

PhD TÉZISEK

Regulatórikus T-sejtek glukokortikoid hormon érzékenységének modell vizsgálata és eltérései szisztémás szklerózisban



Dr. Ugor Emese

PTE KK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Dr. Simon Diána, egyetemi adjunktus

Programvezető: Prof. Dr. Németh Péter, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Pécs

2017

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	8
2.1 A nyirokszervek felosztása	8
2.1.1 Centrális nyirokszervek.....	8
2.1.2 Perifériás nyirokszervek.....	9
2.2 T-sejt fejlődés.....	10
2.2.1 Az érés korai szakaszai	10
2.2.2 Az érés késői, szelekciós szakaszai.....	11
2.3 T-limfocita alcsoportok.....	13
2.4 Az immunológiai tolerancia.....	14
2.4.1 Centrális T-sejt tolerancia	14
2.4.2 Perifériás tolerancia.....	14
2.5 A regulatórikus T-sejtek (Treg)	15
2.6 Treg-ek szerepe egyes betegségekben.....	18
2.7 A glukokortikoid hormonok (GC)	21
2.8 Szisztémás szklerózis	24
2.8.1 Limitált cutan szisztémás szklerózis (lcSSc)	24
2.8.2 Diffúz cutan szisztémás szklerózis (dcSSc).....	24
2.8.3 Tünetek.....	24
2.8.4 Diagnosztika.....	27
2.8.5 Prognózis és betegség aktivitás megítélése	27
3. Célkitűzések	28
4. Anyagok és módszerek	29
4.1 Treg-ek vizsgálata egérmodellen	29
4.1.1 Kísérleti állatok	29
4.1.2 In vivo glukokortikoid kezelés.....	29
4.1.3 Antitestek és fluorochromok	29
4.1.4 Immunfluoreszcencia tímusz és lép metszeteken.....	30
4.1.5 Intracelluláris jelölés és áramlási citometria	30
4.1.6 RT-PCR.....	31
4.1.7 Statisztika	32
4.2 Treg-ek vizsgálata szisztémás szklerózisban	32
4.2.1 Betegek.....	32
4.2.2 Autonatitest mérés.....	33
4.2.3 A Treg alcsoportok áramlási citometriás azonosítása	33

4.2.4	Citokin mérés	34
4.2.5	Metiláció analízis és pirosekvenálás	34
4.2.6	Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)	36
4.2.7	Statisztika	36
5.	Eredmények.....	37
5.1	Treg-ek vizsgálata egérmodellen	37
5.1.1	Tímusz és lép szerkezetének változása GC-kezelés hatására.....	37
5.1.2	DX-kezelés hatása Treg sejtekre	38
5.1.3	Helios+ Treg-ek előfordulása.....	42
5.1.4	DX-kezelés hatása Treg sejtek citokin termelésére és Foxp3 expressziójára	43
5.1.5	DX-kezelés hatása a GR expresszióra.....	45
5.2	Treg-ek vizsgálata szisztémás szkerózisban	49
5.2.1	Treg-ek azonosítása humán mintákban	49
5.2.2	Emelkedett CD127-Treg arány csökkent IL-10 termeléssel dcSSc-ben	51
5.2.3	Emelkedett CD62L+Treg arány és csökkent TGF β termelés SSc-ben	54
5.2.4	CD4+CD25-Foxp3+ T-sejt gyakoriság.....	56
5.2.5	Emelkedett <i>FOXP3</i> génexpresszió aktív SSc-ben.....	57
5.2.6	Hipometilált CpG-k a <i>FOXP3</i> upstream enhancer régióban SSc-ben	59
6.	Összefoglalás és következtetések.....	60
6.1	Treg sejtek összetételének és glukokortikoid hormon érzékenységének vizsgálata egérmodellen.....	60
6.2	Treg sejtek összetételének és funkcióinak vizsgálata szisztémás szkerózisban.....	64
7.	Irodalomjegyzék.....	67
8.	Új eredmények összefoglalása	81
9.	Publikációs lista	82
10.	Köszönetnyilvánítás	85
11.	Mellékletek.....	86

1. Rövidítések jegyzéke

aAb- – autoantitest negatív

ACA – anti-centromer antitest

ACR – American College of Rheumatology

ACTH – adreno-corticotrop hormon

ANA – anti-nukleáris autoantitest

anti-SCL-70 – scleroderma és a 70 kD immunoreaktív fragmens rövidítéséből, másként anti-topoizomeráz I

APC – *allophycocyanin*

APC – antigén prezentáló sejt

BAL – bronchoalveoláris lavage

BSA – borjú szérum albumin

CD – cluster of differentiation

CNS – conserved non-coding sequence

CPH – ciklofoszfamid

CREB – cAMP response element binding protein

CRF – corticotrop releasing faktor

cTEC – kérgi tímusz hámsajt

CTRL – kontrol

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

dcSSc – diffúz cutan szisztémás szklerózis

DIC – differential interference contrast

D-MALT – diffúz mukóza asszociált limfoid szövet

DN – dupla negatív

DTH – késői típusú túlérzékenységi reakció

DX – dexametazon

EScSG – European Scleroderma Study Group

EULAR – European League Against Rheumatism

FACS – fluoreszcencia aktivált multiparaméteres celluláris analizátor és sejtszortírozó

FITC – fluoreszcein-izo-tiocianát

Foxp3 – Forkhead boks protein 3

FSC/SSC – forward scatter/side scatter

GC – glukokortikoid hormon

GR – glukokortikoid receptor

GRE – glukokortikoid válasz elem

HC – egészséges kontroll

HIV – humán immundeficiencia vírus

HRCT – nagy felbontású komputertomográfia

IBD – gyulladós bélbetegség

IL – interleukin

IPEX-szindróma – immundiszreguláció, poliendokrinopátia, enteropatia, X-kromoszómához kötött szindróma

IQR – interkvartilis terjedelem

lcSSc – limitált cutan szisztémás szklerózis

MALT – Mucosal Associated Lymphoid Tissue

MCP – metacarpophalangealis ízület

MFI – átlag fluoreszcencia intenzitás

MHC – Major Histocompatibility Complex

MRSS – Modified Rodnan Skin Score

mTEC – velői tímusz hámsejt

MZ – marginális zóna

NFκB – nukleáris faktor κB

tTreg – természetes regulátoros T-sejt

O-MALT - organizált mukóza asszociált limfoid szövet

PAH – pulmonális artériás hipertónia

PALS – Periarteriolar Lymphoid Sheat

PBMC – perifériás vér mononukleáris sejtek

PBS – foszfát-puffer fiziológias sóoldat

PE – fikoeritrin

PE-Cy5 – fikoeritrin-cychrom5

RORα – Retinoid-related orphan receptor alpha

RPM – egy percre eső fordulatok száma

RPMI – Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium

SEM – Közéérték közepes hibája

SLE – szisztémás lupus erythematosus

SM – szklerózis multiplex

SP – single positive, egyszeresen pozitív

SRC – szkleroderma renális krízis

SSc – szisztémás szklerózis

T_C – citotoxikus T-limfocita

TCR – T-sejt receptor

TGFβ – transforming growth factor beta

T_H – helper T-limfocita

TN – tripla negatív

TNF α – tumor nekrosis faktor α

Treg – regulatorikus T-sejt

Ts – szuppresszor T-sejt

tTreg – természetes regulatorikus T-sejt

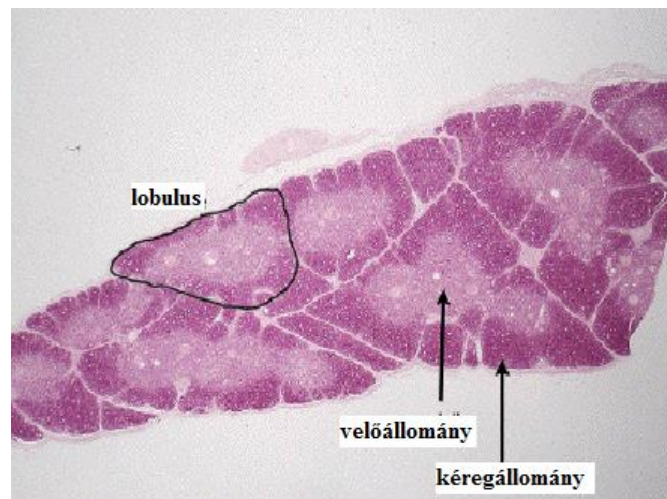
2. Bevezetés

2.1 A nyirokszervek felosztása

2.1.1 Centrális nyirokszervek

A **csontvelő** a csontok központi üregében helyezkedik el, melyben a vérerek közötti területeket nyúlványos retikulumsejtek, rácsrostok, makrofágok és zsírsejtek töltik ki. Ebben a szivacsos szerkezetű kötőszövetes vázban helyezkedik el nagyobb mezők, vagy kisebb szigetek formájában a haemopoetikus állomány. A csontvelői pluripotens őssejtből alakul ki a limfoid és a mieloid progenitor. A T-sejt előalakok a csontvelőt elhagyva a tímuszban folytatják érési folyamataikat, a B-sejtek a sejtfelszíni immunglobulinnal rendelkező alakban hagyják el a csontvelőt, az NK-sejtek egy része progenitorként lép ki, majd a periférián válik érett NK-sejtté, másik része pedig már végleges tulajdonságait elnyerve lép ki a csontvelőből^{1,2}.

A **tímusz** a 3. és 4. garattasakból fejlődik ki, az elülső-felső mediasztinumban helyezkedik el, két lebenyből épül fel. A lebenyeket alkotó lobulusok (lebenykék) kéreg- és velóállománnyal rendelkeznek. A kéregállományban főleg éretlen timociták és kéregállományi epitelsejtek (cTEC) találhatóak, míg a velóállomány érett timocitákat, velóállományi epitelsejteket (mTEC), dendritikus sejteket és makrofágokat tartalmaz.



1. ábra. A tímusz szöveti szerkezete

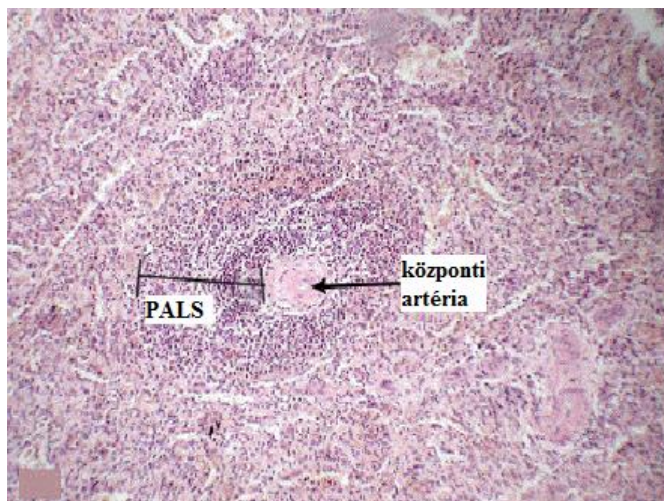
http://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab_6/lymphoid/DMS117/popup.html

Jellegzetes, csak a tímuszban megtalálható struktúra a hagymahéjszerű Hassal-test, mely feltehetően az elpusztult sejtek maradványaiból képződik. A tímusz a T-sejtek

differenciálódásának helye, ahová a T-limfocita progenitorok a véráram útján jutnak a csontvelőből és a kéreg-velő átmenet területén lépnek ki a perivaszkuláris térbe^{1,2}.

2.1.2 Perifériás nyirokszervek

A **lép** a hasüreg bal felső részében, a rekesz alatt elhelyezkedő intraperitoneális szerv. Fehér pulpáját a lép artériás rendszeréhez csatlakozó limfoid állomány képezi, mely a központi artéria körül lévő T-sejt dependens periarterioláris limfoid hüvelyből (PALS) és a hozzá asszociált nyiroktüszők halmazából áll. Az ún. Malpighi folliculusokban B-sejtek vannak többségben (megtalálhatók még a folliculáris dendritikus sejtek, T-sejtek és dendritikus sejtek). A marginális szinusz övező nyirokszövetben elhelyezkedő makrofágok és ún. marginális zóna (MZ) B-sejtek, kiemelt szereppel bírnak a vérben megjelenő antigének és kórokozók felismerésében. A vörös pulpa a sinusokból és a sinusok közti pulpa-kötegekből áll. A kötegekben lép-retikulumsejtek és makrofágok találhatóak, melyek az előregedett vörösvértesteket fagocitálják. Vérlemezek, granulociták, limfociták és plazmasejtek találhatóak még a vörös pulpában^{1,2}.



2. ábra. A lép szöveti szerkezete

http://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab_6/lymphoid/DMS122/popup.html

A **nyirokcsomók** a nyirokereken mentén helyezkednek el elszórtan, de például az ágyék, a hónalj és a hasüreg környékén csoportokban találhatóak. Morfológiailag három régió alkotja: kéregállomány (kortex), kéreg alatti állomány (parakortex) és a

velőállomány (medulla). A kortextben elhelyezkedő nyiroktüszőkben elsősorban B-sejtek találhatóak. A parakortex a nyirokcsomó T-sejt zónája. A medullában főleg makrofágok és plazmasejtek vannak.

A **mukóza asszociált limfoid szövet (MALT)** a nyálkahártya alatt, a lamina propria és a submucosa rétegében elhelyezkedő nyirokszövet, amely az emésztő-, légző- és urogenitális rendszert borító nyálkahártya védelmét szolgálja. Jelentőségét az adja, hogy a nyálkahártya a testfelszín legnagyobb antigénbehatólási felülete, ezzel számos megbetegedés kiindulópontja lehet. Felépítését tekintve beszélünk organizált-MALT-ról (O-MALT) – rendezett struktúrákba tömörülő nyirokszövet, mint például a Peyer-plakkok, a Waldeyer-gyűrű – melyben az antigének felismerése, antigénspecifikus limfociták aktivációja, valamint effektor és memória sejtekké alakulása zajlik, illetve diffúz-MALT-ról (D-MALT), mely a lamina propriában található „effektor szövet” memória sejtekkel, aktivált effektor T-sejtekkel és IgA termelő plazmasejtekkel ^{1,2}.

2.2 T-sejt fejlődés

2.2.1 Az érés korai szakaszai

A T-sejtek, hasonlóan a B-sejtekhez, csontvelői őssejtekből képződnek a közös limfoid progenitor sejtekből. A csontvelőből a tímuszba lépő pro-T-sejtek CD44- és CD117-expresszióval jellemezhetők. A CD44, mint tímuszspecifikus homing receptor szerepel. A CD117 az őssejtek növekedési faktorának receptora (C-kit receptor). Ezek mellett IL-2-receptor α -láncának (CD25) expressziójával jellemezhetők, amelynek megjelenésében a tímusz strómasejtek által termelt IL-1 α és a tumor nekrozis faktor α (TNF α) játszik szerepet. Ezek a sejtalakok már elkötelezettek a T-sejt-vonal irányba, de a T-sejt receptor (TCR) gének átrendeződése még nem indult meg bennük. E háromszorosan negatív sejtek (Triple Negative – TN timociták), amelyek sem TCR-t, sem CD4-CD8 koreceptorokat nem fejeznek ki, a tímusz tok alatti régiókban gyors, IL-7 függő osztódáson mennek át.

A tímusz kéregben, a korai pre-T-sejteken jelentősen csökken a CD44 és a CD117 markerek expressziója, de megtartják a sejtfelszíni CD25 receptort. Ebben az időszakban kezdődik el a TCR γ - és β -gének átrendeződése, és a pót- α -lánc sejtfelszíni

megjelenése (Double Negative – DN). A sikertelen génátrendeződés miatt ezen sejtek 70%-a nem jut el a késői pre-T-sejt szakaszig.

A késői pre-T-sejtek a sikeres β -lánc-átrendeződés eredményeként elveszítik a CD25-markert, és újra az élénk proliferációs képesség jellemző rájuk, melynek eredményeként ezek a sejtek jelentősen feldúsulnak. Ebben az érési állapotban történik az TCR α -gén átrendeződése. Ennek eredményeként a pót- α -láncot tartalmazó receptor mellett megjelenik, majd teljesen felváltja azt az $\alpha\beta$ -láncokból álló TCR. Ezt az érési állapotot mindkét koreceptor együttes megjelenése jellemzi. Ezek a CD4/CD8 dupla pozitív (DP), de még éretlen timociták²⁻⁴.

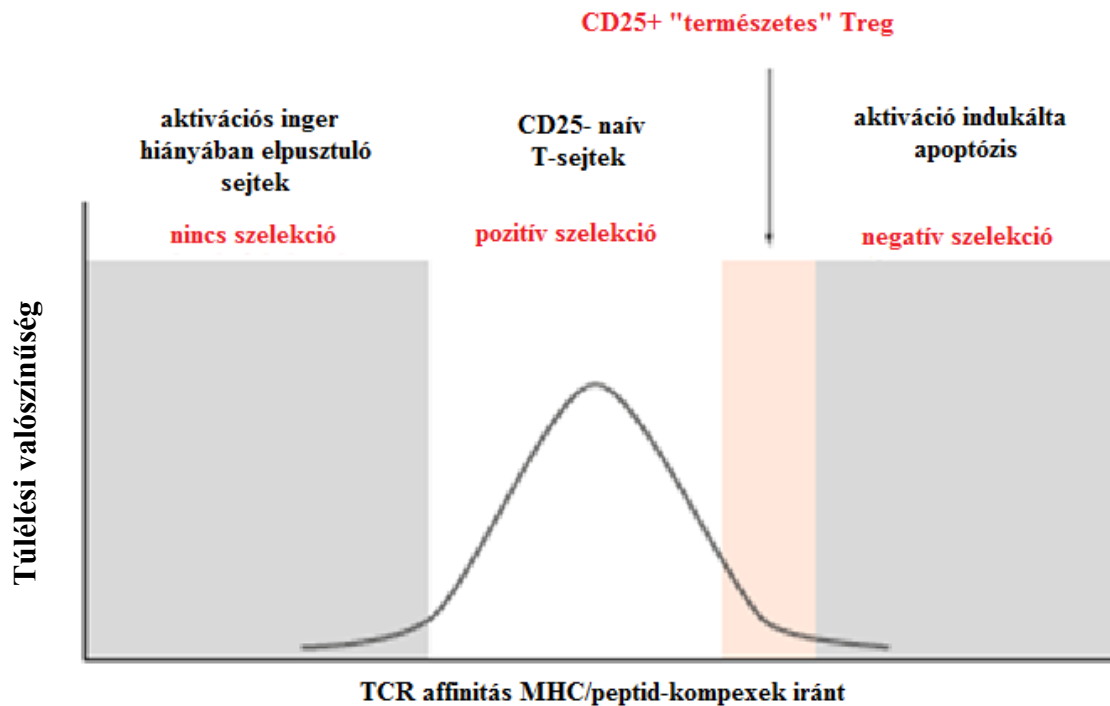
2.2.2 Az érés késői, szelekciós szakaszai

A tímusz kéreg és a velőállomány határán lezajló fejlődési szakaszban mennek végbe a pozitív és negatív szelekciós lépések (A kéregben a kérgi hámsejtek (cTEC) szerepelnek, mint antigén prezentáló sejt (APC), a velőállományban a velői hámsejteké (mTEC), dendritikus sejteké, makrofágoké APC szerep.).

Az egyedi $\alpha\beta$ TCR-t és mindkét (CD4+CD8+) koreceptort hordozó (DP) T-limfociták szoros kölcsönhatásba kerülnek az MHCI és MHCII molekulákat egyaránt kifejező kérgi hámsejtekkel. Csak a saját MHC-molekulát felismerő T-limfocitaprekurzorok jutnak tovább a differenciálódási úton. Aktivációs inger hiányában elpusztulnak azok a T-sejtek, melyek a sikeres génátrendeződési folyamatok eredményeként olyan TCR-t jelenítenek meg, amely nem reagál az egyedre jellemző MHC-molekulák valamelyikével, illetve azok, amelyekben nem jön létre funkcionális TCR. Tehát a pozitív szelekció funkcionális jelentősége, hogy megakadályozza a „használatlan” T-sejtek felhalmozódását és a sejtek megtanulják a saját MHC felismerést (MHC restrikció).

Tovább aktiválódnak és differenciálódnak azok a pozitívan szelektálódott T-sejtek, amelyek képesek a saját MHC-molekulákat felismerni, de TCR-jük a saját MHC és idegen fehérjéből származó peptidek kombinációjára specifikus. A negatív szelekció során aktiváció indukálta apoptózissal elpusztulnak azok a T-limfociták, amelyek túl nagy affinitással képesek felismerni a saját MHC és saját fehérjéből álló peptidkombinációkat. Azok a T-limfociták, amelyeknek nagy az affinitása, de a negatív szelekció értelmében még nem pusztulnak el apoptózissal, természetes regulatórikus T-sejtek lesznek (tTreg). (3. ábra)

A negatív szelekciót túlélő érett T-limfociták vagy csak CD4, vagy csak CD8 koreceptort hordoznak a felszínükön (Single Positive – SP). A negatív szelekció funkcionális jelentősége az, hogy a T-limfocita-érés során eltávolításra kerülnek azok az autoreaktív T-sejtek, amelyek a perifériára kerülve a szervezet saját szöveteit, sejtjeit veszélyeztetik ^{2,5} (saját struktúrák toleranciája).

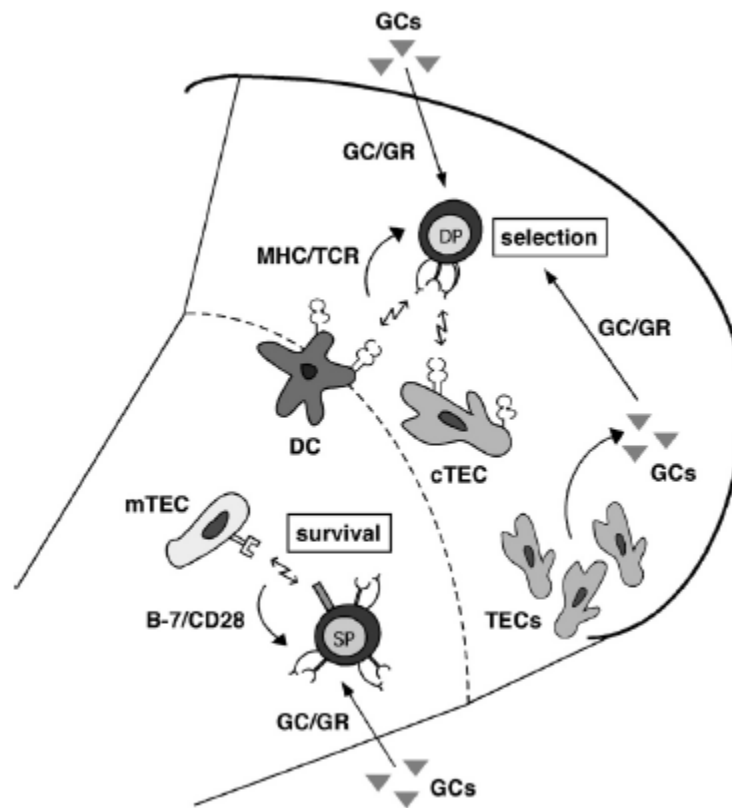


3. ábra. A T-sejt érés szelekciós szakaszai

Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie. 3. Auflage ed.2011, München: Spektrum Akademischer Verlag*

A „kölcsonös antagonizmus” modell szerint nem csak a TCR jelátviteli út vonal vesz részt a pozitív szelekcióban, és a DP timociták túlélésében, hanem a folyamat a TCR- és a lokálisan a cTEC által termelt glukokortikoid hormon (GC) indukálta apoptózist elindító jelátviteli út vonal antagonizmusának eredménye. A TCR vagy glukokortikoid receptor (GR) jelátvitel önállóan apoptózist indukál, a két receptor együttes aktiválása azonban antagonizálja egymást. Ennek értelmében a pozitív szelekcióban azok a sejtek élnek túl, melyekben a TcR és GR jelátviteli út vonal együttesen éri a sejtet. A kis affinitású TCR-nél a GC indukál apoptózist, mert a TCR jelátvitel nem tudja azt elnyomni. Azoknál a T-limfocitáknál, amelyeknek közepes az affinitása, a TCR és GR szignál neutralizálják egymást, így nem pusztulnak el (4. ábra) ⁵⁻⁹. A pozitív szelekciót túlélő sejtek tovább vándorolnak a medullába és ott a dendritikus sejtek és mTEC sejteken

az MHC-saját peptideket túl nagy affinitással felismerő TCR-t expresszáló timociták a negatív szelekció áldozatai lesznek, mert ott a GR jelátvitel már nem érvényesül és az erős TCR szignált nem képes antagonizálni.



4. ábra. Glukokortikoidok szerepe a szelekciós lépésekben – „kölsönös antagonizmus” modell

Herold M J et al J. Cell Mol Life Sci.2006, 63; 1

2.3 T-limfocita alcsoportok

A tímuszt elhagyó érett, $\alpha\beta$ TCR-t hordozó limfociták jól elkülöníthető alcsoportokba sorolhatók: a CD8-koreceptort hordozó, sejtpusztító aktivitással rendelkező citotoxikus T-limfociták (T_C), a CD4-koreceptort hordozó, meghatározott limfokinek termelésére képes helper T-limfociták (T_H), valamint a regulatórikus T-limfociták (Treg). A termelt limfokinek alapján a T_H sejtek T_{H1} , T_{H2} , T_{H9} , T_{H17} , T_{H22} , és Tfh (follikuláris helper T-sejt) különíthetők el, melyek egészséges szervezetben egyensúlyban vannak.

A T_{H1} -sejtek elsősorban a késői típusú túlérzékenységi reakció (DTH) kiváltásáért és a T_C -k aktiválásáért felelősek. Aktiválódásuk gyulladással és szöveti károsodással jár együtt. Túlsúlyuk számos bakteriális, virális fertőzés esetén jellemző, illetve egyes autoimmun megbetegedések kialakulásában fontos szerepet játszhat.

A T_{H2} -sejtek az ellenanyag termelés fő segítői. Működésük eredményeként fokozódik az IgM típusú antitestek termelése és bizonyos, elsősorban nem komplementkötő izotípusú IgG-ellenanyagok megjelenése. Elsősorban az extracelluláris baktériumok, toxinok, paraziták és oldott antigének elleni védekezés során nélkülözhetetlenek. Fontos funkciójuk az is, hogy mérsékelik a T_{H1} -sejtek aktiválódását és azok által beinduló gyulladási folyamatokat. Terhesség során, parazitás fertőzések esetén és allergiás megbetegedésekben jellegzetes módon T_{H2} irányba tolódik a T_H -alpopulációk egyensúlya^{3,10}.

2.4 Az immunológiai tolerancia

Az immunológiai tolerancia az immunrendszer antigénspecifikus válaszképtelensége, mely elsősorban a saját antigének vonatkozásában figyelhető meg³.

2.4.1 Centrális T-sejt tolerancia

A tímusz negatív szelekciós folyamata során apoptózissal pusztulnak el mindazon T-sejtek, melyek receptora túl nagy affinitással kapcsolódik a saját MHC – saját peptid komplexekhez. Ezt a folyamatot nevezzük a centrális tolerancia kialakulási mechanizmusának^{3,5}.

2.4.2 Perifériás tolerancia

A centrális toleranciamechanizmus sok autoreaktív T-sejtet kiszűr az érő repertoárból, ez mégsem jelenti az autoreaktivitás hiányát az adaptív immunrendszerben. Sok érett limfocita van minden szervezetben, amelyek saját antigént nagy affinitással ismernek fel, ennek ellenére az autoimmun betegségek relatíve ritkák. Ez a perifériás toleranciának köszönhető, melynek fontosabb mechanizmusai a következők^{3,5}:

- 1) Anergia: amennyiben kostimulációs jel (CD28 – B7) hiányában találkozik a naív-T-sejt a saját antigénnel, nem pusztul el, azonban válaszképtelenné, anergiássá válik.
- 2) Ignorancia: a kis affinitással saját epitópokat felismerő sejtek figyelmen kívül hagyják a saját epitópokat a periférián. Ugyancsak ignorálhatják a limfociták az igen kis koncentrációban jelen lévő autoantigéneket.
- 3) Klonális deléció: Irreverzibilis folyamat, amelynek során az autoreaktív T-sejtek az autoantigén által közvetített jel hatására nem aktiválódnak, hanem programozott sejthalállal elpusztulnak.
- 4) Szuppresszió (Treg-ek): A 70-es években általánosan elfogadott volt a nézet, miszerint az immunrendszer részét képezik a T_C-k és a T_H-k mellett a szuppresszor T-sejtek (T_S) is. A későbbiekben a T_S-sejtek létezését az immunológia évtizedekre elvetette, és az immunválasz szabályozását a T_H1/T_H2 sejtek egyensúlyával magyarázták. Csak a közelmúltban igazolódott egyértelműen egy külön szabályozó, az immunválaszt gátló sejtcsoport létezése, melyet regulatórikus T sejteknek (Treg) neveztek el. Az anergiával, ignoranciával és delécióval szemben a Szuppresszió egy aktív tolerancia-mechanizmus. Ez a sejtpopuláció a T_H1- és T_H2-sejteket is képes gátolni.

2.5 A regulatórikus T-sejtek (Treg)

A regulatórikus T-sejt egy olyan speciális alcsoportja (populációja) a T-sejteknek^{11,12}, amely kulcsszerepet játszik a saját antigénnel szembeni toleranciában^{13,14} és az antigén stimuláció által kiváltott túlzott immunreakció gátlásában^{15,16}, így segítve az immunhomeosztázis fenntartását és csökkentve az autoimmun betegségek és allergiák kialakulásának kockázatát^{17,18}. Klinikai relevanciáját tovább növeli a transzplantáció utáni szervkilökődés folyamatában és az anya magzat iránti toleranciájában betöltött szerepe¹⁹.

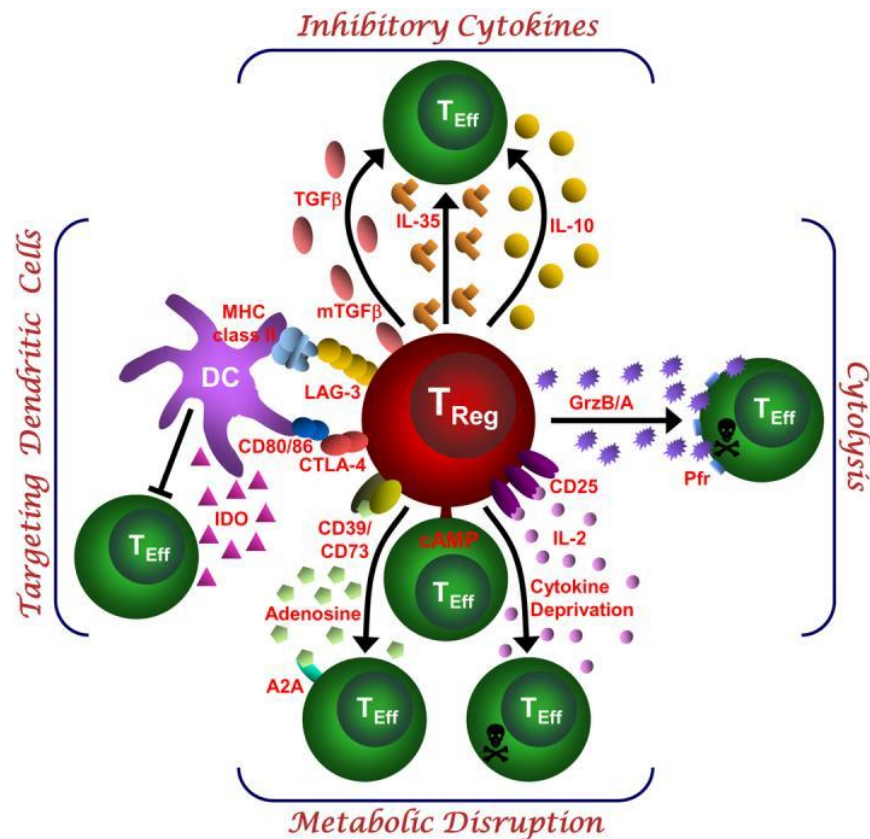
A Treg sejtek ezidáig legjobban leírt alcsoportja a tímusz eredetű, természetes (tTreg) Treg-sejtek és a periférián kialakuló indukált (iTreg)^{20,21} - újabb nomenklátúra szerint periférás (pTreg) – Treg-sejtek. Mindkét alcsoportra jellemző a Foxp3 (Forkhead boks protein 3) transzkripciós faktor és a sejtfelszíni CD25 és CD4 expresszió^{21–23}.

A sejtvonal specifikus faktorok fontos szerepet játszanak a sejtek differenciálódásában azáltal, hogy számos olyan gén expresszióját szabályozzák, melyeknek expressziós minázata adott sejtípus funkcionális és fenotípusos tulajdonságait meghatározzák²⁴. A Foxp3 a forkhead transzkripciós faktor család tagja, melyet egy általános DNS kötő domén, a forkhead box domén, vagy winged helix domén határoz meg^{25,26}. A Foxp3-at a Treg irányú sejtvonal elköteleződés „fő szabályozójának” tartják^{11,27}. Funkciója még ismeretlen, de a működőképes Foxp3 hiánya IPEX-szindrómához vezet^{28,29}. Egyes adatok szerint felmerült, hogy a Foxp3 expresszió önmagában nem elegendő a Treg-ek stabil szuppressziójának fenntartásához vagy a működőképes Treg-ek megbízható definíciójához. Erre példa az aktivált effektor T-sejtek (Teff) tranziens Foxp3 expresszióra anélkül, hogy szuppresszor aktivitásra tennének szert sőt, az aktiváció hatására proinflammatorikus citokineket termelnek. Mint transzkripciós faktor, a Foxp3 sok más sejtaktivációban, differenciálódásban és TCR stimulációban szerepet játszó transzkripciós faktorkal kerül interakcióba³⁰⁻³². A másik oldalról viszont a Foxp3 transzkripciós ko-represszorként is viselkedhet, mivel gátolja az NFκB, CREB, és RORα aktivitását. Tehát a Foxp3 kölcsönhatásban más transzkripciós faktorokkal transzkripciós aktivátorként és represszorként is működik, illetve a T-sejteket az immuntolerancia irányába programozza, például úgy, hogy represszálja az IL-2-t és szabályozza a Treg-ek szuppresszor funkcióját a NFAT transzkripciós faktorkal való interakciója által^{25,33}. Ezen kívül egyes transzkripciós faktor partnerei kölcsönösen elősegítik a Foxp3 gén expresszióját²⁴. A *FOXP3* gén metilátlan promóter és enhanszer régiói stabil, hosszútávú Foxp3 expressziót biztosítanak³⁴⁻³⁷, amely mintázat a tímusz eredetű tTreg-ekre jellemző, míg a hipometilált enhanszer régió az indukált Treg-ek esetében típusos, a konvencionális T-sejtekben pedig teljesen metilált³⁸.

A **természetes** Treg (tTreg) sejtek a negatív szelekció során a saját antigéneket közepesen magas affinitással felismerő DP timocitákból differenciálódnak CD4 SP sejté, amelyek IL-2 receptor α-láncot (CD25)^{39,40} és az X kromoszóma által kódolt, „Forkhead box” családba tartozó Foxp3 transzkripciós faktort^{17,39-41} expresszálják. A tTreg sejtek a perifériára kerülve az effektor sejteket direkt sejt-sejt kapcsolódás és citokin termelés (IL-4, IL-10, TGFβ) révén gátolják⁴². A Treg-ek exogén IL-2 és megfelelő TCR stimuláció hatására proliferálnak.

A Treg-sejtek keletkezési mechanizmus szerinti másik ismert típusa a **perifériás** Treg-sejtek (pTreg)^{17,43}, melyek a periférián alakulnak ki, ún. tolerogén mikro környezetben”, antigénfelismerés hatására (pl. kostimuláció hiánya) naiv, CD4⁺

sejtekből⁴². Citokin termelésük alapján tovább csoportosíthatóak: az IL-10 termelő, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ Tr1, a TGFβ termelő, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ TH3 (orális tolerancia)^{44,45} és a FoxP3⁺ iTreg sejtekre. Az effektor sejteket citokin termelésük és direkt sejt-sejt kapcsolódások révén gátolják (5. ábra)⁴⁶⁻⁴⁸.



5.A ábra A reulatórikus T-sejtek gátló mehanizmusai

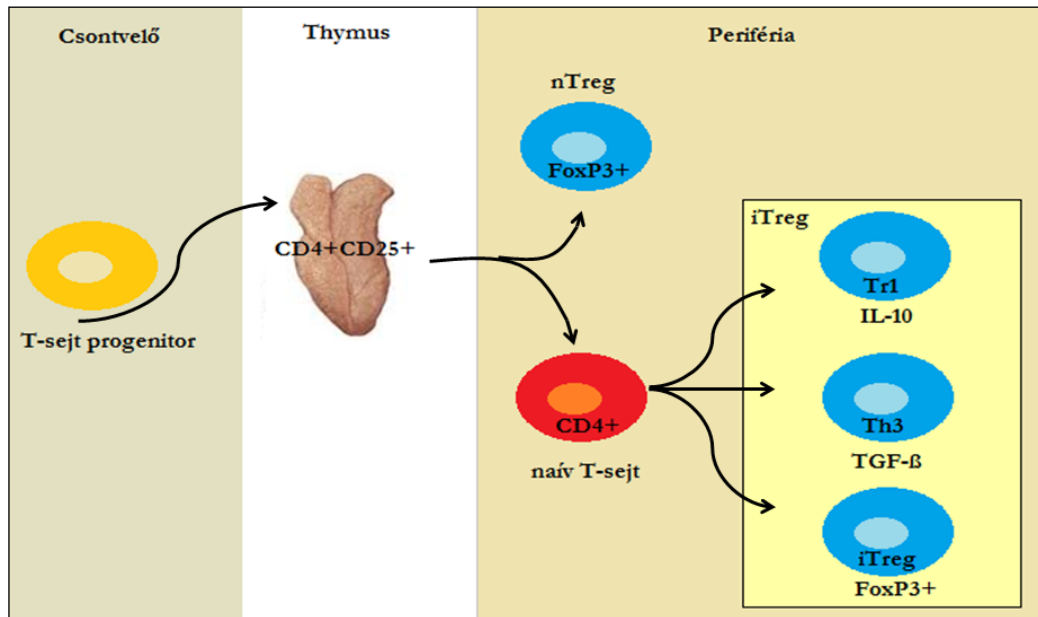
Vignali DA et al Nat Rev Immunol. 2008 Jul;8(7):523-32.

A TGFβ a “transforming growth factor beta” szupercsalád egy szabályozó citokinje, amely receptor serin/threonine kináz jelátviteli útok hat, Treg-ek, makrofágok és sok más sejttípus is termeli. Pleiotrop hatású citokin, mely IL-6-al közösen a naív T-sejtek Th17 irányú, IL-6 hiányában pedig a pTreg irányú differenciálódását segíti elő²¹.

Az IL-10-et bizonyos körülmények között szintén termelik más sejttípusok is (Th1, Th2, Th17, B-sejtek), jellemzően immunválasz és gyulladás gátló citokin^{34,49}.

Egyes irodalmi adatok szerint a tTreg-ek és a pTreg-ek elkülönítésére a Helios transzkripciós faktor használható^{40,50}. A Helios az Ikaros családba tartozó transzkripciós

faktor, melynek expressziója T-limfocita sejtvonalra korlátozódik^{51,52}. Funkcionális szerepe ismeretlen, bár kimutatták, hogy a Foxp3 promóterhez kapcsolódva fokozza a Foxp3 expressziót^{40,53}, és a Helios expresszió a Treg-ekben korrelál a szuppresszor funkcióval⁵³. Más irodalmi adatok szerint a Helios nemcsak a tímusz eredetű tTreg-sejtekre jellemző, mert T-sejt-aktiváció és -prolifерáció során is megjelenik, nyugvó sejtekben pedig csökken az expressziója^{54,55}.



5.B ábra. Regulatórikus T-sejtek kialakulása

Ugor et al IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 6:(1-2) pp. 17-24. (2014)

Josefowicz et al Immunity (30): 616-622. (2009)

2.6 Treg-ek szerepe egyes betegségekben

A regulatórikus T-sejt egy olyan speciális populációja a T-sejteknek^{11,12}, amely alapvető szerepet játszik a saját antigénekkal szembeni toleranciában^{13,14} és az antigén stimuláció által kiváltott túlzott immunreakció gátlásában^{15,16}, így segítve az immunhomeosztázis fenntartását és csökkentve az autoimmun betegségek és allergiák kialakulásának kockázatát^{17,18}, ugyanakkor gátolják a fertőző mikroorganizmusok eltávolítását és a tumorelles immunitás hatékonyságát is.

Az effektor és szuppresszor funkció egyensúlyának megbomlása esetén, ha a Treg sejtek kerülnek túlsúlyba, kialakulhatnak daganatok, gyakoribbak a fertőzések, a HIV. Daganatos betegek perifériás vérében és a tumorban a Treg-ek felhalmozódnak, és az anti-tumor immunválasz elnyomása révén a tumor növekedését promótlják, így rossz prognózist jeleznek. Colorectális carcinómában a FoxP3⁺ Treg-ek mennyisége a tumort drenáló nyirokcsomóban sokkal nagyobb, mint a perifériás vérben, vagy a tumorban, és pozitív korrelációt mutat a betegség stádiumával⁵⁶.

A Treg sejtek hiánya esetén pedig autoimmun betegségek, allergia, graft kilökődés, gyulladós bélbetegségek (IBD), IPEX szindróma jöhet létre. Szklerózis multiplex (SM) esetén a Treg sejtek csökkent számát és funkcionális deficitjét írták le⁵⁷. Az SM egér modelljében a Treg sejtek „kivédik” a betegséget azáltal, hogy az autoreaktív TH1-sejtek proliferációját és pro-inflammatórikus citokin termelését elnyomják⁵⁸. 1-es típusú diabetes betegek Treg sejtjeinél is funkcionális deficitet találtak⁵⁹. Gyulladós bélbetegségben szenvedőknél a csökkent perifériás Treg szám korrelál a betegség aktivitásával (remisszióban emelkedik, aktív szakaszban csökken)⁶⁰. A szisztémás lupus erythematosus (SLE) egy szisztémás autoimmun betegség, ami a több szervet érint, úgymint bőr, ízületek, vesék és központi idegrendszer. A saját antigénekkal szembeni tolerancia elvesztése, autoreaktív limfocitáktaktivációja és gyulladós mediátorok és autoantitestek képzése jellemzi^{17,61}. A betegség fellángolásakor a Treg sejtek mennyisége csökken⁶². A kollagén-indukált arthritis modellben a Treg-ek depléciója felgyorsítja/rontja a szisztémás ízületi gyulladást, míg a Treg-ek bevitele „kivédi” a betegséget¹⁷.

Az SSc-ben észlelt érelváltozások és fibrózis kialakulásának kulcs ingere a T-limfocita aktiváció. Ennek eredményeképpen az aktivált T-limfociták, főként CD4⁺ T-sejtek fedezhetőek fel az SSc-ben szenvedő betegek keringésében és az érintett szerveikben is. Ezen felül sok tanulmány az immunrendszer más elemeit – mint például autoantitestek és emelkedett citokin szintek – is összefüggésbe hozza az SSc patológiájával. Mivel a TGFβ részt vesz a fibrózisként megjelenő szervi érintettség kialakulásában valamint a Treg kialakulásban és funkciójában is, esetleg szerepet játszhat az SSc patogenezisében is.

