



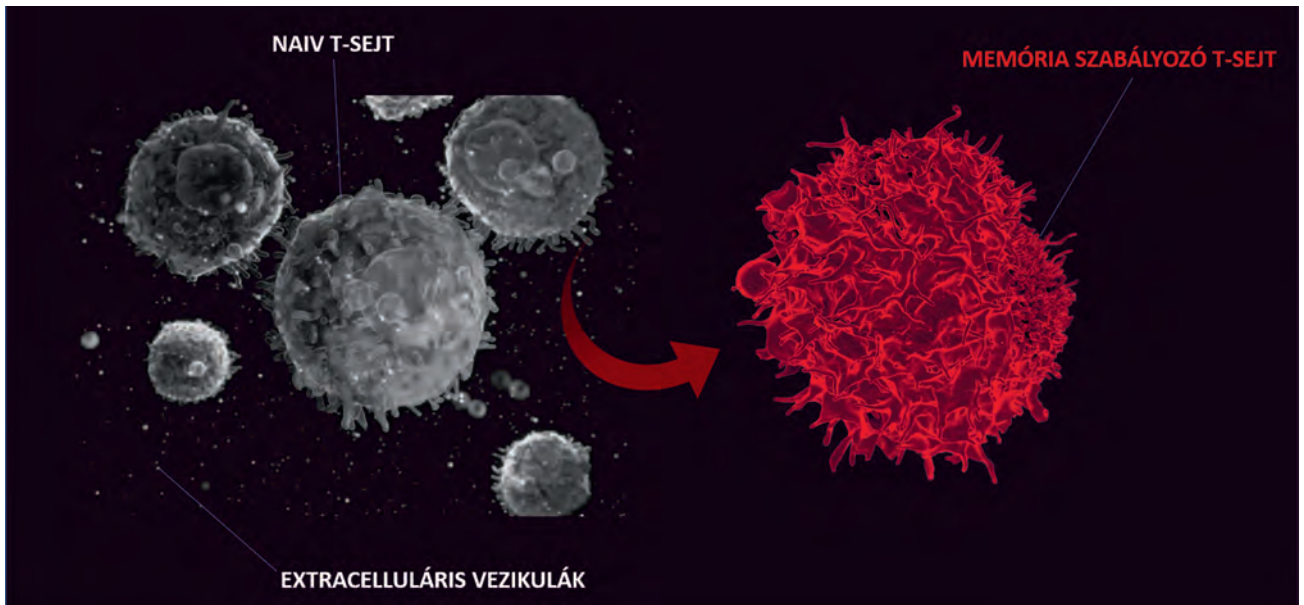
A SZABÁLYOZÓ T-SEJTEKET MEGHATÁROZÓ HSPE1, AZAZ A VÁRANDÓSSÁG SORSDÖNTŐ GÉNJE

A terhesség titkos sorsának felderítése

Létezésünk előfeltétele a nemzedékek közötti folyamatosság biztosítása. A folyamatosság alappillére a sikeres várandósság, ám napjainkban az egyre növekvő tendenciát mutató meddőségi arányban Magyarország is csatlakozik a nyugati és északi fejlett államokhoz. Jelenleg a humán megtermékenyített petesejtek több mint feléből nem születik egészséges újszülött. Az anyaméhben fejlődő magzat félig apai eredetű, ennek értelmében az anyai immunrendszernek létfontosságú feladata felismerni a félidegen magzatot és toleranciát kialakítani a magzattal szemben. Az esetek túlnyomó részében az anyai immunrendszer részéről a magzat iránt nem alakul ki vagy megbomlik a toleranciaegyensúly, ez mind a magzat, mind az anya szempontjából súlyos következményekkel járhat.

A félidegen magzat egy egyedi elfogadást erősítő válasza készíteti az anyai immunrendszert. A terhesség a természet egyik legszebb és legösszetettebb jelensége, mely eredményeként új élet születik. A szinte tökéletes alkalmazkodást számos mechanizmus biztosítja. A várandós immunrendszerének egy olyan új egyensúlyi állapotot kell teremteni, ami sajátosan felismeri és tolerálja a magzati antigéneket, és ezzel párhuzamosan fenntartja a megfelelő, úgynevezett immunkészleteti állapotot, amely egy esetleges fertőzés

vagy kórokozó behatolásakor hatékony védekezést eredményez. Az evolúció során több mechanizmus is kialakult a magzat iránti tolerancia létrehozásához és fenntartásához. Az egyik legkiemelkedőbb mechanizmus a magzati specifitással rendelkező anyai szabályozó T-sejtek (T_{reg}) kialakulása. Az anyai immunrendszer toleranciaegyensúlyának beállításáért elsősorban a T_{reg} -sejtek felelősek. Amennyiben az immuntolerancia nem bontakozik ki teljességében, már a beágyazódás vagy az azt követő első hetekben



