajlamosít. Feltehetően a szupprimált limfocita funkció normalizálódásának deficitje is hozzájárulhat a post-stroke infekciók kialakulásához.

## 7. Genetikai vizsgálatok

Fenti kísérletek mellett az elmúlt három év alatt több vizsgálatot végeztünk az OTKA támogatásával, mely az autoimmun betegségek, elsősorban sclerosis multiplex és myasthenia gravis genetikai hátterét vizsgálta genomikai és funkcionális genomikai vizsgálatokkal.

### 1. Génbankok

Közel 300 SM betegtől izoláltunk DNS-t, és a betegek kétharmadában a HLA-DRB1\*1501 tipizálás is megtörtént. Az SM génbank mellett a betegek döntő részénél liquorbank is

rendelkezésre áll, és a betegek klinikai adatainak feldolgozása is megtörtént. Ötven betegnél részletes neuropszichológiai mérések történtek.

Kb. 160 myasthenia gravis betegről izoláltunk DNS-t, valamennyi betegnél megtörtént az anti-AchR, anti-titin ellenanyag meghatározás a szérumból, és 40 szeronegatív betegnél anti-MuSK meghatározás is történt. A betegek klinikai adatait feldolgoztuk.

## 2. Ctla-4 polimorfizmus és funkcionális összefüggések sclerosis multiplexben<sup>27</sup>

A Tübingeni Egyetemen kollaborációban az SM bank felhasználásával befejeztünk egy sclerosis multiplex-szel kapcsolatos *Ctla-4* polimorfizmus vizsgálatot. A hazai minták PCR analízise klinikánkon történt. Közel 700 betegnél, magyar, német és lengyel populációban elemeztük a *Ctla-4* gén két polimorfizmusát kollaborációban, DRB1\*1501 pozitivitás, valamint klinikai adatok vonatkozásában is. Az adatok elemzését a nemzeti populációkra külön, valamint metanalízisben is elvégeztük.

## 3. IL-23R polimorfizmus vizsgálata sclerosis multiplexben<sup>28</sup>

DNS bankunk felhasználásával a PTE Humángenetikai Intézetével kollaborációban az IL-23R nemrég leírt polimorfizmusát teszteltük relapszáló-remittáló és szekunder progresszív SM-ben.

## 4. Monozigóta ikerpárok T sejtjeinek génexpressziós vizsgálata sclerosis multiplexben<sup>29</sup>

A Japán Országos Neuroscience Központtal kollaborációban SM-re konkordáns és diszkordáns monozigóta ikerpárok T sejtjeit izoláltuk, majd génexpressziós vizsgálatot végeztünk útvonalelemzéssel.

## 5. Myasthenia gravis (MG) polimorfizmus

A Tübingeni Egyetemen kollaborációban zajlanak MG asszociációs vizsgálatok.

## **8. Esettanulmányok**

Az elmúlt 3 évben számos neurológiai és neuroimmunológiai esettanulmány került publikálásra az OTKA támogatásával. Az esetek egy részében kísérletes vizsgálatok (genetika, immunológia, funkcionális MRI és voxel-based agyi morfometria) történtek ritka kórképekben<sup>30-42</sup>.

## **A MÉG NEM KÖZÖLT, DE KÖZLÉSRE LEADOTT ÉS KÉZIRATBAN ELŐKÉSZÍTETT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA:**

1. Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaci T, Pal J, Banati M, Javorhazi A, Szekeres-Bartho J, Szereday L, Illes Z. Human kidney and brain tumors are infiltrated by mucosal-associated invariant T cells. (*benyújtott: Am J Pathol, lásd absztraktokat és beszámolót*)
2. 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. (*benyújtott: Eur J Clin Invest, lásd absztraktokat és beszámolót*)
3. Szots M, Szomor A, Kover F, Pajor L, Komoly S, Kalman E, Gomori E, Illes Z. Intravascular lymphoma of the nervous system. (*benyújtott: J Neurol, lásd absztraktot*)
4. Peterfalvi A, Molnar T, Pusch G, Szapary L, Szereday L, Komoly S, Illes Z. Early suppression of pro-inflammatory and cytotoxic T cell functions after ischemic stroke. (*kézirat előkészítve, lásd absztraktokat és beszámolót*)
5. 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. (*kézirat előkészítve, lásd absztraktot*)
6. Rozsa C, Vincent A, Lang B, Aranyi Z, Kovacs GG, Komoly S, Illes Z. Paraneoplastic chronic demyelinating polyneuropathy and Lambert-Eaton myasthenic syndrome associated with multiple anti-neural antibodies and small-cell lung cancer. (*kézirat előkészítve*)

7. Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Increased level of C-reactive protein (CRP) at onset of acute ischemic stroke correlates with leukocyte antisedimentation representing activation of leukocytes. (*kézirat előkészítés alatt, lásd absztraktot*)
8. Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Etiology of post-stroke infections: immunodepression or iatrogenic infection? (*kézirat előkészítés alatt*)
9. Banati M, Illes Z. Invariáns T sejt receptort expresszáló T sejtek idegrendszeri betegségekben. (*kézirat előkészítés alatt*).