Sok közlemény számol be emelkedett Treg arányokról SSc-s betegek perifériás vérének mononukleáris sejt (PBMC) frakciójában, míg néhány tanulmány normál, vagy csökkent Treg szinteket közöl^{24,26,27,30}. Mindemellett általános feltételezés, hogy nem

csak a Treg-ek megváltozott száma, hanem azok diszfunkciója is felelős az SSc-ben talált abnormális immunszuppressziót mutató Treg sejtekért²⁶.

A konvencionális Treg definíció (CD4+CD25high+Foxp3+ T-sejtek) mellett számos tanulmány definiált további Treg alcsoportokat újabb sejtfelszíni jelölések alapján. Ilyen Treg markernek mutatkozik a CD127 (interleukin-7 receptor alpha chain) alacsonyabb expressziója, vagy jelen nem léte a sejtfelszínen a CD4+CD25high+ T-sejteken belül³¹, amely lehetővé teszi az élő Treg tisztítást és azonosítást. A legszigorúbb és legprecízebb megközelítés a Treg-ek azonosítására a CD4 és CD25, valamint Foxp3 expresszió, illetve ezek melletti CD127 negativitás marad²⁶. A CD62L (L-selektin) egy limfocita homing receptor a nyirokcsomókban, egy újabb marker, mely egy olyan alpopulációját különbözteti meg a Treg-eknek, amelyek aktívan recirkulálnak a nyirokcsomókba. Ezek a sejtek legfőképpen a naív T-sejtek aktivációját gátolják a nyirokcsomókban, valamint elsősorban gyulladáshoz vezető területekre vándorolnak így gátolva a gyulladást a perifériás szövetekben^{32,33}.

Legújabb kutatási eredmények azt tanúsítják, hogy a Treg sejtek Foxp3 expressziója epigenetikai kontroll alatt áll⁴⁹. Egy meghatározott DNS metilációs mintázat karakterisztikus hiszton modifikációkkal kombinálva nyitott kromatinszerkezetet hoz létre, ezáltal állandósítva a *FOXP3* expressziót a Treg-ekben. A promóter, upstream enhancer és intronic enhancer régióban három konzervált, nem-kódoló szekvenciához (CNS-conserved non-coding sequence) kapcsolódva demetilált vagy hipometilált CpG szigetek biztosítják a *FOXP3* gén stabil expresszióját³⁴⁻³⁷. Ezek a régiók az elsődleges célpontjai az epigenetikai szabályozásnak, és szükségesek az expressziójának módosításához a T-sejteket érő környezeti hatások függvényében⁴⁹. A tímusz eredetű természetes Treg-ekben ezen régiók alapvetően metilálatlanok, ami egy stabil Foxp3 expressziót eredményez, az indukált Treg-ekben ezen régiók hipometiláltak³⁸, míg az effektor T-sejteket teljesen metiláltak. Mivel a Foxp3 stabil expressziója alapvető fontosságú, azt feltételezzük, hogy az SSc-ben szenvedő betegek Treg sejtjeiben a *FOXP3* promóter és upstream enhancer régiók metilációs státusza megváltozott, ami felborítja az egyensúlyt a pTreg-ek (CD62L-) és tTreg-ek (CD62L+) között.

2.7 A glukokortikoid hormonok (GC)

A természetes GC-k a mellékvese zona fasciculatájában képződnek. Prekursoruk a koleszterin, szintézisük és felszabadulásuk a hipofízis elülső lebeny hormon, az adrenocorticotrop hormon (ACTH) hatására megy végbe. Az ACTH-szekrúciót a hipotalamus corticotrop releasing faktora (CRF), illetve a vér glukokortikoid hormon szintje szabályozza. Élettani hatásaik közé tartozik számos metabolikus folyamat befolyásolása, csökkentik a glükóz felvételt és hasznosítást, fokozzák a glükoneogenezist, emelik a vércukor szintet, fokozzák a fehérjebontást, elősegítik a zsírsavak metabolizmusát. Negatív feedback révén gátolják az ACTH és CRF szekrúcióját. Mindezen metabolikus folyamatok mellett összetetten befolyásolják az immunrendszer működését is. Csökkentik a neutrofil granulociták migrációját, valamint a leukociták és makrofágok aktiválását, apoptózist indukálnak a T_H1 -, T_H2 - és B-sejtekben, a neutrofil és eozinofil granulocitákban, az IL-2 és receptora génjének transzkripcióját gátolva csökkentik a T_H -k hatását és a T-sejtek klonális proliferációját⁶³.

Az allo- és autoantitestekkel szembeni immunválasz gátlásával a Treg-ek mellett a glukokortikoidok is fontos tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának.

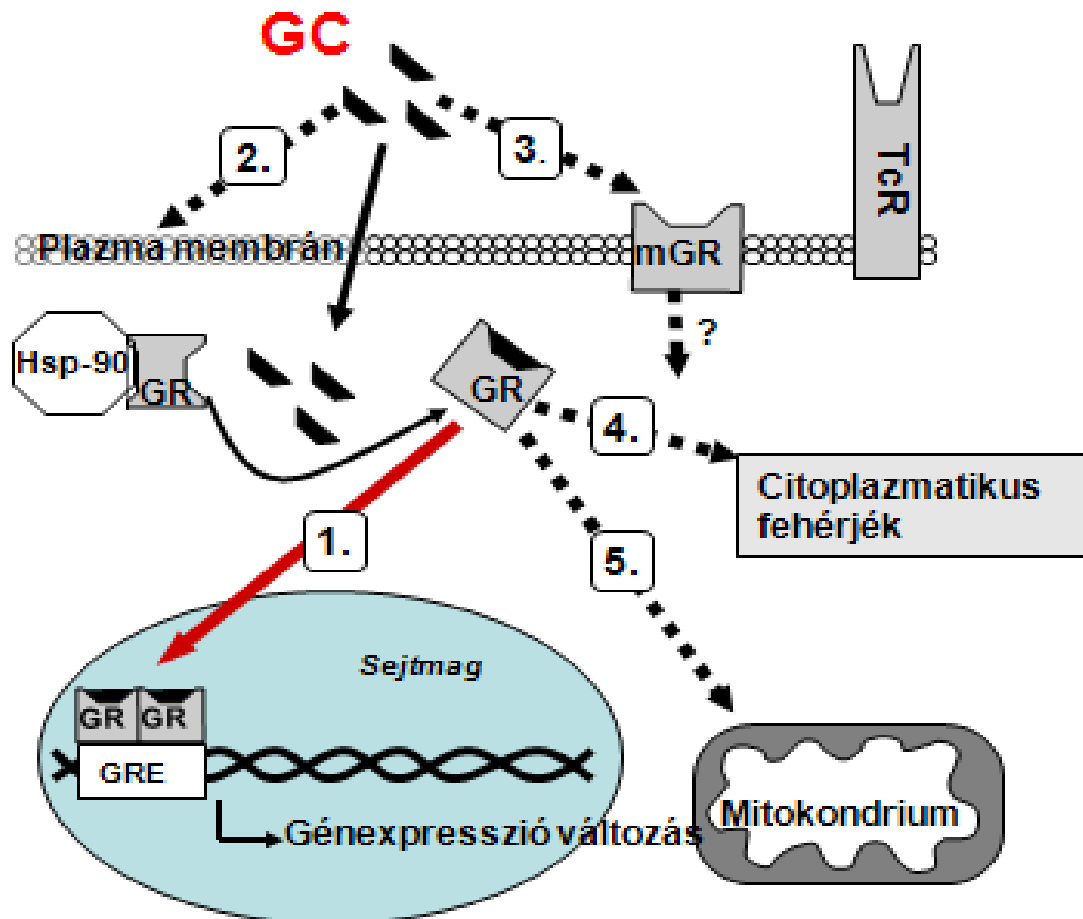
Genomikus hatás:

A GC-k a sejtbe lépve a citoplazmában lévő specifikus glukokortikoid receptorokhoz (GR) kötődnek. A receptor a citoplazmában hőszokk-proteinekkel komplexeket képez, amelyről a GC kötődés által kiváltott konformációváltás miatt a receptor leszakad, így szabaddá válik a DNS-kötő domén. A GC-GR komplex ezután dimereket képez, majd a sejtmagba jutva a DNS glukokortikoid válasz eleméhez (GRE) kötődik és génexpressziós változásokat okoz. A genomikus hatások órák alatt következnek be (6. ábra)^{6,64}.

Nem-genomikus hatások:

Nem minden GC hatás magyarázható a genomikus folyamatokkal. Anafilaxiás reakció, asztmás roham kezelése során is használnak GC-analógokat, ezekben az esetekben azért alkalmazhatóak, mert a nem-genomikus hatások létrejöttéhez csak percekre van szükség. Ilyen hatás a GR kölcsönhatása citoplazmatikus jelátviteli

fehérjékkel (NF κ B esetén az interakció már alacsonyabb koncentrációban is megtörténik, amikor a GRE-géntranszkripció még nem okoz változást). Nagy dózisu GC kezelés hatására alakulnak ki a membrán GR közvetítette hatások (monocitákon, B-sejteken), direkt hatások a plazmamembránon keresztül (membrántranszport-folyamatok, membrán permeabilitás befolyásolása), és a mitokondriális hatások (6. ábra)^{6,65}.



6. ábra. Glukokortikoid jelátvitel T-sejteken:

1. génexpresszió változás, 2. direkt membrán hatások, 3. membrán GR, 4. interakció citoplazmatikus fehérjékkel, 5. mitokondriumba való transzlokáció

In: Boldizsar et al.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signaling in T cells (Immunobiology. 2010; 215(7): 521-6.)

A klinikumban igen széleskörűen alkalmaznak különböző betegségek kezelésében GC-analógokat (pl.: dexametazon (DX): allergiás állapotok, autoimmun betegségek, transzplantált betegekben a szervkilökődés megelőzése, hematológiai malignitások), amelyek világszerte az egyik leggyakrabban felírt gyógyszerek, a gyulladáscsökkentő és immunoszuppresszív aktivitásuk, limfocita apoptózist indukáló képességük miatt, mégis keveset tudunk a Treg sejtekre gyakorolt hatásaikról.

Jelenleg nem ismert pontosan a GC-kezelés hatása a Treg-ek aktivitására vagy előfordulási gyakoriságára, de bizonyított, hogy a GC-k használata elősegíti a Treg indukciót⁶⁶⁻⁶⁸. Ezért a GC-kezelést terápianként alkalmazzák olyan esetekben, amikor csökkent vagy elveszett a saját antigénekkal szembeni perifériás tolerancia (mint például autoimmun betegségek, allergia), vagy alkalmazzák transzplantáció utáni szervkilökődés megelőzésére is. Mivel a Treg sejtek és a GC hormonok is a citokintermelés és a sejtaktiváció befolyásolásával fejtik ki immunoszuppresszív hatásukat, érdekes kérdés volt a szinergisztikus hatásuk vizsgálata. A Treg sejtek GC érzékenységet vizsgáló tanulmányok egérikísérletekben ellentmondásosak, beszámoltak mind emelkedett, mind csökkent Treg arányokról DX kezelés hatására. Balb/c egerek tímuszában és lépében emelkedett CD4⁺CD25⁺ Treg sejtarányt, illetve magasabb Bcl-2 és GR szinteket figyeltek meg CD4⁺CD25⁺ sejtekben a CD4⁺CD25⁻ sejtekhez képest⁶⁹. Egy másik vizsgálatban IL-2 és DX adása szintén magasabb Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg sejtarányokat eredményezett a perifériás nyirokszervekben⁷⁰. A másik oldalról viszont a Treg-eket betegségmodellben vizsgáló tanulmányok a kortikoszteroid kezelés Treg kialakulást kolatózó hatását feltételezik, de nem vizsgálták a Treg sejteket specifikus sejtfelszíni, vagy intracelluláris markerrel⁷¹.

2.8 Szisztémás szklerózis

A szisztémás szklerózis krónikus, sokszervi érintettséget mutató betegség, melyre a bőr és belső szervek fibrózisa, autoimmun jelenségek valamint érrendszeri károsodások jellemzőek. Két fő formáját különböztetik el: a limitált cutan szisztémás szklerózist (lcSSc) és a diffúz cutan szisztémás szklerózist (dcSSc)⁷².

2.8.1 Limitált cutan szisztémás szklerózis (lcSSc)

Az lcSSc alcsoport jellegzetes autoantitestje az anti-centromer antitest (ACA)⁷³. A bőrtünetek elsősorban a kezeket, alkart és az arcot érintik. Az erre a formára jellemző pulmonalis artériális hipertónia, a subcutan kalcinózis valamint a gasztrointesztinális traktus fibrózisa és a következményes hipomotilitás később kialakuló elváltozások, melyeket a Raynaud szindróma kialakulása akár évekkkel megelőzhet^{74,75}. Az lcSSc jobb prognózisú forma, mely kezelés mellett az életkilátásokat nem, vagy alig befolyásolja.

2.8.2 Diffúz cutan szisztémás szklerózis (dcSSc)

A dcSSc alcsoport jellegzetes autoantitestjei az anti-RNS polimeráz III és az anti-topoizomeráz-I (anti-Scl 70)⁷³. A diffúz formára jellemző, hogy a bőrtünetek gyorsan progrediálnak és kiterjedt a bőrérzékenység, beleértve a törzs és a végtagok proximális (könyök illetve térd feletti) részét, gyakoribb a polyarthrititis előfordulása, és típusos a fibrózis tendosynovitis is. Bármely tünet már a betegség korai szakaszában jelen lehet, vagy az első tünet után rövid időn belül kialakulhat. A tüdő interstitialis fibrózisa, a vese, a szívizom és a gasztrointesztinális traktus diffúz fibrózisa olyan elváltozások, melyek kialakulása rontja a betegség e formájában szenvedők életkilátásait⁷⁵.

2.8.3 Tünetek

2.8.3.1 Bőrjelenségek

A bőr az érintett területeken vastagabbá, feszessé válik, melynek hátterében a fibroblaszt sejtek fokozott kollagén és intercelluláris mátrix termelése áll. A sclerodermás bőrelváltozások kiterjedésének, elhelyezkedésének és progressziójának vizsgálata mind a betegség diagnosztikájában, mind a betegség aktivitásának és a terápia

hatékonyágának megítélésében fontos szerephez jut. Az American College of Rheumatology (ACR) Klasszifikációs kritériumai szerint, ha a bőrvastagodás a metacarpophalangealis ízületől (MCP) proximálisan is észlehető, és mindkét kéz ujjai érintettek, az elégséges feltétel a szisztémás szklerózis diagnózisának felállításához⁷⁶. A bőrelváltozások megítélését segítő mutató a „Modified Rodnan Skin Score” (MRSS), mely a bőrmegvastagodás mértékét vizsgálja 17 meghatározott régióban⁷⁷.

Ezen kívül gyakoriak a betegek ujjbegyein kialakuló fekélyek⁷⁸, a teleangiectasiák kialakulása, és az érintett bőrterületek pigmentációs zavara is. A limitált forma esetén jelentkezhet szubcutan kalcinózis is, mely a betegség által érintett bőrterületeken alakul ki, normális szérum kalcium és foszfát szint mellett.

2.8.3.2 Csont és ízületi eltérések

A betegségre jellemző tipikus vázrendszeri tünet a végperc csontjának felszívódása, mely radiológiai módszerekkel detektálható. A polyarthralgia minden szisztémás szklerózis típusban gyakori jelenség, de valódi sokízületi gyulladás inkább a diffúz formára jellemző korai tünet. Mindkét formában késői tünetként kialakulhatnak súlyos ízületi kontraktúrák, melyek jelentős életminőség romlást okoznak az érintett betegeknek⁷⁹.

2.8.3.3 Raynaud jelenség és érrendszeri károsodás

A Raynaud jelenség háttérében epizódikusan jelentkező vazospasztikus rohamok következtében fellépő keringészavar áll, mely az ujjak elfehéredését, cianózisát okozza, és jelentős fájdalommal jár. A spazmus oldódása után hyperaemia alakul ki. A jelenség általában mindkét kezet érinti, és a keringészavar csak a rohamok idején áll fenn.

Az érrendszeri károsodás a kapillárisokat és a kisartériákat érinti elsősorban. A kapillárisok degenerálódnak, az ér-újdonképződés csökken, így avasculáris területek, és óriáskapillárisok alakulnak ki, melyeket kapillármikroszkópos vizsgálattal lehet detektálni. A kisartériákban obliteratív arteriopathia alakul ki, mely szervkárosodásokhoz (Pl.: vese, tüdő) vezet⁸⁰.

2.8.3.4 Belső szervi manifesztációk

2.8.3.4.1 Gasztrointesztinális rendszer

Az emésztőszervrendszeri érintettség a sclerodermás betegek 90%-ában megfigyelhető, és a traktus bármely részét érintheti. A leggyakoribb panaszokat okozó elváltozás a nyelőcső érintettsége miatt kialakuló refluxbetegség, és a következményes oesophagitis. A gyomor és a vékonybelek fibrózisa az enterális idegek és a bélfal izmainak destrukciója miatt motilitás zavart okoz, így a következményes pangás bakteriális túlnövést, bélrendszeri gyulladást válthat ki.

Az érrendszeri károsodások is érinthetik a gasztrointesztinális traktust, a kialakuló teleangiectáziák, és az úgynevezett „görögdinnye gyomor” vérzés forrásai lehetnek⁸¹.

2.8.3.4.2 Tüdő érintettség

Szklerodermában a tüdő manifesztációnak két alapvetően eltérő formája lehet. Az egyik típusú elváltozás az egész szervezetben jelenlévő fibrózis tüdő manifesztációja, mely interstitialis alveolitis, majd fibrózis képében jelenik meg. A folyamat kiterjedtségének és aktivitásának megítélésére több egymást kiegészítő klinikai vizsgálat áll rendelkezésre, úgy mint a légzésfunkciós vizsgálatok, nagy felbontású tüdő komputertomográfia (HRCT) és a bronchoalveolaris lavage (BAL) során nyert minta sejttözetétel vizsgálata. A tüdőérintettség másik formája, a limitált altípusban szenvedő betegekben kialakuló pulmonális arteriális hipertónia (PAH)⁸². PAH esetén a pulmonális átlagnyomás, és a vasculáris ellenállás megemelkedik, miközben a pulmonális kapilláris éknyomás csökken, a tüdőben kialakuló vaszkulopátia miatt. PAH gyanúja esetén fontos a beteg echokardiográfiás vizsgálata, a megváltozott nyomásviszonyok miatt várhatóan kialakuló jobb kamrai hypertrófia és dilatáció megítélése végett^{82,83}.

2.8.3.4.3 Szív érintettség

A szív pumpafunkciójának gyengülését, valamint ingerképzési és ingerületvezetési zavarok kialakulását a miokardium fibrózisa valamint a koronária artériák és kapillárisok károsodása miatti keringésromlás együttesen okozzák⁸⁴.

2.8.3.4.4 Veseérintettség

A vesekárosodások hátterében a vese ischaemiás károsodása áll, ami főként a kisartériák obliteratív vaszkulopátiája miatt jön létre. A veseérintettség legsúlyosabb formája az ún. szkleroderma renális krízis (SRC). Gyorsan progrediáló állapot magas vérnyomással, azotaemiával kezdődik végül veseelégtelenség alakul ki. A folyamat

kezelés nélkül általában fatális kimenetelű, A korai vérnyomáscsökkentő kezelés lassítja a folyamatot, de a betegek jelentős része később dialízisre szorul⁸⁵.

2.8.3.4.5 Izomérintettség

A szisztémás szklerózisos betegek 10-15%-ában polimyositis alakul ki, mely a diffúz formában szenvedőknél gyakoribb jelenség. A kialakuló izomgyengeség és fájdalom az életminőséget rontó tényező⁷⁹.

2.8.4 Diagnosztika

Az ARC és az EULAR (European League Against Rheumatism) 2013-ban kialakította új klasszifikációs rendszerét⁷⁷. A kritériumrendszer alapján elégséges a diagnózis felállításához, ha mindkét kézen a MCP ízületől proximálisan is észlelhető a szklerodermára jellemző bőrmegvastagodás. A klasszifikációs rendszerben további hét kiegészítő szempontot határoztak meg, úgy, mint a sclerodactylia, és bőrmegvastagodás jelenléte a kezeken, mely nem haladja meg a MCP ízületet proximális irányban; az ujjbegyeken lévő fekélyek, vagy csillag alakú hegek; teleangiectasia; abnormális körömágy kapillárisok; interstitialis tüdőbetegség, vagy pulmonalis arterialis hipertónia illetve a szisztémás szklerózisra jellemző autoantitestek jelenléte. A klasszifikációs rendszerben meghatározott autoantitestek az anti-centromer antitest, az anti-topoizomeráz I antitest (Anti-Scl-70) és az anti-RNS polimeráz III antitest.

2.8.5 Prognózis és betegség aktivitás megítélése

A betegség prognózisát első sorban a létrejött károsodások mértéke, másod sorban a betegség aktivitása határozza meg. A beteg állapotának megítéléséhez fontos tisztázni az összes lehetséges szervi manifesztáció meglétét, illetve súlyosságát. Általánosságban megállapítható hogy a lcSSc esetén megfelelő kezelés mellett az életkilátások alig csökkennek, míg dcSSc esetén a szervi manifesztációktól függően még ma is gyakran fatális kimenetelű a betegség. A betegség aktivitása a tünetek időbeli kialakulásán, progresszióján, valamint a tünetek nélkül zajló kóros folyamatok detektálásán keresztül írható le, melynek megítélése a betegek osztályozásában fontos szempont mind a klinikai gyakorlatban, mind a betegséggel kapcsolatos kutatásokban⁸⁶. A betegség aktivitásának megítélésére 2003-ban egy multicentrikus tanulmány keretében az European Scleroderma Study Group (EScSG) megalkotta az „EScSG activity index”- et, melynek további paraméterekkel történő bővítését célzó vizsgálatok jelenleg is folynak⁸⁷.

3. Célkitűzések

1. Az utóbbi időben megjelent ellentmondásos kutatási eredmények miatt célunk volt a nagydózisú GC hormon kezelés hatásának vizsgálata a tímusz és perifériás nyirokszervekben előforduló Treg sejtekre. Vizsgálni kívántuk a Treg sejtek GC érzékenységét a Treg arány és abszolút sejtszám nyomon követésével kezeletlen és DX kezelt BALB/c egerek tímuszában és különböző perifériás nyirokszerveiben.
2. A Treg sejtek funkciójában GC kezelés hatására történő változásokat a sejtek szuppresszor citokin termelésével és a citokinek és a Foxp3 transzkripciós faktor relatív mRNS expressziójának mérésével kívántuk meghatározni.
3. A GC érzékenységet nagyban meghatározó GR expressziót fehérje és mRNS szinten terveztük vizsgálni Treg sejtekben.
4. Konfokális mikorszópos technikával kívántuk vizsgálni a GC hormon indukált GR transzlokáció morfológiai változásait Treg sejtekben valamint a ligand kötött GR és a Foxp3 transzkripciós faktorok esetleges ko-lokalizációját.
5. Célunk volt továbbá korai SSc-ben szenvedő betegek perifériás vérmintáiban a Treg sejtek pontos azonosítása; valamint az esetleges eltérések nyomon követése a Treg és citokinjeinek (IL-10 és TGF β) szintjében az egészséges kontrol mitákhoz képest.
6. Vizsgálni kívántuk az egyes eltérések összefüggését a betegség különböző szempontok alapján képzett további alcsoportjaival.
7. A Treg sejtek SSc-ben mutatkozó eltéréseinek esetleges epigenetikai hátterét keresve – mivel a Treg fenotípusban fontos tényező a Foxp3 – vizsgálni kívántuk a *FOXP3* gén promóter és upstream enhancer régiójának metilációs státuszát.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Treg-ek vizsgálata egérmodellen

4.1.1 Kísérleti állatok

Munkánk során 4-6 hetes BALB/c egerekkel dolgoztunk. Az egerek tartása és feldolgozása a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által jóváhagyott engedély alapján történt (#BA 02/2000-16/2015).

4.1.2 In vivo glukokortikoid kezelés

A glukokortikoid hatás kiváltására az állatokat 20 mg/kg/nap dexametazonnal (Oradexon, N. V. Organon) oltottuk 1-4 napon át intraperitoneálisan. Ez a koncentráció nagy dózisú szteroid kezelést jelent. Kezeletlen állatok szolgáltak kontrollként. Az állatokat 24 órával az utolsó oltást követően áldoztuk fel. A vizsgált szerveket az eltávolítást követően 0,1% BSA és 0,1% NaN₃ tartalmú PBS-ben mechanikusan homogenizáltuk, majd ezt követően nejlonszűrőn szűrtük.

4.1.3 Antitestek és fluorochromok

Az immunfluoreszcens metszetek készítésekor a lépben a B-sejt zóna azonosítására B220-Alexa647 (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) antitestet, a T-sejt zónára Thy1-FITC (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) antitestet használtunk. A tímuszban DAPI (Sigma, Cat: 28718-90-3) jelöli a sejtmagokat és FoxP3-PE (eBioscience, Cat: 12-4771-82) a Treg-sejteket.

Az áramlási citometriás mérésnél a Treg-ek azonosítására anti-CD4-FITC (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet; YTS 191), anti-CD8-PE (BD Pharmingen; 53-6.7) és anti-CD25-PE-Cy5 (eBioscience; RM4-5) vagy anti-CD25-PECy7 (clone PC61) sejtfelszíni antitesteket, illetve anti-FoxP3-PE (eBioscience és Exbio; 3G3), anti-Helios-APC (BioLegend, Cat:137222), anti-IL-10-APC (BioLegend; JES5-16E3) és anti-TGFβ-PerCP (BioLegend, TW7-16B4) intracelluláris antitesteket használtunk.

A GR expresszió változás vizsgálatára anti-CD4-AlexaFluoro647 (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) és anti-CD25-PerCP (BioLegend, Cat:102027) vagy anti-CD25-PE-Cy5 (eBioscience) sejtfelszíni antitesteket, illetve anti-FoxP3-PE (eBioscience, Cat: 12-4771-82; Exbio, Cat:1P-601-C100) és anti-GR-FITC (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) intracelluláris antitesteket használtunk.

A Treg sejtek FACS separálásához anti-CD4-PE (clone YTS 191.1.2, ImmunoTools; YTS 191.1.2), and anti-CD25-PE-Cy5 (eBioscience; PC61.5.) antitesteket használtunk.

4.1.4 Immunfluoreszcencia tímusz és lép metszeteken

Az eltávolított tímusból és lépből 5-10 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, majd 10 perces hideg acetonos fixálás és 20 perces 5% BSA-tartalmú PBS pufferrel való telítés után 30 percre megfelelő antitestek kerültek rájuk. Végül 3-szor 5 percnyi mosást (PBS pufferben) követően PBS – glicerin 1:1 arányú keverékével fedtük a metszeteket. Az analízist Olympus fluoreszcens mikroszkóppal végeztük.

4.1.5 Intracelluláris jelölés és áramlási citometria

A kísérleti állatok tímuszát, lépét, mezenterialis és perifériás nyirokcsomóit, valamint Peyer-plakkjait eltávolítottuk. A szerveket mechanikusan homogenizáltuk, majd a kapott szuszpenziót vattán átszűrtük, 5 percig 1000 RPM-en centrifugáltuk, majd 1ml RPMI tápfolyadékba vettük fel. A sejtek életképességét tripánkék festék kizárásos teszttel határoztuk meg, majd mintánként 10^6 sejttel dolgoztunk tovább. A sejteket kétszer mostuk PBS-ben.

A sejtfelszíni jelöléshez antitest koktélt készítettünk, adott antitestek megfelelő koncentrációban 100 µl PBS/0,1%BSA/0,1%NaN₃ pufferbe (jelölő puffer) kerültek. 30 percen keresztül inkubáltuk jégen. Ezt követően a mintákat kétszer mostuk 2 ml PBS/NaN₃ mosó-pufferben.

Az intracelluláris jelöléshez a BioLegend FoxP3 Fixáló/Permeabilizáló puffer kit-et (Cat: 421403) használtuk: 1 ml FoxP3 Fixáló/Permeabilizáló puffert adtunk a mintákhoz, majd szobahőmérsékleten, sötétben 20 percig inkubáltuk. Centrifugálást

követően, a felülúszó eltávolítása után a sejteket egyszer 1 ml jelölő pufferben, egyszer 1 ml FoxP3 Permeabilizáló pufferben mostuk, majd 1 ml FoxP3 Permeabilizáló pufferben vettük fel, ebben 15 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. Centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után került a mintákra az intracelluláris antitest-koktél, szintén megfelelő koncentrációban, 100 µl jelölő pufferben, amivel sötétben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Kétszer 2 ml mosó pufferes mosás után 400 µl FACS-Fix pufferben felvettük a sejteket az áramlási citometriás méréshez.

Az áramlási citometriás mérést a FACSCantoII (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) áramlási citométeren, az analízist pedig az FCS Express 4 Flow Research Edition programmal végeztük. Mintánként 10000 eseményt mértünk a limfocita kapuból. A nagyság és granularitás (FSC/SSC) paraméterek alapján azonosítottuk a limfocitákat, majd azokon belül csak a CD4⁺ sejteket vizsgáltuk tovább.

4.1.6 RT-PCR

Treg sejtek izolálása RT-PCR-hoz

Az összegyűjtött timocitákat és lépsejteket anti-CD4-PE és anti-CD25-PE-Cy5 sejtfelszíni antitestekkel jelöltük a korábbiakban leírt protokoll szerint. A jelölt sejtek analízise BD FACSAriaII Cell Sorting System segítségével történt BD FACSDiva Software (BD Biosciences)-el. A limfocita kapun belül a CD4 és magas CD25 pozitivitást mutató sejtek kerültek kiválogatásra.

RNS előkészítés és kvantitatív RT-PCR

Az RNS izolálása 10⁵ CD4⁺CD25^{high+} sejtől NucleoSpin RNA XS kit segítségével, a cDNA előállítása random oligo(dT) primerek (Applied Biosystems) felhasználásával történt. A génexpresszió kvantifikálása a SYBR Green metódussal zajlott Applied Biosystems 7500 RT-PCR rendszerben. A relatív expressziós szintek meghatározása aktinhoz való normalizálást követően történt, az eredményeket pedig a kezeletlen Treg-ek mRNS szintjeinek többszöröseként ábrázoltuk (RQ). A következő primer-szekvenciákat alkalmaztuk: β-ACTIN (Forward) 5'- GGG AGG GTG AGG GAC TTC C -3'; β-ACTIN (Reverse) 5'- TGG GCG CTT TTG ACT CAG GA -3'; IL-10 (Forward) 5'- GTG AAG ACT TTC TTT CAA ACA AAG -3'; IL-10 (Reverse) 5'- CTG

CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT -3'; Foxp3 (Forward) 5'- TAC TTC AGA AAC CAC CCC GC -3'; Foxp3 (Reverse) 5'- GTC CAC ACT GCT CCC TTC TC -3'; TGFβ1 (Forward) 5'- GAC TCT CCA CCT GCA AGA CC 3'; TGFβ1 (Reverse) 5'- GGA CTG GCG AGC CTT AGT TT-3'; egér GR (Forward) 5'- TGG TGT GCT CCG ATG A-3'; egér GR (Reverse) 5'-AGG GTA GGG GTA AGC -3'.

4.1.7 Statisztika

A statisztikai kiértékelést SPSS v. 22.0 statistics package (IBM, USA) programmal végeztük. Munkánk során, a diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk. A különböző csoportok eredményeinek összehasonlítására a Student-féle t-tesztet használtuk, és a $P < 0,05$ eltérést fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

4.2 Treg-ek vizsgálata szisztémás szklerózisban

4.2.1 Betegek

A vizsgálatot az Országos Etikai Bizottság engedélyezte (Engedélyszám: 84-256/2008-1018EKU) A vizsgálatban résztvevő személyek előzetes tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot tettek. Beteganyagunkat (n=26) a Pécsi Tudományegyetem Reumatológiai és Immunológiai Klinika által kivizsgált, és gondozott, immunszuppresszív kezelésben még nem részesült (n=18), illetve szteroid és/vagy ciklofoszfamid (CPH) kezelt (n=8) szisztémás szklerózisos betegek alkotják. A kontrollcsoportot (n=10) korban, és nemben illesztett egészséges önkéntesek alkotják. A 26 betegből 20 nő, 6 férfi, a betegek átlagéletkora 54,69 év, az átlagos betegség-fennállás 2,54 év. a LeRoy kritériumok alapján 7 az lcSSc alcsoportba, 19 a dcSSc alcsoportba lett sorolva. A betegség diagnózisa az ACR/EULAR által 2013-ban kidolgozott diagnosztikus kritériumrendszer alapján lett felállítva. A betegség fennállás az első nem-Raynaud tünet megjelenésétől lett számítva. A vérminták standard eljárás szerint, heparin tartalmú vákuumcsőbe történő levétel után kerültek feldolgozásra. A tüdő fibrózis kimutatása HRCT-vel és/vagy a forszírozott vitálkapacitás mérésével történt. (FVC <80%). A betegség aktivitás az EScSG betegség aktivitási index alapján lett meghatározva. Aktív betegségnak minősült, ha az aktivitási index értéke nagyobb volt, mint 3.

	SSc (n=26)	lcSSc (n=7)	dcSSc (n=19)
Általános adatok			
Kor (év), átlag (SD)	54.7 (12.6)	56.6 (8.0)	54 (14.0)
Nem (nő), n (%)	20/26 (76.9%)	6/7 (85.7%)	14/19 (73.7%)
Betegség időtartama (év), átlag (SD)	2.5 (1.7)	3.0 (2.2)	2.37 (1.5)
Aktív betegség, n (%)	15/26 (57.7%)	3/7 (42.9%)	12/19 (63.2%)
Aktív betegség (EScSG>3), n (%)	8/26 (30.8%)	1/7 (14.3%)	7/19 (36.8%)
Szervi érintettség			
Tüdő fibrózis, n (%)	17/26 (65.4%)	3/7 (42.9%)	14/19 (73.7%)
PAH, n (%)	0/26 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/19 (0.0%)
Renális krízis, n (%)	1/26 (3.8%)	0/7 (0.0%)	1/19 (5.3%)
MRSS, átlag (SD)	10.6 (10.6)	2.8 (3.3)	13.1 (10.9)
Antitestek			
ACA+, n (%)	6/26 (23.1%)	4/7 (57.1%)	2/19 (10.5%)
Scl-70+/RNAPol-III+, n (%)	12/26 (46.1%)	1/7 (14.3%)	11/19 (57.9%)
Gyulladásos labor paraméterek			
Gyorsult süllyedés, n (%)	4/26 (15.4%)	0/7 (0.0%)	4/19 (21.0%)
Hypocomplementaemia, n (%)	4/26 (15.4%)	2/7 (28.6%)	2/19 (10.5%)
Emelkedett CRP, n (%)	9/26 (34.6%)	3/7 (42.9%)	6/19 (31.6%)

1. táblázat: A betegek klinikai és laboratóriumi adatai

4.2.2 Autonátitest mérés

A betegség-specifikus autonátitestek mérése konvencionális ELISA módszerrel vagy immunoblot technikával történt. Positív anti-nukleáris autoantitest (ANA) screening tesztet (ANA-Ease ELISA Kit, Genesis, GD74) követően az anti-CenpB (Orgentec, ORG 633) és anti-Scl-70 (Orgentec, ORG 212-24) antitestek detektálása antigen specifikus ELISA tesztel történt. Az anti-RNA polymerase III (RNA-Pol-III) antitest meghatározása immunoblot technikával (Euroimmune, DL 1532-1601 G) történt, amely az anti-CenpB és az anti-Scl-70 pozitivitás igazolására is szolgált.

4.2.3 A Treg alcsoportok áramlási citometriás azonosítása

A többparaméteres áramlási citometriás vizsgálatok Ficoll gradiens centrifugálással izolált PBMC-ken történt. A Treg és alcsoportjainak meghatározására FITC konjugált anti-CD4 (Becton Dickinson, RPA-T4), APC konjugált anti-CD25

(Becton Dickinson, M-A251), PE konjugált anti-Foxp3 (Becton Dickinson, 259D/C7), PacificBlue konjugált anti-CD127 (BioLegend, AO19D5) és APC/Cy7 konjugált anti-CD62L (BioLegend, DREG-5C) antitesteket használtunk. Az intracelluláris jelölés Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) segítségével történt. A jelölt sejtek fluoreszcenciájának mérése FACS Canto II áramlási citométeren (Becton Dickinson, USA) zajlott, a mért adatok analízise FCS Express 4 szoftverrel történt (De Novo Software, USA).

4.2.4 Citokin mérés

A funkcionális analízishez a PBMC-k 4 órás, 25ng/ml PMA (Sigma)/ 1µg/ml Ionomycin (Sigma)/10µg/ml Brefeldin (Sigma) jelenlétében RPMI-ben, 37°C-on történő stimulálását követően IL-10 és TGFβ termelést áramlási citometria segítségével vizsgáltuk PerCP/Cy5.5 konjugált anti-TGFβ1 (BioLegend, TW4-2F8), PE/Cy7 konjugált anti-IL-10 (BioLegend, JES3-9D7) antitestek felhasználásával CD4/CD25/CD127/CD62L sejtfelszíni jelölést követően a sejtek mosása után az intracelluláris jelölés Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) segítségével történt. A jelölt sejtek fluoreszcenciájának mérése FACS Canto II áramlási citométeren (Becton Dickinson, USA) zajlott, a mért adatok analízise FCS Express 4 szoftverrel történt (De Novo Software, USA). Az IL-10 és TGFβ termelés meghatározása a CD4+CD25+CD127-Foxp3+ és a CD4+CD25+CD127-Foxp3+CD62L+ sejcsoporton belül történt.

4.2.5 Metiláció analízis és piroszekvenálás

Genomiális DNS izolálása a B-sejt depletált limfocitákból QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) felhasználásával történt. A *FOXP3* promóter és upstream enhancer cél régióban lévő CpG metiláció szintjének meghatározásához használt assay a PyroMark Assay Design software (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével lett tervezve. A DNS minták biszulfid konverziója EpiTectFast 96 Bisulfite Kit (Qiagen) segítségével történt. A PCR amplifikációs lépések Vapo-Protect™ -en (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany) történtek. Denaturációs lépés 5 perc 95°C, 37 ciklus 30 másodpercig 95°C, primer-specifikus annealing 60°C 30 másodpercig, 72°C 45 másodpercig, és a végső

extensio 72°C 7 percig. A reakciós keverék MgCl₂ tartalmú 5µl 10x PCR puffert, 1 µl 10 mM dNTP mixet, 2.5 µl forward and reverse primert (végső koncentráció 0.5 µM), 0.4 µl (végső koncentráció 1 U) Taq DNA polimerázt (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 36.6 µl nukleázmentes vizet, és 2 µl templát DNS-t (70-200 ng) tartalmazott. A következő primereket használtuk fel: Foxp3 (forward) 5'- Biotin-AGT TTG GTT TGT GGG AAA TTG TT -3'; Foxp3 (reverse) 5'- ACC CTA TTA TCT CAT TAA TAC CTC TCA -3'; Foxp3 (Sequence1) 5'- ATA AAA ACA AAA TTA TTT TTA ATA -3'; Foxp3 (Sequence2) 5'- AAA TTA TTA AAA AAA AAA AAT CTA C -3'; Foxp3 Enhancer (forward) 5'- ATG AAG GGG AGG AGG AAG -3'; Foxp3 Enhancer (reverse) 5'- Biotin-CCT CCA ACT CCA CCA TAA C -3'; Foxp3 Enhancer (Sequence1) 5'- GAG GAA GAG GAG GTT -3'; Foxp3 Enhancer (Sequence2) 5'- GGG TTT TAT TTG GTT TTT ATA TT -3'. A PCR termékek ellenőrzése 1.0% agaróz gél elektroforézissel történt.

A biszulfít piroszekvenálás PyroMark™Q96 MD Pyrosequencing System-en történt PyroMark Gold Q96 CDT Reagent Kit (Qiagen) segítségével. Az adatok analízise Pyro Q-CpG software (Qiagen) segítségével történt.

Gene	Sequence analyzed*
FOXP3Sequence 1	<u>C</u> RTAACAATTTCCACAAACCAA <u>A</u> CTA
CpG number	1
FOXP3Sequence 2	<u>R</u> ACTTCCACAC <u>C</u> R <u>T</u> ACAAC <u>R</u> TAATTTTTCTTCT <u>C</u> RATATA
CpG number	1 2 3 4
FOXP3Enhancer Sequence 1	TGTTTT <u>Y</u> GAGTTTTTAT <u>Y</u> GTTGTGTTTT <u>Y</u> GTTTT <u>Y</u> GT
CpG number	1 2 3 4
FOXP3Enhancer Sequence 2	TTYGTTGTYGTT <u>Y</u> G <u>Y</u> GTYGGGTYGTTTGGAG <u>Y</u> GT
CpG number	1 2 3 4 5 6 7
	*analyzed CpG sites are underlined and consecutively numbered

2. táblázat A biszulfít piroszekvenálásnál használt szekvenciák

4.2.6 Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

RNS izolálás a B-sejt depletált limfocitákból RNeasy PlusMikro kit (Qiagen) felhasználásával történt. A cDNS előállítás 25-400 µg RNS-ből történt, a Maxima reverse transcriptase-al (Thermo Scientific) végrehajtott reverz transzkripcióhoz oligo(dT)₁₈ primerek (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) felhasználásával A Real-time PCR applied Biosystems® Real Time PCR 7500-al (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) történt, iTaquniver SYBR green (Bio-Rad, Ismaning, Germany) felhasználásával. Az amplifikáció 40 cikluson keresztül zajlott, a *FOXP3* relatív expressziójának meghatározása β2-microglobulin (β2M) expresszióra való normalizálást követően történt. Felhasznált primerek: Foxp3 (forward) 5'- TCA TCT GTG GCA TCA TCC GA -3'; Foxp3 (reverse) 5'- GGA ACT CTG GGA ATG TGC TG -3'; β2M (forward) 5'- CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC -3'; β2M (reverse) 5'- GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG -3'.