1. ábra. Méhlepény (trophoblast) eredetű extracelluláris vezikula milió szerepet játszik a naiv T-sejtek szabályozó T-sejteké váló differenciációjában (átalakulásában)

a terhesség véget ér. Ha a kialakuló immuntolerancia egyensúlyi állapota felborul, az általában vetéléshez vezet. A T_{reg} -sejtek nem megfelelő működésbeli vagy számbeli negatív változásuk döntően meghatározza a terhesség kimenetelét: spontán, ismétlődő vetélést, koraszülést vagy preeklampsziát (terhességi magasvérnyomás és fehérjevizelés szindróma) okozva. A koraszülés hátterében leggyakrabban a preeklampszia áll. Preeklampsziában az anyai méhben lévő spirális erek átalakulása tökéletlenül zajlik, azaz a magas ellenállású, kis átmérővel rendelkező erek fala nem alakul át alacsony ellenállással és megnövekedett átmérővel jellemezhető spirálisér-szerkezetté. A preeklampsziás várandósságokból született magzatok születési súlya jelentősen alacsonyabb. A terhességi kornak megfelelő alacsony születési súly megnöveli a későbbi életkorban a 2-es típusú cukorbetegség, metabolikus szindróma és a kardiovaszkuláris kockázatot is. Továbbá az anyai oldalt vizsgálva a preeklampszia anyai erek endotél rétegének károsítása révén a hosszútávú anyai kardiovaszkuláris rizikót is igen megemelik. A folyamat molekuláris mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de feltételezhető, hogy a T_{reg} -sejtek kiemelkedő szerepet játszanak.

A karmesterként működő T_{reg} -sejtek a méhlepényben folyamatosan szabályozzák valamennyi anyai immunsejt működését. A szabályozás mechanizmusa sokrétű: a T_{reg} -sejtek felszínén gátló molekulákat találunk (pl. CTLA-4), amelyek fékezik a magzatra káros hatású immunsejtek aktiválódását (például természetes ölősejtek, B-sejtek). Továbbá a T_{reg} -sejtek olyan gátló molekulákat

bocsátanak ki a méhlepénybe, amelyek az immuntoleranciának, azaz elfogadó környezetnek kedveznek (pl. IL-10, IL-35, TGF- β 1). Az anyai-magzati határfelületen lévő T_{reg} -sejtek a T-sejt túlélési faktort (IL-2) nagyobb érzékenységgel kötik meg, mintegy „megvonják” a többi T-sejttől, ezzel is kiváltják a magzatra káros hatású (pl. citotoxikus T-sejtek) sejtek számának jelentős csökkenését. A T_{reg} -sejtek közvetlenül is kapcsolatba lépnek más immunsejtekkel, meggátolva a végrehajtó T-sejtek működését a méhlepény szintjén.

Egyelőre nem tisztázott, hogy pontosan milyen molekuláris folyamatláncnak köszönhető a megváltozott immunműködést biztosító anyai T_{reg} -sejtek kialakulása, számuknak a fenntartása és altípusainak működésbeli jelentősége. Az eddigi tudományos kutatások eredményei arra utalnak, hogy a méhlepényben található naiv (ún. differenciálódásra alkalmas) T-sejtekből alakulnak ki. A méhlepényben a magzati eredetű trophoblast sejtek közvetlen kapcsolatban állnak az anyai véredényekkel és jellemzőjük, hogy interleukin 6 (IL-6) molekula termelése révén differenciáltásra készítetik a méhlepényben lévő anyai nyugvó T-sejteket. Az, hogy milyen irányba differenciálódnak a T-sejtek számos tényezőtől függhet. Hipotézisünk alapján a magzati trophoblast sejtek által kibocsátott extracelluláris vezikulák (EV) felelősek a T_{reg} -sejt irányú differenciáció meghatározásában. A trophoblast sejtek nagy számban kibocsátanak az anyai keringésbe EV-eket, azaz sejtmembránnal körülvett hólyagokat, amelyek belsejükben (vagy a vezikula membránjában) szelektíven beválasztott fehérjéket