## IRODALOM:

1. Illes Z., Kondo T, Yokoyama K, Ohashi T, Tabira T, Yamamura T: Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol*, 2000, 164:4375-4381
2. Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaci T, Pal J, Szereday L, Illes Z. Brain and kidney tumors are differentially infiltrated by subsets of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. 17<sup>th</sup> Meeting of the European Neurological Societies, Rhodes, Greece, 2007. június 16-20. *J Neurol*, 2007, 254 (Suppl 3):III/77.
3. Peterfalvi A, Gomori E, Magyarlaci T, Pal J, Szereday L, Illes Z. Brain and kidney tumors are differentially infiltrated by subsets of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. 29<sup>th</sup> International Danube Symposium, Würzburg, Germany, 2007. Június 2-5. *J Neurol Transm*, 2007, 114:CXXXI.
4. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticaty P, Gilfillan S, Lantz O: Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, 2003, 422:164-169
5. Illes Z., Shimamura M, Newcombe J, Oka N, Yamamura T: Accumulation of Valpha7.2-Jalpha33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int Immunol*, 2003, 16:223-230
6. Yamamura T, Sakuishi K, Illes Z., Miyake S. Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. *J Neuroimmunol*, 2007, 191:8-15
7. Illes Z. Va7.2-Ja33 NKT cells accumulate in multiple sclerosis lesions in contrast to a deficiency of Va24-JaQ NKT cells. The immuno-regulatory role of natural killer T cells in inflammatory disease. Edited by Croxford JL. Fort PO, Kerala, Research Signpost, 2005, pp.143-158
8. Prussin C, Foster B: TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol*, 1998, 159:5862-5870
9. Treiner E, Duban L, Moura IC, Hansen T, Gilfillan S, Lantz O: Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells: an evolutionarily conserved T cell subset. *Microbes and Infection*, 2005, 7:552-559
10. Miley MJ, Truscott SM, Yu YY, Gilfillan S, Fremont DH, Hansen TH, Lybarger L: Biochemical features of the MHC-related protein 1 consistent with an immunological function. *J Immunol*, 2003, 170:6090-6098
11. Shimamura M, Huang Y-Y: Presence of a novel subset of NKT cells bearing an invariant V(alpha)19.1-J(alpha)26 TCR alpha chain. *FEBS Letters*, 2002, 516:97-100
12. Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S: MR1-restricted V alpha 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol*, 2006, 176:1618-1627
13. Wilson SB, Delovitch TL: Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3:211-222