4.2.7 Statisztika

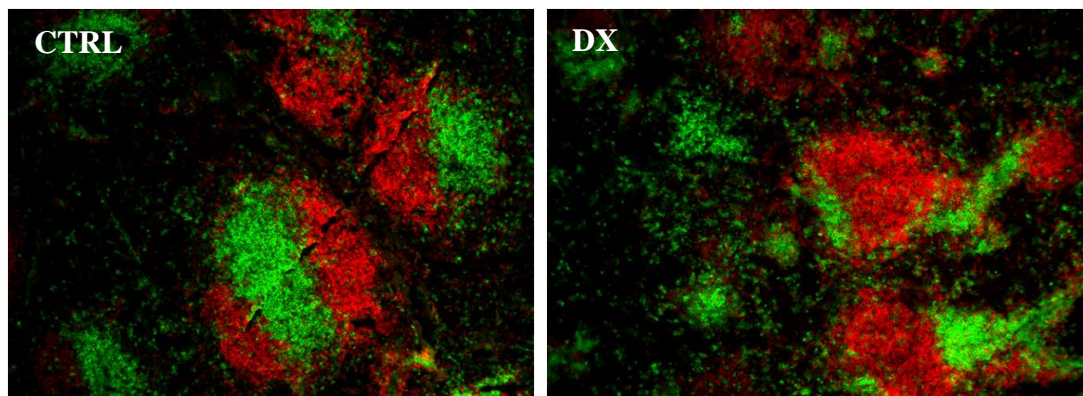
A statisztikai kiértékelést SPSS v. 22.0 statistics package (IBM, USA) programmal végeztük. Az adatokkal normalitás vizsgálatot végeztünk Shapiro-Wilkteszt segítségével, melyet követően normál eloszlású adatainkat Student-féle t-próbával, nem-normál eloszlású adatainkat pedig Mann-Whitney-U teszttel elemeztük. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük. A normál eloszlású adatok ábrázolásakor az adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM), míg a nem-normál eloszlású adatok ábrázolásakor a medián értékeket és az interkvartilis terjedelmet (IQR) jelenítettük meg. A változók közötti korreláció azonosítására Spearman féle rangkorrelációs együtthatót használtunk.

5. Eredmények

5.1 Treg-ek vizsgálata egérmodellen

5.1.1 Tímusz és lép szerkezetének változása GC-kezelés hatására

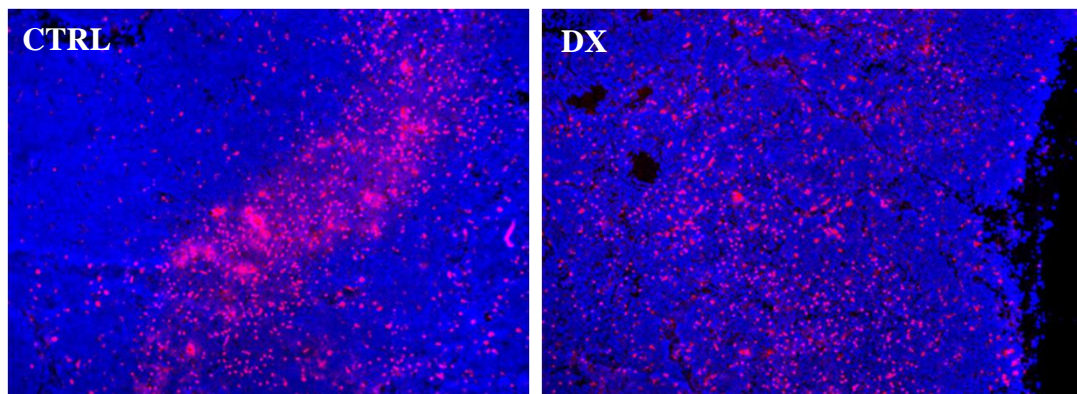
A GC-k egyik régóta ismert hatása, hogy a tímusz involúcióját okozzák. In vivo egyszeri, 24 órás, nagy dózisú (20 mg/kg) GC-kezelés a tímuszban a kéreg-velő organizációt is tönkreteszi, az addig homogén elhelyezkedésű Treg sejtek szétszóródnak, elhelyezkedésük diffúzzá válik. A lép fehér pulpában ugyancsak megváltozik kezelés hatására a limfoid normál szerkezet, amely főleg a T-sejt zónát (PALS) érinti. A sejtek tömött elhelyezkedése fellazul, a PALS szerkezete diffúzzá válik. (7-8. ábra).



7. ábra. Dexametazon kezelés hatása a lép szöveti szerkezetére

A lépben is megfigyelhető a kezeletlen mintához képest a T-sejt-zóna diffúzzá válása DX-kezelés hatására

(piros: B220-Alexa647 – B-sejt-zóna; zöld: Thy1-FITC ~ T-sejt-zóna) (PALS).

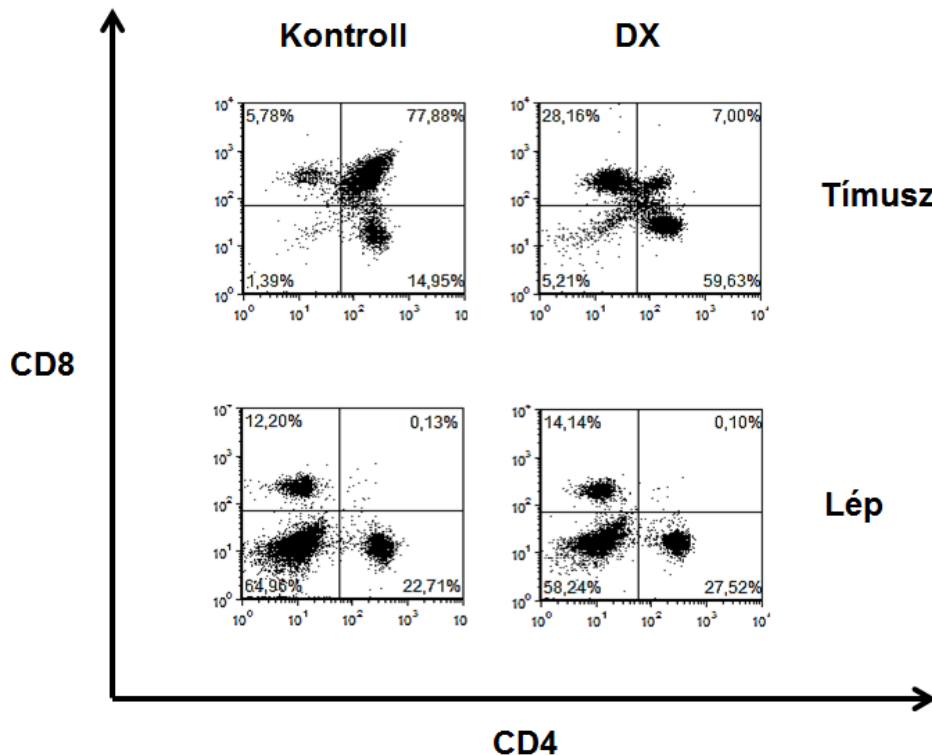


8. ábra. Dexametazon kezelés hatása a tímusz szöveti szerkezetére

A tímuszban jellemzően a kéreg-velő határon található Treg-sejtek (Foxp3-PE – piros) elhelyezkedése (K: kontroll) már egyszeri DX-kezelés hatására diffúzzá válik (kék: DAPI).

5.1.2 DX-kezelés hatása Treg sejtekre

Mivel a glukokortikoidokat immunszuppresszánsként használják a klinikumban, először a nagy dózisu DX-kezelés hatását vizsgáltuk a tímociták és különböző nyirokszervek perifériás T-sejt alcsoportjainak arányára és abszolút sejt számára. Ismételt (48 órás) DX kezelés hatására a tímuszban a kettős pozitív (DP) tímociták szinte eltűntek, arányuk 77,9%-ról 7%-ra csökkent (9. ábra), miközben a legkevésbé érett, kettős negatív (DN) és egyszeresen pozitív (SP) tímociták aránya emelkedett (DN: 3,7-szeres, CD4 SP: 4-szeres, CD8 SP 4,9-szeres) (9. ábra). A CD8 SP tímociták mutatkoztak leginkább rezisztensnek a GC-indukálta apoptózisra.



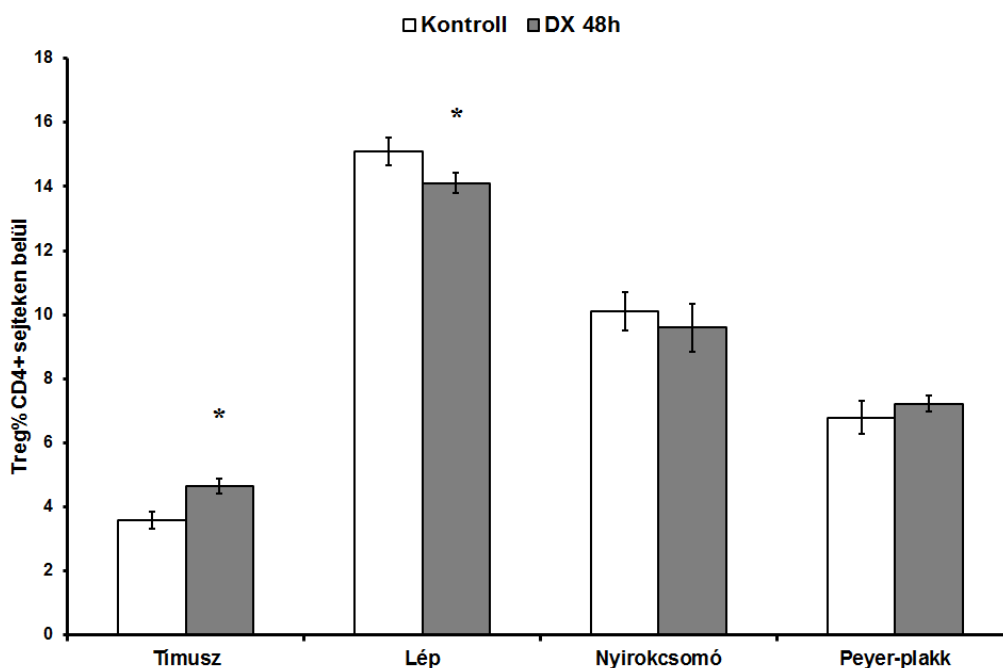
9. ábra. Dexametazon kezelés hatása a tímusz és a lép sejt összetételére.

Ismételt (48 órás) DX-kezelés hatására a lép és a tímusz lymphoid sejt összetevői megváltoznak. Anti-CD4-FITC és anti-CD8-APC antitesttel történő jelöléssel a lépben emelkedik a TH- és TC-sejt-arány, vagyis a nem T-sejtek nagyobb arányú fogyása

figyelhető meg a kezelés hatására. A tímuszban a kettős pozitív sejtek csaknem teljes eltűnése (depléciója) miatt emelkedett a kettős negatív és egyszeresen pozitív, érett sejtek aránya.

A lépben a CD4/CD8 arány nem változott szignifikánsan, mindemellett a nem-T-sejt (B- és NK-sejt) populáció arányának csökkenését, illetve a Th sejtarány 22,7%-ról 27,5%-ra való, és Tc sejtarány 12,2%-ról 14,1%-ra való relatív növekedését tapasztaltuk (9. ábra).

A következőkben a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg sejtek normál eloszlását vizsgáltuk kontrol egerek centrális (tímusz) és perifériás (lép, nyirokcsomók és Peyer plakkok) nyirokszerveiben. A tímuszban a Treg arány a CD4⁺T-sejteken belül megközelítőleg 3,5%, míg ez az arány a perifériás nyirokszervekben jóval magasabb, 7-15 % (lép ~15%, nyirokcsomók ~10%, Peyer plakkok ~7%) volt (10. ábra). Ismételt (2x) DX kezelés a Treg sejtek aránya a tímuszban a CD4⁺ T-sejteken belül szignifikánsan emelkedett. A perifériás nyirokszervek közül a lépben egy kicsi, de szignifikáns Treg arány csökkenést tapasztaltunk, míg a nyirokcsomók és Peyer plakkok Treg arányaiban nem történt érdemi változás a kezelés hatására.



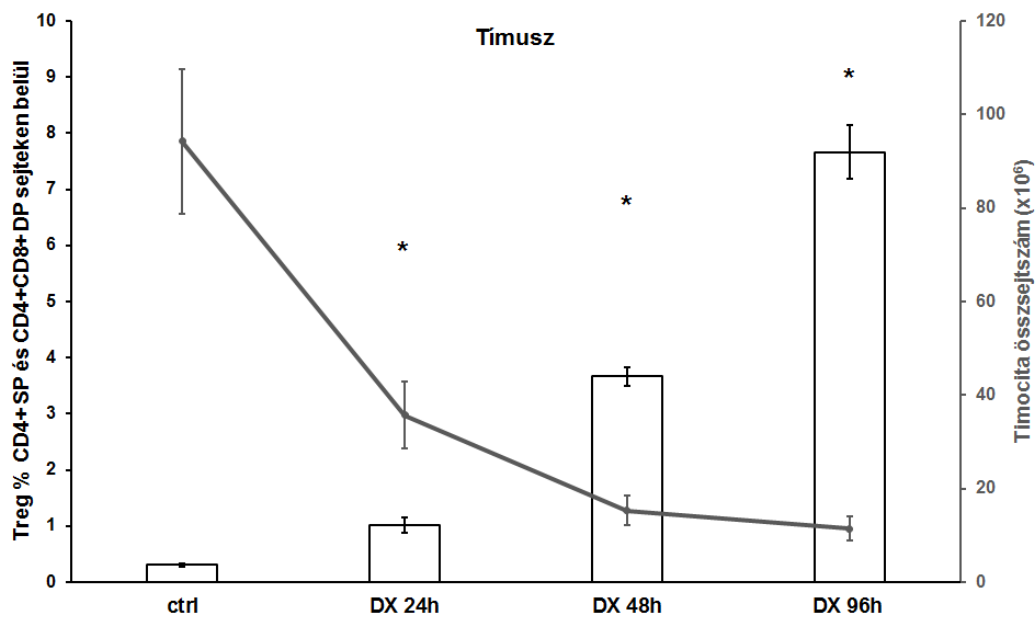
10. ábra Treg-sejt-arányok változása 48 órás nagy dózisú DX-kezelés hatására a centrális (tímusz) és a perifériás nyirokszervekben. A tímuszban a Treg-sejt-arány szignifikáns ($p < 0,001$) emelkedését figyeltük meg, míg a lépben enyhe sejtaránycsökkenés történt ($p < 0,05$). A nyirokcsomókban és Peyer-plakkokban nem történt szignifikáns Treg-arány-változás. A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk.

Szintén vizsgáltuk a Treg sejtek abszolút számának változását a tímuszban és perifériás nyirokszervekben ismételt (4x) DX kezelés hatására. A tímuszban a Treg sejtek száma változatlan maradt, míg a perifériás nyirokszervekben szignifikáns sejtszámcsökkenés volt megfigyelhető (3. táblázat). A kezelés hatására létrejövő különbség a tímusz eredetű és perifériás Treg sejtszámok változása között, a tímusz eredetű Treg-ek relatív DX-rezisztenciájából adódott, ami masszív (16-szoros) Treg arány növekedéshez vezetett a tímuszban, míg a teljes timocita sejtszám a kezelés előtti érték hatodára esett (8×10^7 -ről $1,3 \times 10^7$ sejt-re) (11. ábra). A perifériás nyirokszervekben a DX kezelés az összlímfocitaszám szignifikáns csökkennését okozta a Treg sejtszám csökkenésével együtt (3. táblázat), melyet a szervek méretének drasztikus csökkenése kísért, melyet korábbi vizsgálataink is igazolnak^{65,88}. Ez arra utal, hogy az érett T-sejtek és a perifériás nyirokszervek Treg sejtjei GC érzékenyek.

Treg sejtszám $\times 10^5$ (átlag \pm SEM)	Tímusz	Lép	Nyirokcsomó	Peyer plakkok
Kontroll	4,24 \pm 0,92	83,92 \pm 16,72	4,42 \pm 0,11	0,48 \pm 0,07
DX 96h	5,05 \pm 1,35	26,93 \pm 5,13 *	2,24 \pm 0,39 *	0,23 \pm 0,06 *

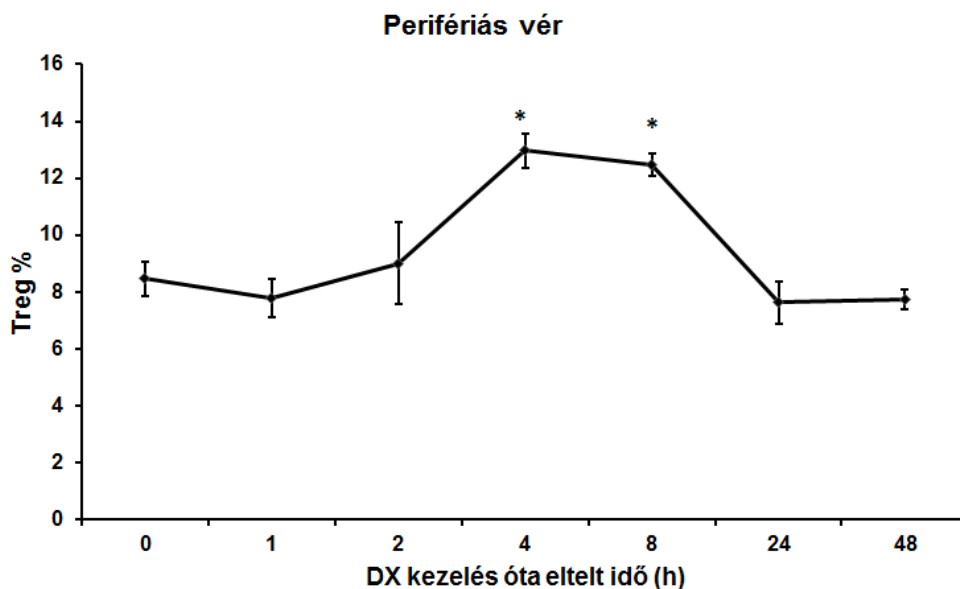
3. táblázat A regulátorikus T-sejtek abszolút számának változása 4 napos glukokortikoidhormon-kezelés hatására
4 napos nagy dózisú (20 mg/kg) dexametazon kezelés hatására a perifériás nyirokszervekben szignifikánsan csökkent a Treg-sejt-szám ($p < 0,05$), míg a tímuszban inkább enyhe, de nem szignifikáns Treg-sejt-szám-emelkedés volt megfigyelhető.

Szintén vizsgáltuk az egyszeri, nagy dózisú GC kezelés hatásának időkinetikáját a perifériás vér Treg sejtjeire. Szignifikáns Treg sejtarány növekedést tapasztaltunk az oltást követő 4. és 8. órában, míg a 24. órára az arány visszatért a kiindulási szintre és 48 órával az oltást követően is a kontrol szinten maradt (12. ábra.)



11. ábra Ismételt DX-kezelés hatása a tímusz abszolút timocita sejszámára és a Treg-arányra

Az oszlopdiaqramon a Treg-arányok szignifikáns növekedése látható ($p < 0,05$), míg a vonaldiagram a teljes timocita sejszám drasztikus csökkenését mutatja ($p < 0,001$) az idő függvényében. A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk.



12. ábra Perifériás vér Treg időkinetikája egyszeri, nagy dózisú DX (20 mg/kg) adását követően

Négy órával a DX kezelést követően a Treg arány szignifikáns növekedését figyeltük meg az állatok perifériás vérében, amely a kezelést követő 24. órára újra a kezdeti szintekre csökkent. A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk.

5.1.3 Helios+ Treg-ek előfordulása

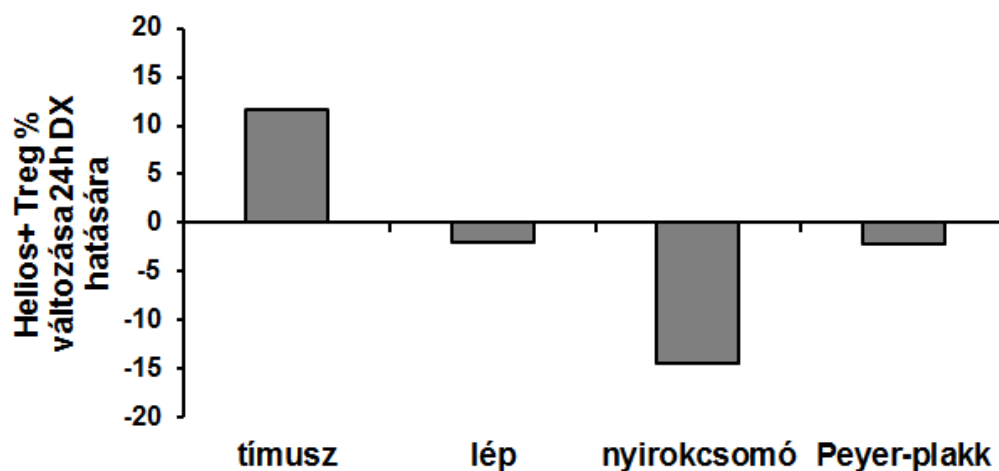
Korábbi adatok szerint a tTreg-ek és a pTreg-ek elkülönítésére a Helios transzkripciós faktor használható^{40,50}, ezért vizsgáltuk a különböző eredetű Treg sejtek Helios pozitivitását. A kezeletlen állatok tímuszában a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-sejtek 87%-a mutatott Helios pozitivitást. A perifériás nyirokszervek közül a lépben a legmagasabb ez az arány: 65%, a nyirokcsomóban 53%, a Peyer-plakkban 48%, (4.táblázat).

Treg % (átlag± SEM)	Tímusz	Lép	Nyirokcsomó	Peyer-plakk
Helios+ tTreg % CD4+ sejteken belül	3,11 ± 0,19	8,72 ± 0,32	5,38 ± 0,29	3,30 ± 0,24
Helios- pTreg% CD4+ sejteken belül	0,48 ± 0,08	4,58 ± 0,17	4,72 ± 0,20	3,48 ± 0,27
tTreg : pTreg arány (%)	87 : 13	65 : 35	53 : 47	48 : 52

4. táblázat Helios⁺ sejtek aránya a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-sejtek sejteken belül

Helios jelölés alapján nem tudunk különbséget tenni a tTreg-ek és a pTreg-ek között, hiszen a tímuszban a Treg-ek 13%-a Helios negatív, míg a lépben meglepő módon a Treg-ek 65%-a Helios pozitív

A 24 órás nagy dózisú DX kezelést követően a Helios⁺ sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, a nyirokcsomóban pedig szignifikánsan csökkent. A többi perifériás szervben a SEM értékeket is figyelembe véve azt mondhatjuk, hogy nem változott (13. ábra).

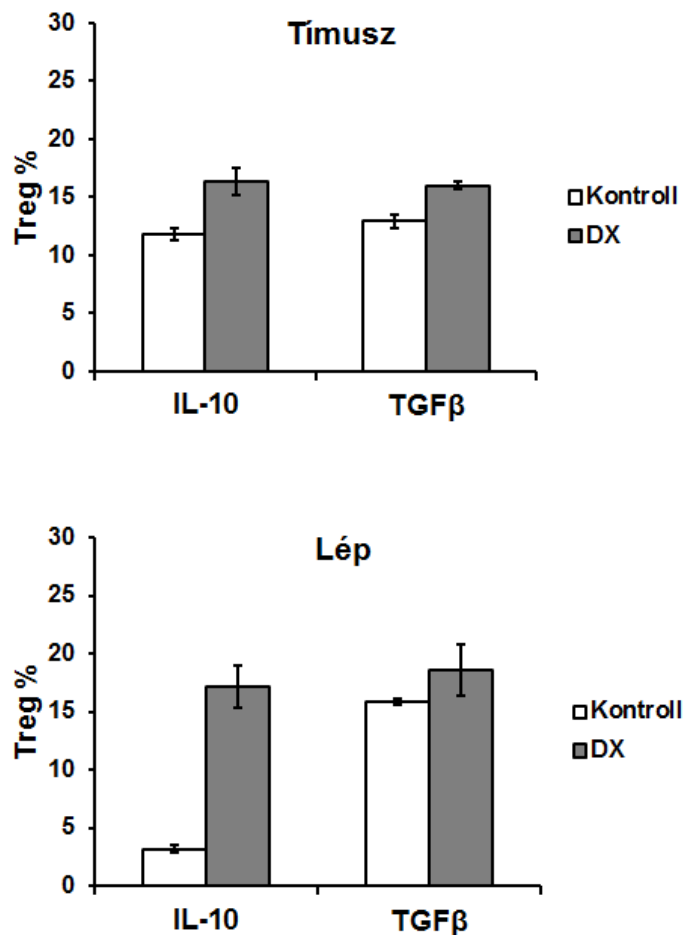


13. ábra Helios⁺ sejtek arányának változása 24 órás nagy dózisú DX kezelés hatására

A Helios pozitív Treg-ek aránya DX kezelés hatására centrálisan emelkedik, míg a periférián nem változik, vagy csökken. A diagramokon a mért adatok átlagát ábrázoltuk.

5.1.4 DX-kezelés hatása Treg sejtek citokin termelésére és Foxp3 expressziójára

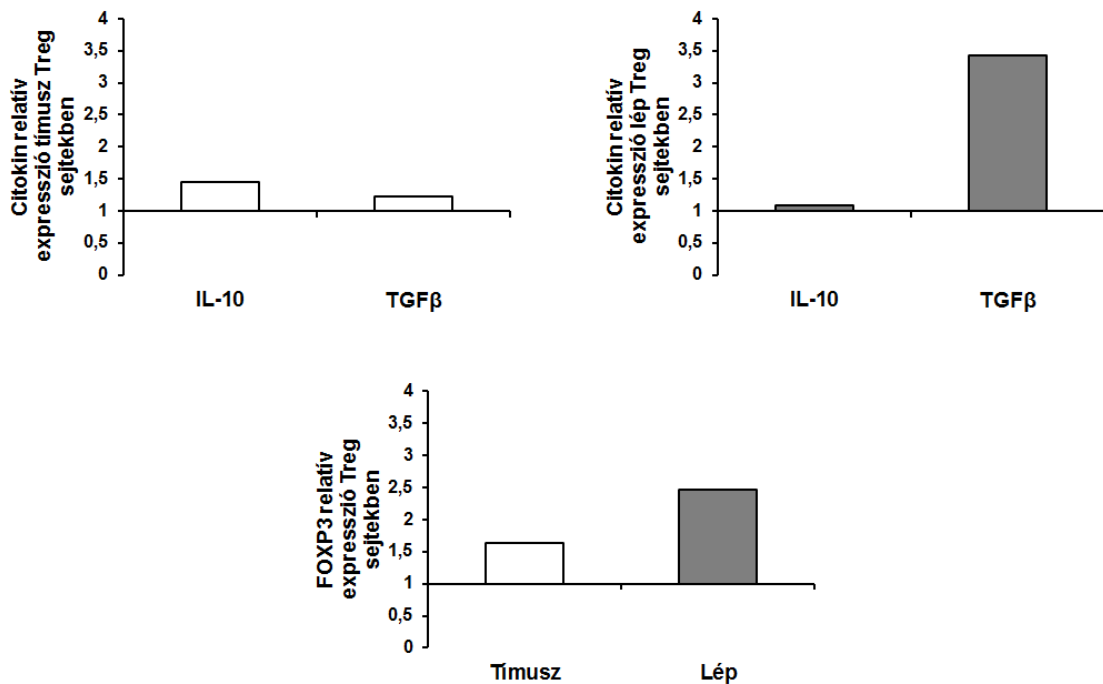
A következőekben azt vizsgáltuk, hogy a GC kezelés a Treg sejtarányokra kifejtett hatása mellett a Treg funkcióra is hatással van-e, ezért a tTreg-ek és pTreg-ek IL-10 és TGFβ termelésének és Foxp3 expressziójának változását követtük. A tímuszban az IL-10 pozitív és TGFβ pozitív Treg-ek aránya hasonló volt ($11.0 \pm 2.3\%$ és $13.5 \pm 3.1\%$), és a DX kezelés mindkét citokin esetében szignifikáns aránynövekedést okozott ($17.6 \pm 1.4\%$ és $21.0 \pm 4.9\%$) (14. ábra). A kontroll állatok lépében a TGFβ pozitív Treg-ek aránya ($13.7 \pm 2.0\%$) szignifikánsan magasabb volt az IL-10 pozitív Treg-ekhez ($3.6 \pm 0.5\%$) viszonyítva, és bár a 48 órás DX kezelés hatására az IL-10 emelkedés jóval markánsabb, de mindkét citokin aránya szignifikánsan emelkedett (14. ábra)



14. ábra DX kezelés hatása a Tregok citokin (IL-10 és TGFβ) termelésére

Kezeletlen állatok tímuszában a Treg-ek IL-10 és TGFβ pozitivitása hasonló szinteket mutatott, a DX kezelés hatására mindkét citokin aránya szignifikánsan emelkedett ($p < 0,05$). Kezeletlen állatok lépében magasabb a TGFβ pozitív Treg arány, mint az IL-10 pozitív és DX kezelés hatására mindkettő szignifikánsan emelkedik ($p < 0,05$). A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk.

Szintén vizsgáltuk a CD4⁺CD25^{high+}-re FACS módszerrel tisztított, DX kezelt és kezeletlen Treg-ek IL-10 és TGFβ relatív mRNA expresszióját. A tímusz eredetű Treg-ek citokin expressziója nem mutatott egyértelmű változást az ismételt (2x), nagy dózisu DX kezelésre. Hasonlóképpen nem változott az IL-10 mRNA expresszió a lépőből izolált Treg-ekben sem, viszont a DX kezelés a TGFβ mRNA relatív expresszióját 3,4-szeresére emelte (15. ábra).



15. ábra Citokin (IL-10, TGFβ) és Foxp3 relatív mRNA expresszió tímusz és lép eredetű Treg sejtekben

Kontrol és DX kezelt állatok CD4⁺CD25^{high+} tisztított tímusz és lép Treg sejteiben mértük az IL-10 és TGFβ relatív mRNA expressziót. A tímusz eredetű Treg sejtekben az IL-10 és a TGFβ relatív mRNA expressziója is változatlan maradt DX kezelés hatására, míg a lép eredetű Treg sejtek TGFβ expressziója szignifikáns emelkedést mutatott (RQ=3,4).

DX kezelés hatására a Foxp3 relatív mRNA expresszió enyhe emelkedést mutatott a tímusz eredetű Treg sejtekben (RQ=1,36), míg szignifikáns emelkedést a lép eredetű Treg sejtekben (RQ= 2,47).

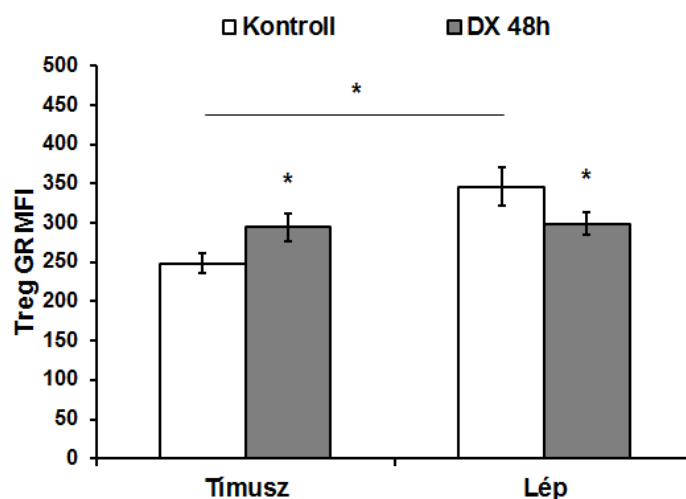
A következőkben a Foxp3 transzkripciós faktor relatív expressziós változásait vizsgáltuk, amely szoros összefüggésben áll a Treg sejtek szuppresszor funkciójával. Hasonló mértékű Foxp3 mRNA szinteket találtunk a tímusz eredetű és lépből izolált, tisztított CD4⁺CD25^{high+} Treg sejtekben, de a DX kezelés hatására csak a lépben tapasztaltuk egyértelmű emelkedést (15. ábra). Ez összecseng a fentebb leírt, lép eredű Treg sejtek DX kezelésre adott funkcióváltozásával, és magyarázhatja ezen sejtek TGFβ mRNA-ének upregulációját is.

5.1.5 DX-kezelés hatása a GR expresszióra

Egy adott sejttípus GC érzékenységét nagyban meghatározza annak GR expressziós szintje⁸⁹, ezért vizsgáltuk a lehetséges összefüggést a tTreg-eknél tapasztalt GC rezisztencia és a Treg-ek GR expressziója között. Ennek érdekében áramlási

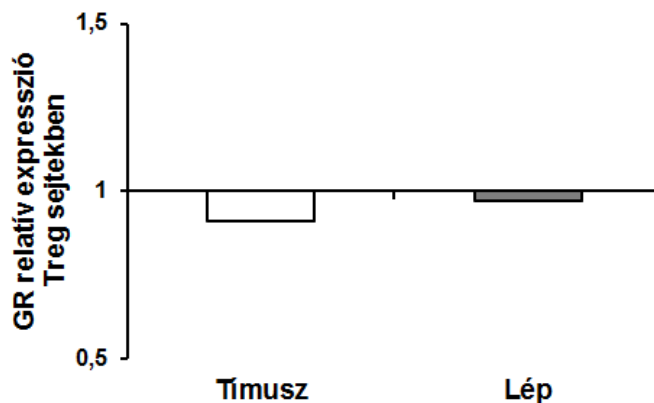
citometriával mértük az intracelluláris GR szinteket és qRT-PCR-t végeztünk a GR mRNS szintek meghatározásához CD4⁺CD25^{high+} tisztított tímusz és lép eredetű Treg sejtekben.

Ismételt, nagy dózisu DX kezelést követően a tímuszban túlélő (GC rezisztens) tTreg-ekben emelkedett GR fehérjeszinteket találtunk, míg a lép eredetű pTreg-ekben – melyek szignifikánsan magasabb GR expressziót mutattak a tTreg-ekhez képest – a kezelés hatására szignifikánsan csökkent a GR expresszió (16. ábra). Ez a GC indukált GR upreguláció jellemző a kettős pozitív timocitákra, míg a GR downreguláció az egyszerűen pozitív és érett T-sejtek olyan tulajdonsága, melyet az intézetünk által korábban végzett vizsgálatok egér és humán sejteken is leírtak^{90,91}.



16. ábra Tímusz és lép eredetű Treg sejtek glukokortikoid receptor expressziója. Kontrol állatok glukokortikoid receptor (GR) átlag flureszcencia intenzitása (MFI) tímusz eredetű Treg-ekben szignifikánsan alacsonyabb a lép eredetű Treg-ekéhez képest ($p < 0,05$). DX kezelés hatására a tTreg-ekben GR upreguláció, míg a lép Treg sejteiben GR downreguláció volt megfigyelhető ($p < 0,05$). A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk.

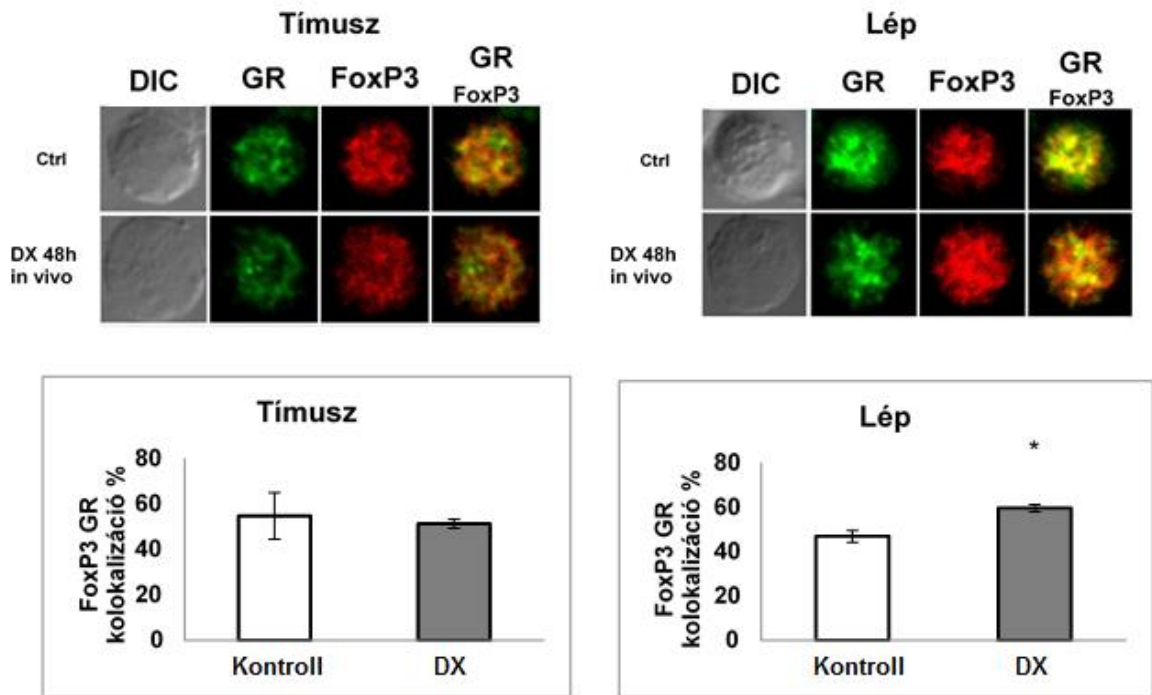
24 órával az utolsó DX kezelést (2.) követően nem tapasztaltunk változást a GR mRNS expresszióban sem a tímusz eredetű, se a lép eredetű Treg-ekben (17. ábra)



17. ábra Tímusz és lép eredetű Treg sejtek glukokortikoid receptor relatív mRNS expressziója

A GR relative mRNS expressziója nem változott DX kezelés hatására sem a tímusz, sem a lép Treg sejtjeiben.

Egy az intézetünk által végzett korábbi kísérletből kiderült, hogy a GC érzékeny kettős pozitív timocitákban a DX kezelés sejtmag helyett mitokondriális GR transzlokációt okoz, ami arra utal, hogy az aktuális GR expressziós szint mellett, a GR sejten belüli elhelyezkedése is jelentős meghatározója a GC indukálta apoptózisra való érzékenységnek⁹². Ezért vizsgáltuk a GR és Foxp3 kolokalizációját kezeletlen és glukokortikoiddal in vivo előkezelt állatok negatívan szelektált CD4⁺ T-sejtjein konfokális mikroszkóp segítségével. A kezeletlen mintákon mind a tímusz, mind a lép Treg sejtjeiben magas kolokalizációs arányt találtunk a Foxp3 és a GR között. DX kezelés hatására a Foxp3-GR térbeli asszociációja a lépből származó Treg-ekben tovább nőtt, míg a tímusz eredetű Treg-ekben nem változott (18. ábra).



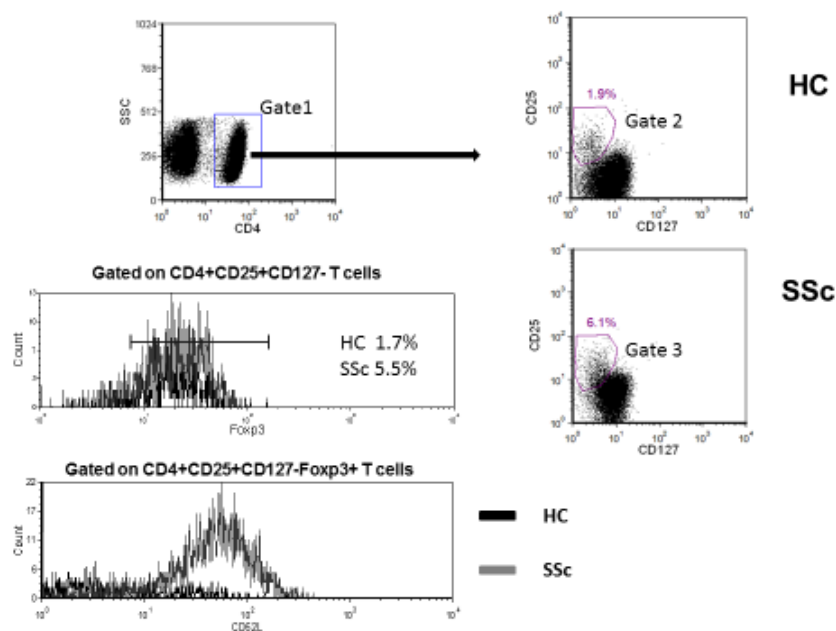
18. ábra Konfokális mikroszkóp felvételek GR és Foxp3 festést követően CD4⁺ T-sejteken, valamint a GR és Foxp3 kolokalizációjára kifejtett DX hatás. Kontroll és DX kezelt BALB/c egerek tímuszából és lépéből negatívan szelektált CD4⁺ T-sejteket jelöltünk anti-GR-FITC és anti-Foxp3-Alexa647 antitestekkel. A reprezentatív képeken a Treg sejtek GR (zöld) és Foxp3 (piros) jelölődése, illetve kolokalizációjuk, melyet a fuzionált képek sárga területei jelölnek. A tímusz Treg sejteiben a GR és Foxp3 kolokalizáció mértéke nem változott DX kezelés hatására, míg a lép Treg sejteiben a kolokalizáció szignifikáns növekedését tapasztaltuk ($p < 0,05$). A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk. (DIC, differential interference contrast)

5.2 Treg-ek vizsgálata szisztémás szkerózisban

5.2.1 Treg-ek azonosítása humán mintákban

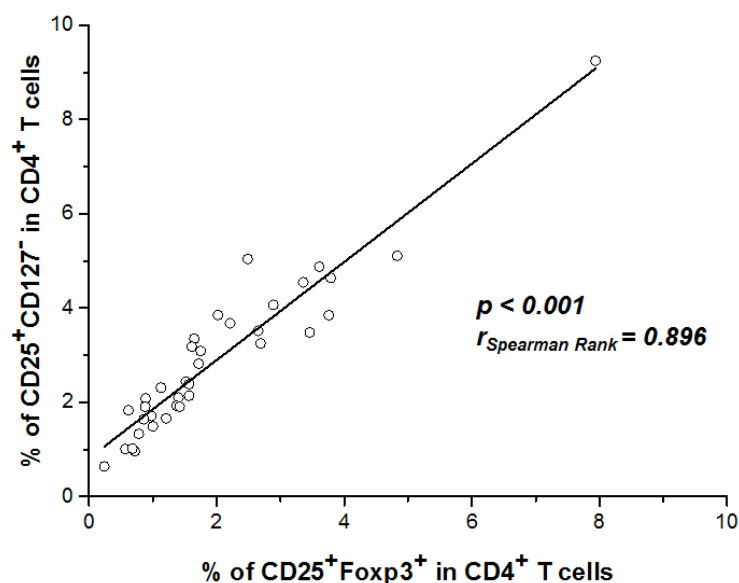
A Treg sejtek azonosítására három különböző, korábbi Treg sejt vizsgálatokon alapuló markerkombinációt alkalmaztunk. Összehasonlítottuk a „konvencionális” CD4+CD25+Foxp3+Treg jelölést, egy „kiterjesztett” (CD4+CD25+CD127-) sejtfelszíni és a kettő kombinációjából adódó “kombinált” CD4+CD25+Foxp3+CD127- jelöléssel az egészséges kontroll csoportban és az SSc korai formájában szenvedő betegcsoportban (19. ábra). Elsőként a Foxp3 pozitivitás és CD127 negativitás közötti összefüggést vizsgáltuk a CD4+CD25+ T-sejteken belül minden vérmintában. Szoros összefüggést ($p < 0.001$, $r = 0.896$) találtunk a mintákban előforduló Foxp3+ és CD127- sejtek arányai között (20. ábra), ami korábbi vizsgálatok eredményeivel összecseng^{93,94}. Ezt követően összehasonlítottuk a különböző markerkombinációkkal azonosított Treg arányokat az egészséges kontroll és SSc csoportban. A konvencionális Treg markereket, illetve a csak sejtfelszíni markereket tartalmazó kombinációkkal hasonló, de nem szignifikánsan emelkedett Treg sejtarányokat találtunk az SSc csoportban.