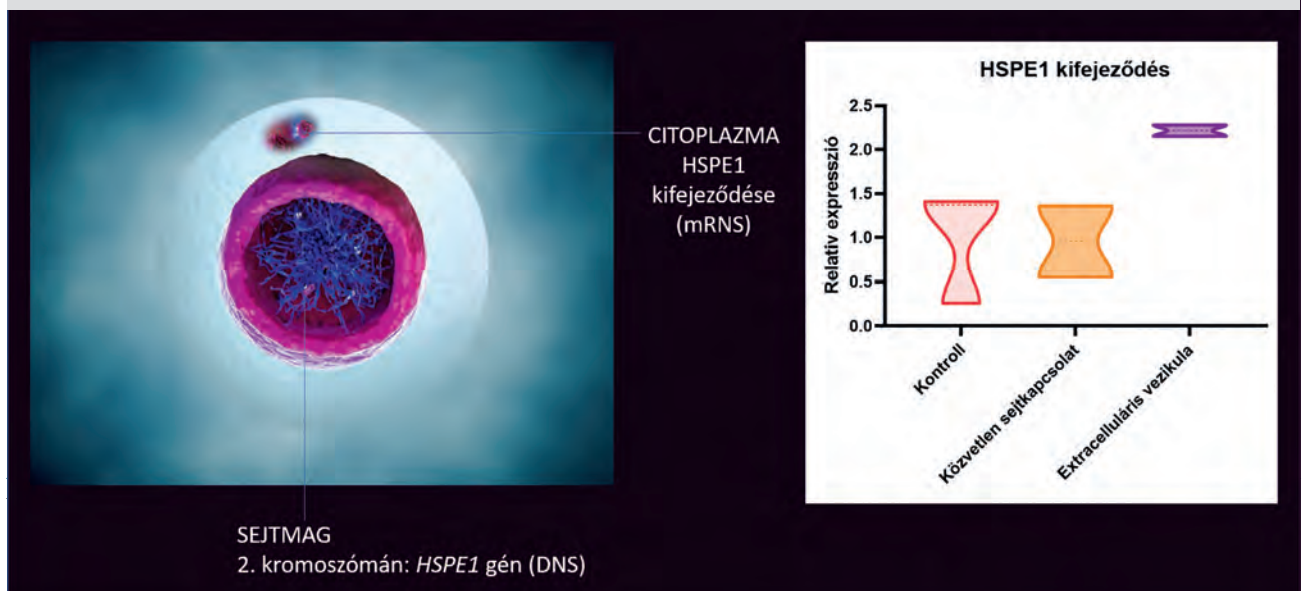
és nukleinsavakat tartalmaznak. A kibocsátott vezikulákat vizsgálva azt találtuk, hogy sajátos üzeneteket (HSPE1 fehérjét és IL-6 jelátviteli útvonalat meghatározó mikroRNS-eket) tartalmaznak a célsejtek számára, melyekkel befolyásolják a célsejtek jelátviteli útvonalait és génkifejeződési mintázatát. Új generációs szekvenálással feltártuk a trophoblast sejtvonalból származó vezikulák mikroRNS mintázatát. Bioinformatikai célgén és koexpressziós hálózatanalízisünk alátámasztja kísérletes rendszerünkben azonosított IL-6 receptorra hatnak, amelyben 21 IL-6 receptor expresszióra ható mikroRNS-t azonosítottunk a vezikuláris mintákban. Az azonosított mikroRNS-k a célsejtbe jutva, célzottan hozzákötődnek komplementaritás alapján az *IL6ST* és *ERAP1* génekről átíródott hírvívó RNS molekulákhoz, és meggátolják az IL-6 receptor fehérjévé átíródását. A trophoblast-eredetű vezikulák fő célsejtjeiként a T-sejteket és monocita sejteket azonosítottunk.

A Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében végzett kutatásaink eredményei azt mutatják, hogy a trophoblast eredetű EV-k főként a sejten belüli IL-6 jelátviteli útvonal kulcselemeire hatnak. Az EV-k fehérjetartalmának vizsgálata során a T_{reg} -sejtek kialakulási útvonalában potenciálisan igen jelentős, kis méretű hősokk-fehérjét (HSPE1) azonosítottunk tömegspektrometriával. A fehérje jelenlétét áramlási citometriával is kimutattuk úgy a vezikulák belsejében, mint a vezikuláris felszínen. A *HSPE1* fehérjét a *HSPE1* gén kódolja, amely a 2. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. A fokozott *HSPE1* génavivódás következményeként nagyobb mennyiségű *HSPE1* hírvívó RNS termék képződik a sejtmagban, amely a citoplazmába jut. A citoplazmában az RNS molekula alapján fehérjévé íródik át. A sejten belül a fehérje fő szerepe más fehérjék megfelelő térbeli szerkezetének kialakításának segítése, főként sejt-stressz alatt. A *HSPE1* evolúciósan igen konzervált fehérje, és a megtermékenyítést követő 6-48 órában kimutatható az anyai szervezetben.