14. Han M, Harrison L, Kehn P, Stevenson K, Currier J, Robinson MA: Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T cells. *J Immunol*, 1999, 163:301-311
15. Illes Z, Kondo T, Yokoyama K, Ohashi T, Tabira T, Yamamura T. Identification of autoimmune T cells among in vivo expanded CD25+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*. 1999, 162:1811-7.
16. Antel, J.P., E. McCrea, U. Ladiwala, Y. Qin, and B. Becher. 1998. Non-MHC-restricted cell-mediated lysis of human oligodendrocytes in vitro: relation with CD56 expression. *J Immunol* 160:1606-1611.
17. Aranami T, Miyake S, Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J Immunol*, 2006, 177:5659-5667.
18. Péterfalvi Á, Szereday L, Molnár T, Szapáry L, Pál J, Mikó É, Illes Z. Az adaptív immunválasz akut változásai ischemiás stroke-ban. A Magyar Stroke Társaság VIII. Konferenciája. Budapest, 2007. május 24-26. **II. díj, előadás**
19. Péterfalvi Á, Illes Z. Az adaptív immunválasz akut változásai ischemiás stroke-ban. Neurobiológus Doktoranduszok Fóruma, Pécs, 2007. november 16. **III. díj, előadás**
20. 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. 29<sup>th</sup> International Danube Symposium, Würzburg, Germany, 2007. Június 2-5. *J Neurol Transm*, 2007, 114:CXXIV.
21. 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. 29<sup>th</sup> International Danube Symposium, Würzburg, Germany, 2007. Június 2-5. *J Neurol Transm*, 2007, 114:CXXIV.
22. Bogar L, Horvath JA, Tekeres M. Leucocyte motion during gravity sedimentation of whole blood. In *Advances in Critical Care Testing. The 1996 IFCC-AVL Award*. Edited by: List WF, Müller MM, McQueen MJ. New York: Springer; 1997:13-19.
23. Bogar L, Tekeres M. Leukocyte flotation during gravity sedimentation of the whole blood. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2000;22:29-33.
24. Bogar L, Tarsoly P, Jakso P: Characteristics of light and heavy polymorphonuclear leukocytes. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2002;27:149-153.
25. Abraha HD, Butterworth RJ, Bath PMW, Wassif WS, Garthwaite J, Sherwood RA. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem*. 1997;34:366-370.
26. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1998, 29:730.
27. Greve B, Simonenko R, Illes Z, Peterfalvi A, Mycko MP, Rozsa C, Selmaj KW, Bauer P, Berger K, Weissert R.. Multiple sclerosis and the putative autoimmunity SNP CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland. *Mult Scler*, 2007. Oct. 17. Epub ahead of print
28. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, Magyar L, Farago B, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Meleg B. IL23R 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett*, 2008, 431:36-38.
29. 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, 422:30-33.
30. Feldmann A, Trauninger A, Toth L, Kotek G, Kosztolanyi P, Illes E, Pfund Z, Komoly S, Nagy F, Illes Z. Atrophy and decreased activation of fronto-parietal attention areas contribute to higher visual dysfunction in posterior cortical atrophy. *Psychiatry Res: Neuroimaging*, 2008, elfogadva
31. Feldmann A, Illes Z, Kosztolanyi P, Illes E, Mike A, Kover F, Kovacs N, Nagy F. Morphometric changes of gray matter in Parkinson's disease with depression: A voxel-based morphometry study. *Muscle Nerve*, 2007, elfogadva

32. Aschermann Z, Gomori E, Kovacs GG, Pal E, Simon G, Komoly S, Marodi L, Illes Z. X-linked hyper-IgM syndrome associated with a rapid course of multifocal leukoencephalopathy. Arch Neurol, 2007, 64:273-276
33. Illes Z., Vincent A, Kovacs GG, Merkli H, Tordai A, Komoly S, Nagy F. Acquired neuromyotonia precipitated by thyroid-surgery and associated with anti-acetylcholine receptor antibodies. Eur Neurol, 2006, 55:222-224.
34. Aschermann Z, Szalay F, Komoly S, Illes Z. Persistent akinetic-rigid side effects of neuroleptics may indicate Wilson's disease. Ideggy Szle, 2007, 60:404-405
35. Merkli H, Várdi Visy K, Kunos László, Horváth R, Komoly S, Illes Z. Késői kezdetű Pompe-betegség diagnosztikája és kezelése pulmonológus és neurológus együttműködésével a biotechnológia keretei között. Tüdőgyógyászat, 2007, 1:23-26
36. Pál E, Aschermann Z, Gömöri É, Kovács G, Simon G, Maródi L, Komoly S, Illes Z. Progresszív multifocalis leukoencephalopathia. Ideggy Szle, 2007, 60:263-268
37. Mike A, Gaál V, Németh , Kövér F, Komoly S, Illes Z. Susac szindróma: egy ritka interdiszciplináris kórkép neurológiai, pszichiátriai, szemészeti, fül-orr-gégészeti és neuroradiológiai vonatkozásai. Orv Hetil, 2007, 148:897-905
38. Szóts M, Bors L, Kálmán E, Szapáry L, Illes Z. Intravascularis lymphomatosis: egy ritka kórkép diagnosztikai nehézségei. Orv Hetil, 2007, 148:749-752
39. Merkli H, Pál E, Nagy F, Horváth R, Várdi Visy K, Komoly S, Illes Z. Légzésvisszajáró myopathia: diagnosztikai nehézségek egy felnőttkori Pompe-eset kapcsán. Orv Hetil, 2006, 147:1421-1424
40. Kovács N, Balás I, Illes Z., Kellényi L, Nagy F. A tremorometria szerepe az ablatív műtétek eredményességének előrejelzésében. Ideggy Szle, 2006, 59:438-440.
41. Merkli H, Nagy F, Pál E, Gáti I, Kovács N, Komoly S, Illes Z. Amyotrophias lateralsclerosis Baranya megyében az elmúlt 54 év tükrében. Ideggy Szle, 2006, 59:406-408.
42. Illes Z. A humán prion betegségek. Infekció és infektológia. 2006, 3:146-152.