A CD4+CD25+Foxp3+CD127- markerkombinációt alkalmazva szignifikánsan emelkedett Treg sejtarányt találtunk az SSc csoportban az egészséges kontroll csoporthoz képest ($p < 0.05$) (21. ábra). Ezen adatok alapján későbbi kísérleteink folyamán a CD4+CD25+Foxp3+CD127- markerkombinációt használtuk, amely a jelenlegi legpontosabb és legszigorúbb kombinációnak tekinthető a Treg-ek azonosítására²⁶.



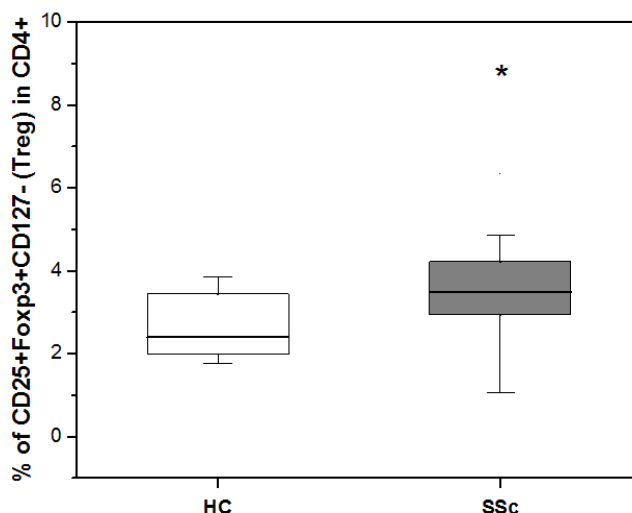
19. ábra A Treg és alcsoportok azonosításának kapuzási stratégiája

CD25, CD127, CD62L és Foxp3 markerek kombinációját használtuk a CD4 kapun belül a Treg-ek meghatározására egészséges kontrol és SSc csoportokban. Egészséges kontrol (Gate2) és SSc esetek (Gate3) CD25+/CD127- sejtarányainak összehasonlítása történt CD4+ sejteken belül (Gate1) (dot plotok), majd ezen populáció Foxp3 pozitivitását vizsgáltuk (felső histogram). A CD62L pozitivitást a CD4+CD25+Foxp3+CD127- populáción belül vizsgáltuk (alsó histogram).



20. ábra A Foxp3 pozitívítás és CD127 negativitás közötti korreláció

A CD4+CD25+Foxp3+ sejtarányokat korreláltattuk a CD4+CD25+CD127- sejtarányokkal az össze vizsgált mintában (egészséges kontrol és SSc betegek együtt). Szoros összefüggést találtunk a CD4+CD25+Foxp3+ és a csak sejtfelszíni jelöléssel (CD4+CD25+CD127-) azonosított Treg arányok között ($p < 0,001$; $r = 0,896$; $n = 36$).

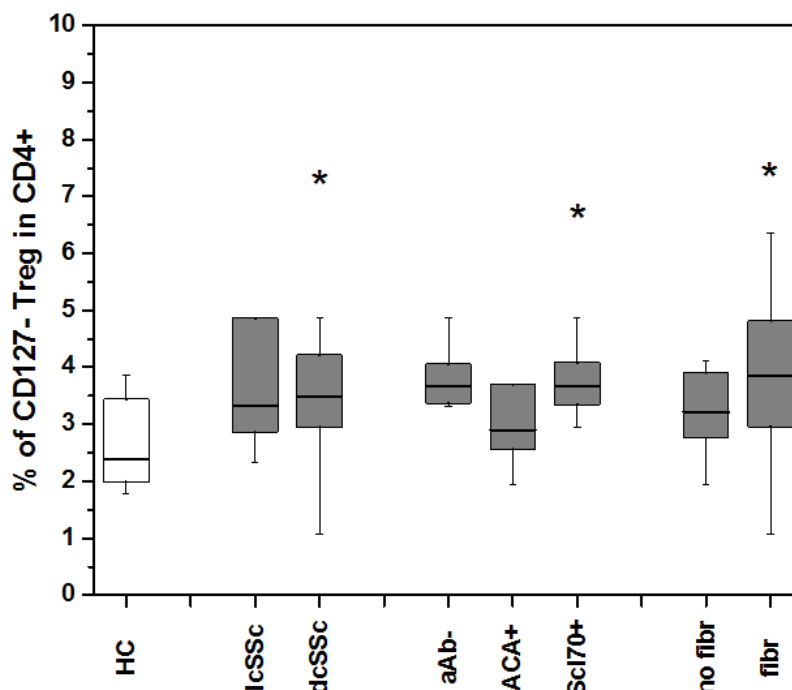


21. ábra Treg arányok egészséges kontrollokban (HC) és Szisztémás szklerózisban (SSc)

A „kombinált” jelölést alkalmazva ($CD4+CD25+Foxp3+CD127-$) a Treg-ek szignifikánsan magasabb arányait találtuk SSc betegek mintáiban az egészséges kontrol csoporthoz hasonlítva (* $p < 0.05$, $n_{SSc} = 26$, $n_{HC} = 10$). A boxok az IQR-t jelenítik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

5.2.2 Emelkedett CD127-Treg arány csökkent IL-10 termeléssel dcSSc-ben

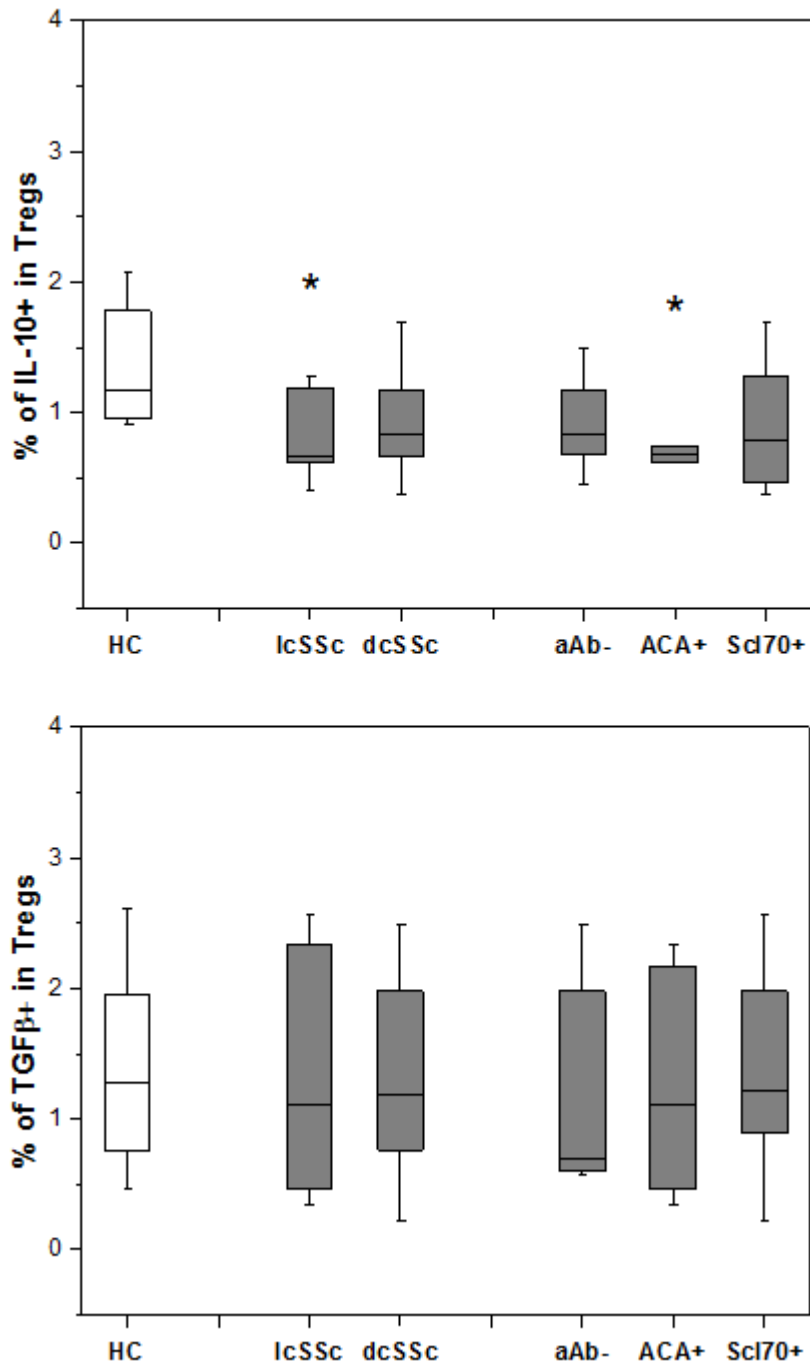
Miután az SSc-ben szenvedő betegek emelkedett Treg arányát találtuk a $CD4+$ T-sejeken belül a “kombinált” jelölés segítségével, az SSc betegcsoportot további alcsoportokra bontva, - mint limitált és diffúz SSc forma (lcSSc és dcSSc); különböző autoantitestek jelenléte és a tüdő fibrózisának jelenléte alapján – vizsgáltuk tovább. A diffúz formában szenvedő, az anti-Scl-70 és anti-RNA-Pol-III autoantitest szeropozitivitást mutató, valamint a tüdő fibrózisával érintett betegalcsoportokban szignifikánsan magasabb Treg arányokat találtunk az egészséges kontrollok mintáihoz viszonyítva ($p < 0.05$) (22. ábra).



22. ábra Treg sejtarányok egészséges kontroll csoportban és az SSc különböző alcsoportjaiban

Szignifikánsan magasabb CD127-Treg arányokat (a CD4+ T-sejteken belül) találtunk dcSSc esetekben (* $p < 0.05$, $n_{dcSSc} = 19$, $n_{HC} = 10$), az Scl-70+/RNA-Pol-III+ esetekben ($p < 0.05$, $n_{Scl-70+/RNA\ pol\ III+} = 12$, $n_{HC} = 10$) és a tüdő fibrózisával érintett (fibr) esetekben (* $p < 0.05$, $n_{fibr} = 17$, $n_{HC} = 10$) egészséges kontrollokhoz képest. A boxok az IQR-t jelenítik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

Szintén vizsgáltuk a Treg sejtek jellemző citokinjeinek (IL-10 és TGF β) eltéréseit a különböző betegségalcsoportokban. Az egészséges kontrol csoporthoz viszonyítva szignifikánsabb alacsonyabb IL-10 pozitív Treg arányokat találtunk az SSc csoportban ($p < 0.05$), ami a további felosztás során a limitált formában, illetve ACA (anti-centromere antibody) pozitivitás esetén bizonyult szignifikánsnak ($p < 0.05$), de gyakorlatilag az összes felosztási szempont által képzett alcsoportban jelen volt (23. ábra). A TGF β pozitív Treg arány egyik felosztás szerinti alcsoportban sem mutatott szignifikáns eltérést.

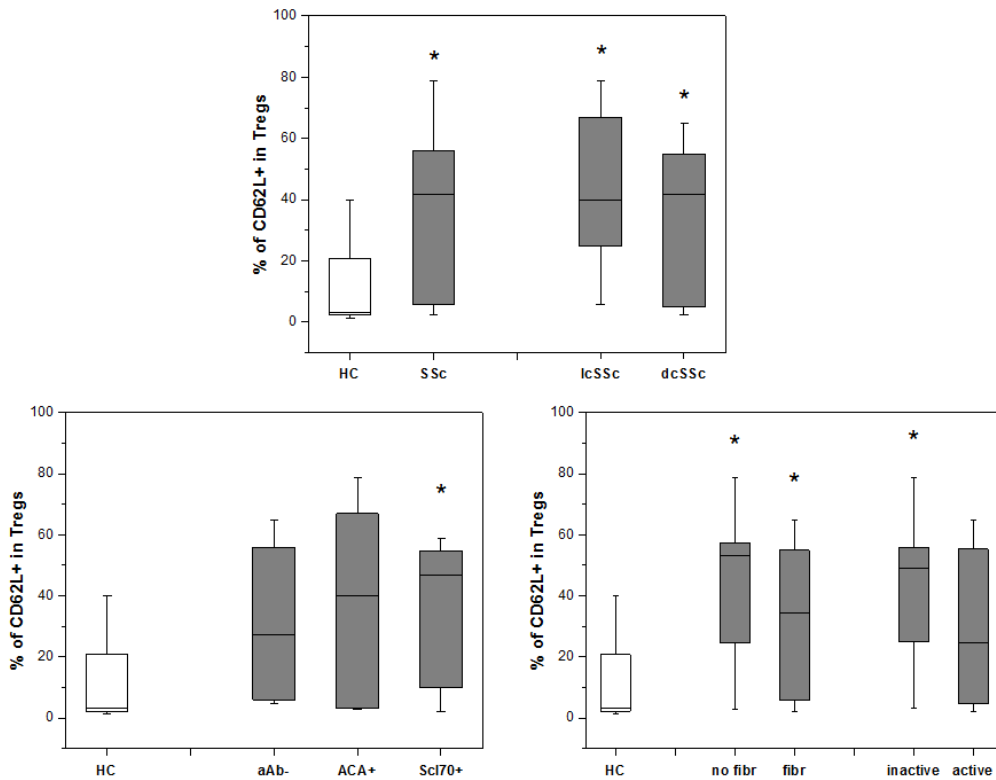


23. ábra Treg citokinek (IL-10, TGFβ) egészséges kontroll csoportban és az SSc különböző alcsoportjaiban

lcSSc és ACA+ esetekben az IL-10 pozitív Treg-ek alacsonyabb arányait találtuk (* $p < 0.05$, $n_{lcSSc} = 7$, $n_{HC} = 10$) (* $p < 0.05$, $n_{ACA+} = 6$, $n_{HC} = 10$). Hasonló tendencia, de nem szignifikáns különbség volt megfigyelhető a többi betegségalcsoportban is. A TGFβ pozitív Treg arányok nem különböztek az egyes betegségalcsoportokban. A boxok az IQR-t jelentik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

5.2.3 Emelkedett CD62L+Treg arány és csökkent TGFβ termelés SSc-ben

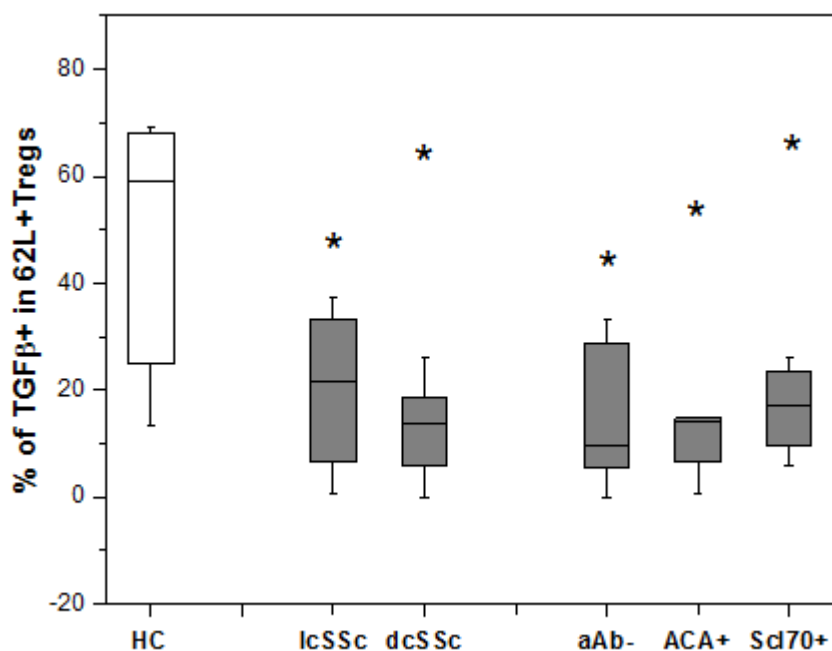
A különböző recirkulációs (“homing”) sajátosságokkal rendelkező Treg-ek vizsgálata érdekében elemeztük a CD62L pozitív (L-selectin) Treg-ek előfordulási gyakoriságát a CD4+CD25+Foxp3+CD127- Treg csoporton belül, valamint ezen sejtek citokin pozitivitását is. A Treg-ek szignifikánsan magasabb aránya CD62L+ az SSc betegcsoportban az egészséges csoporthoz viszonyítva ($p < 0.05$) (24. ábra). A betegcsoportot a korábban leírtak szerint tovább felosztva – az autoantitest negatívitást és az ACA pozitívitást mutató csoportot leszámítva – minden alcsoportban szignifikánsan magasabb CD62L+Treg arányokat találtunk ($p < 0.05$) (24. ábra). Tehát a betegség gyakorlatilag minden formájában magasabb az erősebb szuppresszor funkcióval bíró CD62L+ Treg-ek⁹⁵ előfordulási aránya.



24. ábra CD62L+Treg sejtarányok egészséges kontroll csoportban és az SSc különböző alcsoportjaiban

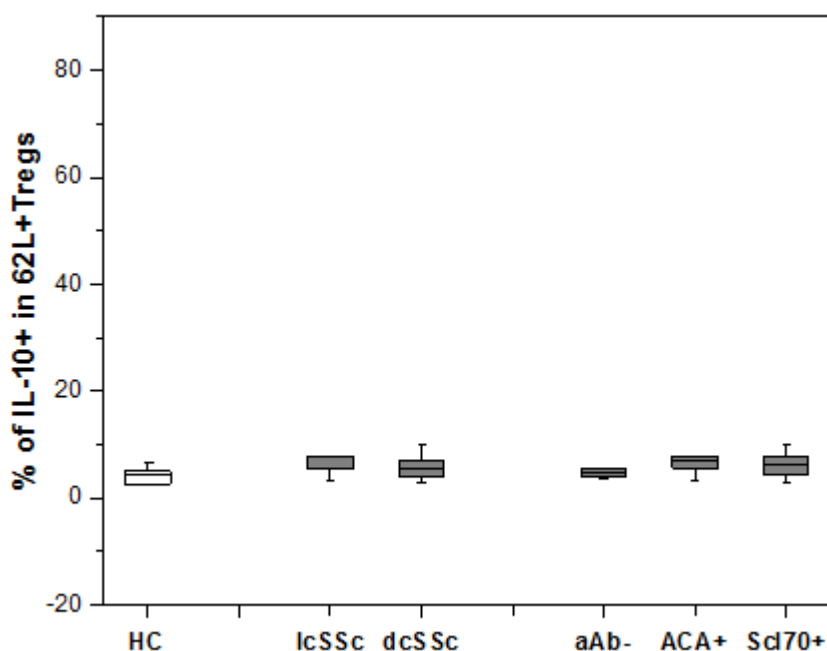
A CD62L+ Treg arány az lcSSc és a dcSSc esetekben is magasabbnak bizonyult az egészséges control csoporthoz hasonlítva (* $p < 0.05$, $n_{SSc} = 26$, $n_{HC} = 10$), és az összes betegcsoportban is, az autoantitest negatív (aAb-) és ACA+ eseteket kivéve. A boxok az IQR-t jelenítik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

A következőkben a CD62L+ Treg citokinjeit vizsgáltuk. Az egészséges kontroll csoport mintáiban lényegesen magasabb volt az IL-10 pozitív és a TGFβ pozitív CD62L+ Treg arány (IL-10: $4.3 \pm 0.6\%$; TGFβ: $49.1 \pm 9.6\%$), mint a teljes Treg populációban mért citokin pozitivitás (IL-10: $1.3 \pm 0.2\%$; TGFβ: $1.4 \pm 0.2\%$). Az lcSSc és a dcSSc alcsoportban is szignifikánsan alacsonyabb TGFβ pozitív CD62L+ Treg arányt találtunk az egészséges csoporthoz viszonyítva. Az autoantitest pozitivitás alapján történő felosztás esetében mindhárom csoportban (autoantitest negatív, ACA pozitív, Scl-70 és RNA-Pol-III pozitív) szintén szignifikánsan alacsonyabb TGFβ pozitív CD62L+ Treg arányt találtunk ($p < 0,05$) (25.A ábra). Az IL-10 pozitív CD62L+Treg arányokban nem tapasztaltunk különbségeket egyik alcsoport esetében sem (25.B ábra). A citokin pozitív CD62L+ Treg-ek ilyen csökkenése és emellett arányuk növekedése, a Treg-ek funkcionális kimerülésére utalhat.



25.A ábra CD62L+Treg citokinek (IL-10, TGFβ) egészséges kontroll csoportban és az SSc különböző alcsoportjaiban

A TGFβ pozitív CD62L+Treg arányok alacsonyabbak mind lcSSc, mind a dcSSc (* $p < 0.05$, $n_{lcSSc} = 7$, $n_{dcSSc} = 19$, $n_{HC} = 10$) az autoantitest pozitivitástól függetlenül (* $p < 0.05$, $n_{aAb-} = 8$, $n_{ACA+} = 6$, $n_{Scl-70+/RNA\ pol\ III+} = 12$, $n_{HC} = 10$). A boxok az IQR-t jelentik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

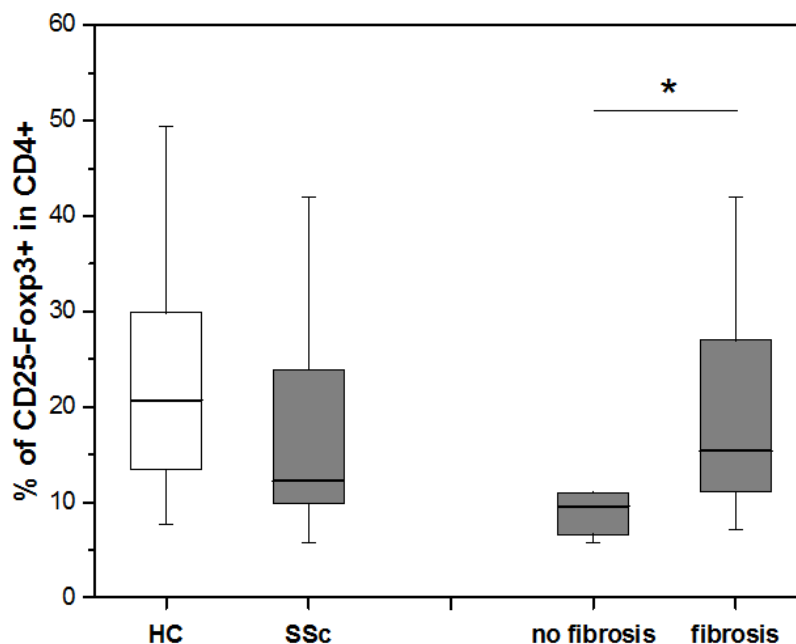


25.B ábra CD62L+Treg citokinek (IL-10, TGF β) egészséges kontroll csoportban és az SSc különböző alcsoportjaiban

Az IL-10 pozitív CD62L+Treg arányok egyik betegségealcsoportban sem mutatnak különbséget az egészséges control csoporthoz hasonlítva. A boxok az IQR-t jelenítik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

5.2.4 CD4+CD25-Foxp3+ T-sejt gyakoriság

Korábban leírtak egy CD4+CD25-, de Foxp3+ sejtcsoportot, mely megfelelő hatásokra CD25+, Treg fenotípusná konvertálható⁹⁶. Ezen CD4+CD25-Foxp3+, Treg rezerv sejtpopuláció érintettségét is vizsgáltuk SSc-ben. Egészséges kontrolokhoz hasonlítva egy nem szignifikáns, de tendenciózusan alacsonyabb CD4+CD25-Foxp3+ T-sejt arányt találtunk SSc-ben. A tüdő fibrózisával nem érintett SSc betegcsoportban ezen sejtcsoport aránya viszont szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a tüdő fibrózisával érintett csoporthoz képest ($p < 0.05$) (26. ábra). Ebből arra következtetünk, hogy a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek olyan nagy arányban alakulnak át Treg sejtekké, hogy ez a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek relatív hiányát okozza.



26. ábra Megváltozott $CD4+CD25-Foxp3+$ T-sejt arányok SSc-ben

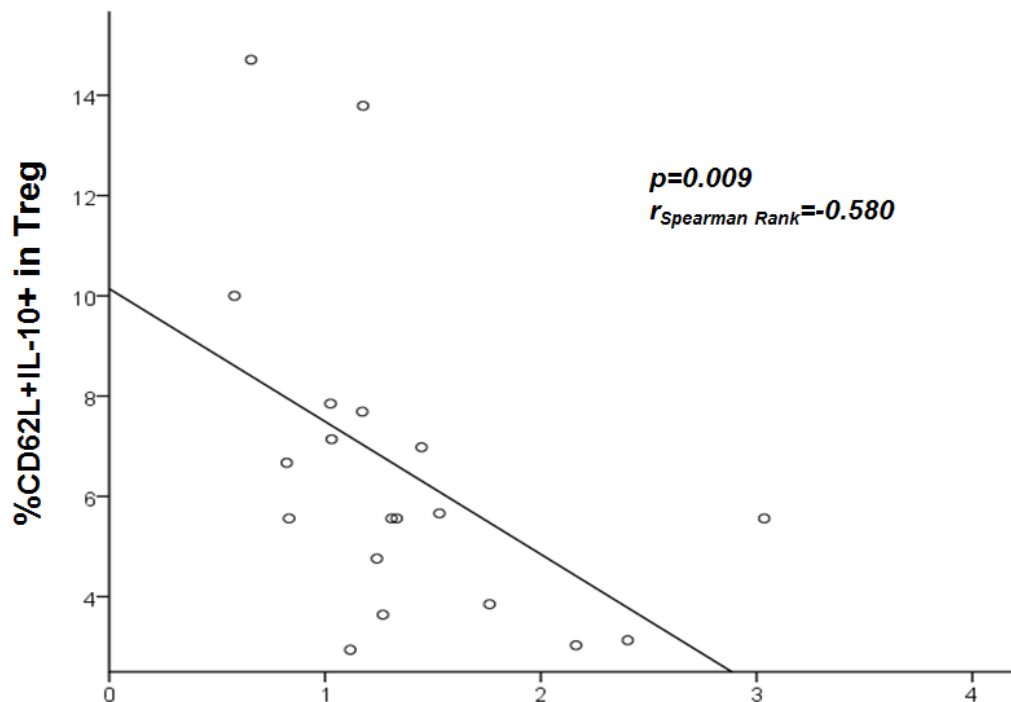
A $CD4+CD25-Foxp3+$ T-sejtek aránya SSc-ben nem mutat szignifikánsan alacsonyabb arányokat egészséges control mintákhoz hasonlítva, de a tüdő fibrózisával érintett csoportban szignifikánsan magasabb az arányuk a tüdő fibrózisával nem érintett csoporthoz képest (* $p < 0.05$, $n_{nofibr} = 9$, $n_{fibr} = 17$). A boxok az IQR-t jelenítik meg, a „whisker”-ek a legkisebb és legnagyobb értéket, míg a vízszintes vonal a medián értéket.

5.2.5 Emelkedett *FOXP3* génexpresszió aktív SSc-ben

Vizsgáltuk a *FOXP3* gén expresszióját qRT-PCR-al SSc-ben szenvedő betegek B-sejt depletált limfocita mintáiban. A relatív génexpresszió értékei (RQ) az egyes SSc betegminták génexpressziós szintjének az egészséges kontrolok átlagértékét véve $RQ=1$ -nek lettek kiszámítva. Szignifikánsan magasabb számban találtunk upregulált *FOXP3* expressziót ($RQ>2$) mutató mintákat (7 a 14-ből) az aktív betegcsoportban az inaktív betegcsoporthoz hasonlítva (1 a 11-ből) (5. táblázat). A *FOXP3* génexpresszió és a korábban definiált Treg alcsoportok közötti korreláció analízis egy inverz összefüggést mutatott a *FOXP3* RQ értékek és az IL-10 pozitív $CD62L^+$ Treg arányok között ($p=0,009$; $r_{Spearman Rank} = -0,580$) (27. ábra). Ez az összefüggés alátámasztja a $CD62L^-$ effektor memória Treg sejtek funkcionális károsodását SSc-ben.

	Esetszám	FOXP3		P-érték
		emelkedett	normál	
Aktivitás				
igen	14	7	7	=0.042
nem	11	1	10	
Tüdőfibrozis				
igen	16	4	12	=0.394
nem	9	4	5	
Autoantitest				
ACA +	9	4	5	=0.581
Slc70 +	5	1	4	
Más +	11	3	8	
Alcsoport				
lcSSc	7	3	4	=0.64
dcSSc	18	5	13	

5. táblázat A FOXP3 génexpresszió és az SSc klinikai vonásai közötti összefüggés

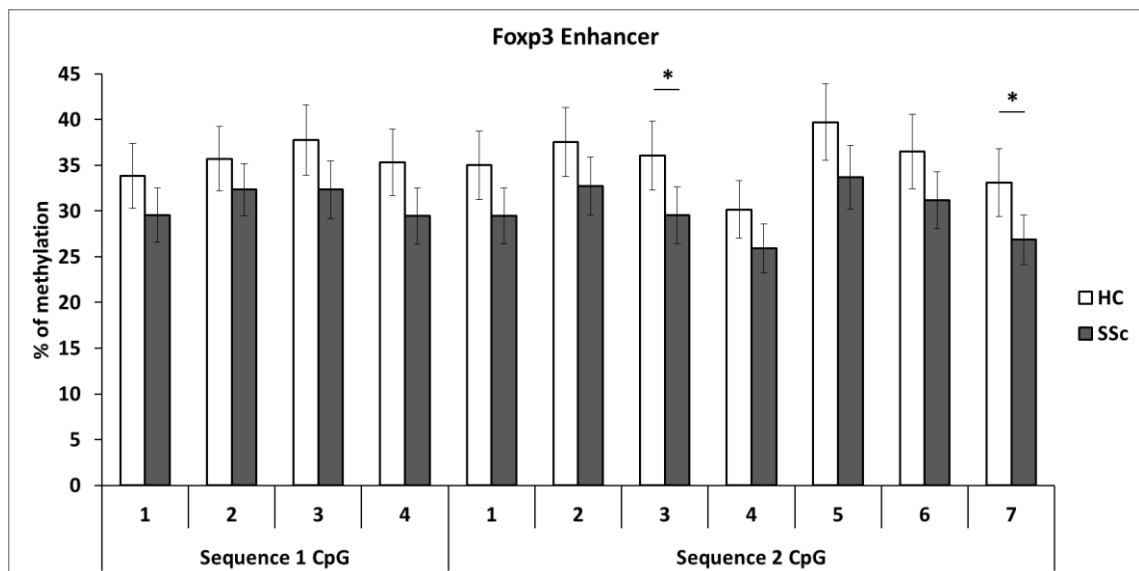


27. ábra CD62L+Treg IL-10 pozitivitása és a Fxp3 génexpresszió közötti összefüggés

Szignifikáns, negatív korreláció volt felfedezhető a relatív FOXP3 génexpresszió (RQ értékek) és az IL-10 pozitív CD62L+Treg populáció között ($p < 0.009$, $r = -0.580$, $n = 26$) SSc esetekben.

5.2.6 Hipometilált CpG-k a FOXP3 upstream enhancer régióban SSc-ben

Mivel a *FOXP3* gén expressziója több SSc-ben szenvedő beteg mintájában is upregulációt mutatott, vizsgáltuk a FOXP3 génlókuszt proximális promotor és upstream enhancer CpG régióinak metilációs státuszát. Egyik felosztás szerinti betegcsoportban sem találtunk szignifikáns különbséget a promotor régiók metilációs státuszában a kontroll mintákhoz hasonlítva. Ezzel szemben a *FOXP3* upstream enhancer 1 és 2 régióban tendenciózusan alacsonyabb metilációs arány mutatkozott az SSc mintákban a kontrolokhoz hasonlítva, míg szignifikáns volt a hypometiláció a *FOXP3* upstream enhancer 2 régiójában a 3 és 7 CpG szekvenciáknál (28. ábra). Ez az adat emelkedett, stabil Foxp3 expresszázó sejtpopuláció jelenlétére utal SSc-s betegekben.



28. ábra A FOXP3 enhancer 1 és 2 régiók metilációs státusza egészséges kontroll csoportban és SSc-ben.

A FOXP3 gén enhancer régiójának minden CpG régiója tendenciózusan alacsonyabb metilációs arányt mutatott. Szignifikáns hypometilációt találtunk a FOXP3 upstream enhancer 2 régiójában a 3 és 7 CpG szekvenciáknál (* $p < 0.05$, $n_{SSc} = 26$, $n_{HC} = 10$). A diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ($\pm SEM$) ábrázoltuk.

6. Összefoglalás és következtetések

6.1 Treg sejtek ösztételének és glukokortikoid hormon érzékenységének vizsgálata egérmodellen

Az allo- és autoantigénekkal szembeni immunválasz gátlásával a regulatórikus T-sejtek (Treg) és glukokortikoid hormonok (GC) fontos tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Gyulladásos betegségek, autoimmun és transzplantált betegek kezelésének egyik legfontosabb eszközei a GC analógok, mégis keveset tudunk a Treg sejtekre kifejtett hatásairól.

Munkánk során a GC kezelés centrális és perifériás nyirokszervekben előforduló természetes és perifériás Treg sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk.

Nagy dózisú, ismételt DX kezelés hatására a tímusz és a lép szerkezete is megváltozott, a T-sejt zóna diffúzzá vált. A tímuszban a természetes Treg sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, a kezelés hosszával párhuzamosan pedig tovább nőtt, miközben az összsejtszám drámaian csökkent – ami a kettős pozitív GC érzékeny timociták pusztulásával magyarázható. Eközben a Treg sejtszám nem változott, így a tapasztalt arány növekedése kizárólag azok túléléséből adódik.

A perifériás nyirokszervekben sokkal magasabb a Treg-ek aránya, de kezelés hatására ez nem változott, miközben az összsejtszámok csökkentek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a periférián főleg pTreg-ek fordulnak elő nagy számban, és ezek másképp reagálnak GC expozícióra. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a tTreg sejtek rezisztensek a GC indukálta apoptózisra, ezáltal növekszik arányuk.

Mivel az tTreg-ek a tímuszban jönnek létre, joggal feltételezhető, hogy előfordulásuk ott a leggyakoribb. A tímuszban a vártan megfelelően igen magas a Helios-pozitivitás a Treg-sejteken belül. Meglepő azonban, hogy a perifériás nyirokszervekben is a Treg-ek fele Helios-pozitív. Ez az eredmény kétséget ébreszt a Helios markerként való felhasználását illetően a tTreg és pTreg alcsoportok elkülönítésében⁵³. Ha a periférián valóban ilyen magas a tTreg-sejtek előfordulása, akkor az összsejtszám csökkenése mellett a Treg-ek arányának – a tTreg-ek szteroidrezisztenciája miatt – növekednie kellett volna, de ez egyik perifériás nyirokszervben sem történt meg, sőt, a nyirokcsomókban még szignifikáns csökkenésüket is tapasztaltuk. Eredményeink inkább azt a megállapítást támasztják alá, hogy a periférián a Helios T-sejt-aktivációs marker, és bár kétségtelen, hogy centrálisan

magasabb a Helios pozitivitás a Treg-eken belül, expressziója mégsem kizárólag tTreg-re jellemző.

Megállapítottuk, hogy a tTreg-ek rezisztensek a GC indukálta apoptózisra a tímuszban tapasztalt változások alapján, tehát a tTreg-ek aránya nem változhatna a kezelés hatására, de legalábbis nem csökkenhetne. Ennek ellenére a perifériás nyirokcsomóban jelentősen csökkent az arányuk. A többi perifériás nyirokszervben azt mondhatjuk, hogy nincs változás. A tímuszban viszont majdnem 90%-ra emelkedik a Helios⁺ sejtek aránya, ami további bizonyíték a tTreg-ek szteroid rezisztenciájára.

GC analóg adása in vitro a GR szignifikáns down-regulációját okozza⁹⁷. In vivo kísérleteinkben ismételt, nagy dózisú DX kezelést követően a tímusz tTreg sejteiben emelkedett GR fehérjeszinteket találtunk, míg a lép eredetű pTreg-ekben – melyek szignifikánsan magasabb GR expressziót mutattak a tTreg-ekhez képest – a kezelés hatására szignifikánsan csökkent a GR expresszió. Ez a GC indukált GR upreguláció jellemző a kettős pozitív timocitákra, míg a GR downreguláció az egyszerűen pozitív és érett T-sejtek olyan tulajdonsága, melyet az intézetünk által korábban végzett vizsgálatok eger és humán sejteken is leírtak^{90,91}. 24 órával az utolsó DX kezelést (2.) követően nem tapasztaltunk változást a GR mRNS expresszióban sem a tímusz eredetű, se a lép eredetű Treg-ekben. Ez összefügghet a tímuszban és perifériás szervekben található Treg-sejtek eltérő GC-érzékenységgel. Treg-sejtekben a GC által elindított jelátviteli útvonalak tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Megemlítendő, hogy DX kezelést követően az állatok perifériás vérében a Treg sejtarány sajátos idő-függő kinetikát mutatott: átmeneti sejtarány emelkedés az oltást követő 4-8 óránál jelentkező csúccsal, majd visszatérés a kezeletlen kontroll szintekre. Ez a Treg sejtek különböző limfoid szervekből történő „kiszabadulásának” következménye lehet, illetve arra utalhat, hogy a DX kezelés a vérben egy átmeneti immunszuppressziót, és Treg átrendeződést okoz. Mivel a Treg-ek különféle mikrobiális infekciókban játszhatnak szerepet⁹⁸ arányuk relatív növekedése érintheti a gazdaszervezet fogékonyságát fertőző betegségekkel szemben is.

Egy adott sejt GC érzékenysége a GC expressziójának szintjétől és különböző jelátviteli utakkal való összekapcsolódásától függ^{89,99}. Intézetünkben végzett korábbi kísérletek alapján ismert, hogy az éretlen DP timociták expresszálják a legalacsonyabb szinten a GR-t, ennek ellenére a legérzékenyebb sejtpopuláció a GC-indukálta apoptózisra^{88,92}. A GC kezelést túlélő, SP sejté differenciálódó timocitákban ugyanakkor

a GR upregulációja figyelhető meg. Az érett, perifériás limfocitákban ugyancsak magasabb a GR szint, sokkal rezisztensebbek a GC-analóg kezelésekkel szemben, és bennük a GR szignifikáns downregulációja figyelhető meg GC kezelést követően⁹⁷. Jelenlegi adataink azt mutatják, hogy a kezeletlen kontroll állatok tímuszában található Treg-ek GR expressziója alacsonyabb, mint a lép Treg sejtjeiben, ami a lokális mikrokörnyezeti hatások következménye lehet (mint például a lokális GR termelés). GC kezelés hatására a tímuszban a Treg sejtek GR expressziója emelkedett, míg a lép Treg sejtjeiben downreguláció volt megfigyelhető, ami szintén a tímusz eredetű és perifériás Treg-ek különböző GC szenzitivitására utalhat. A GC hatására aktivált jelátviteli utak a Treg sejtekben azonban további vizsgálatokat igényelnek.

In vivo ismételt DX kezelés hatására megemelkedett IL-10 és TGF β pozitív Treg arányokat találtunk. Mindkét említett citokin immunosuppresszív aktivitással rendelkezik^{100,101}, a TGF β -t a „purveyor of immune privilege” (immunválaszt kiváltó)-nek is nevezik¹⁰². Az IL-10 és a TGF β a Treg sejtek gátló hatásának fő mediátorai az effektor T-sejteken és az immunrendszer más sejtjeiben. Adataink azt mutatják, hogy a DX kezelés az IL-10 és TGF β pozitív Treg arányok emelkedését okozza mind a tímuszban, mind a lépben. Ezen citokinek relatív expressziója mRNA szinten is emelkedést mutatott, kivéve az IL-10 esetében a lépben. Azonos mértékű Foxp3 mRNA szinteket találtunk a tímusz eredetű és lépből izolált Treg sejtekben, de a DX kezelés hatására csak a lépben tapasztaltuk szignifikáns emelkedést. Ez összecseng a lép eredű TGF β pozitív Treg arányok emelkedésével, és magyarázhatja ezen sejtek TGF β mRNA szintjének upregulációját is. Az IL-10 fehérje és mRNA közötti korreláció hiánya a lépben adódhat abból a tényből, hogy a kezeletlen állatok CD4+CD25+ FACS szeparált sejtjei között aktivált, IL-10 termelő helper T-sejtek is megtalálhatóak, de ezek a sejtek a DX kezelés hatására eltűnnek, így a DX hatására bekövetkező IL-10 változások mRNA szinten nem detektálhatóak. Ezen felül sokféle fehérje és azoknak megfelelő mRNA között találtak hasonló eltéréseket különböző sejtjelekben és szövetekben¹⁰³.

Adataink alátámasztják, hogy a GC kezelés a tímuszban és lépben is a Treg sejtek immunosuppresszív tulajdonságait fokozza. Tehát a DX (és esetlegesen más GC-k) a glukokortikoidok számos hatásmechanismusa^{89,99} mellett befolyásolhatják fő immun szabályozó utakat és mechanizmusokat azáltal, hogy elősegítik a Treg sejtek szelektív túlélését és ezen sejtek immunosuppresszív citokinjeinek termelését növelik.

A tímuszban és a lépben a GR és a Foxp3 fizikai kolokalizációját tudtuk kimutatni. DX kezelés hatására a lépben a kolokalizáció szintje fokozódott. Ez arra utal, hogy a GR és a Foxp3 transzkripciós faktorok a kromatin meghatározott régióhoz kapcsolódnak, ahol a transzkripciót közösen vagy egyenként szabályozzák. Korábbi tanulmányok szerint a GR kapcsolódik a nukleázok számára is hozzáférhető open-kromatin régiókhoz¹⁰⁴, amely meglévő enhancer régiókat a Foxp3 kihasznál és ahhoz kapcsolódik a Treg sejt specifikáció során¹⁰⁵. Ezen adatok fényében logikusan felmerül a kérdés: Van-e bizonyíték a GR és Foxp3 transzkripciós hálózatok közti kapcsolatról? Ezzel kapcsolatban DX kezelt egér sejtekben teljes genomra kiterjedő ChIPseq és microarray analízis segítségével meghatározták a GR-kötő helyeket. Több gén mellett a *FOXP3* gén is tartalmazott GR-kötő régiót¹⁰⁶. Ez arra utal, hogy emlős sejtekben a GR befolyásolhatja a *FOXP3* gén aktivitását, és a Foxp3 pedig így szabályozhatja többféle célgén aktivitását^{107,108}. A GR és Foxp3 kolokalizációt mutató adataink alátámaszthatják a feltevést, miszerint Treg sejtekben a glukokortikoidok direkt módosítják a *FOXP3* gén aktivitását, így befolyásolva az immunrendszer egy fő szabályozó ágát.

Jelen adatok alapján egy másik érdekes kérdés, hogy van-e additív vagy szinergikus hatása a Treg-ekben a megemlekedett Foxp3, IL-10 és TGF β között. Ezen faktorok közti ismert genomszintű (epigenomszintű) és fehérje jelátviteli utak közti kölcsönhatásaikra alapozva azt feltételezzük, hogy léteznek az előbb említett hatások. Először is, a Foxp3 alacsony szintű expressziója korlátozott Treg fenotípust indukál alacsony, vagy teljesen hiányzó szuppresszor funkcióval, és a teljes szuppresszor hatás csak a Foxp3 magas expressziójával érhető el¹⁰⁹. Aztán a Foxp3 gén indukcióját Treg-ekben a TGF β jelátvitel segíti elő (azáltal, hogy a Smad2/3 a Foxp3 gén CNS1 régiójához kapcsolódik), és a TGF β része a pozitív visszacsatolási huroknak a Foxp3+ Treg sejtek kialakulásában^{108,110}. Végül pedig az IL-10 parakrin úton hatva a Treg-ekre segíti a Foxp3 expresszió fenntartásában¹¹¹.