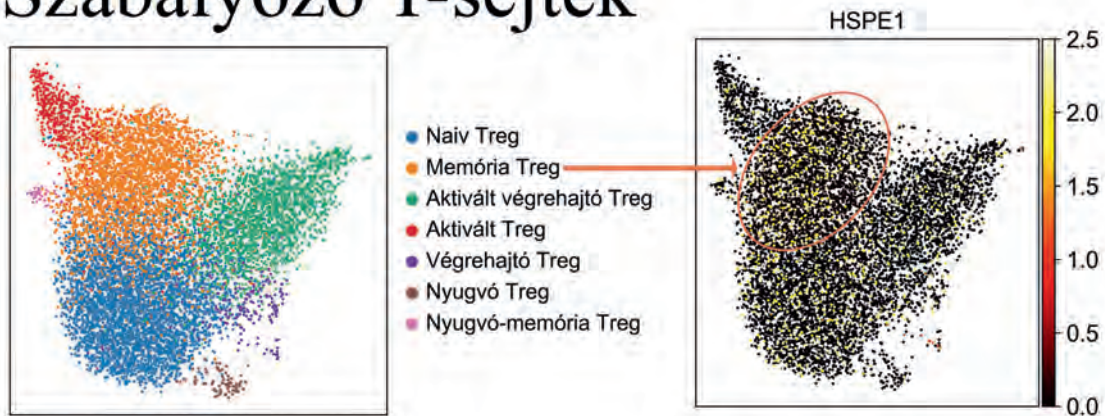
Ugyanakkor művi vetélést követően 6-24 óra elteltével a *HSPE1* fehérje jelenléte már nem mutatható ki. A keringő *HSPE1* szintje, tehát igen szoros összefüggést mutat a várandóssággal. Jelenlegi kutatásainkat *HSPE1* fehérje és a várandósságra jellegzetes T_{reg} -sejtek száma és működése közötti összefüggés felderítésére fókuszáljuk. Trophoblast (BeWo) sejtvonalból a CRISPR-Cas9 molekuláris ollóval kikapcsoltuk a *HSPE1* gént. A *HSPE1* módosított BeWo sejtvonalból izolált EV-k hatását vizsgáljuk a T-sejtekre: hogyan változik a differenciálódásuk és a T_{reg} -sejt alcsoportok megoszlása. A kialakult T_{reg} -sejtek működését RNS szinten valós idejű PCR-rel, illetve a sejtek komplex mozgását (mekkora távot tesznek meg, milyen sebességgel és milyen irányítottsággal) holomikroszkóppal vizsgáljuk. A T_{reg} -sejtek altípusainak meghatározását és kiválasztását áramlási citométerrel és sejtszorterrel végezzük.

A *HSPE1* gén kifejeződése a keringő fehérvérsejtekben IL-6 jelenlétében trophoblast sejtekkel való közvetlen kapcsolat esetén nem változik. Azonban, ha a trophoblast sejtek által kibocsátott EV-kel kezeljük a fehérvérsejteket a *HSPE1* gén kifejeződése igen megemelkedik. A trophoblast-eredetű EV-k következképpen képesek a sejtmagban lévő *HSPE1* gént aktiválni, amelynek eredményeként a *HSPE1* fehérje szintje megnő. A folyamatot végigkövetve azt látjuk: *HSPE1* fehérje kiinduló pontja lehet annak a molekuláris folyamatláncnak, amely elindítja és biológiai körként fenntartja a T_{reg} -sejtek számát és szerepet játszhat a működésileg igen jelentős memória T_{reg} -sejtek kialakulásában, tehát minden bizonnyal kulcsfontosságú az anya és a magzat közötti toleranciaegyensúly kialakításában. Továbbá kísérletes rendszerben kimutattuk, hogy az IL-6 jelenlétében a trophoblast eredetű EV-k szabályozó T-sejtek kialakulását váltják ki a keringő naiv T-sejtekből, tovább erősítve azt a feltételezést, hogy az anyai toleráns immunválasz kialakításában a magzati eredetű szabályozás kiemelkedően fontos.