Humán vizsgálatok során nyert adatok szerint a glukokortikoid kezelés növeli a Treg sejtek arányát és/vagy funkcióját különböző betegségekben. Például szklerózis multiplexben szenvedő betegek esetében GC kezelés hatására a CD4⁺CD25^{high} sejtek arányának emelkedését és a Foxp3 expresszió növekedését figyelték meg, és arra a következtetésre jutottak, hogy a szteroidok így mozdítják elő a relapsusból való felépülést¹¹². Graves-betegségben szenvedők esetében a dexametazon kezelés javítja a Treg funkciót¹¹³, míg nikkel allergia esetében az orális GC kezelés fokozott Treg választ váltott ki a bőrben¹¹⁴.

Összefoglalva eredményeink alapján a GC-analóg dexametazon kezelés a Treg-ek arányának növekedését okozta, és ezen Treg-ek fokozott szinten termelték az IL-10 és TGF β immunosuppresszív citokineket. Ezen adatok hozzájárulnak a glukoortikoidok azon biológiai hatásainak ismeretéhez, melyek az immunrendszer szabályozó ágát befolyásolják, és olyan klinikai állapotokban is jelentőségük lehet, ahol hasznos lehet a Treg sejtek aktivitásának fokozása.

6.2 Treg sejtek összetételének és funkcióinak vizsgálata szisztémás szkerózisban

Az SSc egy krónikus, progresszív megbetegedés, amely kiterjedt dermális és vizcerális gyulladással, érkárosodással és autoantitest termeléssel jár, ami immunológiai folyamatok részvételét jelzi. A Treg sejteket döntő fontosságú résztvevőként azonosították a celluláris és humorális immunválasz mértékének korlátozásában. A Treg-ek száma és aktivitása meghatározóan befolyásolhatja a betegség lefolyását¹¹⁵. Kísérleteink során első célunk az volt, hogy azonosítsuk a Treg sejteket a CD4+ T-sejt populáción belül, különböző sejtfelszíni és intracelluláris markerek kombinációjával, beleértve a az intracelluláris Foxp3 transzkripciós faktort is, amely érintett a Treg differenciálódásban¹¹. Élő Treg sejtek izolálásához konvencionálisan sejtfelszíni jelölést alkalmaznak, és CD4+CD25^{high}+CD127⁻ fenotípus alapján készült Treg analízis szoros korrelációt mutatott a Foxp3+ és CD127⁻ Treg-ek között az általunk végzett kísérletekben is. Mindazonáltal a Foxp3 pozitivitás és CD127 negativitás együttes felhasználása a Treg sejtek azonosítására^{93,116} szignifikáns különbségeket fedett fel az SSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok mintáinak Treg arányai között.

Korábbi vizsgálatok emelkedett Treg arányokat találtak SSc-ben^{24,26,117}, míg mások csökkent szintjeiről számoltak be²⁷. Egyik alapvető eredményünk a korai stádiumú SSc-s miták emelkedett CD127-Treg aránya az egészséges kontroll minták Treg arányához képest. A statisztikailag szignifikánsan magasabb Treg arányok még kifejezettebbek voltak a betegség súlyosabb formáiban, úgy mint a dcSSc, Scl-70 és RNA-Pol-III autoantitest pozitív és tüdőfibrózis esetében. Bár ellentmondásosak az eredmények a Treg alpopulációk változásait illetően SSc-ben¹¹⁵, adataink az SSc-s betegek perifériás vérében emelkedett Treg arányokat mutató vizsgálatokat támasztják alá, melynek háttérében a CD62L+Treg-ek arányának jelentős növekedése áll. A

CD62L+Treg-ek a természetes, vagy tímusz eredetű Treg sejtpopulációt és centrális memória Treg sejteket képviselnek³³, melyek egy a nyirokszervekbe történő recirkulációs mintázatot mutatnak, így szuppresszáva a naív CD4+ T-sejtek aktivációját. Egérkísérletek során kimutatták, hogy a CD62L+Treg-ek szignifikánsan magasabb gátló aktivitással rendelkeznek, mint CD62L negatív társaik⁹⁵. Egy másik tanulmányban cöliákiában szenvedő betegek CD62L+Treg sejtjeit mint a Treg-ek limfoid szövet homing csoportját írták le, míg a CD62L negatív Treg-ek a mukózális homing csoport, melyek a szöveti immunhomeosztázisért felelősek¹¹⁸.

SSc-ben nem csak a CD62L pozitív és negatív Treg-ek közötti egyensúly eltolódását találtuk, hanem a Treg-ek funkciójának zavarát is, úgy mint csökkent IL-10 termelés a teljes Treg populációban, és csökkent TGF β termelés a CD62L+Treg alcsoportban. Mivel a Treg eredetű anti-inflammatorikus citokinek központi szerepet játszanak az immunválasz gátlásában és a gyulladásos és autoimmun folyamatok patológiájában¹¹⁹, az IL-10 pozitív Treg-ek ilyen csökkenése és emellett a Treg arányának növekedése a Treg-ek funkcionális kimerülésének következménye lehet, más T-sejt populációkhoz hasonlóan^{120,121}. Kísérleteinkben nem találtuk csökkenteni a CD62L+Treg-ek IL-10 pozitivitását, ami arra utalhat, hogy a CD62L-Treg alcsoportok (Tr1¹²², vagy CD62L- effektor memória Treg³³) IL-10 termelése elégtelen. Kimutatták, hogy ezek a sejtek felelősek a szöveti homeosztázis egyensúlyáért és a gyulladásos válaszok gátlásáért a bőrben és a mukózában. A vizsgálataink során talált emelkedett *FOXP3* génexpresszió az SSc aktív formájában és ennek inverz korrelációja a CD62L+IL-10+ Treg-ekkel szintén alátámasztják az effektor memória Treg sejtek funkcionális károsodását SSc-ben. A másik fontos citokin a Treg funkcióban a TGF β ¹²³, melynek szintje csökkent a CD62L+Treg populáción belül, de a teljes Treg csoporton belül nem. Ezen adatok a CD62L+ tTreg-ek és centrális memória Treg-ek funkciójának károsodását, és emellett a Th3 alcsoport – mely TGF β -t termel – funkciójának érintetlenségét támasztják alá¹²². Az IL-10 és TGF β expresszázó Treg-ek funkcionális változásainak hátterében álló mechanizmusok nem ismertek pontosan, bár vannak újabb kutatási eredmények, melyek szerint epigenetikai mechanizmusok, mint DNS metilációs státusz, hiszton modifikáció és nem-kódoló RNS-ek szerepet játszhatnak az SSc patogenezisében¹²⁴. A Foxp3 pozitív Treg fenotípus stabilizálásában szerepet játszhat a *FOXP3* génlókus proximalis promóterének és upstream enhanszerének metilációs státusza. A *FOXP3* gén metilálatlan promóter és enhanszer régiói stabil, hosszútávú Foxp3 expressziót biztosítanak^{34–37}, amely mintázat a tímusz eredetű tTreg-ekre jellemző,

míg a hipometilált enhanszer régió a perifériás Treg-ek esetében típusos, a konvencionális T-sejtekben pedig teljesen metilált³⁸. A *FOXP3* gén általunk végzett metilációs analízise az enhanszer régió minden CpG helyén hipometilációt mutatott az SSc-betegek mintáiban szignifikánsan csökkent metilációval 2 specifikus CpG helyen. Ez a megfigyelés egy emelkedett, stabil Foxp3 expresszálo sejtpopuláció jelenlétére utal SSc-s betegekben, ami összecseng az áramlási citometriás méréseink során tapasztalt emelkedett CD62L+Foxp3+ Treg arányokkal, melyet más kutatások is igazolnak³⁸.

A CD4+CD25-Foxp3+ sejtek tendenciózan csökkent előfordulási gyakoriságát találtuk SSc-ben szenvedő betegek mintáiban, de ezen változás csak tüdőfibrózis esetén volt szignifikáns. Úgy tartják, hogy a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek a Treg sejteknek egy reservoir készletük, amelyek homeosztatisz expanzio és/vagy aktiváció hatására CD25 pozitívvá válva Treg-ekké alakulnak⁹⁶. Feltevésünk szerint ezen sejtek arányának csökkenése a Treg arányok erőteljes megemelkedésére vezethető vissza. Ez gyakorlatilag arra utal, hogy a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek olyan nagy arányban konvertálódnak Treg sejtekké, hogy ez felülmúlja a rezerv, CD4+CD25-Foxp3+ sejtek képződését. Továbbá feltételezhető, hogy a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek kimerülése, vagy azon T-sejt populációk változásai, melekéből a CD4+CD25-Foxp3+ reservoir készlet kialakul – mint ahogy azt krónikus antigén jelenléttel járó állapotokban, például krónikus infekciók vagy daganat esetében – felelősek a CD4+CD25-Foxp3+ T-sejtek csökkent jelenlétéért SSc-ben^{120,121}. Mivel ezen sejtek lehetnek az indukált Treg-ek forrásai, nem meglepő az SSc-s mintákban talált egyensúlyhiány az tTreg-ek és pTreg-ek között.

Összefoglalva, adataink zavart egyensúlyt (emelkedett relatív arányok) mutatnak a regulatórikus T-sejt alcsoportok között, valamint abnormalitásokat a Treg alcsoportok IL-10 és TGFβ citokin termelésében SSc-ben szenvedő betegek mintáiban. Az aránybeli változások a betegség stádiumához és autoantitest státuszához kapcsolódva jelentek meg. A *FOXP3* gén enhanszer régiójában hipometilált CpG helyeket találtunk SSc-s betegeknél. Ez arra utal, hogy legalább részben epigenetika mechanizmusok felelősek az SSc-ben tapasztalt Treg egyensúly- és funkciózavarért. További kutatások szükségesek ezen immunológiai változások SSc patogenezisre és progresszióra kifejtett hatásáról.

7. Irodalomjegyzék

1. Szentágothai J, Réthelyi M. *Funkcionális Anatómia*. 8. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 2006.
2. Gergely J, Erdei A. *Immunbiológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 2000.
3. Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É. *Az Immunológia Alapjai*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2007.
4. Bommhardt U, Beyer M, Hünig T, Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(3):263-280. doi:10.1007/s00018-003-3224-3.
5. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. 3. München: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
6. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(1):60-72. doi:10.1007/s00018-005-5390-y.
7. Godfrey DI, Purton JF, Boyd RL, Cole TJ. Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol Today*. 2000;21(12):606-611. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114419>. Accessed September 5, 2013.
8. Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J Immunol*. 1999;163(3):1327-1333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415031>. Accessed September 5, 2013.
9. Vacchio MS, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med*. 1997;185(11):2033-2038. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2196338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed September 5, 2013.

10. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R. *Taschenatlas Der Immunologie*. 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1998.
11. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500. doi:10.1038/nri2785.
12. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2011;10(12):744-755. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.004.
13. Charles C, Clements P, Furst DE, with CAT-192 Study Group and S, al. et, Furst D. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet (London, England)*. 2006;367(9523):1683-1691. doi:10.1016/S0140-6736(06)68737-0.
14. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;8(1):42-54. doi:10.1038/nrrheum.2011.149.
15. Allanore Y, Simms R, Distler O, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1:15002. doi:10.1038/nrdp.2015.2.
16. Simon D, Balogh P, Bognár A, et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 34 Suppl 100(5):30-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056741>. Accessed August 19, 2017.
17. Lourenço E V, La Cava A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity*. 2011;44(1):33-42. doi:10.3109/08916931003782155.
18. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-532. doi:10.1038/nri2343.
19. Zuber J-P, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2006;45(Supplement 3):iii23-iii25. doi:10.1093/rheumatology/kel285.

20. Liu M, Wu W, Sun X, et al. New insights into CD4(+) T cell abnormalities in systemic sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:31-36. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.12.002.
21. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48 Suppl 3(suppl_3):iii3-7. doi:10.1093/rheumatology/ken481.
22. Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2013;12(3):340-354. doi:10.1016/j.autrev.2012.05.011.
23. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6:272. doi:10.3389/fimmu.2015.00272.
24. Slobodin G, Ahmad MS, Rosner I, et al. Regulatory T cells (CD4(+)CD25(bright)FoxP3(+)) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. *Cell Immunol.* 2010;261(2):77-80. doi:10.1016/j.cellimm.2009.12.009.
25. Li X, Zheng Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol.* 2015;36(6):344-353. doi:10.1016/j.it.2015.04.006.
26. Radstake TRDJ, van Bon L, Broen J, et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One.* 2009;4(6):e5981. doi:10.1371/journal.pone.0005981.
27. Antiga E, Quaglino P, Bellandi S, et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. *Br J Dermatol.* 2010;162(5):1056-1063. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09633.x.
28. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27(1):68-73. doi:10.1038/83784.

29. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-21. doi:10.1038/83713.
30. Beşliu AN, Bănică LM, Lonescu R, et al. Role of cellular immunity in systemic sclerosis pathogenesis: update on CD4+T cells population studies. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 68(1):5-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19507621>. Accessed August 19, 2017.
31. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods.* 2007;319(1-2):41-52. doi:10.1016/j.jim.2006.10.008.
32. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood.* 2006;108(2):426-431. doi:10.1182/blood-2006-01-0177.
33. Campbell DJ. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *J Immunol.* 2015;195(6):2507-2513. doi:10.4049/jimmunol.1500801.
34. Janson PCJ, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. Joly E, ed. *PLoS One.* 2008;3(2):e1612. doi:10.1371/journal.pone.0001612.
35. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009;30(6):899-911. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019.
36. Lal G, Zhang N, van der Touw W, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol.* 2009;182(1):259-273. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109157>. Accessed August 19, 2017.
37. Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T

- cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(9):2378-2389. doi:10.1002/eji.200737594.
38. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-423. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.002.
 39. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*. 2007;8(5):457-462. doi:10.1038/ni1455.
 40. Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, et al. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e34547. doi:10.1371/journal.pone.0034547.
 41. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):253-257. doi:10.1038/nri1032.
 42. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009;30(5):616-625. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.009.
 43. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009;30(5):626-635. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.002.
 44. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:207-214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722636>. Accessed September 5, 2013.
 45. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265(5176):1237-1240. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520605>. Accessed September 5, 2013.
 46. Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É. *Az Immunológia Alapjai*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2007.

47. Bevan MJ. In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. *Immunity*. 1997;7(2):175-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285402>. Accessed September 5, 2013.
48. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-532. doi:10.1038/nri2343.
49. Kitagawa Y, Wing JB, Sakaguchi S. Transcriptional and Epigenetic Control of Regulatory T Cell Development. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol 136. ; 2015:1-33. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.07.011.
50. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3433-3441. doi:10.4049/jimmunol.0904028.
51. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev*. 1998;12(6):782-796. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=316626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed September 8, 2013.
52. Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol*. 1998;8(9):508-S1. doi:10.1016/S0960-9822(98)70202-7.
53. Getnet D, Grosso JF, Goldberg M V, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol*. 2010;47(7-8):1595-1600. doi:10.1016/j.molimm.2010.02.001.
54. Serre K, Bénézech C, Desanti G, et al. Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One*. 2011;6(6):e20731. doi:10.1371/journal.pone.0020731.
55. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is

- a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*. 2011;6(8):e24226. doi:10.1371/journal.pone.0024226.
56. Deng L, Zhang H, Luan Y, et al. Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2010;16(16):4105-4112. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1073.
 57. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2004;199(7):971-979. doi:10.1084/jem.20031579.
 58. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002;169(9):4712-4716. <http://www.jimmunol.org/content/169/9/4712.full>. Accessed September 4, 2013.
 59. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TIM. Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):92-99. doi:10.2337/diabetes.54.1.92.
 60. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+CD25high T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1868-1878. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.043.
 61. Chavele K-M, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3603-3610. doi:10.1016/j.febslet.2011.07.043.
 62. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(4):553-554. doi:10.1136/ard.2005.044974.
 63. Gyires K, Fürst Z. *Farmakológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2007.

64. Schmetzer O. *Immunologie*. 1. Auflage. München: Urban&Fischer; 2009.
65. Boldizar F, Talaber G, Szabo M, et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology*. 2010;215(7):521-526. doi:10.1016/j.imbio.2009.10.003.
66. Mathian A, Jouenne R, Chader D, et al. Regulatory T Cell Responses to High-Dose Methylprednisolone in Active Systemic Lupus Erythematosus. Crispin J, ed. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143689. doi:10.1371/journal.pone.0143689.
67. Stary G, Klein I, Bauer W, et al. Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF- β and expand regulatory T cells. *J Immunol*. 2011;186(1):103-112. doi:10.4049/jimmunol.1002485.
68. Calmette J, Ellouze M, Tran T, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo. *J Immunol*. 2014;193(12):5863-5872. doi:10.4049/jimmunol.1400758.
69. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OMZ. Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol*. 2004;34(3):859-869. doi:10.1002/eji.200324506.
70. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OMZ. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol*. 2006;36(8):2139-2149. doi:10.1002/eji.200635873.
71. Stock P, Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J Immunol*. 2005;175(11):7380-7387. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301645>. Accessed August 21, 2017.
72. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis: Recent insights. *Joint Bone Spine*. 2015;82(3):148-153. doi:10.1016/j.jbspin.2014.10.010.

73. Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Serological profile of patients with systemic sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014;68:987-991. doi:10.5604/17322693.1117543.
74. Wirz EG, Jaeger VK, Allanore Y, et al. Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: a 10-year longitudinal study from the EUSTAR database. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(7):1285-1292. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207271.
75. Hügler T, Schuetz P, Daikeler T, et al. Late-onset systemic sclerosis--a systematic survey of the EULAR scleroderma trials and research group database. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(1):161-165. doi:10.1093/rheumatology/keq321.
76. Johnson SR. New ACR EULAR guidelines for systemic sclerosis classification. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(5):32. doi:10.1007/s11926-015-0506-3.
77. Alhajeri H, Hudson M, Fritzler M, et al. 2013 American College of Rheumatology/European League against rheumatism classification criteria for systemic sclerosis outperform the 1980 criteria: data from the Canadian Scleroderma Research Group. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;67(4):582-587. doi:10.1002/acr.22451.
78. Silva I, Loureiro T, Teixeira A, et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: role of flow-mediated dilatation and capillaroscopy as risk assessment tools. *Eur J Dermatol*. 25(5):444-451. doi:10.1684/ejd.2015.2605.
79. Morrisroe KB, Nikpour M, Proudman SM. Musculoskeletal Manifestations of Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015;41(3):507-518. doi:10.1016/j.rdc.2015.04.011.
80. Emad Y, Al-Sherbeni H, Ragab Y, et al. Arterial vasculopathy in systemic sclerosis: computerized tomography (CT) angiographic features of macrovascular and microvascular upper limbs arteries. *Joint Bone Spine*. 2014;81(5):433-437. doi:10.1016/j.jbspin.2014.03.014.
81. Savarino E, Furnari M, de Bortoli N, et al. Gastrointestinal involvement in

- systemic sclerosis. *Presse Med.* 2014;43(10):e279-e291.
doi:10.1016/j.lpm.2014.03.029.
82. Posa M, Stelle M, Lador F, Chizzolini C. [Lung involvement in systemic sclerosis]. *Rev Med Suisse.* 2015;11(469):802-806.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26040160>. Accessed August 22, 2017.
83. Wells AU. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Presse Med.* 2014;43(10):e329-e343. doi:10.1016/j.lpm.2014.08.002.
84. Meune C, Khanna D, Aboulhosn J, et al. A right ventricular diastolic impairment is common in systemic sclerosis and is associated with other target-organ damage. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;45(4):439-445.
doi:10.1016/j.semarthrit.2015.07.002.
85. Bose N, Chiesa-Vottero A, Chatterjee S. Scleroderma renal crisis. *Semin Arthritis Rheum.* 2015;44(6):687-694. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.12.001.
86. Mohan C, Assassi S. Biomarkers in rheumatic diseases: how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity? *BMJ.* 2015;351:h5079.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612523>. Accessed August 22, 2017.
87. Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S, et al. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(9):901-903. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922968>. Accessed August 22, 2017.
88. Berki T, Pálkás L, Boldizsár F, Németh P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol.* 2002;14(5):463-469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978776>. Accessed August 21, 2017.
89. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev.* 2013;24:41-56. doi:10.1159/000342502.

90. Berki T, Tavakoli A, Nagy KK, Nagy G, Németh P. Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients. *Transpl Int*. 2002;15(2-3):132-138. doi:10.1007/s00147-002-0397-x.
91. Boldizsár F, Pálincás L, Czömpöly T, Bartis D, Németh P, Berki T. Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology*. 2006;211(10):785-796. doi:10.1016/j.imbio.2006.06.005.
92. Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, et al. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol*. 2009;21(11):1269-1276. doi:10.1093/intimm/dxp093.
93. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1693-1700. doi:10.1084/jem.20060468.
94. Di Ianni M, Del Papa B, Cecchini D, et al. Immunomagnetic isolation of CD4+CD25+FoxP3+ natural T regulatory lymphocytes for clinical applications. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(2):246-253. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03901.x.
95. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. 2005;105(5):2220-2226. doi:10.1182/blood-2004-05-2044.
96. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(11):4091-4096. doi:10.1073/pnas.0408679102.
97. Du J, Li M, Zhang D, et al. Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):R108.

doi:10.1186/ar2763.

98. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005;6(4):353-360. doi:10.1038/ni1181.
99. Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):518-530. doi:10.1016/j.tips.2013.07.003.
100. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-181. doi:10.1038/nri2711.
101. Ng THS, Britton GJ, Hill E V., Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Front Immunol.* 2013;4:129. doi:10.3389/fimmu.2013.00129.
102. Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev.* 2006;213(1):213-227. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00437.x.
103. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009;583(24):3966-3973. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.036.
104. John S, Sabo PJ, Johnson TA, et al. Interaction of the Glucocorticoid Receptor with the Chromatin Landscape. *Mol Cell.* 2008;29(5):611-624. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.010.
105. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ, et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell.* 2012;151(1):153-166. doi:10.1016/j.cell.2012.06.053.
106. Kuo T, Lew MJ, Mayba O, Harris CA, Speed TP, Wang J-C. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(28):11160-11165. doi:10.1073/pnas.1111334109.

107. Sadlon TJ, Wilkinson BG, Pederson S, et al. Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185(2):1071-1081. doi:10.4049/jimmunol.1000082.
108. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007;445(7130):931-935. doi:10.1038/nature05478.
109. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500. doi:10.1038/nri2785.
110. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol*. 2016;37(11):803-811. doi:10.1016/j.it.2016.08.012.
111. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-344. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
112. Murai M, Turovskaya O, Kim G, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1178-1184. doi:10.1038/ni.1791.
113. Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA, et al. Glucocorticoids increase CD4⁺ CD25^{high} cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2009;119(4):239-245. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01090.x.
114. Stary G, Klein I, Bauer W, et al. Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF- β and expand regulatory T cells. *J Immunol*. 2011;186(1):103-112. doi:10.4049/jimmunol.1002485.
115. Slobodin G, Rimar D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52(2):194-201. doi:10.1007/s12016-016-8563-6.

116. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-1711. doi:10.1084/jem.20060772.
117. Liu X, Gao N, Li M, et al. Elevated levels of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction. Zheng SG, ed. *PLoS One*. 2013;8(6):e64531. doi:10.1371/journal.pone.0064531.
118. van Leeuwen MA, du Pré MF, van Wanrooij RL, et al. Changes in Natural Foxp3⁺Treg but Not Mucosally-Imprinted CD62LnegCD38⁺Foxp3⁺Treg in the Circulation of Celiac Disease Patients. Sestak K, ed. *PLoS One*. 2013;8(7):e68432. doi:10.1371/journal.pone.0068432.
119. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428854>. Accessed August 20, 2017.
120. Jin H-T, Jeong Y-H, Park H-J, Ha S-J. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Rep*. 2011;44(4):217-231. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.4.217.
121. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-499. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739672>. Accessed August 20, 2017.
122. Kassan M, Wecker A, Kadowitz P, Trebak M, Matrougui K. CD4⁺CD25⁺Foxp3 regulatory T cells and vascular dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 2013;31(10):1939-1943. doi:10.1097/HJH.0b013e328362feb7.
123. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008;9(3):239-244. doi:10.1038/ni1572.
124. Luo Y, Wang Y, Shu Y, Lu Q, Xiao R. Epigenetic mechanisms: An emerging role in pathogenesis and its therapeutic potential in systemic sclerosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;67:92-100. doi:10.1016/j.biocel.2015.05.023.

8. Új eredmények összefoglalása

1. Tímusz és lép szerkezetének megváltozását találtuk GC-kezelés hatására: tímuszban a Treg sejtek elhelyezkedése és a PALS diffúzzá válik
2. Leírtuk a tímusz Treg sejtjeinek glukokortikoszteroidrezisztenciáját, szemben a periférián magasabb arányban található Treg-ek GC érzékenységével
3. Centrálisan magasabb a Helios pozitivitást találtunk a Treg-eken belül, expressziója mégsem kizárólag tTreg-re jellemző, mivel a perifériás nyirokszervekben is magas előfordulásukat találtuk
4. Az IL-10 és TGF β pozitív Treg arányok emelkedését találtuk DX-kezelés hatására, valamint ezen citokinek és a Foxp3 relatív expressziójának mRNS szintű emelkedését
5. DX-kezelés hatására a tímuszban a túlélő Treg-ek GR upregulációját, a lép Treg sejtjeiben pedig az érett T-sejtekre jellemző GR downregulációját figyeltük meg
6. DX-kezelést követően a perifériás vérben a Treg sejtarány sajátos idő-függő kinetikáját találtuk
7. A tímuszban és a lépben a GR és a Foxp3 fizikai kolokalizációját találtuk.
8. A korai stádiumú SSc-s miták emelkedett CD127- Treg arányát az egészséges kontroll minták Treg arányához képest és csökkent IL-10 termelésüket találtuk
9. Korai stádiumú SSc-ben a CD62L pozitív és negatív Treg-ek közötti egyensúly eltolódását és a CD62L+ Tregek csökkent TGF β termelését írjuk le
10. A CD4+CD25-Foxp3+ sejtek tendenciózusan csökkent előfordulási gyakoriságát találtuk a tüdő fibrózisával érintett esetekben
11. Emelkedett FOXP3 génexpressziót találtunk aktív SSc-ben és inverz összefüggést a FOXP3 RQ értékek és az IL-10 pozitív CD62L+Treg arányok között
12. Hipometilált CpG-eket találtunk a FOXP3 upstream enhancer régióban SSc-ben

9. Publikációs lista

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. Ugor Emese, Simon Diána, Pap Ramóna, Nikola Kraljik, Németh Péter, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea
Regulatórikus T-sejtek glukokortikoidhormon-érzékenységének vizsgálata
IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 6:(1-2) pp. 17-24. (2014)
2. Emese Ugor, Diána Simon, Giovanni Almanza, Ramóna Pap, József Najbauer, Péter Németh, Péter Balogh, Martina Prelog, László Czirják, Tímea Berki
Increased proportions of functionally impaired regulatory T cell subsets in systemic sclerosis
CLINICAL IMMUNOLOGY (2017); 184:54-62. *IF: 3,990*
3. Emese Ugor, Lilla Prenek, Ramóna Pap, Gergely Berta, Dávid Ernst, József Najbauer, Péter Németh, Ferenc Boldizsár, Tímea Berki
Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression
IMMUNOBIOLOGY (2017) DOI: [10.1016/j.imbio.2017.10.010](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.010) *IF: 2,720*

Egyéb publikáció

4. Prenek L, Boldizsar F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, Nemeth P, Berki T
The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells.
APOPTOSIS 22:(2) pp. 239-253. (2017) *IF: 3,833*
5. Prenek Lilla, Ugor Emese, Papp Ramóna, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea
A glukokortikoid hormon nem genomikus hatásai a T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára
IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 6:(3-4) pp. 54-58. (2014)

Kongresszusi előadások és poszterek

Berki T, Ugor E, Pap R, Prenek L, Boldizsár F, Németh P

Glucocorticoid hormone influence in vivo differentiation and enhance in vitro expansion of functional regulatory T cells

10th International Congress on Autoimmunity, April 6-10, 2016, Leipzig, Germany (2016)

T Berki, G Talaber, E Ugor, P Nemeth, F Boldizsar

Role of mitochondria in non-genomic glucocorticoid receptor signaling pathway of thymocytes

46th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI), 22-24 March, 2012, ESCI, Budapest (2012)

Ugor E, Simon D, Pap R, Németh P, Minier T, Czirják L, Berki T

AB0731 Investigation of Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis

ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES 74:(Suppl. 2) p. 1143. (2015)

E. Ugor, D. Simon, K. Bodnár, R. Pap, P. Németh, T. Minier, L. Czirják, T. Berki

Functionally impaired regulatory T cells in systemic sclerosis

4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria 6-9 September 2015

R. Pap, E. Ugor, L. Prenek, D. Simon, T. Berki

In vitro development of functional thymic and splenic regulatory T cells

4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria 6-9 September 2015

Berki Tímea, Ugor Emese, Engelmann Péter, Németh Péter, Boldizsár Ferenc

Investigation of glucocorticoid sensitivity and glucocorticoid receptor expression in regulatory T cells

10th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, Barcelona, Spain March 11-12. 2013 (2013)

Berki Tímea, Ugor Emese, Engelmann Péter, Németh Péter, Boldizsár Ferenc

Investigation of glucocorticoid sensitivity and glucocorticoid receptor expression in regulatory T cells

10th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, Barcelona, Spain March 11-12. 2013 (2013)

Berki Tímea, Ugor Emese, Simon Diána, Németh Péter, Boldizsár Ferenc

Glucocorticoid sensitivity of regulatory T cells differ from that of other T cell populations

IMPULSE ANN EFES-EJI SYMPOSIUM, MÁTRAHÁZA, 2013 SZEPTEMBER 1-3.
(2013)

Berki Tímea, Ugor Emese, Engelmann Péter, Németh Péter, Boldizsár Ferenc

A természetes és indukált regulatórikus T sejtek glucocorticoid hormon érzékenységének vizsgálata egér modellben

Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2012, Május (2012)

Berki Tímea, Talaber Gergely, Ugor Emese, Nemeth Peter, Boldizsar Ferenc

Mitochondrial glucocorticoid receptor signaling pathway in DP thymocytes

8th International Congress on Autoimmunity, 2012 May 9-13., Garanda, Spain (2012)

10. Köszönetnyilvánítás

Kiemelt köszönettel tartozom Prof. Dr. Berki Tímeának, aki tudományos munkám vezetőjeként segítette és tanácsaival irányította már TDK-s koromtól kezdve kutatási tevékenységemet és biztosította azok háttérét. Lelkesedése, szakmai tudása és közvetlensége már a másodéves gyakorlatok és szemináriumok során felkeltette érdeklődésemet az immunológia iránt.

Köszönetemet szeretném kifejezni társ-témavezetőmnek, Dr. Simon Diánának, aki a kutatómunka során a legalapvetőbb laboratóriumi fogásoktól, a statisztika világán át, a legmagasabb rendű tudományos együttgondolkodásig terjedően barátián támogatott, és akihez bármikor fordulhattam tanácsért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Németh Péternek támogatását, hasznos szakmai tanácsait és nem utolsósorban, hogy lehetővé tette az intézetben végzett munkámat.

Köszönöm Dr. Talabér Gergelynek és Dr. Szabó Mariannak, hogy megmutatták a kutatómunka gyakorlati oldalát, és bevezettek az immunológia „erdejébe”.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Balogh Péternek és Dr. Kellermayer Zoltánnak, akik példát mutattak a kutatói pálya iránti elhivatottságból.

Köszönöm Pálné Katona Anikónak a - gyakorlatilag minden létező irányba terjedő-figyelmét, önzetlen segítségét, mérhetetlen türelmét és támogatását.

Köszönettel tartozom PhD hallgatótársaimnak, illetve az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet valamennyi dolgozójának a vidám hétköznapiokért és segítő – sokszor nélkülözhetetlen szerepet játszó – együttműködésért.

Külön köszönet kollégáimnak Heidt Diánának és Emmert-Fledrich Anitának azért a rengeteg segítségért, tanácsért, türelméért és végtelen jókedvéért, amellyel támogatták munkámat. Mindenek előtt pedig hálás vagyok nekik őszinte barátságukért, amellyel nem csak a szakmai, de a mindennapi életben is mindig előrébb segítettek.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Családomnak, akikre mindig számíthattam tanulmányaim és kutatói pályám során is, és akik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

A kutatás az OTKA K-105962 azonosító számú, az OTKA-K75912 azonosító számú, a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 azonosító számú és az EFOP 3.6.1-16-2016-0004 azonosító számú projektek keretei között valósult meg.

11. Mellékletek

Regulatórikus T-sejtek glukokortikoidhormon-érzékenységeinek vizsgálata

UGOR EMESE¹, SIMON DIÁNA¹, PAP RAMÓNA¹, KRALJIK NIKOLA², NÉMETH PÉTER¹, BOLDIZSÁR FERENC¹, BERKI TIMEA¹

¹ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs

² Institute of Public Health for the Osijek-Baranja County, Croatia

CÉLKITŰZÉS: A regulatórikus T-sejtek (Treg) kulcsfontosságú tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. A klinikumban széleskörűen alkalmaznak glukokortikoidhormon- (GC-) analógokat gyulladáscsökkentő és immunosuppresszív aktivitásuk, lymphocytaapoptózist indukáló képességük miatt, mégis keveset tudunk a Treg-ekre gyakorolt hatásairól. Munkánk célja a perifériás és centrális nyirokszervekben a természetes és indukált Treg-ek arányának és GC-érzékenységeinek, valamint glukokortikoidreceptor- (GR-) expressziójuk változásának nyomon követése volt. **MÓDSZEREK:** Kísérleteinkben 4–6 hetes BALB/c egereket kezeltünk 1–4 napon át nagy dózisu dexamethsonnal. Ezt követően az állatok thymusából, mesenterialis nyirokcsomóiból, lépéből és a Peyer-plakkokból sejteket izoláltunk, és jelöltünk sejtfelszíni (anti-CD4; anti-CD25) és intracelluláris (anti-Foxp3; anti-Helios; anti-GR) antitestekkel, majd áramlási citometriával mértük a természetes (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Helios⁺) és indukált (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻) Treg-ek arányát, abszolút számát és GR-expressziójukat. **EREDMÉNYEK:** A kezeletlen állatok thymusában alacsonyabb a Treg-sejtek aránya (<1,0%), mint a perifériás nyirokszervekben (7–15%). A thymusban a Treg-sejtek több, mint 90%-a, a lépben a sejtek 2/3-a, míg a többi perifériás nyirokszervben kb. a fele természetes Treg-sejt. Többszöri, nagy dózisu DX-kezelés hatására a thymusban a Treg-sejt-arány több mint tízszeresére emelkedik ($p < 0,001$) az abszolút Treg-szám változása nélkül, miközben a GR upregulációja figyelhető meg a sejtekben. Ezt a thymusban jelen lévő legalacsonyabb GR-expressziójú, és GC-kezelésre legérzékenyebb kettős pozitív sejtek pusztulása kíséri. A perifériás nyirokszervekben ezzel ellentétesen a Treg-ek száma jelentősen csökkent, de arányuk csak kissé változott meg GC-kezelés hatására, ami GR downregulációval járt. **KÖVETKEZTETÉSEK:** Kísérleteink alapján elmondható, hogy a Treg-ek viszonylag rezisztensek a GC-kezelés által indukált apoptózisra, ami hozzájárulhat a GC-k immunosuppresszív hatásához. Perifériás nyirokszervekben a természetes Treg-ek mellett indukált Treg-ek is előfordulnak, amelyek feltételezhetően másképp reagálnak szteroidexpozícióra.

Kulcsszavak: regulatórikus T-sejt, glukokortikoidhormon, glukokortikoidreceptor, thymus, tolerancia

INVESTIGATION OF GLUCOCORTICOID HORMONE SENSITIVITY OF REGULATORY T CELLS

INTRODUCTION: Regulatory T cells (Treg) are key players of the regulation of immune response and peripheral tolerance. Glucocorticoid (GC)-analogues are widely used to treat different diseases because of their anti-inflammatory and immunosuppressive activity, and their ability to induce lymphocyte apoptosis. Despite the long-established medical use of GC-analogues, the mechanism of GC action on Tregs, is still incompletely understood. The goal of our work was to determine the changes in the ratio of natural and induced Treg cells in peripheral and central lymphoid organs, to investigate the effect of GC treatment on Treg cell composition and to follow the alterations in their glucocorticoid receptor (GR) expression. **METHODS:** In our experiments we treated 4–6-week old BALB/c mice for 1–4 days with high dose Dexamethasone. Cells were isolated from the thymus, mesenteric lymph nodes, spleen and Peyer's patches and were stained with cell surface (anti-CD4; anti-CD25) and intracellular (anti-Foxp3; anti-Helios; anti-GR) antibodies. We determined the ratio, absolute cell number and GR expression of natural (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) and induced (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻) Treg cells using flow cytometry. **RESULTS:** In the thymus of untreated mice the ratio of Tregs was lower (<1,0%) than in the peripheral lymphoid organs (7–15%). More than 90% of the Treg cells found in the thymus, 2/3 of them in the spleen, and approximately half of them in the other peripheral lymphoid organs examined were natural Treg cells. After multiple, high dose DX treatment we observed a more than tenfold increase ($p < 0,001$) in the ratio of Tregs in thymus, without changes of the absolute cell number and with upregulation of the GR. These changes were associated with the apoptosis of double positive cells, which have the lowest GR expression and are the most sensitive

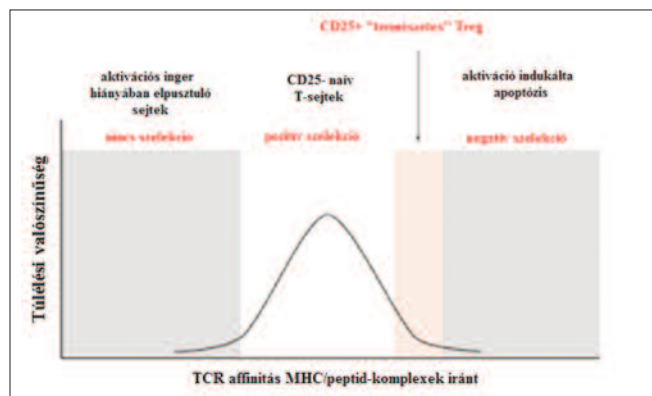


cell population to GC treatment. In contrast, in the peripheral lymphoid organs the total Treg cell number decreased, but the ratio changed only slightly after GC treatment, accompanied by GR downregulation. **CONCLUSION:** Based on our experiments, we suggest that nTreg cells are relatively resistant to GC treatment induced apoptosis, which can serve as a base for the immunosuppressant actions of GC. In peripheral lymphoid organs beside nTreg cells iTreg cells are also present, which respond to steroid exposition presumably otherwise.

Keywords: regulatory T cells, glucocorticoid hormone, glucocorticoid receptor, thymus, tolerance

Az immunológiai tolerancia az immunrendszer antigénspecifikus válaszképtelensége, mely a saját antigénekre vonatkozóan a centrális nyirokszervekben az autoreaktív B- és T-lymphocyta előalakok klonális deléciójával, míg a periférián a regulatórikus T-sejtek (Treg) általi szuppresszióval valósul meg. A Treg-ek mellett mind az endogén, mind a terápiásan alkalmazott glukokortikoidhormonok (GC) fontos szabályozói az immunválasznak és a perifériás tolerancia fenntartásának, ugyanakkor keveset tudunk a Treg-sejtekre gyakorolt hatásokról.

A leginkább ismert Treg-ek $CD4^+CD25^+$ sejt felszíni és $Foxp3^+$ intracelluláris markerekkel jellemezhetők [1]. Az anergiával, ignoranciával és delécióval szemben az általuk előidézett szuppresszió aktív toleranciamechanizmus. A Treg-sejtek kialakulásáról több elmélet is létezik. Az „affinitásmodell” szerint a thymusban lezajló negatív szelekció során aktivációindukált apoptózissal elpusztulnak azok a T-sejtek, amelyek túl nagy affinitással kötődnek a saját MHC-peptid komplexhez. Ugyanakkor azok a T-sejtek, amelyeknek nagy az affinitása, de a negatív szelekció értelmében még nem szanálódnak, természetes regulatórikus T-sejtek lesznek



1. ábra

Az elsődleges T-sejt-érés szelekciós szakaszai.

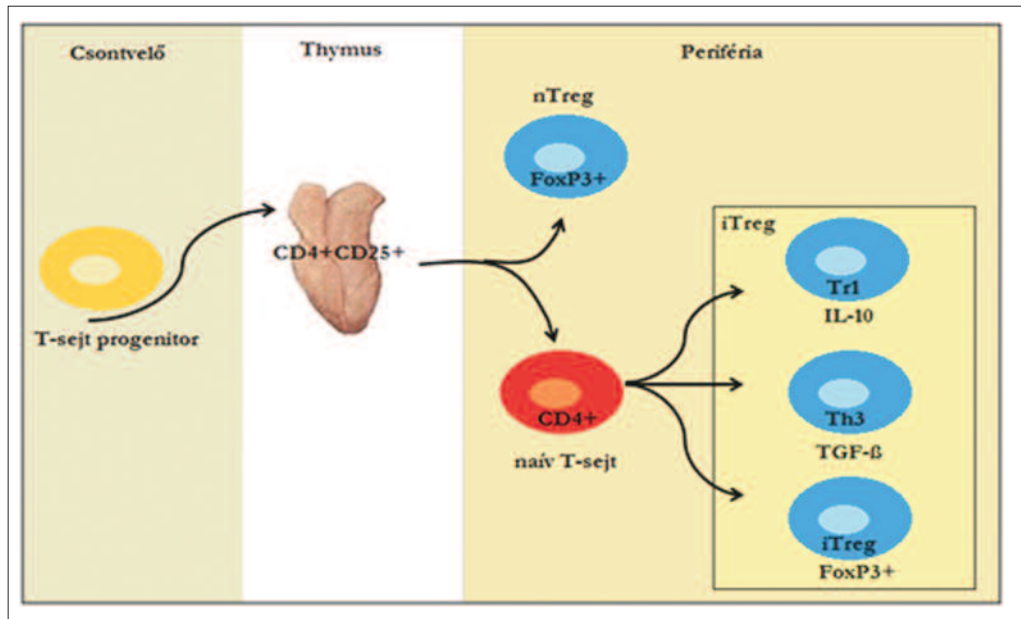
A thymus kéreg/velőállomány határán a kettős pozitív thymocyta fejlődési szakaszban történnek a pozitív és negatív szelekciós lépések. A pozitív szelekció jelentősége, hogy megakadályozza a nem funkcionális T-sejtek felhalmozódását. A negatív szelekció során az autoreaktív T-lymphocyták aktivációindukált apoptózisa zajlik. Azok a $CD4^+$ T-lymphocyták, amelyeknek viszonylag nagy az affinitása a saját MHC-II/saját peptid iránt, de a negatív szelekció során még nem pusztulnak el, $CD4^+/CD25^+$ természetes regulatórikus T-sejtek lesznek

Módosítva Schütt és Bröker (2011) után

(nTreg) (1. ábra) [2]. A másik elmélet, az ún. „kölcsonös antagonizmus” modell szerint nemcsak a TCR jelátviteli útvonal vesz részt a pozitív szelekcióban, hanem a folyamat a TCR- és GC-indukált apoptózist elindító jelátviteli útvonal antagonizmusának eredménye. Azoknál a T-sejteknél, amelyeknek közepes az affinitása, a TCR- és glukokortikoidreceptor- (GR-) szignál neutralizálják egymást, így nem pusztulnak el, hanem Treg-gé alakulnak [2–6].

Az nTreg-sejtek $CD4$ -pozitivitásuk mellett nagy denzitásban IL-2-receptor α -láncot (CD25) is expresszálnak [7, 8]. Jellemző rájuk az X-kromoszóma által kódolt „Forkhead box” családba tartozó Foxp3 transzkripció faktor jelenléte [7–10], melynek funkciója még ismeretlen, de hiánya IPEX-szindrómához vezet [11, 12]. A thymusból a perifériára kerülve az nTreg-sejtek az effektorsejteket direkt sejt-sejt kapcsolódás és citokintermelés (IL-10, TGF β) révén gátolják [13]. Az nTreg-sejtek exogén IL-2 és megfelelő TCR-stimuláció hatására proliferálnak. A Treg-sejtek keletkezési mechanizmus szerinti másik ismert típusa az indukált Treg-sejtek (iTreg) [9, 14], melyek a periférián alakulnak ki, ún. „tolerogén mikro-környezetben” antigénfelismerés hatására (pl. kostimuláció hiánya) naiv, $CD4^+$ sejtekből [13]. Citokintermelésük alapján tovább csoportosíthatók T_R1 , T_H3 (orális tolerancia) [15, 16] és $Foxp3^+$ iTreg-sejtekre (2. ábra). Az effektorsejteket citokintermelésük révén gátolják [17, 18]. Az nTreg és iTreg elkülönítésére irodalmi adatok szerint az Ikaros családba tartozó Helios transzkripció faktor használható [8, 19], melynek expressziója a T-lymphocyta sejtvonalra korlátozódik [20, 21]. Funkcionális szerepe ismeretlen, bár kimutatták, hogy a Foxp3 promóterhez kapcsolódva fokozza a Foxp3-expressziót [8, 22], valamint a Helios-expresszió a Treg-ekben korrelál a szuppresszor funkcióval [22]. Más irodalmi adatok szerint a Helios nemcsak a thymuseredetű nTreg-sejtekre jellemző, mert T-sejt-aktiváció és -prolifерáció során is megjelenik, nyugvó sejtekben pedig csökken az expressziója [23, 24].

A Treg-ek szerepét egyre több betegségben bizonyítják, de pontos hatásmechanizmusuk még nem ismert. Az effektor- és szuppresszorfunkció egyensúlyának megbomlása esetén, ha a Treg-ek kerülnek túlsúlyba, nagyobb az esélye a daganatok kialakulásának, gyakoribbak a fertőzések (pl. HIV-fertőzés). Daganatos betegek perifériás vérében és a tumorban a Treg-ek felhalmozódnak, és az immunválasz elnyomása révén elősegítik a tumor növekedését, így rossz prognózist jeleznek [25]. Treg hiányában pedig autoimmun betegségek,



2. ábra

A regulatórikus T-sejtek kialakulása a csontvelőből a thymusba lépő T-sejt-előalakokból történik. A természetes Treg-sejtek a negatív szelekció során túlélő CD4⁺-sejtek egy alcsoportja, amely a CD25 upregulációja és Foxp3 transzkripciós faktor hatására alakul ki, és kerül a perifériára; míg az indukált Treg-sejtek antigén hatására aktiválódó, naív CD4⁺-sejtekből alakulnak ki a periférián

allergia, graftkilökődés, gyulladásos bélbetegség (IBD), IPEX-szindróma jöhet létre. Sclerosis multiplex (SM) esetén a Treg-ek csökkent számát és funkciózavarát írták le [26]. Az SM egérmmodelljében a Treg-ek „kivédik” a betegséget azáltal, hogy az autoreaktív TH₁-sejtek proliferációját és proinflammatoricus citokintermelését elnyomják [27]. 1-es típusú diabeteses betegek Treg-sejtjeinél is hibás működést találtak [28]. Gyulladásos bélbetegségben szenvedőknél a csökkent perifériás Treg-szám korrelál a betegség aktivitásával [29]. Ugyancsak összefüggés mutatható ki SLE-s betegekben a betegség aktivitása és a Treg-sejt-szám között [9, 30]. A betegség fellángolásakor a Treg-ek mennyisége csökken [31].

A GC-k fontos tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. A klinikumban igen széles körben alkalmaznak különböző betegségek kezelésében GC-analógokat [pl. dexametsont (DX) allergiás állapotok, autoimmun betegségek, transzplantáción átesett betegek, hematológiai rosszindulatú betegségek kezelésére), amelyek világszerte az egyik leggyakrabban felírt gyógyszerek gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív aktivitásuk, lymphocytaapoptózist indukáló képességük miatt, mégis keveset tudunk a Treg-ekre gyakorolt hatásairól. Irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a klinikumban szisztémásan adott GC-k segítik a Treg-ek működését, ezáltal új megvilágításba helyezve a GC-mediált immunszuppressziót [32]. Munkánk célja a perifériás és centrális nyirokszervekben a Treg-sejtek arányának meghatározása volt, majd a GC-kezelés hatásának vizsgálata a thymus és a lép szöveti alapszerkezetére és a Treg-ek összetételére, illetve azok GR-expresszió változásának vizsgálata.

Anyakok és módszerek

Kísérleti állatok és kezelésük

4–6 hetes BALB/c egereket kezeltünk 20 mg/kg/nap (nagy dózisú) dexamethasonnal (Oradexon[®], Organon) vagy PBS-sel 1–4 napon át ip., majd 24 órával az utolsó kezelés után az állatokat feláldoztuk, és vizsgáltuk a lymphoid szerveket. Ebben az életkorban még nem kezdődik el a thymus involúciója, így sejtes összetétele jól vizsgálható. A thymus, lép, mesenterialis nyirokcsomók (mLN) és Peyer-plakkok (PP) eltávolítása után azokat mechanikusan homogenizáltuk RPMI médiumban, majd nejlonszűrőn átszűrtük, és tripánkéfték-kizárásos teszttel megszámloltuk a sejteket. Az egerek tartása és kezelése a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által jóváhagyott engedély alapján történt (#BA 02/2000-2/2006).

Immunhisztológiai jelölés

Fagyasztott (7–10 μm vastag), jéghideg acetoneban fixált, 5% BSA-val blokkolt metszeteken a lépben a B-sejtek azonosítására anti-B220-Alexa647 (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, IBI), a T-sejtekre anti-Thy1-FITC (PTE KK IBI) antitestet használtunk. A thymusban a sejtmagokat DAPI (Sigma), a Treg-sejteket anti-Foxp3-PE (eBioscience) antitesttel jelöltük. A minták kiértékelése Olympus BX61 CCD kamerával és AnalySIS szoftverrel ellátott fluoreszcens mikroszkóppal, 200-szoros nagyítással történt.



Áramlási citometria

A thymus, lép, mLN és PP sejtjeinek áramlási citometriás mérésnél a Treg-sejtek azonosítására anti-CD4-FITC vagy anti-CD4-AlexaFluoro647 (PTE KK IBI) és anti-CD25-PE-Cy5 (BioLegend) sejt felszíni antitesteket, illetve anti-Foxp3-PE (Exbio, Klón: 3G3) anti-Helios-APC (BioLegend) és anti-GR-FITC (klón: 5E4/B1, PTE KK IBI33) intracelluláris antitesteket használtunk. A 10^6 sejt/minta sejt felszíni jelölés után a mintákat PBS-ben mostuk, majd a Foxp3 jelölő kit (e-Bioscience) instrukciói szerint végeztük az intracelluláris jelöléseket. A mérést FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose CA) áramlási citométeren, az analízist pedig az FCS Express 4 Flow Research Edition programmal végeztük. Mintánként 10 000 eseményt mértünk a lymphocytá kapuból, majd a CD4⁺ lymphocytákon belül mértük a Treg-alcsoportokat és azok átlagos anti-GR-FITC fluoreszcenciaintenzitását.

Statisztika

Munkánk során a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai analízise SPSS 11.0 szoftver segítségével történt. Az adatok értékeléséhez a Student-féle t-tesztet használtuk, és a $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) és $p < 0,001$ (***) értéknél fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Treg-sejtek előfordulása a lymphoid szervekben

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a kezeletlen állatok primer és szekunder nyirokszerveiben milyen a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-ek megoszlása. A thymusban a Treg-ek aránya 0,5% körüli, míg a perifériás nyirokszervekben ez az arány lényegesen magasabb: a lépben a legtöbb (15%), az mLN-ben ennél kevesebb (10%), és a PP-ben a legkevesebb (6-7%) a Foxp3⁺ Treg-ek aránya (1. táblázat).

A természetes és indukált Treg-sejtek megoszlása

A Foxp3/Helios kettős pozitivitás jellemző a thymuseredetű nTreg-ekre, míg az iTreg-ek Helios-negatívak. A kezeletlen állatok thymusában a Treg-ek 87%-a Helios-positív, vagyis tartható nTreg-nek. A perifériás nyirokszervek közül a lépben 65%, az mLN-ben 53%, a PP-ben pedig 48%, vagyis a sejtek közel fele nTreg (1. táblázat).

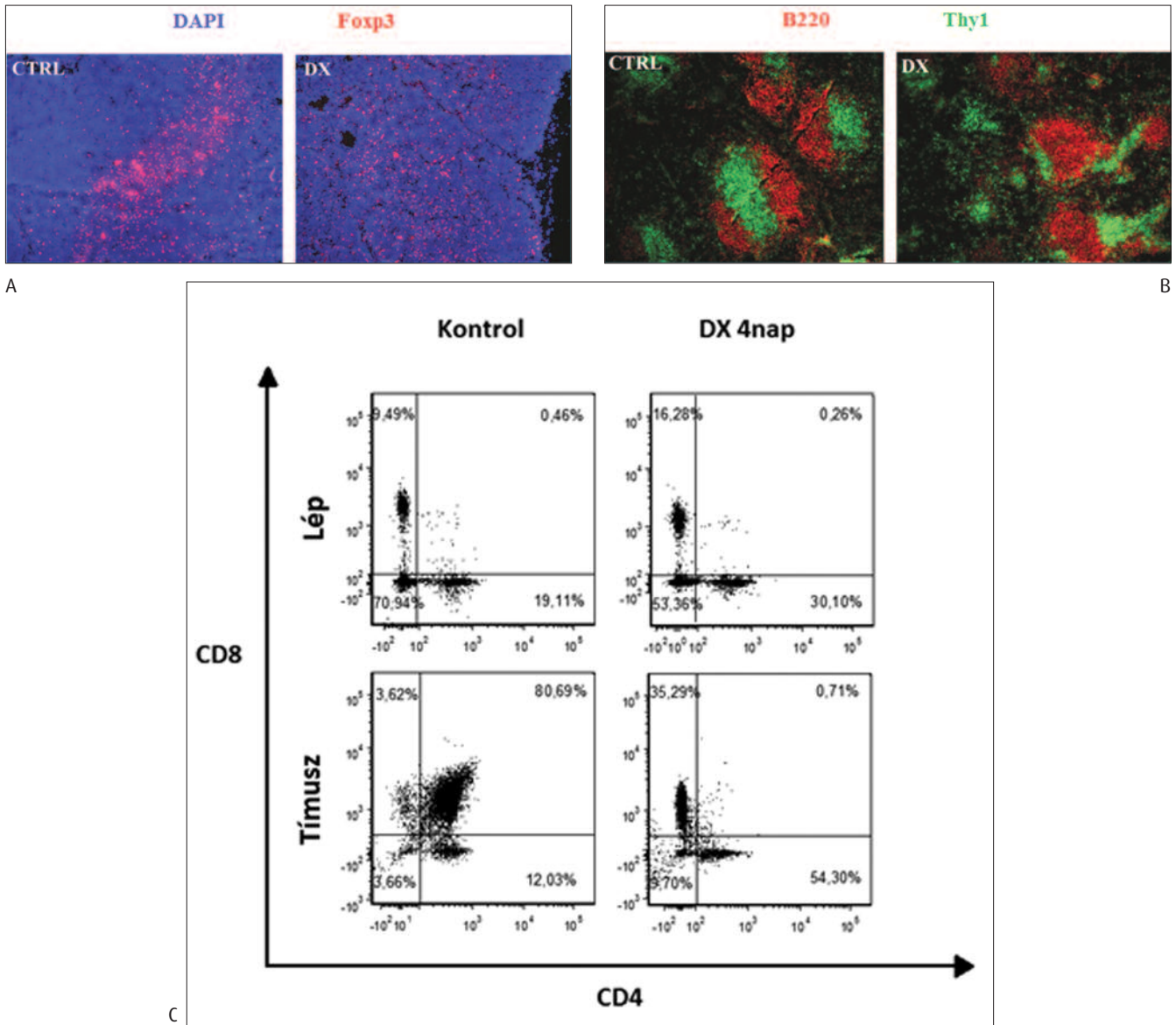
A thymus és a lép szerkezetének és sejtösszetételének változása DX-kezelés hatására

A GC-k egyik régóta ismert hatása, hogy a thymus involúcióját okozzák. In vivo egyszeri, nagy dózisú (20 mg/kg) GC-kezelés után 24 órával a thymusban a kéreg-velőállomány szöveti organizáció felbomlása figyelhető meg, az addig homogén csoportban elhelyezkedő Foxp3⁺ Treg-ek elhelyezkedése diffúzzá válik (3. ábra A). A lép fehér pulpájában DX-kezelés hatására ugyancsak megváltozik a normális lymphoid szerkezet, amely főleg a T-sejt-zónát (PALS) érinti, szerkezete diffúzzá válik (3. ábra B). Ismételt (4 napos) DX-kezelés után a lépben a CD4/CD8 arány megtartott, ugyanakkor csökkent a nem T-sejtek aránya, és a T-helper-sejtek aránya 19%-ról 30%-ra, míg a citotoxikus T-sejteké 9,5%-ról 16%-ra emelkedett (3. ábra C). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a lépben az érett T-sejtek kevésbé érzékenyek a DX-hatásra, mint a nem T-sejtek. Ez az átrendeződés a lép teljes lymphocytaszámának csökkenésével is járt. Ezzel szemben a thymusban szinte eltűnnek az éretlen kettős pozitív (DP) thymocyták, arányuk 80%-ról 1% alá csökken, míg a kettős negatív legéretlenebb és az érett CD4, ill. CD8 egyszeresen pozitív sejtek aránya lényegesen megemelkedik (3. ábra C). Mindez a DX-érzékeny, DP thymocyták pusztulásának következménye, ami a thymus teljes sejtszámának drasztikus (tized részére) csökkenésével is jár (5. ábra).

1. táblázat. Természetes (nTreg) és indukált (iTreg) regulatórikus T-sejtek aránya a lymphoid szervekben

Treg % (átlag \pm SEM)	Thymus	Lép	Nyirokcsomó	Peyer-plakk
Összes Treg	0,53 \pm 0,06	15,09 \pm 0,43	10,10 \pm 0,61	6,78 \pm 0,51
Természetes: nTreg	0,46 \pm 0,05	9,83 \pm 0,28	5,38 \pm 0,29	3,30 \pm 0,24
nTreg : iTreg arány	87 : 13	65 : 35	53 : 47	48 : 52

Kezeletlen állatok centrális és perifériás nyirokszerveiben jelentősen eltér a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg- és CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺ nTreg-sejtek előfordulási aránya. A thymusban jellemző az nTreg-sejtek dominanciája, míg a perifériás nyirokszervekben eltérő nTreg/iTreg arány figyelhető meg



3. ábra

Dexamethasonkezelés hatása a thymus és a lép szöveti szerkezetére és sejtes összetételére.

(A) A thymusban jellemzően a kéreg-velő határon található Treg-sejtek (Foxp3-PE – piros) elhelyezkedése (K: kontroll) már egyszeri DX-kezelés hatására diffúzzá válik (kék: DAPI).

(B) A lépben is megfigyelhető a kezeletlen mintához képest a T-sejt-zóna diffúzzá válása DX-kezelés hatására (piros: B220-Alexa647 – B-sejt-zóna; zöld: Thy1-FITC ~ T-sejt-zóna) (PALS).

(C) Ismételt (4 napos) DX-kezelés hatására a lép és a thymus lymphoid sejtes összetevői megváltoznak. Anti-CD4-FITC és anti-CD8-APC antitesttel történő jelöléssel a lépben emelkedik a T_H - és T_C -sejt-arány, vagyis a nem T-sejtek nagyobb arányú fogyása figyelhető meg a kezelés hatására. A thymusban a kettős pozitív sejtek csaknem teljes eltűnése (depléciója) miatt emelkedett a kettős negatív és egyszerűen pozitív, érett sejtek aránya

A DX-kezelés hatása a Treg-sejtekre

Megvizsgáltuk a nagy dózisú DX-kezelés hatását a különböző nyirokszervekben előforduló Treg-ek arányára és az abszolút sejtszámra is. 48 órás (kétszeri) DX-kezelés után a thymusban a Treg-ek aránya szignifikánsan, közel tízszeresére emelkedett (4. ábra). Ez a változás a DP, GC-érzékeny, éretlen thymocyták jelentős pusztulásának következtében kialakuló re-

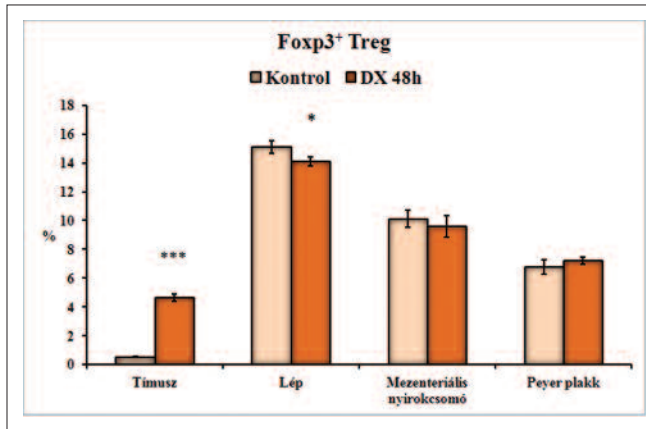
latív sejtarány emelkedés, az abszolút Treg-sejt-szám enyhe, de nem szignifikáns növekedésével (2. táblázat), ami azt bizonyítja, hogy a thymusban a Treg-ek rezisztensek a DX által indukált apoptózisra. A perifériás nyirokszervek közül a lépben tapasztaltunk enyhe, de szignifikáns Treg-arány-csökkenést, ugyanakkor sem az mLN-ben, sem a PP-ben a Treg-arány nem változott (4. ábra). Ugyanakkor a perifériás nyirokszervekben GC-kezelés hatására az összlymphocytaszám,



1. táblázat. A regulatórikus T-sejtek abszolút számának változása 4 napos glukokortikoidhormon-kezelés hatására

Treg-sejt-szám x 105 (átlag ± SEM)	Thymus	Lép	Nyirokcsomó	Peyer-plakk
Kezeletlen	4,24 ± 0,92	83,92 ± 16,72	4,42 ± 0,11	0,48 ± 0,07
Dexamethason (4 nap)	5,05 ± 1,35	26,93 ± 5,13**	2,24 ± 0,39***	0,23 ± 0,06*

4 napos nagy dózisu (20 mg/kg) dexamethasonkezelés hatására a perifériás nyirokszervekben szignifikánsan csökkent a Treg-sejt-szám (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), míg a thymusban inkább enyhe, de nem szignifikáns Treg-sejt-szám-emelkedés volt megfigyelhető

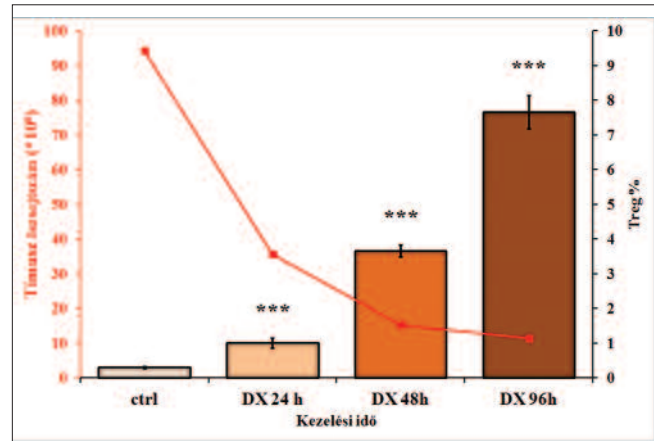


4. ábra

Treg-sejt-arányok változása 48 órás nagy dózisu DX-kezelés hatására a centrális (thymus) és a perifériás nyirokszervekben. A thymusban a Treg-sejt-arány szignifikáns ($p < 0,001$) emelkedését figyeltük meg, míg a lépben enyhe sejtaránycsökkenés történt ($p < 0,05$). Az mLN-ben és PP-ben nem történt szignifikáns Treg-arány-változás.

és ezzel együtt a Treg-sejt-szám is szignifikánsan csökkent (2. táblázat), ami a szervek méretének látványos kisebbedésével is járt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a perifériás nyirokszervekben az érett T-sejtek és a Treg-ek GC-érzékenysége hasonló.

Megvizsgáltuk külön a Helios-pozitív nTreg- és Helios-negatív iTreg-ek GC-érzékenységét is. A thymusban az nTreg-ek aránya szignifikánsan emelkedett, 0,4%-ról 4%-ra ($p < 0,001$) (10-szeres emelkedés), míg a perifériás nyirokszervek közül a lépben 9,8%-ról 9,0%-ra ($p < 0,05$), az mLN-ben pedig 5,4%-ról 4,3%-ra ($p < 0,01$) csökkent ez az arány. A PP-ben szignifikáns változás nem történt. A Helios-negatív iTreg-ek a kezeletlen állatok thymusában mindössze 0,09%-ban vannak jelen, ami 0,6%-ra nőtt (7-szeres emelkedés), míg a perifériás nyirokszervekben 5% körüli arányban fordultak elő, ami a kezelést követően nem változott (ábrán nem mutatjuk).



5. ábra

Ismételt DX-kezelés hatása a thymus abszolút thymocyta sejtszámára és a Treg-arányra CD4/CD25/FoxP3 jelölés után. Az oszlopdiaagramon a Treg-arányok szignifikáns növekedése látható ($p < 0,001$), míg a vonaldiaagram a teljes thymocyta sejtszám drasztikus csökkenését mutatja ($p < 0,001$) az idő függvényében

DX-kezelés hatásának időkinetikája a thymusban

Vizsgáltuk a GC-kezelés időfüggését is a thymusban, ismételt (1-4 napos) DX-kezelést követően. A kezeletlen állatok thymusában a Treg-ek aránya 0,5%, amely 24 órás nagy dózisu DX-kezelés hatására 2%-ra nő, majd a kezelés hosszával párhuzamosan tovább növekszik közel 8%-ra. Ha az összsejtszámot vizsgáljuk, a kezeletlen thymusban az jellemzően $9,5 \times 10^7$, ami kétszeri DX-kezelést követően $3,6 \times 10^7$ -re csökken, 4 napi kezelés után pedig $1,1 \times 10^7$ sejtszám figyelhető meg (5. ábra), vagyis a thymus sejt állománya közel a tízedére csökken, miközben a Treg-sejt-szám nem változik, csak az arányuk 16-szorosára emelkedik.

A GR-expresszió változása

Egy sejt GC-érzékenységét jelentősen meghatározza, hogy milyen mértékben expresszálja a GR-t. Ezért a továbbiakban

a Treg-re jellemző viszonylagos szteroidrezisztencia, valamint a GR-expresszió közötti összefüggést kerestük. Ehhez az intézetünkben már korábban is alkalmazott intracelluláris áramlási citometriás GR-jelölést használtuk, amely korrelál a sejtek GR-tartalmával mind fehérje-, mind RNS-szinten [33].

Eredményeink szerint a thymusban és a perifériás nyirokszervekben található CD4⁺ T-sejtek és a Treg-ek GR-szintje (MFI: átlagos fluoreszcenciaintenzitás) nem mutat szignifikáns különbséget (nincs ábrázolva). Ugyanakkor a szerveket összehasonlítva, a thymusban és a PP-ben szignifikánsan alacsonyabb a Treg-ek GR-szintje, mint a lépben vagy az mLN-ben (6. ábra A).

Kétszeri (48 órás) nagy dózisu, *in vivo* DX-kezelés után a thymusban túlélő (GC-rezisztens) Treg-ek GR-expressziója a kontrollhoz képest növekedett. Ezzel szemben a perifériás nyirokszervekben a korábbi humán vizsgálatainkban is tapasztalt GR-expresszió-csökkenés volt megfigyelhető a DX-kezelést követően. Ez a változás csak a lépben volt szignifikáns. Ezek alapján úgy tűnik, hogy DX-kezelés hatására a thymusban a túlélő Treg-ekben az eredetileg alacsony GR-szint emelkedik, a lépben pedig az érett T-sejtekre jellemző GR downreguláció figyelhető meg (6. ábra B).

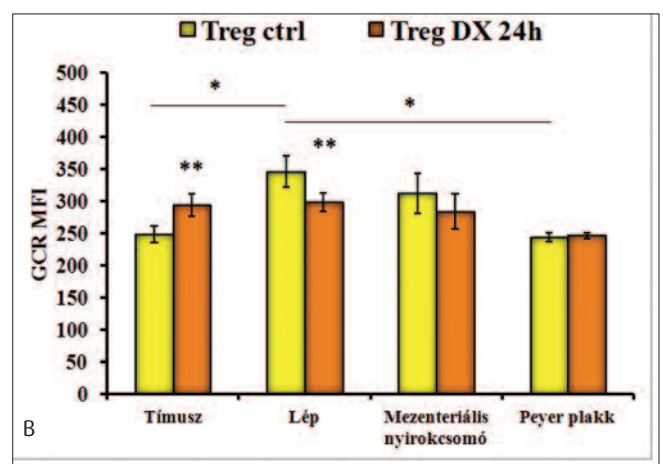
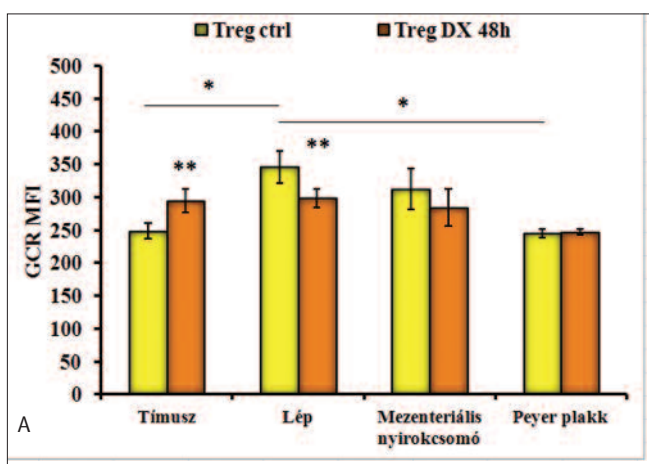
Megbeszélés

Az allo- és autoantigénnel szembeni immunválasz gátlásával a Treg-sejtek fontos tényezői és terápiás célpontjai az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Gyulladásos, autoimmun betegségek és transzplantáción átesett betegek kezelésének egyik legfontosabb eszközei a GC-analógok, mégis keveset tudunk a Treg-sejtekre kifejtett hatásaikról.

Munkánk során a GC-kezelés centrális és perifériás nyirokszervekben előforduló nTreg- (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺) és iTreg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻) sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. Nagy dózisu DX-kezelés hatására a thymus és a lép szerkezete is megváltozott, a lépben a T-sejt-zóna diffúzzá vált, ugyanúgy, mint a thymusban az Treg-sejtek eloszlása is. A thymusban a nTreg-sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, a kezelés hosszával párhuzamosan pedig tovább nőtt, miközben a thymocyták száma drámaian csökkent, ami a DP, GC-érzékeny thymocyták pusztulásával magyarázható. Eközben az abszolút Treg-sejt-szám nem változott, így az arány tapasztalt növekedése kizárólag azok túléléséből adódik. Ez arra enged következtetni, hogy a thymusban többségben jelen levő nTreg-sejtek rezisztensek a GC-indukált apoptotikus hatásra.

A perifériás nyirokszervekben sokkal magasabb a Treg-ek aránya, de 45–60%-uk iTreg. Ismételt DX-kezelés hatására a lépben és az mLN-ben kismérvű Treg-sejt-arány-csökkenés volt megfigyelhető, miközben az összejszámok is csökkentek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a periférián előforduló iTreg-ek és nTreg-ek másképp reagálnak GC-expozícióra.

Mivel az nTreg-ek a thymusban jönnek létre, joggal feltételezhető, hogy előfordulásuk ott a leggyakoribb. A thymusban a vártnak megfelelően igen magas a Helios-pozitivitás a Treg-sejteken belül. Meglepő azonban, hogy a perifériás nyirokszervekben is a Treg-ek fele Helios-pozitív. Ez az eredmény kétséget ébreszt, hogy a Helios jó markerként használható-e az nTreg és iTreg alcsoportok elkülönítésére [22]. Ha a periférián valóban ilyen magas az nTreg-sejtek előfordulása, akkor az összejszám csökkenése mellett a Treg-ek arányának – azok szteroidrezisztenciája miatt – növekednie kellett volna, de ez egyik perifériás nyirokszervben sem történt.



6. ábra

A regulatórikus T-sejtek glukokortikoidreceptor- (GR-) expressziója (A) és annak változása 48 órás nagy dózisu DX-kezelés hatására (B). A különböző nyirokszervekből izolált sejteket CD4/CD25 sejtfelszíni és Foxp3/GR intracelluláris jelölést követően analizáltuk, és a GR átlagos fluoreszcenciaintenzitásokat (MFI) hasonlítottuk össze. A kezeletlen thymusban és PP-ben alacsonyabb a Treg-sejtek GR-szintje, mint a lépben ($p < 0,05$). GC-kezelés hatására a thymusban a GR upregulációja ($p < 0,01$), míg a lépben downreguláció ($p < 0,01$) volt megfigyelhető.



meg, sőt, a lépben és az mLN-ben még szignifikáns csökkenésüket is tapasztaltuk. Eredményeink inkább azt a megállapítást támasztják alá, hogy a periférián a Helios T-sejt-aktivációs marker, és bár kétségtelen, hogy centrálisan magasabb a Helios-pozitivitás a Treg-eken belül, expressziója mégsem kizárólag nTreg-re jellemző.

Egy adott sejt GC-érzékenysége függ annak GR-expressziós szintje mellett a sejtet érő egyéb jelátviteli útvonalak párbeszédétől is. Az intézetünkben végzett korábbi kísérletek szerint a thymusban a DP thymocyták mutatják a legalacsonyabb GR-expressziót [33], és ennek ellenére a legérzékenyebben reagálnak a GC-indukált apoptózisra. Eredményeink alapján ez azzal magyarázható, hogy a DP thymocytákban a ligandkötés hatására a GR elsősorban nem a sejtmagba, hanem a mitokondriumba transzlokálódik, és ott proapoptotikus fehérjék akkumulációját és az intrinsic apoptotikus útvonal elindítását közvetíti [34]. Az érett, perifériás lymphocyták rezisztensebbek a GC-analóg adására, és bennük a GR szignifikáns downregulációját figyelhetjük meg [35]. Kísérleteinkben a kezeletlen állatok thymusában és a Peyer-plakkokban található Treg-sejtek GR-expressziója alacsonyabb, mint a lépben, ami a lokális mikroenvironmenti hatások (lokális GC-termelés) következménye lehet. GC-kezelés hatására a GR-expresszió a thymusban található nTreg-sejtekben növekszik, míg a lépben downreguláció figyelhető meg. Ez összefügg a thymusban és perifériás szervekben található Treg-sejtek eltérő GC-érzékenységgel. Treg-sejtekben a GC által elindított jelátviteli útvonalak tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Támogatás: A munka az OTKA K105962 és a CABCOS II. HUHR/1001/2.1.3/0007 pályázat támogatásával készült

IRODALOM

- [1] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–87.
- [2] Schütt C, Bröker B: *Grundwissen Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [3] Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM: Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63: 60–72.
- [4] Godfrey DI, Purton JF, Boyd RL, Cole TJ: Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol Today* 2000; 21: 606–11.
- [5] Vacchio MS, Ashwell JD: Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med* 1997; 185: 2033–8.
- [6] Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD: Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J Immunol* 1999; 163: 1327–33.
- [7] Zheng Y, Rudensky AY: Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007; 8:457–62.
- [8] Zabransky DJ, et al: Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One* 2012; 7: e34547.
- [9] Lourenço EV, La Cava A: Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* 2011; 44: 33–42.
- [10] Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253–7.
- [11] Brunkow ME et al: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68–73.
- [12] Bennett CL, et al: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20–1.
- [13] Josefowicz SZ, Rudensky A: Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009; 30: 616–25.
- [14] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ: Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626–35.
- [15] Weiner HL: Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207–14.
- [16] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237–40.
- [17] Bevan MJ: In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. *Immunity* 1997; 7:175–8.
- [18] Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É: *Az immunológia alapjai*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.
- [19] Thornton AM, et al: Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184: 3433–41.
- [20] Hahm K, et al: Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 1998; 12: 782–96.
- [21] Kelley CM, et al: Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 1998; 8: 508–51.
- [22] Getnet D, et al: A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47: 1595–600.
- [23] Serre K, et al: Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One* 2011; 6: e20731.
- [24] Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW: Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011; 6: e24226.
- [25] Deng L, et al: Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4105–12.
- [26] Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA: Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971–9.
- [27] Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD: Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002; 169: 4712–6.
- [28] Lindley S, et al: Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 92–99.
- [29] Maul J, et al: Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+CD25high T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868–1878.



- [30] Chavele K-M, Ehrenstein MR: Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 2011; 585: 3603–10.
- [31] Mellor-Pita S, et al: Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 553–4.
- [32] Stary G, et al: Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF- β and expand regulatory T cells. *J Immunol* 2011; 186: 103–12.
- [33] Berki T, Pálkás L, Boldizsár F, Németh P: Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 2002; 14: 463–9.
- [34] Talabér G, et al: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol* 2009; 21: 1269–1276.
- [35] Du J, et al: Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R108.

(Dr. Berki Timea, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12., tel: 72-536-291, fax:72-536-289, e-mail: berki.timea@pte.hu)



Increased proportions of functionally impaired regulatory T cell subsets in systemic sclerosis



Emese Ugor^a, Diána Simon^a, Giovanni Almanzar^b, Ramóna Pap^a, József Najbauer^a, Péter Németh^a, Péter Balogh^a, Martina Prelog^b, László Czirják^c, Tímea Berki^{a,*}

^a Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Clinical Center, Szigeti út 12, 7624 Pécs, Hungary

^b Department of Pediatrics, University Hospital Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, D-97080 Würzburg, Germany

^c Department of Rheumatology and Immunology, University of Pécs, Clinical Center, Akác u. 1, 7632 Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2016

Received in revised form 3 April 2017

accepted with revision 10 May 2017

Available online 15 May 2017

Keywords:

Epigenetic regulation

FOXP3

IL-10

Regulatory T cells

Systemic sclerosis

TGF- β

ABSTRACT

Treg abnormalities have been implicated in the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc). Treg subpopulations and their cytokines, IL-10 and TGF- β in the peripheral blood of early stage SSc patients were investigated. We hypothesized that epigenetically regulated methylation of the FOXP3 promoter and enhancer regions are altered in Tregs of SSc patients, which might be involved in the T cell imbalance. CD4+CD25+Foxp3+CD127- Treg cells were significantly elevated in patients with diffuse cutaneous SSc and in patients with anti-Scl-70/RNA-Pol-III autoantibody positivity and with lung fibrosis. Increased CD62L+ Treg cells were present in all SSc subgroups. The production of immunosuppressive cytokines by both CD127- and CD62L+ Tregs was diminished. We observed reduced methylation of Treg specific FOXP3 enhancer regions, and elevated FOXP3 gene expression in active SSc cases with negative correlation in the frequency of CD62L+IL-10+ Tregs. Our data indicate an inappropriate distribution and cytokine production of Treg cells in early form SSc.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Regulatory T cells (Treg) constitute up to 1–2% of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and 4–5% of the CD4+ T cells. They have an essential role in maintaining the balance between immune activation and tolerance [1]. Therefore changes in their number and/or function might be important in the development of autoimmune diseases, including systemic sclerosis (SSc) [2].

SSc is an autoimmune disease affecting multiple organs and is characterized by fibrosis of the skin and visceral organs, vascular damage and immune dysfunction [3–6]. Activation of T lymphocytes is considered to be a key stimulus in promoting the vascular abnormalities and fibrosis observed in SSc [7,8]. As a result, activated T lymphocytes, especially CD4+ T cells, are readily detected in the circulation and in the affected organs of SSc patients [9]. In addition, many studies also implicate other elements of the immune system in the pathology of SSc, including the presence of autoantibodies and elevated cytokine levels [10,11]. Due to its involvement in the development of fibrosis in affected organs and also in Treg development and function [4,12], transforming growth factor-beta (TGF- β) probably plays a role in SSc pathogenesis.

Several reports have shown that the ratio of Tregs is elevated in the PBMC compartment in SSc, while some studies have reported normal or

decreased Treg levels [13–16]. Nevertheless, it is generally thought that abnormal immune suppression by Treg cells in SSc is due to a change in the frequency and function of Tregs [13].

Beside the conventional definition of Tregs as CD4+CD25high+Foxp3+ T cells, numerous studies have defined further Treg subsets based on additional cell surface staining. Low levels, or no expression, of CD127 (interleukin-7 receptor alpha chain) has been proposed as a Treg marker amongst CD4+CD25high+ T cells [17], allowing the identification and purification of live Treg cells. The most rigorous and precise approach to identify Tregs remains expression of CD4, CD25 and transcription factor Forkhead-box-protein-3 (Foxp3) in conjunction with CD127 negativity [13]. CD62L (L-selectin), a homing receptor of lymphocytes to lymph nodes, has been proposed to further distinguish the CD62L+ Treg subpopulations with an active recirculation into lymph nodes. These cells predominantly suppress naive T cell activation within the lymph nodes, whereas CD62L- Treg cells primarily migrate into inflammatory sites and suppress inflammation in peripheral tissues [18,19].

Recent evidence suggests that Foxp3 expression in Treg cells is under epigenetic control [20]. A distinct DNA methylation pattern combined with the formation of characteristic histone modifications establishes an open chromatin structure, thereby imprinting FOXP3 expression in Treg cells. In addition to three conserved non-coding sequences (CNS) demethylated or hypomethylated CpG regions in promoter [21,22], upstream enhancer [23] and intronic enhancer [24] provide stable long-term expression of the FOXP3 gene. These regions

* Corresponding author.

E-mail address: berki.timea@pte.hu (T. Berki).

are the primary targets of epigenetic regulation and are necessary to modulate its expression depending on the environmental cues T cells receive [20]. In thymically derived natural nTreg cells these regions are generally unmethylated resulting in stable Foxp3 expression, whereas in induced iTreg cells they are hypomethylated [25], while in effector T cells are fully methylated. Given the importance of stable Foxp3 expression, we hypothesize that the methylation status of the *FOXP3* promoter and upstream enhancer regions are altered in SSc patients resulting in an imbalance between iTregs defined by CD62L- and nTregs defined by CD62L+.

The aim of this study was to analyze the Treg subpopulations and their cytokine (IL-10 and TGF- β) production in the peripheral blood of early-stage SSc patients compared to healthy controls (HC) and to evaluate the changes in relation to the disease subgroups. We also analyzed the CD4+CD25-Foxp3+ T cells that are considered to comprise a reservoir pool for Treg cells. In addition we investigated the DNA methylation status of CpGs within the *FOXP3* promoter and upstream enhancer regions which correlates to stable Foxp3 expression in nTregs [26].

We found that in PBMC of early-stage dcSSc cases with Scl-70 and/or RNA-Pol-III autoantibody positivity there is a significantly increased ratio of CD127- Treg cells with diminished IL-10 production when compared to HCs. The CD62L+ Treg cells, which represent a small subgroup of the peripheral Treg population with distinct recirculation pattern, were also elevated in all SSc subgroups with less TGF- β production than in HC Tregs. The observation that the methylation of the *FOXP3* enhancer region is lower in SSc-derived T cells than in HC corresponds to the elevated CD62L+ nTreg ratios detected in dcSSc. These findings may reflect on an inappropriate distribution and function of Treg cell subpopulations in SSc patients.

2. Materials and methods

2.1. Patients

We recruited 26 SSc patients with early onset of the disease [20 females and 6 males; mean age (SD): 54.7 (12.6) years with the mean duration of disease (SD): 2.5 (1.7) years] at the University of Pécs, Department of Rheumatology and Immunology, classified as dcSSc (19) or lcSSc (7) based on the criteria proposed by LeRoy et al. [27] (Table 1.). All patients fulfilled the 2013 ACR/EULAR SSc classification criteria [28]. The onset of SSc was defined as the date of the first SSc-specific symptom other than Raynaud's symptom. Ten age- and gender-matched healthy volunteers were investigated. All participants gave their informed consent to the study. The study was approved by the Hungarian National Ethics Committee (84-256/2008-1018EKU) and was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki 2011. Blood samples were collected using standard procedure in vacuum tubes containing heparin. Pulmonary fibrosis was characterized by detection of fibrosis with high resolution CT and/or decreased forced vital capacity (FVC < 80%). Disease activity was also recorded according to the European Scleroderma Study Group (EScSG) disease activity index and the disease was considered active with index values >3. Thirty one percent of all SSc patients (42% of dcSSc) received immunosuppressive therapy (low dose corticosteroid (6–8 mg methylprednisolone) (3 patients) or cyclophosphamide + corticosteroid (5 patients) at the time of blood collection (Table 1).

2.2. Autoantibody measurements

Disease specific autoantibodies were measured using conventional ELISA tests or by immunoblotting. After positive anti-nuclear antibody (ANA) screening test (ANA-Ease ELISA Kit, Genesis, GD74), anti-CenpB (Orgentec, ORG 633) and anti-Scl-70 (Orgentec, ORG 212–24) antibodies were detected using antigen-specific ELISA tests. Anti-RNA polymerase III (RNA-Pol-III) antibody was detected by immunoblot method

Table 1
Clinical and laboratory characteristics of the SSc patients enrolled.