2. ábra. Trophoblast eredetű extracelluláris vezikulák fokozzák a célsejtekben (naiv T-sejt) a *HSPE1* expressziót



Szabályozó T-sejtek



3. ábra. A szabályozó T-sejteken belül 7 alcsoport különíthető el, ezen belül a memória alcsoportban a legmagasabb a *HSPE1* kifejeződés

Jelenleg a *HSPE1* fehérjét kódoló gén működését vizsgáljuk szabályozó és naiv T-sejtekben ún. egy-sejt transzkriptomikai módszerrel. A módszer újdonsága az, hogy minden vizsgálandó sejthez hozzárendelünk egy-egy egyedi azonosítót, így amikor a génkifejeződést elemezzük (RNS vagy fehérje szinten) minden egyes sejtben külön láthatjuk a kérdéses gén működését. Ez a módszer lehetővé teszi a szabályozó T-sejtek igen érzékeny osztályozását, működésbeli meghatározást és ennek következtében a funkcionális altípusok elkülönítését.

A memória T_{reg} -sejtek azonosítása és a *HSPE1* fehérjével való kapcsolatvizsgálata azért is igen érdekes, mert a várandósságot követően a T_{reg} -sejtek száma lecsökken, de a memória-altípus megmarad, akár évtizedeken át. Egy esetleges következő várandósság kapcsán a memória T_{reg} -sejtek igen gyorsan aktiválódnak és hatékony toleráns mikro-környezet kialakulásnak kedveznek. Számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre, amely alátámasztja, hogy az első várandósságot követő terhességekben (amennyiben az édesapa ugyanaz) az immuntoleranciával kapcsolatos terhesség-specifikus kórképek (pl. preeklampszia, koraszülés) előfordulása nagymértékben csökken. Ezen utóbbi megfigyelés megerősíti a memória T_{reg} -sejtek kérdésének kutatási létjogosultságát.

A preeklampszia korai diagnózisára a mai napig nincs megbízható módszer vagy marker, illetve specifikus kezelés sem áll rendelkezésünkre. A terhességi magas vérnyomásban érintett várandós nőknél a terhesség befejeztével a preeklampsziás tünetek elmúlnak, de a hosszú távú szívérrendszeri megbetegedések kockázata számottevően megnő úgy az édesanya, mint az újszülött számára. Már a terhesség első szakaszában a keringő memória T_{reg} sejtek részletesebb elemzése, *HSPE1* sejten belüli szintjének mérése, vagy a keringő trophoblast eredetű vezikulák *HSPE1* jelenléte korai

markerként szolgálhat a megfelelő vagy a megváltozott immuntolerancia egyensúly állapotáról. A terhességi immunfolyamatok egyre részletesebb megismerése biztosíthatja azt a szilárd kutatási alapot, amelyre gyógyszer-célpontok tervezhetők a jövőben a terhesség-specifikus kórképek megelőzésére/kezelésére és a meddség arányának javítására.

KOVÁCS ÁRPÁD FERENC

IRODALOM

- Athanasas-Platsis, S., Somodevilla-Torres, M. J., Morton, H., & Cavanaugh, A. C. (2004). Investigation of the immunocompetent cells that bind early pregnancy factor and preliminary studies of the early pregnancy factor target molecule. *Immunology & Cell Biology*, 82(4), 361–369. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01260.x>
- Chen, Q., Zhu, X., Chen, R., Liu, J., Liu, P., Hu, A., ... Yuan, H. (2016). Early Pregnancy Factor Enhances the Generation and Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 240(3), 215–220. <https://doi.org/10.1620/tjem.240.215>
- Kovács, Á.F.; Fekete, N.; Turiák, L.; Ács, A.; Kóhidai, L.; Buzás, E.I.; Pállinger, É. Unravelling the Role of Trophoblastic-Derived Extracellular Vesicles in Regulatory T Cell Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3457.
- Kovács, Á. F., Láng, O., Turiák, L., Ács, A., Kóhidai, L., Fekete, N., ... Pállinger, É. (2018). The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. *Scientific Reports*, 8(1), 5426. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23706-7>
- Li, M. O., & Rudensky, A. Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.26>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Rosenblum, M. D., Way, S. S., & Abbas, A. K. (2016). Regulatory T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 90–101. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.1>
- Vento-Tormo, R., Efremova, M., Botting, R. A., Turco, M. Y., Vento-Tormo, M., Meyer, K. B., ... Teichmann, S. A. (2018). Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature*, 563(7731), 347–353. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0698-6>
- Zemmour, D., Zilionis, R., Kiner, E., Klein, A. M., Mathis, D., & Benoist, C. (2018). Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR. *Nature Immunology*, 19(3), 291–301. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0051-0>