	SSc (n = 26)	lcSSc (n = 7)	dcSSc (n = 19)
General data			
Age (years), mean (SD)	54.7 (12.6)	56.6 (8.0)	54 (14.0)
Gender (female), n (%)	20/26 (76.9%)	6/7 (85.7%)	14/19 (73.7%)
Disease duration (years), mean (SD)	2.5 (1.7)	3.0 (2.2)	2.37 (1.5)
Active disease ^a , n (%)	15/26 (57.7%)	3/7 (42.9%)	12/19 (63.2%)
Active disease (EScSG > 3), n (%)	8/26 (30.8%)	1/7 (14.3%)	7/19 (36.8%)
Organ involvement			
Pulmonary fibrosis ^b , n (%)	17/26 (65.4%)	3/7 (42.9%)	14/19 (73.7%)
Pulmonary arterial hypertension ^c , n (%)	0/26 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/19 (0.0%)
Renal crisis, n (%)	1/26 (3.8%)	0/7 (0.0%)	1/19 (5.3%)
MRSS, mean (SD)	10.6 (10.6)	2.8 (3.3)	13.1 (10.9)
Antibodies			
ACA+, n (%)	6/26 (23.1%)	4/7 (57.1%)	2/19 (10.5%)
Scl-70 +/RNAPol-III+, n (%)	12/26 (46.1%)	1/7 (14.3%)	11/19 (57.9%)
Inflammatory laboratory parameters			
Elevated ESR ^d , n (%)	4/26 (15.4%)	0/7 (0.0%)	4/19 (21.0%)
Hypocomplementaemia ^e , n (%)	4/26 (15.4%)	2/7 (28.6%)	2/19 (10.5%)
Elevated CRP ^f , n (%)	9/26 (34.6%)	3/7 (42.9%)	6/19 (31.6%)

^a According to the European Scleroderma Study Group disease activity index (EScSG index > 3).

^b Lung fibrosis detected by high resolution CT and/or forced vital capacity < 80%.

^c Right ventricle pressure \geq 40 mmHg measured by right heart catheterization.

^d Erythrocyte sedimentation rate \geq 30 mm/h.

^e Complement 3 < 0.9 g/l and/or complement 4 < 0.1 g/l.

^f C-reactive protein \geq 5 mg/l.

(Euroimmune, DL 1532–1601 G), which was also used to confirm the anti-CenpB and anti-Scl-70 autoantibody positivity.

2.3. Flow cytometric detection of regulatory T cell subpopulations

Multiparametric flow cytometry was performed on PBMCs isolated by Ficoll density gradient centrifugation. Regulatory T cells and their subgroups were determined using FITC conjugated anti-CD4 (Becton Dickinson, RPA-T4), APC conjugated anti-CD25 (Becton Dickinson, M-A251), PE-conjugated anti-Foxp3 (Becton Dickinson, 259D/C7), PacificBlue conjugated anti-CD127 (BioLegend, AO19D5) and APC/Cy7 conjugated anti-CD62L (BioLegend, DREG-5C) antibodies. Intracellular staining was performed by using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience), following the manufacturer's instructions. Fluorescence of labeled cells was recorded using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and analyzed using FCS Express 4 software (De Novo Software, USA). Lymphocytes were gated based on forward and sideward scatter (FSC and SSC). CD25+Foxp3+ conventional Treg cells were determined as proportion of CD4+ cells. CD4+ cells were analyzed for CD25 and CD127 expression, and then the CD25+CD127- cells for Foxp3 positivity. CD62L+ Tregs (an activated subgroup) were detected in the gated CD4+CD25+CD127-Foxp3+ cells (Fig. 1).

2.4. Cytokine detection

For functional analysis, PBMCs were stimulated with 25 ng/ml PMA (Sigma)/1 μ g/ml Ionomycin (Sigma)/10 μ g/ml Brefeldin (Sigma) in RPMI for 4 h at 37 °C and their IL-10 and TGF- β cytokine production was investigated by flow cytometry using PerCP/Cy5.5 conjugated anti-TGF- β 1 (BioLegend, TW4-2F8), PE/Cy7 conjugated anti-IL-10 (BioLegend, JES3-9D7) antibodies. Following cell surface CD4/CD25/CD127/CD62L labeling, cells were washed and intracellular

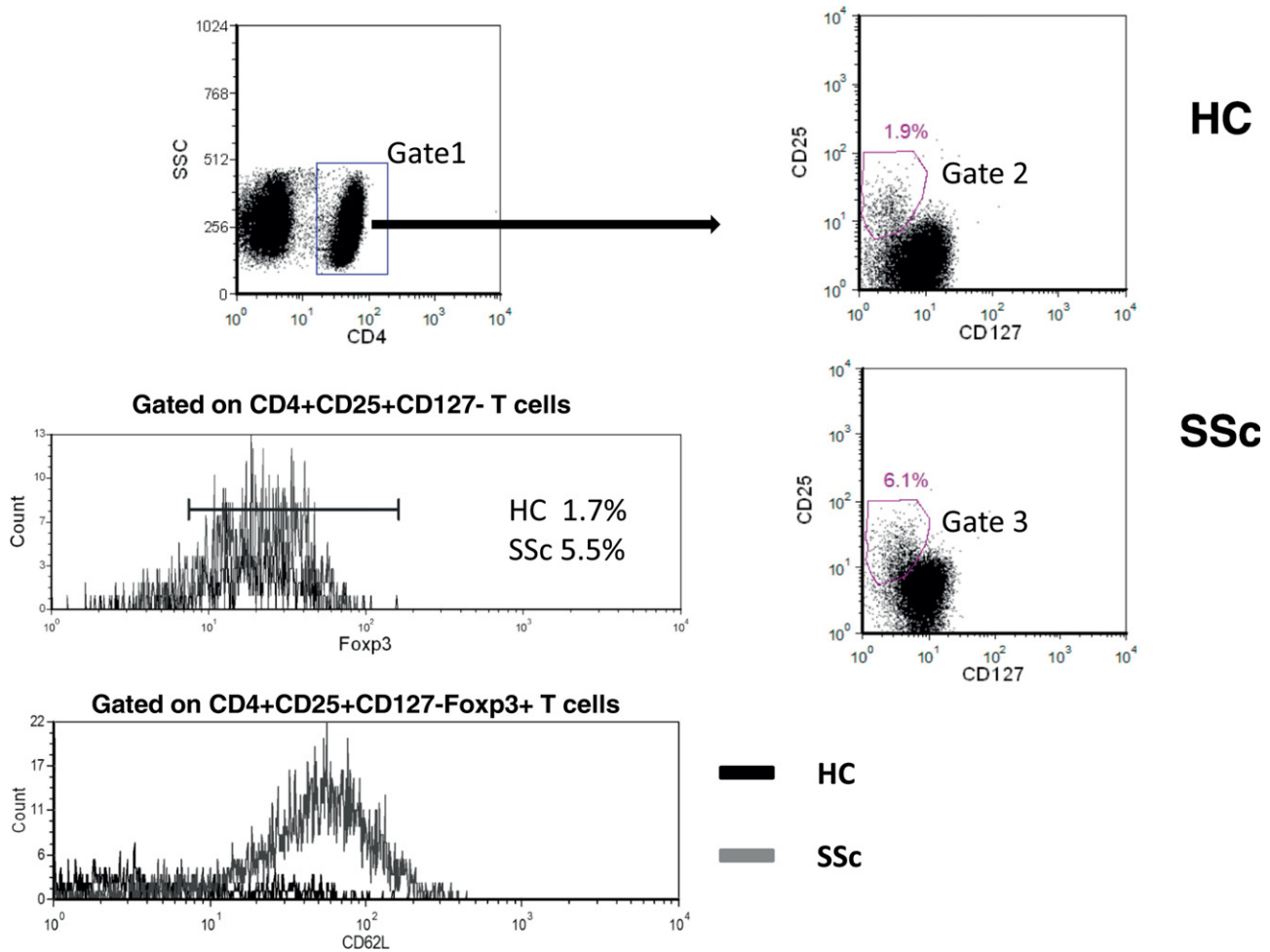


Fig. 1. Gating strategy for identification of Treg subpopulations. Combination of CD25, CD127, CD62L and Fcpx3 markers were used for determining the percentages of Treg cells within the CD4+ T cell population of SSc patients and healthy controls (HC). The CD25+/CD127- cells within the CD4+ cells (Gate 1) of HCs (Gate 2) and SSc cases (Gate 3) were compared (dot plots), followed by the analysis of Fcpx3 positivity (combined Treg detection) (upper histogram) in these gates. The CD62L positive cells (lower histogram) of HCs and SSc patients were determined within the CD4+CD25+Fcpx3+CD127- cell population (extended labeling).

staining was performed using Fcpx3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) following the manufacturer's instructions. Fluorescence of labeled cells was measured using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and analyzed using FCS Express 4 software (De Novo Software, USA). Determination of IL-10 and TGF- β cytokine production within the CD4+CD25+CD127-Fcpx3+ cells and in the CD62L+ Treg cells was performed.

2.5. Methylation analysis by pyrosequencing

Genomic DNA from B cell depleted lymphocytes was obtained using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). Assays for quantification of methylation levels of CpGs in the target regions of *FOXP3* promoter and upstream enhancer were designed by using the PyroMark Assay Design software (Qiagen, Hilden, Germany). Primers and sequences are listed in Supplementary Tables 1 and 2. Bisulfite conversion of DNA obtained from PBMCs of all ($n_{HC} = 10$; $n_{SSc} = 24$) was performed using the EpiTectFast 96 Bisulfite Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. PCR amplification steps were performed on a Vapo-Protect™ (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany) with an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, 37 cycles of 95 °C for 30 s, primer-specific annealing temperature of 60 °C for 30 s, 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 7 min. The reaction mixture consisted of 5 μ l 10 \times PCR buffer with MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTP mix, 2.5 μ l of each forward and reverse primer (final concentration 0.5 μ M), 0.4 μ l (final

concentration 1 U) Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 36.6 μ l PCR-grade water, and 2 μ l template DNA (70–200 ng). PCR products were visualized by electrophoresis in 1.0% agarose gel.

Bisulfite pyrosequencing was performed on a PyroMark™Q96 MD Pyrosequencing System with the PyroMark Gold Q96 CDT Reagent Kit (Qiagen). Pyro Q-CpG software (Qiagen) was used for data analysis.

2.6. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from B cell depleted lymphocytes using RNeasy PlusMikro kit (Qiagen). Complementary DNA (cDNA) was generated from 25 to 400 μ g RNA using oligo(dT)₁₈ primers (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for reverse transcription with Maxima reverse transcriptase (Thermo Scientific). Real-time PCR was performed using the applied Biosystems® Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) utilizing iTaquniver SYBR green according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Ismaning, Germany). Amplification was conducted for 40 cycles. Relative expression of *FOXP3* was determined by normalizing expression of each gene to β 2-microglobulin (for primers see Supplementary Table 3).

2.7. Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using SPSS v. 22.0 statistics package (IBM, USA). Shapiro-Wilk test was used to test for normal

distribution, before applying Student's *t*-test for normally-distributed and non-parametric Mann-Whitney-U for not normally-distributed independent variables. Normally-distributed variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Not normally-distributed variables were expressed as medians and interquartile ranges (IQR). Correlations between variables were identified by Spearman's rank correlation coefficient. Given the explorative nature of the study, no correction for multiple testing was performed. *P* values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Identification of Treg cells

In order to identify Treg cells in SSc patients with early form of the disease and in HC subjects we used three combinations of markers based on data of previous studies on Treg cells. We compared 'conventional' CD4+CD25+Foxp3+ Treg cell staining with an 'extended' cell surface labeling including CD4+CD25+CD127-, and a 'combined' staining of CD4+CD25+Foxp3+CD127-, respectively (gating strategy is shown in Fig. 1). First we tested the correlation of Foxp3+ and CD127- cells within the CD4+CD25+ T cell population of all study subjects and found a strong correlation between the proportions of CD127- and Foxp3+ cells ($p < 0.001$, $r = 0.896$) (Fig. 2A), which agrees with previous reports [29,30]. Then we compared Treg ratios in SSc and HCs using different marker combinations for identification of Tregs. Using the conventional Treg markers and the cell surface staining alone, not significant but similarly elevated Treg cell proportions were detected in SSc patients (data not shown). With the CD4+CD25+Foxp3+CD127- marker combination we detected significantly increased proportions of Treg cells in SSc patients, when compared to the HC group ($p < 0.05$) (Fig. 2B). Based on these data, in our subsequent experiments we used the CD4+CD25+Foxp3+CD127- markers for identification of peripheral Treg cells (CD127-Treg), which is considered to be the most accurate and rigorous marker combination [13].

3.2. Elevated CD127- Treg cell frequencies with decreased IL-10 cytokine production in dcSSc

Since we detected a significantly increased CD127- Treg cell frequency within the CD4+ T cells of SSc patients using the 'combined' labeling strategy, then we separated the SSc patients into subgroups such as limited or diffuse cutaneous SSc (lcSSc and dcSSc), the presence of autoantibodies and the presence or absence of pulmonary fibrosis. We found that patients with dcSSc, anti-Scl-70 and anti-RNA-Pol-III autoantibody seropositivity and patients with pulmonary fibrosis had significantly increased frequencies of CD127- Treg cells when compared to the HC group ($p < 0.05$) (Fig. 3A).

In addition, we also characterized Treg cells based on their cytokine production, including IL-10 and TGF- β . In SSc patients, we found a significantly lower proportion of IL-10 producing Tregs ($p < 0.05$) compared to HC, which was mainly attributed to the lcSSc group (Fig. 3B). When stratifying the SSc group according to the presence of autoantibodies, the ACA+ (anti-centromere antibody) group showed a significantly decreased frequency of IL-10 positive Treg cells ($p < 0.05$), when compared to HC (Fig. 3B). The proportion of TGF- β producing Treg cells did not differ in any subgroups of the disease.

3.3. Elevated proportions of CD62L+ Tregs with decreased TGF- β production in SSc

In order to analyze Treg cells with different homing nature, we also measured the frequency of CD62L+ (L-selectin) Tregs within the CD4+CD25+Foxp3+CD127- Treg cell subgroup and their cytokines.

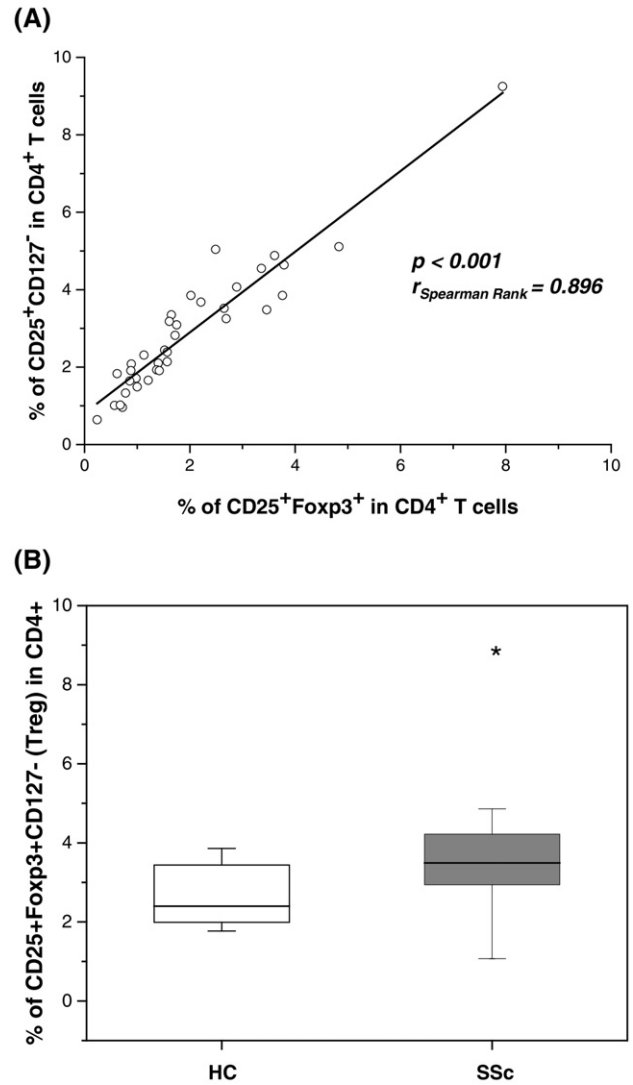


Fig. 2. Identification of Tregs and correlation between Foxp3+ and CD127- Treg cells. (A) The percentages of CD4+CD25+Foxp3+ cells were correlated with the percentages of CD4+CD25+CD127- cells in all individual study subjects (HCs and SSc patients). A strong correlation was found between combined labeled CD4+CD25+Foxp3+ and the cell surface labeled (CD4+CD25+CD127-) Treg cells within the CD4+ T cell population ($p < 0.001$, $r = 0.896$, $n = 36$). (B) With the extended labeling protocol we detected significantly increased proportions of CD127- Treg cells (CD4+CD25+Foxp3+CD127-) as percentage of CD4+ T cells in SSc patients, when compared to the HC group ($*p < 0.05$, $n_{SSc} = 26$, $n_{HC} = 10$). Boxes show IQR, whiskers indicate lowest and highest values, horizontal lines represent medians.

A significantly higher proportion of CD62L+ Tregs were detected in SSc patients, when compared to HCs ($p < 0.05$) (Fig. 4A). We then stratified SSc patients into subgroups according to disease type (lcSSc, dcSSc), the presence of autoantibodies, the presence or absence of pulmonary fibrosis and disease activity. Significantly increased proportions of CD62L+ Tregs were detected in all subgroups, except in the aAb-, and ACA+ cases (Fig. 4A).

Then we analyzed the frequency of cytokine producing CD62L+ Treg cells and found a much higher proportion of IL-10 and TGF- β producing cells than in the total CD127- Treg population. In both lcSSc and dcSSc patients we found decreased frequency of TGF- β producing CD62L+ Tregs compared to HC ($p < 0.05$) (Fig. 4B, right panel). The proportion of IL-10 producing CD62L+ Treg cells did not differ (Fig. 4B, left panel). When stratifying the SSc group according to the presence of autoantibodies, the aAb-, ACA+, and Scl-70+/RNA-Pol-III+ subgroups showed significantly decreased proportions of TGF- β positive CD62L+ Treg cells ($p < 0.05$), when compared to HC (Fig. 4B, right panel).

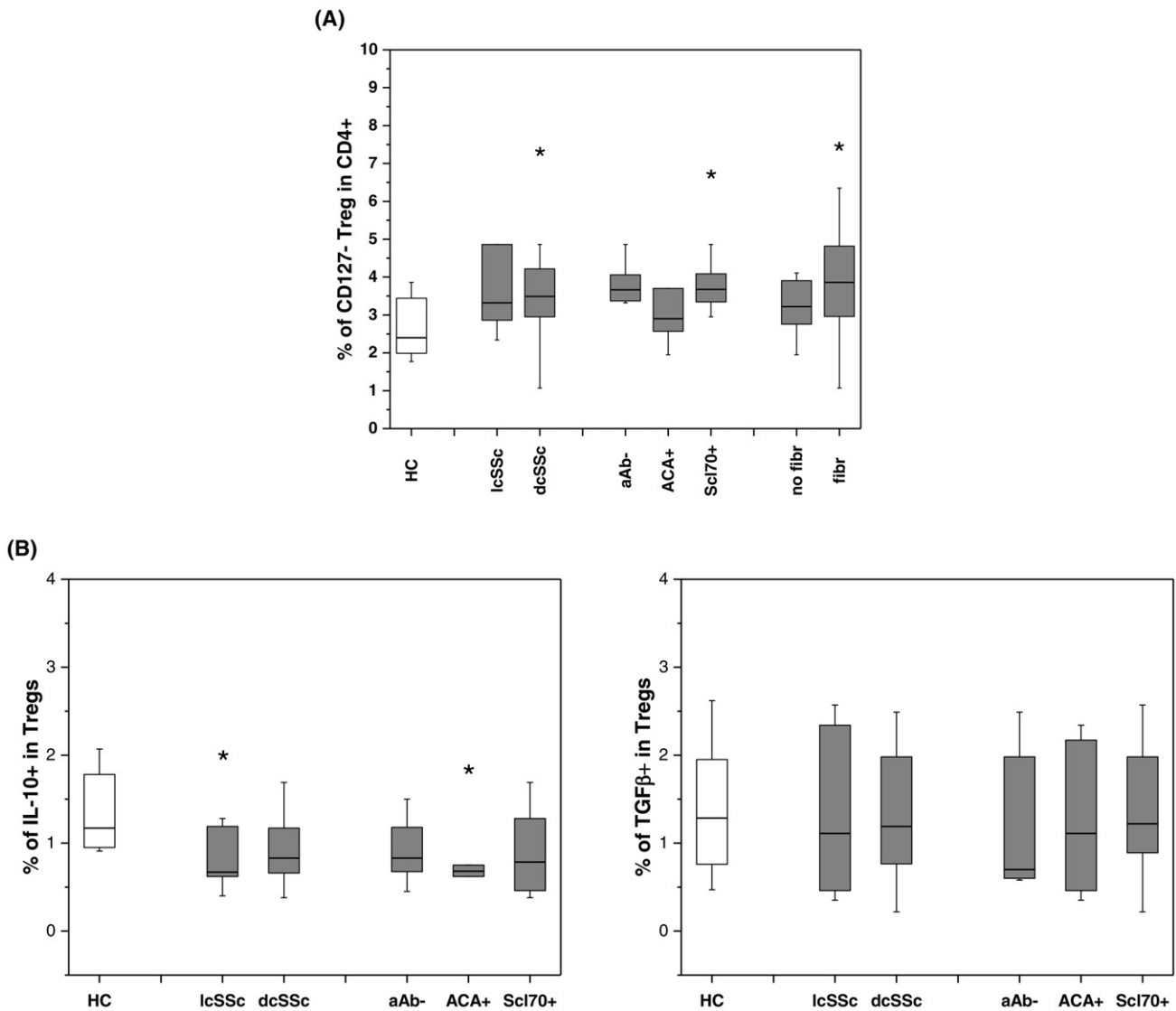


Fig. 3. Treg cells and their cytokines in SSc patients and HCs. (A) Significantly increased CD127- Treg cell ratio (as % of CD4+ T cells) was detected in dcSSc cases ($*p < 0.05$, $n_{dcSSc} = 19$, $n_{HC} = 10$) (left panel), in the Scl-70+/RNA-Pol-III+ group ($p < 0.05$, $n_{Scl-70+/RNA\ pol\ III+} = 12$, $n_{HC} = 10$) and in patients with lung fibrosis (fibr) ($*p < 0.05$, $n_{fibr} = 17$, $n_{HC} = 10$) (lower panel), when compared to HCs. (B) Analysis of cytokines in CD127- Treg cells showed decreased IL-10 producing proportion of Tregs (left panel) in lcSSc patients ($*p < 0.05$, $n_{lcSSc} = 7$, $n_{HC} = 10$), and in the ACA+ group ($*p < 0.05$, $n_{ACA+} = 6$, $n_{HC} = 10$), when compared to HC. A similar tendency, but not significant decrease of IL-10 producing Tregs was observed in all other disease subgroups. The proportion of TGF- β producing Treg cells did not differ in the disease subgroups (right panel). Boxes show IQR, whiskers indicate lowest and highest values, horizontal lines represent medians.

3.4. Abundance of CD4+CD25-Foxp3+ T cells

The evidence that human CD4+CD25- cells containing Foxp3+ T cells convert to a CD25+ Treg phenotype upon homeostatic expansion [31], prompted us to investigate whether this CD4+CD25-Foxp3+ reservoir population is affected in SSc patients. We detected a non-significant tendency to lower percentages of CD4+CD25-Foxp3+ T cells in SSc, when compared to HC. In SSc patients without pulmonary fibrosis the percentage of CD4+CD25-Foxp3+ T cells was significantly lower compared to the SSc group with pulmonary fibrosis ($p < 0.05$) (Fig. 5).

3.5. FOXP3 gene expression is elevated in active SSc patients

We also assessed FOXP3 gene expression with qRT-PCR in B cell depleted lymphocytes of SSc patients. Relative gene expression values (RQ) were calculated by comparing the individual gene expression level in SSc patients to the average of HCs samples adjusted to RQ = 1. We found a significantly higher number of patients (7 of 14) with upregulated

FOXP3 expression (RQ > 2) in the active disease group (Table 2) compared to the inactive disease group (1 of 11). When we analyzed the correlation between FOXP3 gene expression and the previously defined Treg cell subgroups we found an inverse correlation between FOXP3 RQ values and the proportion of IL-10+CD62L+ Treg cells (Fig. 6).

3.6. CpGs within the FOXP3 upstream enhancer are hypomethylated in SSc patients compared to HCs

As FOXP3 gene expression was up-regulated in several SSc patients, we determined the methylation status of the proximal promoter and upstream enhancer CpG regions of the FOXP3 gene locus. No significant differences in the promoter methylation status were observed in any groups of SSc patients compared to HCs (data not shown). Methylation analysis of the FOXP3 upstream enhancer 1 and 2 regions revealed lower percentages of methylation at specific CpGs in SSc patients compared to HCs. Significant hypomethylation was found in CpG 3 and 7 sequences of the FOXP3 upstream enhancer 2 region (Fig. 7).

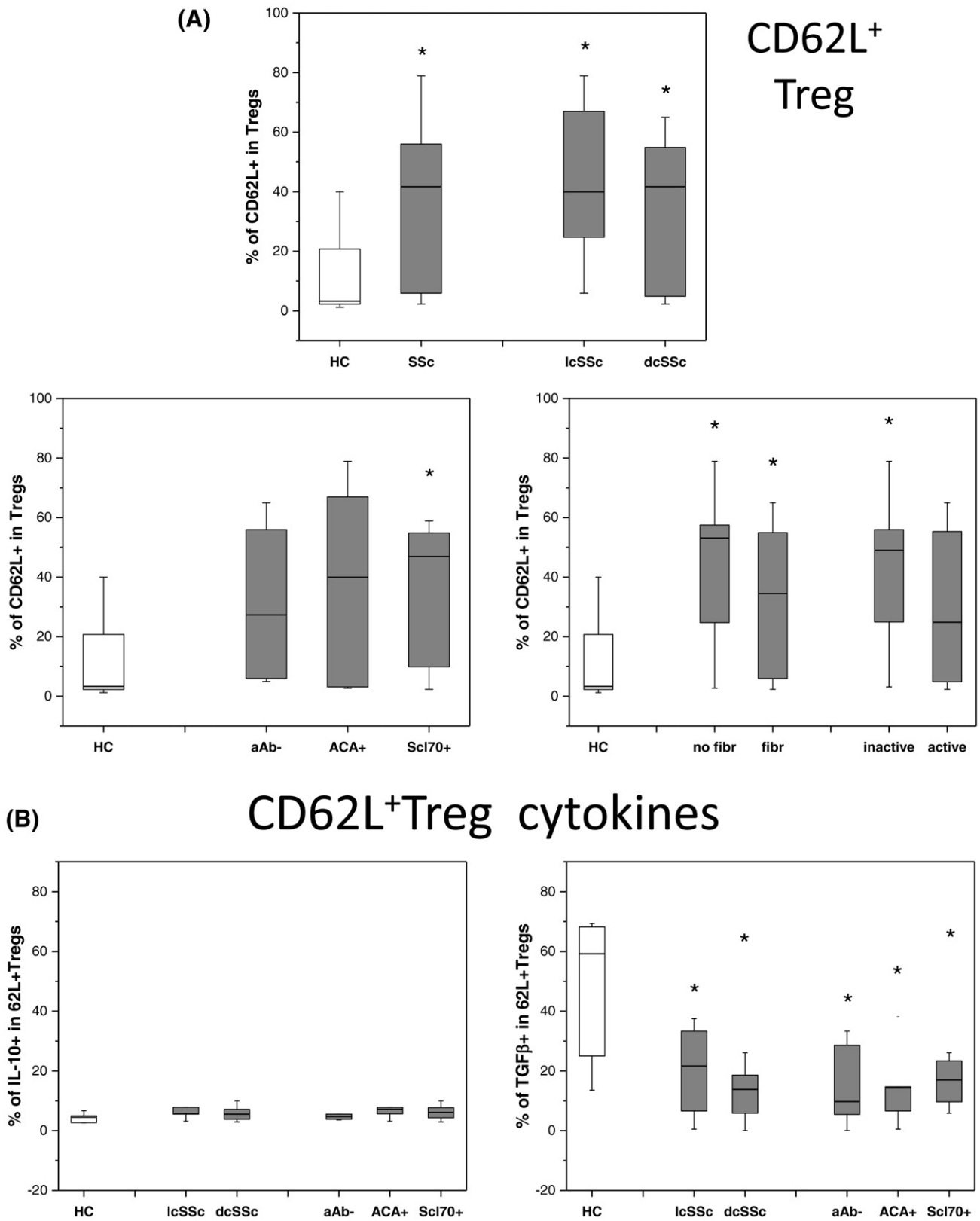


Fig. 4. Frequency of CD62L⁺ Tregs and their cytokine production in SSc patients and HCs. (A) The frequency of CD62L⁺ cells within the CD127⁻Tregs was elevated in both lcSSc and dcSSc compared to HC (**p* < 0.05, *n*_{SSc} = 26, *n*_{HC} = 10), and in all subgroups, except in the aAb⁻, and ACA⁺ cases. (B) The TGF-β producing subset (right panel) within the CD62L⁺ Tregs was decreased in both lcSSc and dcSSc patients (**p* < 0.05, *n*_{lcSSc} = 7, *n*_{dcSSc} = 19, *n*_{HC} = 10) independently from the autoantibody positivity (**p* < 0.05, *n*_{aAb⁻} = 8, *n*_{ACA⁺} = 6, *n*_{Sci-70+/RNA-pol III⁺} = 12, *n*_{HC} = 10), when compared to HC. The proportion of IL-10 producing CD62L⁺ Treg cells did not differ in any disease subgroups (left panel) compared to HCs. Boxes show IQR, whiskers indicate lowest and highest values, horizontal lines represent medians.

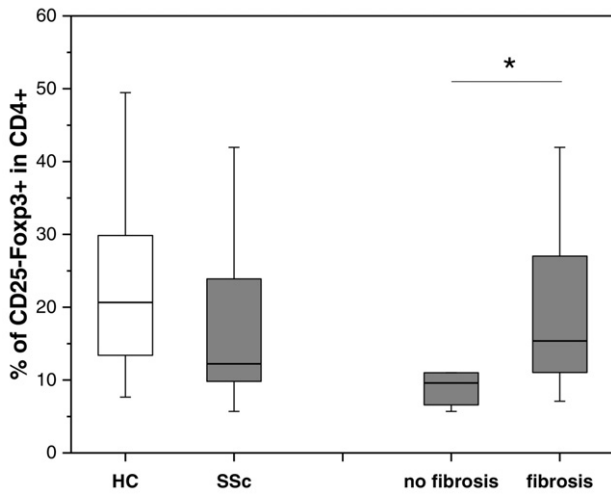


Fig. 5. Altered frequency of CD4+CD25–Foxp3+ T cells in various forms of SSc ($*p < 0.05$, $n_{\text{nofibr}} = 9$, $n_{\text{fibr}} = 17$). HC: healthy control; SSc: the entire SSc cohort; no fibrosis; fibrosis. Boxes show IQR, whiskers indicate lowest and highest values, horizontal lines represent medians.

3.7. Effects of immunosuppressive therapy on the distribution of Treg cell subsets

We also analyzed the possible effect of immunosuppressive therapy on the proportions of Treg cell subtypes and their cytokine production. We found no significant difference of total Treg proportions between SSc patients who received immunosuppressive therapy ($3.5 \pm 0.5\%$; $n = 8$) and those who did not receive immunosuppressive therapy ($3.8 \pm 0.4\%$; $n = 18$). Similarly, CD62L+ Treg subpopulations were not statistically different (untreated: $38.8 \pm 6.4\%$; $n = 18$; treated: $28.1 \pm 8.6\%$; $n = 8$). Therapeutic treatment did not have a significant effect on the cytokine production of Treg cells or any other parameters measured (data not shown).

4. Discussion

SSc is a chronic progressive disease with extensive dermal and visceral inflammation, vascular damage and autoantibody production, indicating the involvement of immunological processes. Treg cells have been identified as crucial cells in limiting the extent of cellular and humoral immune responses. The number and activity of Treg cells may significantly affect the course of the disease [32]. Our first objective in this study was the identification of Treg cells within the CD4+ T cell

Table 2
Association between *FOXP3* gene expression and clinical features in SSc.

	Number of cases	<i>FOXP3</i>		<i>P</i> -value
		up	normal	
Activity				
yes	14	7	7	=0.042
no	11	1	10	
Pulmonary fibrosis				
yes	16	4	12	=0.394
no	9	4	5	
Autoantibody				
ACA+	9	4	5	=0.581
Slc70+	5	1	4	
Other+	11	3	8	
Subset				
lcSSc	7	3	4	=0.64
dcSSc	18	5	13	

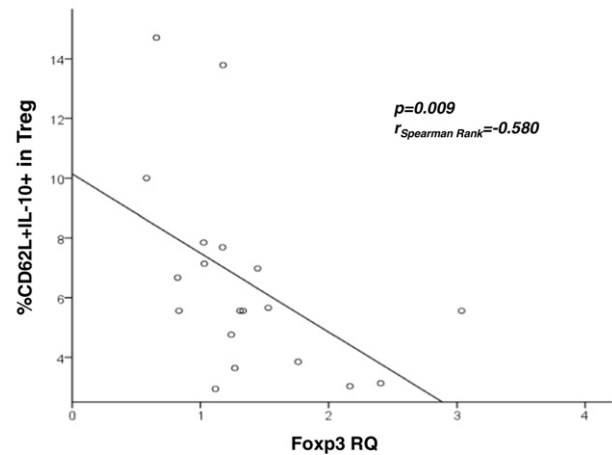


Fig. 6. Relationship between *FOXP3* gene expressions and the Treg cell frequency. A significant negative correlation was found between the relative *FOXP3* gene expression (RQ values) and the CD62L+IL-10+ Treg proportions ($*p < 0.009$, $r = -0.580$, $n = 26$) in SSc patients.

population using various cell surface and intracellular marker combinations, including the detection of the intracellular Foxp3 transcription factor involved in CD4+CD25+ Treg differentiation [1]. For live Treg cell isolation cell surface labeling is conventionally used and the CD4+CD25high+CD127– phenotype based Treg analysis showed close correlation between the Foxp3+ and CD127– Tregs also in our study. However, using both Foxp3 positivity and CD127 negativity of the CD4+CD25+ T cells for Treg cell identification [29,33] revealed significant differences between the Treg cell frequencies of SSc patients and HCs.

Earlier investigations suggested increased Treg proportions [13,14,34], while others reported decreased levels in SSc patients [15]. However, there is general agreement in the literature that patients with active form of disease have increased numbers of circulating Tregs with decreased functional capacity [13,32,35]. Of note, in our study we investigated patients with early stage, active disease, and found increased proportions of functionally impaired Treg cells, which is in agreement with the above-mentioned earlier reports. We hypothesize that this may occur as a result of provision of IL-2 by the FoxP3–, activated conventional T cells in the inflammatory milieu that may lead to expansion of FoxP3+ Tregs by increased proliferation and/or decreased apoptosis [36]. Second, some Tregs may switch to a pro-inflammatory phenotype in the presence of specific cytokines [32,37], and such Tregs may still express FOXP3, and the immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- β at decreased levels.

One of our consistent findings is that the proportion of CD127– Treg cells is elevated in the early disease stage of SSc patients compared to HC subjects. The statistically significant higher Treg proportions were more pronounced in severe forms of the diseases, such as dcSSc cases with Scl-70 and RNA-Pol-III autoantibody positivity and pulmonary fibrosis. Although no consensus has been reached regarding changes in Treg subpopulations in SSc [32], our data support the finding of increased Treg levels in the peripheral blood of SSc patients due to the elevated frequency of CD62L+ Tregs representing the natural or thymic Treg cell population and a group of central memory Tregs [19] both with a recirculation pattern into the lymphatic organs suppressing the activation of naive CD4+ T cells. As an important subset within the Treg cells in murine studies, CD62L+ Treg cells have been shown to possess significantly higher inhibitory capacity than their CD62L– Treg counterpart [38]. In another study in coeliac disease patients CD62L+ Treg cells were described as lymphoid tissue homing proportion of Tregs, while CD62L– Tregs as mucosal homing cells responsible for the tissue immune homeostasis [39]. In SSc, there is not only an imbalance between the CD62L positive and negative Treg cells, but their functional capacity is also disturbed in terms of reduced IL-10 secretion by the total Treg group and in terms of TGF- β production by the CD62L+ Treg subset.

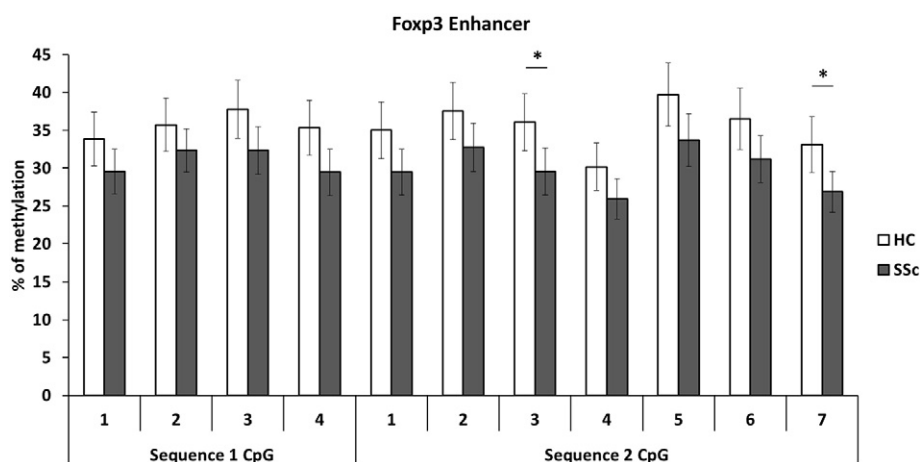


Fig. 7. Methylation status of CpG sequences within FOXP3 enhancer 1 and 2 regions in SSc patients and HCs. All CpG sites of FOXP3 gene enhancer regions showed a tendency towards hypomethylation. Significant hypomethylation compared to HCs was seen in CpG 3 and 7 sequences in the second enhancer region in samples of SSc patients. The values are given as mean \pm SEM ($*p < 0.05$, $n_{SSc} = 26$, $n_{HC} = 10$).

Since the Treg-derived anti-inflammatory cytokines play a central role in suppression of immune response and in preventing inflammatory and autoimmune pathologies [40], such a decrease in IL-10 positive Treg cells in the face of increased proportions of Treg cells could be due to a functional exhaustion of the Treg cells, similar to other T cell populations [41,42]. Of note, in our study, no decreased production of IL-10 was observed in the CD62L+ Treg cell population, which may suggest that the CD62L- Treg cell subpopulation(s), (in human studies also called Tr1 [43] or CD62L- effector memory Treg cells [19]) are defective in IL-10 production. This cell group has been shown to be responsible for the balance of tissue homeostasis, and inhibition of inflammatory responses in the skin and mucosa. Our finding, that elevated FOXP3 gene expression is characteristic in SSc patients with active forms of the disease and inversely correlate with the proportion of CD62L+IL-10+ Tregs also support the functional impairment of the effector memory Treg cells in SSc. Another important cytokine in the functioning of Treg cells is TGF- β [44], levels of which were decreased in the CD62L+ Treg cell population, but not in the total Treg cells. This finding supports the functional impairment of CD62L+ nTregs and central memory Tregs, while the peripherally induced Treg subpopulation (also called Th3), which is known to produce TGF- β is not affected [43]. The mechanism underlying the functional changes in IL-10 and TGF- β expression by FoxP3+ Treg cells is not well defined, however there is emerging evidence that epigenetic mechanisms, such as DNA methylation status, histone modifications and non-coding RNAs might be involved in SSc pathogenesis [45]. Methylation status of the proximal promoter and upstream enhancer CpG regions of the FOXP3 gene locus may play a role in stabilization of the FoxP3-positive Treg cell phenotype. Unmethylated FOXP3 gene locus promoter and enhancer regions provide stable long-term expression of the FOXP3 gene which is characteristic for the thymically derived nTreg cells, hypomethylated FOXP3 enhancer region is characteristic for induced iTregs and it is fully methylated in conventional T cells. Our methylation analysis of the FOXP3 genes revealed hypomethylation at all CpG sites of the FOXP3 enhancer regions in SSc T cells compared to that of HCs with significantly diminished methylation in 2 specific CpG sites. This observation support an elevated stable FoxP3-expressing cell population in SSc patients which is consistent with our flow cytometric finding regarding the increased CD62L+FoxP3+ Treg proportions in SSc patients as found by others [25].

We observed a tendency of decreased CD4+CD25-Foxp3+ T cell frequency in all SSc patients but significant alteration was only in patients without lung fibrosis. Of note, the CD4+CD25-Foxp3+ T cells are considered to comprise a reservoir pool for Treg cells that can be recruited to the CD25+ pool upon homeostatic expansion and/or

activation [31]. We hypothesize that depletion of the CD4+CD25-Foxp3+ T cell pool could be due to a robust increase in Tregs, as suggested by our data. Mechanistically this could reflect a high conversion rate of the CD4+CD25-Foxp3+ T cells into the CD4+CD25+Foxp3+ Treg pool that outpaces the generation of CD4+CD25-Foxp3+ T cell reservoir. Additionally, it can be envisioned that exhaustion of the CD4+CD25-Foxp3+ T cell population, or changes in T cell populations that are involved in the generation of the CD4+CD25-Foxp3+ pool (similarly to that described in conditions of chronic antigen persistence, e.g. chronic infections or cancer), could underlie the reduction in CD4+CD25-Foxp3+ T cells in SSc [41,42]. Since these cells might be the source of induced iTregs, it would not be surprising if an imbalance between nTreg and iTreg cells also existed in SSc patients.

In summary, our data demonstrate an imbalance (increased relative proportion) of regulatory T cell subsets and abnormalities in TGF- β and IL-10 cytokine production by Treg cell subsets in SSc patients. The proportional changes were attributable to disease stage and autoantibody status. We also detected hypomethylation of CpG sites in the enhancer region of FOXP3 in SSc patients. These data suggest that epigenetic mechanisms may underlie, at least in part, the imbalance of Treg cell function in SSc. Further studies should reveal the impact of such immunological changes on the pathogenesis and progression of SSc.

Acknowledgements

Funding: This work was supported by the Hungarian Scientific Research Fund OTKA, K105962, and OTKA, K112939, and by the European Union (European Social Fund) EFOP-3.6.1.-16-2016-00004. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2017.05.013>.

References

- [1] S. Sakaguchi, M. Miyara, C.M. Costantino, D.A. Hafler, FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system, *Nat Rev Immunol* 10 (2010) 490–500.
- [2] M. Miyara, G. Gorocho, M. Ehrenstein, L. Musset, S. Sakaguchi, Z. Amoura, Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases, *Autoimmun. Rev.* 10 (2011) 744–755.
- [3] C. Charles, P. Clements, D.E. Furst, Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies, *Lancet* 367 (2006) 1683–1691.
- [4] S. Bhattacharyya, J. Wei, J. Varga, Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities, *Nat. Rev. Rheumatol.* 8 (2012) 42–54.

- [5] Y. Allanore, R. Simms, O. Distler, M. Trojanowska, J. Pope, C.P. Denton, J. Varga, Systemic sclerosis, *Nat Rev Dis Primers* 1 (2015) 15002.
- [6] D. Simon, P. Balogh, A. Bognár, Z. Kelleremayer, P. Németh, N. Farkas, T. Minier, V. Lőránd, L. Czirják, T. Berki, Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis, *Clin Exp Rheumatol* 34 (Suppl. 100) (2016) 30–36.
- [7] J.P. Zuber, F. Spertini, Immunological basis of systemic sclerosis, *Rheumatology (Oxford)* 45 (Suppl. 3) (2006) iii23–iii25.
- [8] M. Liu, W. Wu, X. Sun, J. Yang, J. Xu, W. Fu, M. Li, New insights into CD4(+) T cell abnormalities in systemic sclerosis, *Cytokine Growth Factor Rev* 28 (2016) 31–36.
- [9] D.J. Abraham, T. Krieg, J. Distler, O. Distler, Overview of pathogenesis of systemic sclerosis, *Rheumatology (Oxford)* 48 (Suppl. 3) (2009) iii3–iii7.
- [10] S. Mehra, J. Walker, K. Patterson, M.J. Fritzler, Autoantibodies in systemic sclerosis, *Autoimmun. Rev.* 12 (2013) 340–354.
- [11] D. Pattanaik, M. Brown, B.C. Postlethwaite, A.E. Postlethwaite, Pathogenesis of systemic sclerosis, *Front. Immunol.* 6 (2015) 272.
- [12] X. Li, Y. Zheng, Regulatory T cell identity: formation and maintenance, *Trends Immunol.* 36 (2015) 344–353.
- [13] T.R. Radstake, L. van Bon, J. Broen, M. Wenink, K. Santegoets, Y. Deng, A. Hussaini, R. Simms, W.W. Cruikshank, R. Lafyatis, Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression, *PLoS One* 4 (2009) e5981.
- [14] G. Slobodin, M.S. Ahmad, I. Rosner, R. Peri, M. Rozenbaum, A. Kessel, E. Toubi, M. Odeh, Regulatory T cells (CD4+)CD25(bright)FoxP3(+) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity, *Cell. Immunol.* 261 (2010) 77–80.
- [15] E. Antiga, P. Quaglino, S. Bellandi, W. Volpi, E. Del Bianco, A. Comessatti, S. Osella-Abate, C. De Simone, A. Marzano, M.G. Bernengo, P. Fabbri, M. Caproni, Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea, *Br. J. Dermatol.* 162 (2010) 1056–1063.
- [16] A.N. Beşliu, L.M. Bănică, R. Lonescu, D. Predeţeanu, C. Stăvaru, C.M. Marica, C. Chiţon, G. Pistol, M. Stefănescu, C. Mătache, Role of cellular immunity in systemic sclerosis pathogenesis: update on CD4+T cells population studies, *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 68 (2009) 5–13.
- [17] D.J. Hartigan-O'Connor, C. Poon, E. Sinclair, J.M. McCune, Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells, *J. Immunol. Methods* 319 (2007) 41–52.
- [18] S. Wei, I. Kryczek, W. Zou, Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking, *Blood* 108 (2006) 426–431.
- [19] D.J. Campbell, Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis, *J. Immunol.* 195 (2015) 2507–2513.
- [20] Y. Kitagawa, J.B. Wing, S. Sakaguchi, Transcriptional and epigenetic control of regulatory T cell development, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 136 (2015) 1–33.
- [21] P.C. Janson, M.E. Winerdal, P. Marits, M. Thörn, R. Ohlsson, O. Winqvist, FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans, *PLoS One* 3 (2008) e1612.
- [22] M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taffin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorocho, S. Sakaguchi, Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor, *Immunity* 30 (2009) 899–911.
- [23] G. Lal, N. Zhang, W. van der Touw, Y. Ding, W. Ju, E.P. Bottinger, S.P. Reid, D.E. Levy, J.S. Bromberg, Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation, *J. Immunol.* 182 (2009) 259–273.
- [24] U. Baron, S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grützkau, J. Dong, A. Thiel, T.J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Türbachova, A. Hamann, S. Olek, J. Huehn, DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 2378–2389.
- [25] N. Ohkura, Y. Kitagawa, S. Sakaguchi, Development and maintenance of regulatory T cells, *Immunity* 38 (2013) 414–423.
- [26] H. Morikawa, S. Sakaguchi, Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells, *Immunol. Rev.* 259 (2014) 192–205.
- [27] E.C. LeRoy, C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, T.A. Medsger, N. Rowell, F. Wollheim, Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis, *J. Rheumatol.* 15 (1988) 202–205.
- [28] F. van den Hoogen, D. Khanna, J. Fransen, S.R. Johnson, M. Baron, A. Tyndall, M. Matucci-Cerinic, R.P. Naden, T.A. Medsger, P.E. Carreira, G. Riemekasten, P.J. Clements, C.P. Denton, O. Distler, Y. Allanore, D.E. Furst, A. Gabrielli, M.D. Mayes, J.M. van Laar, J.R. Seibold, L. Czirjak, V.D. Steen, M. Inanc, O. Kowal-Bielecka, U. Müller-Ladner, G. Valentini, D.J. Veale, M.C. Vonk, U.A. Walker, L. Chung, D.H. Collier, M.E. Csuka, B.J. Fessler, S. Guiducci, A. Herrick, V.M. Hsu, S. Jimenez, B. Kahaleh, P.A. Merkel, S. Sierakowski, R.M. Silver, R.W. Simms, J. Varga, J.E. Pope, 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative, *Arthritis Rheum* 65 (2013) 2737–2747.
- [29] N. Seddiki, B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, B. Fazekas de St Groth, Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 1693–1700.
- [30] M. Di Ianni, B. Del Papa, D. Cecchini, E. Bonifacio, L. Moretti, T. Zei, R.I. Ostini, F. Falzetti, L. Fontana, G. Tagliapietra, C. Maldini, M.F. Martelli, A. Tabilio, Immunomagnetic isolation of CD4+CD25+FoxP3+ natural T regulatory lymphocytes for clinical applications, *Clin. Exp. Immunol.* 156 (2009) 246–253.
- [31] S. Zelenay, T. Lopes-Carvalho, I. Caramalho, M.F. Moraes-Fontes, M. Rebelo, J. Demengeot, Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 4091–4096.
- [32] G. Slobodin, D. Rimar, Regulatory T cells in systemic sclerosis: a comprehensive review, *Clin Rev Allergy Immunol* 52 (2017) 194–201.
- [33] W. Liu, A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, J.A. Bluestone, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 1701–1711.
- [34] X. Liu, N. Gao, M. Li, D. Xu, Y. Hou, Q. Wang, G. Zhang, Q. Sun, H. Zhang, X. Zeng, Elevated levels of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction, *PLoS One* 8 (2013), e64531.
- [35] A. Giovannetti, E. Rosato, C. Renzi, A. Maselli, L. Gambardella, A.M. Giammaroli, P. Palange, P. Paoletti, S. Pisarri, F. Salsano, W. Malorni, M. Pierdominici, Analyses of T cell phenotype and function reveal an altered T cell homeostasis in systemic sclerosis. Correlations with disease severity and phenotypes, *Clin. Immunol.* 137 (2010) 122–133.
- [36] A. Liston, D.H. Gray, Homeostatic control of regulatory T cell diversity, *Nat Rev Immunol* 14 (2014) 154–165.
- [37] D.V. Sawant, D.A. Vignali, Once a Treg, always a Treg? *Immunol. Rev.* 259 (2014) 173–191.
- [38] J. Ermann, P. Hoffmann, M. Edinger, S. Dutt, F.G. Blankenberg, J.P. Higgins, R.S. Negrin, C.G. Fathman, S. Strober, Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD, *Blood* 105 (2005) 2220–2226.
- [39] M.A. van Leeuwen, M.F. du Pré, R.L. van Wanrooij, L.F. de Ruyter, H.R. Raatgeep, D.J. Lindenbergh-Kortleve, C.J. Mulder, L. de Ridder, J.C. Escher, J.N. Samsom, Changes in natural Foxp3(+)Treg but not mucosally-imprinted CD62L(neg)CD38(+)/Foxp3(+)Treg in the circulation of celiac disease patients, *PLoS One* 8 (2013) e68432.
- [40] S.S. Iyer, G. Cheng, Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease, *Crit. Rev. Immunol.* 32 (2012) 23–63.
- [41] H.T. Jin, Y.H. Jeong, H.J. Park, S.J. Ha, Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment, *BMB Rep.* 44 (2011) 217–231.
- [42] E.J. Wherry, T cell exhaustion, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 492–499.
- [43] M. Kassan, A. Wecker, P. Kadowitz, M. Trebak, K. Matrougui, CD4+CD25+Foxp3 regulatory T cells and vascular dysfunction in hypertension, *J. Hypertens.* 31 (2013) 1939–1943.
- [44] Q. Tang, J.A. Bluestone, The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulating, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 239–244.
- [45] Y. Luo, Y. Wang, Y. Shu, Q. Lu, R. Xiao, Epigenetic mechanisms: an emerging role in pathogenesis and its therapeutic potential in systemic sclerosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67 (2015) 92–100.



Research paper

Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression

Emese Ugor^a, Lilla Prenek^a, Ramóna Pap^a, Gergely Berta^b, Dávid Ernsts^c, József Najbauer^a, Péter Németh^a, Ferenc Boldizsár^a, Tímea Berki^{a, *}

^a Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary

^b Department of Medical Biology, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary

^c Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Dexamethasone
Treg
Foxp3
Glucocorticoid receptor
IL-10
TGFβ

ABSTRACT

Objective: Despite the fact that glucocorticoids (GC) are important therapeutic tools, their effects on regulatory T cells (Treg) are not well defined. The aim of our work was to investigate how GCs influence in vivo the thymic (tTreg) and peripheral Treg (pTreg) differentiation, survival and cytokine production.

Methods: Tregs were detected with flow cytometry in lymphatic organs of 4–6 weeks old BALB/c mice after repeated (2–4 days), high-dose in vivo GC treatment using CD4/CD25 cell surface and Foxp3/IL-10/TGFβ/glucocorticoid receptor (GR) intracellular staining. Cytokine, Foxp3, and GR mRNA levels of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells were analyzed using RT-PCR. Foxp3 and GR localization in Treg cells was investigated with confocal microscopy.

Results: GC treatment of mice resulted in increased relative tTreg frequency in the thymus, which was due to decreased total thymocyte numbers with unchanged absolute tTreg cell count. In contrast the relative pTreg cell ratio in secondary lymphatic organs decreased or showed no changes after GC treatment, while the absolute number of pTregs decreased. Elevated intracellular IL-10⁺ and TGFβ⁺ tTreg and pTreg ratios were measured in GC-treated animals, accompanied with elevated Foxp3 mRNA expression. In addition, GC treatment caused increased TGFβ and IL-35 mRNA expression in CD4⁺CD25^{high} splenic and elevated IL-10 mRNA level in thymic tTregs. GR expression of thymic tTreg cells was lower than in pTregs. GC treatment caused an opposite change in GR levels, elevating GR in tTregs but decreasing it in pTregs. We observed a nuclear localization of GR in both tTregs and pTregs, which showed high colocalization (~60%) with Foxp3 transcription factor. These data suggest an interaction of these two transcription factors with further increase due to GC treatment in splenic pTregs.

Conclusion: Our data show selective survival of tTregs and elevated production of immunosuppressive cytokines by Treg cells after GC treatment, which may contribute to the immunosuppressive effects of GCs.

1. Introduction

Regulatory T cells (Treg) are a specialized subpopulation of T cells (Sakaguchi et al., 2010; Shevach and Thornton, 2014) that play a key role in maintaining tolerance to self-antigens (Sakaguchi et al., 2009; Vignali et al., 2008) and in suppression of excessive immune responses after antigenic stimulation (Sakaguchi et al., 2008; Vila et al., 2009), thereby helping in maintaining an immune homeostasis

and lowering the risk for developing autoimmune diseases and allergies. Some of the clinically important issues are their participation in prevention of organ rejection after transplantation and tolerance to a fetus by the mother (Kisielewicz et al., 2010). The best described subsets of Treg cells are: (A) the thymus-derived natural Treg cells (tTreg), which are generated during thymic negative selection and preferentially recognize self-antigens, and (B) the induced Treg (iTreg) cells converted from conventional CD4⁺ T cells in the periphery (Apostolou and von Boehmer, 2004; Kretschmer et al.,

* Corresponding author at: Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Szegedi út 12, Hungary.
Email address: berki.timea@pte.hu (T. Berki)

2005), recently also named peripheral Treg cells (pTreg). Both tTregs and pTregs are positive for cell surface markers CD4 and CD25 and express the characteristic transcription factor Foxp3 (Forkhead box protein 3) (Hori and Sakaguchi, 2004; Kretschmer et al., 2005; Sakaguchi et al., 1995) for the acquisition of their immunosuppressive phenotype and function (Kim, 2009; Schmetterer et al., 2012). Foxp3 represents a rare example of a lineage specification factor (Rudra et al., 2012) with a specialized role in supporting differentiation and function of a single cell type, and therefore it is considered a “master regulator” of Tregs (Sakaguchi et al., 2010; Veiga-Parga et al., 2013). As a transcription factor, Foxp3 interacts with multiple other transcription factors known to be involved in activation, differentiation, and response of CD4⁺ T cells (Kanamori et al., 2016; Katoh et al., 2013; Sadlon et al., 2010). Foxp3 may also act as a transcriptional co-repressor since it inhibits the activity of NFκB, CREB, and RORα and also can transcriptionally repress IL-2 and maintain suppressor functions of Tregs by interacting with NFAT transcription factor (Schmetterer et al., 2012; Selvaraj, 2013). Treg cells mediate their immunosuppressive and regulatory function by direct cell–cell interaction or via secretion of immunosuppressive cytokines such as TGFβ (member of transforming growth factor beta superfamily) (Kretschmer et al., 2005), IL-10, or IL-35, the recently described Treg cytokine (Saraiva and O’Garra, 2010; Wang et al., 2016).

Glucocorticoid hormone (GC) is a primary stress hormone necessary for life, and it regulates numerous physiologic processes to maintain homeostasis (Kadmiel and Cidlowski, 2013; Oakley and Cidlowski, 2013). Despite their multiple side effects and broad organ-specificity, high-dose synthetic GC analogues are frequently used in the therapy of autoimmune diseases, hematological malignancies and allergies. GC analogues have been shown to influence immune functions by promoting the apoptosis of immature double positive (DP) thymocytes (Berki et al., 2002a; Prenek et al., 2017; Talabér et al., 2009) and to trigger complex anti-inflammatory actions by influencing both the molecular and cellular components of the immune system (Buttgereit and Scheffold, 2002). They mediate their biological effects by binding to intracellular glucocorticoid receptors (GRs) that can act through genomic and non-genomic mechanisms. Ligand-occupied GRs can act through genomic pathways as transcription factors and induce or repress the transcription of numerous genes by directly binding to DNA response elements and/or by physically associating with other transcription factors (Oakley and Cidlowski, 2013). A number of genes that are up-regulated via the transactivation mechanism exhibit anti-inflammatory actions, but GR can also act via transrepression and lead to down-regulation of inflammatory cytokines, such as TNFα, IL-12 and IFNγ (De Bosscher and Haegeman, 2009). Transrepression can be mediated by direct interaction of GR with other transcription factor(s), including NFκB, AP-1, CREB, NFAT, STAT6, IRF3, STAT3, GATA-3, and T-bet (Ratman et al., 2013).

Our group previously published that high dose GC treatment induces the apoptotic death of immature, developing CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) thymocytes, via a non-genomic GC hormone action by mitochondrial translocation of ligand-bound GR (Prenek et al., 2017; Talabér et al., 2009). Since naturally arising Tregs develop in the thymus from DP thymocytes, our question was how tTregs respond to high dose GC treatment. The current literature is controversial regarding the effect of glucocorticoid (GC) treatment on the activity or frequency of Tregs, but there is evidence that utilizing GCs may help to induce Tregs (Calmette et al., 2014; Mathian et al., 2015; Stary et al., 2011). Since both Treg cells and GC hormones exert their immunosuppressive effects by influencing cytokine production and cell activation, it was an interesting question to investigate their syner-

gistic effects. Studies about the sensitivity of Treg cells to GCs in mice reported both increased and decreased proportions of Treg cells after dexamethasone (DX) treatment. In BALB/c mice increased proportions of CD4⁺CD25⁺ Treg cells in thymus and spleen and higher levels of Bcl-2 and GR in CD4⁺CD25⁺ cells compared to CD4⁺CD25⁻ cells were observed (Chen et al., 2004), however, the authors did not use Foxp3 for Treg identification. Administration of IL-2 and DX in another study also resulted in higher proportion of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg cells in secondary lymphoid organs (Chen et al., 2006) without examining the thymus. On the other hand, studies investigating Treg cells in a murine model for asthma suggested that treatment with corticosteroids limits the development of Treg cells; however, in this study Foxp3 was not used to identify Treg cells (Stock et al., 2005). DX administration in a multiple sclerosis mouse model resulted in the decrease of the relative frequency of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells in the spleen, as well as in the spinal cord lesions of GR^{fllox}GR^{lckCre} mice (Wüst et al., 2008).

In view of the controversial reports published recently on the GC sensitivity of Treg cells and their effects on Treg functions we wanted to gain a more complete picture regarding Treg cells as identified by CD4/CD25/Foxp3 markers. We first investigated the Treg ratio and absolute cell numbers and their inhibitory cytokine production in thymus, blood and different peripheral lymphatic organs of control and high dose GC-treated BALB/c mice. We also studied the GR and Foxp3 expression level and localization and the GR and Foxp3 colocalization in tTreg and pTreg cells after GC treatment. Thymic tTreg cells showed GC resistance, while peripheral Treg cells were sensitive to GC treatment. We found a strong GC-induced upregulation of cytokine synthesis in Tregs and a significant colocalization of the two transcription factors (GR and Foxp3), which can explain the synergistic immunosuppressive effects of the GCs and Tregs.

2. Material and methods

2.1. Animals

Four to six-weeks-old BALB/c mice were kept under conventional conditions and provided with pelleted rodent chow and acidified water ad libitum. All animal experiments were carried out in accordance with the regulations set out by the University’s committee on animal experimentations (#BA 02/2000-16/2015).

2.2. In vivo GC treatment

Mice were treated each day with intraperitoneal injection of 20 mg/kg bodyweight of dexamethasone (Oradexon, N. V. Organon) for 1–4 days. Untreated mice served as controls. The mice were euthanized 24 h after the last injection. Thymus, spleen, peripheral lymph nodes and Peyer’s patches were removed and homogenized mechanically in PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃, followed by filtration through a nylon mesh. Anticoagulated blood samples were obtained 1, 2, 4, 8, 24 and 48 h post a single dose DX injection. Cell viability was determined using a hemocytometer and trypan blue dye exclusion test.

2.3. Antibodies and fluorochromes

The following antibodies were used for flow cytometry: anti-CD4-FITC (IBI clone YTS 191; Department of Immunology and Biotechnology (DIB) Pécs, Hungary), or anti-CD4-PE-Cyanine5 (PE-Cy5) (clone RM4-5) and anti-CD25-PECy7 (clone PC61) and anti-CD8-PE (clone: 53-6.7) (all from BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) and anti-LAP (TGFβ)–PerCP (BioLegend, clone TW7-16B4) for cell surface antigens. Intracellular anti-Foxp3-PE (clone 3G3,

Exbio, Czech Republic), anti-IL-10-APC (clone JES5-16E3, BioLegend, San Diego, CA, USA), and anti-GR-FITC (Clone 5E4-B1, produced in our laboratory, Pécs, Hungary) (Berki and Németh, 1998). Monoclonal antibodies were used according to the staining procedure of the eBioscience Foxp3 staining kit (eBioscience, San Diego, CA, USA).

For confocal microscopy the following antibodies were used: anti-CD4-Pacific Blue (BD Pharmingen, clone RM4-5), anti-Foxp3-Alexa Fluor 647 (BioLegend, clone 150D), anti-GR-FITC (Clone 5E4-B1, Hungary). PromoFluor Antifade Reagent (PromoKine, Heidelberg, Germany) was used to prevent bleaching.

For FACS separation of Treg cells anti-CD4-PE (clone YTS 191.1.2, ImmunoTools, Friesoythe; Germany), and anti-CD25-PE-Cy5 (clone PC61.5, eBioscience) antibodies were used.

2.4. Flow cytometry

1×10^6 cells were stained with anti-CD4-FITC and anti-CD25-PerCP antibodies followed by two washing steps. Then the cells were incubated in e-Bioscience fixation/permeabilization buffer and stained with anti-Foxp3-PE and anti-GR-FITC intracellular antibodies. After 2 washing steps, cells were fixed in 300 μ l FACS-Fix [9 μ l 35% formaldehyde (Sigma-Aldrich) + 291 μ l phosphate-buffered saline] and measured with a FACSCantoII flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analyzed using the FCS Express 4 Flow Research Edition software. Thymocyte subpopulations were gated based on their cell surface CD4/CD8 staining. Treg cells were determined in the CD4 gate based on their CD25/Foxp3 positivity. GR expression of T cell subpopulations and Treg cells was determined on histogram overlays by analyzing the FL-1 mean fluorescence intensities (MFI) separately.

2.5. Stimulation and staining of cells for cytokine detection

For cytokine detection thymocytes or splenocytes of DX treated and control animals were stimulated with 25 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich), 1 μ g/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich) and 10 μ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% FCS (Gibco) at 37 °C in a CO₂ incubator for 24 h. Cytokine detection was performed on 10^6 cells/samples in binding buffer [PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% NaN₃ (both from Sigma-Aldrich)] after anti-CD4-FITC, anti-CD25-PE-Cy7, and anti-LAP (TGF β)-PerCP cell surface staining and intracellular anti-Foxp3-PE and anti-IL-10-APC antibody labeling according to the staining procedure of the eBioscience Foxp3 staining kit. Samples were measured with a FACS Canto II cytometer and analyzed using the FCS Express 4 Flow Research Edition program. In the lymphocyte gate CD4⁺/CD25⁺ T cells were gated and the Foxp3⁺TGF β ⁺ and Foxp3⁺IL-10⁺ cell ratios were determined.

2.6. CD4⁺ T cell isolation and purification

CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Enrichment Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) following the manufacturer's instructions. Briefly, after isolation of thymocytes or splenocytes 1–1.5 $\times 10^8$ cells/ml were suspended in recommended medium (PBS, containing 2% FBS, 1 mM EDTA) in a 5 ml (12 \times 75 mm) polystyrene tube, and the EasySep™ Mouse CD4⁺ T Cell Pre-Enrichment Cocktail was added at 50 μ l/ml cell suspension and incubated at room temperature (15–25 °C) for 15 min. Then the EasySep™ Biotin Selection Cocktail was added at 150 μ l/ml cell suspension, mixed and further incubated for 15 min at room temperature (15–25 °C). Then EasySep™ D Magnetic Particles

were added at 150 μ l/ml of cells, mixed and incubated at room temperature (15–25 °C) for 10 min. The tubes were placed into the magnet with a total volume of 2.5 ml for 5 min and the supernatant was used for further experiments. The purity of the cells (assessed by CD4-FITC and CD8-PE labeling of thymocytes and splenocytes) used in further experiments was > 96%.

2.7. Labeling of cells for confocal laser scanning microscopy

After negative selection, CD4⁺ thymocytes and splenocytes were stained with anti-CD4-Pacific Blue for 30 min. Then the cells were washed in PBS and fixed and permeabilized using the eBioscience Foxp3 staining kit, and labeled with anti-Foxp3-Alexa647 and anti-GR-FITC intracellular antibodies. After labeling and washing, the cells were cytospinned onto slides. The excess fluid was carefully aspirated and the slides were covered using PromoFluor Antifade Reagent.

Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning confocal imaging system was used for acquiring visual data in three separate channels (FITC or green for GR, far-red for Foxp3, UV for CD4) with an Olympus Fluoview FV-1000S-IX81 image acquisition software system. Colocalization analysis was performed using the open source software BioimageXD on far-red and green channels of images acquired by confocal laser microscopy. To quantify the degree of colocalization, we calculated and compared the number of colocalized pixels in individual Treg cells. The thresholds of images were auto-set and compared by Manders method of colocalization (Manders et al., 1993). The quantification of fluorescence was achieved by conversion of the standardized pictures taken from the confocal microscope into 8-bit gray-scale images using the open source software ImageJ. The standardized pictures from the confocal microscope were all handled in the same manner with the same values for image processing to allow comparison of fluorescence intensity. Therefore first thresholds were set to reduce image noise and particles touching the edge of the image were excluded. Remaining artifacts and other interfering effects were excluded manually from pixel analysis.

2.8. Isolation of Treg cells for RT-PCR

Thymocytes and splenocytes were collected and stained with anti-CD4-PE and anti-CD25-PE-Cy5. Stained cells were then analyzed using BD FACSAriaII Cell Sorting System with BD FACSDiva Software (BD Biosciences). Cells in the lymphocyte gate were sorted based on CD4 expression and high expression levels of CD25.

2.9. RNA preparation and quantitative RT-PCR

RNA was isolated from 10^5 CD4⁺CD25^{high+} cells using NucleoSpin RNA XS kit, and cDNA was prepared using random oligo(dT) primers (Applied Biosystems). Gene expression was quantified with the SYBR Green method using the Applied Biosystems 7500 RT-PCR system. The relative expression levels were determined by normalization to actin housekeeping gene, and results were presented as fold induction compared to unstimulated Treg mRNA levels (RQ). Primer sequences were as follows: β -ACTIN (Forward) 5'- GGG AGG GTG AGG GAC TTC C - 3'; β -ACTIN (Reverse) 5'- TGG GCG CTT TTG ACT CAG GA - 3'; IL-10 (Forward) 5'- GTG AAG ACT TTC TTT CAA ACA AAG - 3'; IL-10 (Reverse) 5'- CTG CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT - 3'; Foxp3 (Forward) 5'- TAC TTC AGA AAC CAC CCC GC - 3'; Foxp3 (Reverse) 5'- GTC CAC ACT GCT CCC TTC TC - 3'; TGF β 1 (Forward) 5'- GAC TCT CCA CCT GCA AGA CC 3'; TGF β 1 (Reverse) 5'- GGA CTG GCG AGC CTT AGT TT-3'; IL-35 [Ebi3 (Forward) 5'- AGC AGC AGC CTC CTA GCC T - 3'; Ebi3 (Re-

verse) 5'- ACG CCT TCC GGA GGG TC -3'; IL12 α (Forward) 5'- TGG CTA CTA GAG AGA CTT CTT CCA CCA -3'; IL12 α (Reverse) 5'- GCA CAG GGT CAT CAA AGA C -3']; mouse GR (Forward) 5'- TGG TGT GCT CCG ATG A-3'; mouse GR (Reverse) 5'-AGG GTA GGG GTA AGC -3'.

2.10. Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using SPSS v. 22.0 statistics package (IBM, Armonk, NY, USA). Variables were expressed as mean \pm SEM. Student's *t*-test was used to compare data between the investigated groups. *P* values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Effect of DX treatment on thymic and peripheral Treg cells

In our previous studies we have shown that *in vivo* DX treatment resulted in a concentration-dependent depletion of DP thymocytes (Berki et al., 2002a; Talabér et al., 2009) by inducing the mitochondrial apoptotic pathway (Prenek 2016). Based on these data we were interested in determining the effect of high dose therapeutic GC hormone treatment on thymic tTreg and also pTreg cells that play a key role in physiological immunosuppression. After repeated (2x) 20 mg/kg DX treatment, in the thymus the immature double-positive (DP) thymocytes largely disappeared, their proportion dropped from 77.9% to 7% (Fig. 1A). The proportion of the most immature double-negative (DN) and single-positive (SP) thymocytes increased (DN: 3.7-fold, CD4 SP: 4-fold, CD8 SP: 4.9-fold) (Fig. 1A, upper

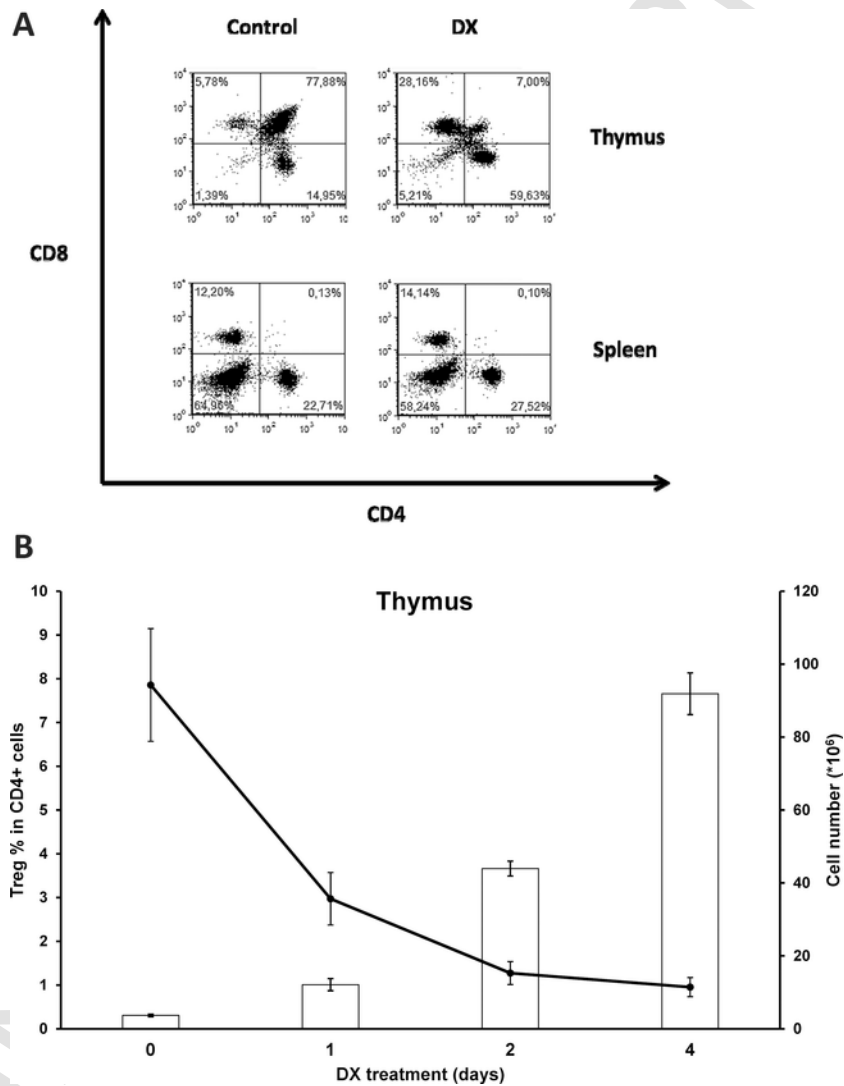


Fig. 1. (A) Effect of repeated (2x) high-dose (20 mg/kg) DX treatments on the lymphoid cell composition of the thymus and spleen. In the thymus we observed increased proportions of double-negative and single-positive cells as a result of almost complete depletion of double-positive cells after repeated DX treatment. In the spleen no significant changes were observed in the ratios of CD4⁺ T helper, CD8⁺ T cytotoxic and non-T cells. Representative flow cytometry dot-plots are shown of anti-CD4 and anti-CD8 antibody-labeled cells isolated from the thymus and spleen of control and DX-treated mice. (B) Effect of repeated high-dose DX treatment on thymic tTreg ratio and total thymocyte count. Mice were treated for 1, 2 and 4 days with DX and the thymic tTreg ratio was measured together with the total thymocyte count. The bar graph depicts the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg% in the CD4⁺ cell population (including CD4⁺ SP and CD4⁺CD8⁺ DP cells). Significant increase in tTreg ratios was observed after repeated DX treatments. The line graph depicts total thymocyte numbers that showed a drastic decrease after repeated DX treatments. Data are shown as mean \pm SEM. Note: in this series of experiments CD8 labeling was not performed, thus the results of CD4 gating are skewed because of double-positive cells, which are the most steroid-sensitive thymocytes.

panels). In the spleen, the CD4/CD8 ratio did not change significantly, but we detected a decrease in the proportion of non-T cells (B and NK) and a relative increase of CD4⁺ T helper cell frequencies from 22.7% to 27.5%, and the CD8⁺ cytotoxic T cell ratios from 12.2% to 14.1% (Fig. 1A, lower panels).

When we followed the proportion of tTreg cells in the thymus after repeated (1–4x) DX treatment, we detected significantly increased tTreg ratios in the CD4⁺ T cell gate in correlation with the number of treatments. After the last treatment a robust (16-fold) increase in thymic tTreg cell ratios could be measured, while the absolute thymocyte number dropped to one sixth of the original value (from 8×10^7 to 1.3×10^7 cells/thymus) (Fig. 1B).

We also investigated the time-kinetics of a single high-dose GC treatment on Treg cells in the peripheral blood. As shown in Fig. 2A, 4 h and 8 h after DX treatment we detected a significant increase in the Treg cell ratios, which by 24 h returned to the starting control levels and remained at this level at 48 h post-treatment.

Next we compared the normal distribution and GC treatment induced changes of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in the primary (thymus) and secondary lymphoid organs (spleen, lymph nodes and Peyer's patches). In the thymus the proportion of tTregs in the CD4⁺ T cell gate was approximately 3.5%, whereas in the peripheral lymphoid organs this ratio was higher, between 7 and 15% (spleen ~15%, lymph nodes ~10%, and Peyer's patches ~7%) (Fig. 2B). In the spleen we detected a small but significant decrease in the Treg ratio, while no change was detected in the lymph nodes and Peyer's patches (Fig. 2B). We also measured the total numbers of Treg cells in the thymus and peripheral lymphoid organs of mice after repeated (4x) DX treatment and compared the results to untreated controls. Of note, the total number of thymic tTreg cells did not change, whereas the total number of pTreg cells in the peripheral lymphoid organs decreased significantly (Table 1). These data suggest that thymic tTreg cells are resistant to GC induced apoptosis, while pTregs in the peripheral lymphoid organs are sensitive to GC treatment.

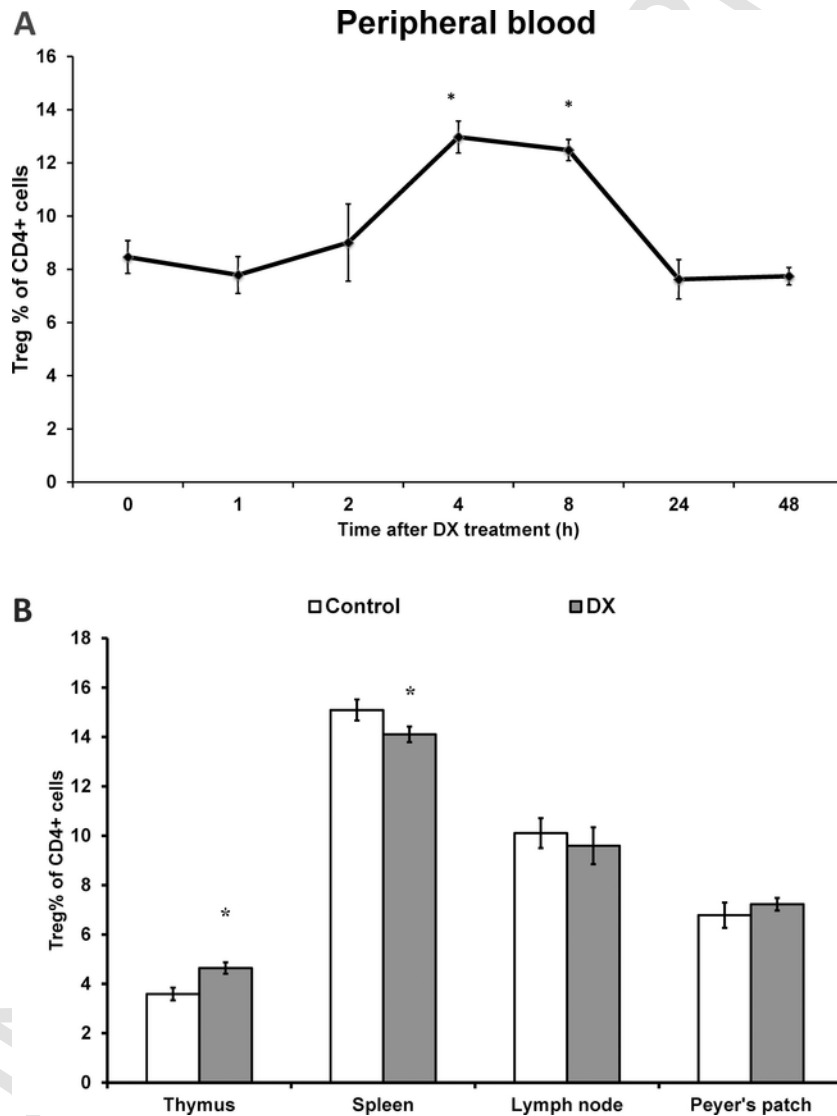


Fig. 2. (A) Time kinetics Tregs in the peripheral blood after single injection of high-dose DX. Single DX treatment induced a significant elevation of the ratio of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells at 4–8 h in the peripheral blood, and returned to starting levels only after 24 h. Data are shown as mean \pm SEM. (B) Treg cell ratios in the thymus and peripheral lymphoid organs change after high-dose DX treatment. In the thymus we observed a significant increase in the proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells, whereas in the spleen there was a decrease in the Treg ratio (* $p < 0.05$). In the lymph nodes and Peyer's patches no significant change in Treg ratios was observed. Diagram shows the percent of Treg cells within the CD4⁺ lymphocyte population in lymphoid organs of control and DX-treated mice. Data are shown as mean \pm SEM.

Table 1
Treg cell numbers in the lymphoid organs of control and DX-treated mice.

Treg cell number x10 ⁵ (mean ± SEM)	Thymus	Spleen	Lymph node	Peyer's patches
Control	4.24 ± 0.92	83.92 ± 16.72	4.42 ± 0.11	0.48 ± 0.07
DX 4 days	5.05 ± 1.35	26.93 ± 5.13**	2.24 ± 0.39***	0.23 ± 0.06*

There was a significant decrease in the numbers of Treg cells in the peripheral lymphoid organs after 4 days of high-dose (20 mg/kg) DX treatment (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). In the thymus a slight, but not significant increase in tTreg numbers was observed.

3.2. Effect of DX treatment on cytokine production and Foxp3 expression of Treg cells

Next we investigated whether GC treatment, in addition to the effects on Treg cell ratios, has an effect on Treg cell function, therefore we tested the IL-10 and TGFβ production and Foxp3 expression by tTreg and pTreg cells.

In the thymus, the ratio of IL-10- and TGFβ-positive tTreg cells was similar (11.0 ± 2.3% and 13.5 ± 3.1%), but DX treatment resulted in significant increase in both cytokine secreting tTreg ratios (17.6 ± 1.4% and 21.0 ± 4.9%) (Fig. 3A, left panel). In the splenic pTreg cells of control animals, we detected significantly higher TGFβ positivity (13.7 ± 2.0%), compared to IL-10 positivity (3.6 ± 0.5%). As a result of DX treatment the percentage of both IL-10 and TGFβ positive Tregs increased significantly, but the fold-increase for IL-10 was higher than for TGFβ (Fig. 3A, right panel).

We also compared the DX treatment-induced relative IL-10 and TGFβ mRNA expression in purified (sorted) CD4⁺CD25^{high+} Tregs. In the thymic tTreg cells the cytokine mRNA expression showed an increasing tendency, especially the relative elevation of IL-10 mRNA level as a result of repeated (2x) high-dose GC treatment. In the splenic pTreg cells DX treatment induced an increased relative expression of TGFβ mRNA, whereas the relative IL-10 mRNA expression remained unchanged (Fig. 3B, upper panels). We also measured the effect of DX treatment on another Treg suppressor cytokine, IL-35, which was unchanged in thymus and showed an elevation in splenic pTreg at mRNA level (data not shown).

Next we studied the relative quantitative changes of Foxp3 transcription factor expression, which plays a role in determining the functions of Treg cells (Sakaguchi et al., 2010). Foxp3 mRNA levels were very similar in purified CD4⁺CD25^{high+} thymic and splenic Treg cells (data not shown), but showed an increasing tendency after DX treatment in both splenic and thymic Tregs (Fig. 3B, lower panel). The DX-induced increased Foxp3 mRNA expression is consistent with a higher Treg cell commitment and production of immunosuppressive cytokines.

3.3. Effect of DX treatment on GR expression and GR/Foxp3 colocalization

The GC sensitivity of a given cell type is largely determined by the level of its GR expression (Ramamoorthy and Cidlowski, 2013). Therefore, we looked for a possible relationship between the observed GC resistance of tTregs and their GR expression. For this purpose we measured intracellular GR protein levels by flow cytometry in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs using anti-GR antibody that recognize both GRα and β isoforms and GR mRNA levels by qRT-PCR in purified thymic and splenic CD4⁺CD25^{high+} Treg cells.

In thymic tTreg cells of untreated animals we detected significantly lower GR protein levels than in splenic pTreg cells (Fig. 4A white bars). After repeated high-dose DX treatment we measured a significantly increased GR protein level in tTregs surviving in the thymus (cells resistant to GC), when compared to controls. Opposite

to this, the control splenic pTregs that expressed higher levels of GR showed a decrease in their GR expression after DX treatment (Fig. 4A). This GC-induced upregulation of GR expression was characteristic in DP thymocytes while downregulation of GR expression was characteristic of SP thymocytes and mature T cells, an effect that we had observed in earlier studies both in mouse and human cells (Berki et al., 2002b; Boldizsár et al., 2006). 24 h after the last DX treatment (2x), we did not observe detectable changes in GR mRNA expression in thymic and splenic Treg cells (data not shown).

In one of our previous studies we have shown that in GC-sensitive DP thymocytes that express low levels of GR, DX treatment caused mitochondrial translocation of the GR instead of nuclear translocation, which suggest that the GR level and its subcellular localization are critical in determining the sensitivity to apoptosis induction of a given cell type (Sionov et al., 2006; Talabér et al., 2009). Therefore, we investigated the GR and Foxp3 localization in thymic and splenic Treg cells with and without previous *in vivo* DX treatment using confocal microscopy. We observed a characteristic nuclear localization of both GR and Foxp3 in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tTreg and pTreg cells. In untreated samples Foxp3 highly colocalized with GR both in thymic and splenic Treg cells (Fig. 4B). Upon DX treatment colocalization further increased in the splenic pTreg cells, while in thymic tTregs this association showed no change (Fig. 4B).

4. Discussion

By inhibiting the immune response against allo- and autoantigens, Treg cells are important members of the immune regulation and the maintenance of tolerance, and are also therapeutic targets. GC analogues are still among the most important drugs in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases and patients with organ transplants, however, the effect of GC on Treg cells is controversial. The significance of our current work is that we included in our study both the primary and secondary lymphoid organs and the peripheral blood and have determined the effect of repeated high dose DX treatment on Tregs in these immunological compartments. This 20 mg/kg GC concentration corresponds to the clinically applied high-dose in humans. The main focus of our study was to gain information about the effects of DX treatment on cytokine production and GR and Foxp3 expression and subcellular localization, factors that are important in determining Treg commitment and functionality. We used both immunological and molecular biologic methods to detect the expression of these molecules both at protein and mRNA levels.

In previous studies we investigated the GC sensitivity and apoptosis mechanism of different thymocyte subpopulations, and found that DP thymocytes are the most sensitive to GC-induced apoptosis although they express the lowest level of GR. Therefore, first we wanted to determine the GC sensitivity of thymic tTreg cells since they are derived from the DP thymocytes during negative selection. The ratio of tTregs increased significantly after DX treatment, and it continued to increase in parallel with the duration (1–4 days) of the treatment, whereas the overall number of thymocytes decreased dramatically, which can be explained by apoptosis of GC-sensitive DP thymocytes. The absolute number of Treg cells did not change significantly or increased slightly, thus the observed increase in their ratio was the re-

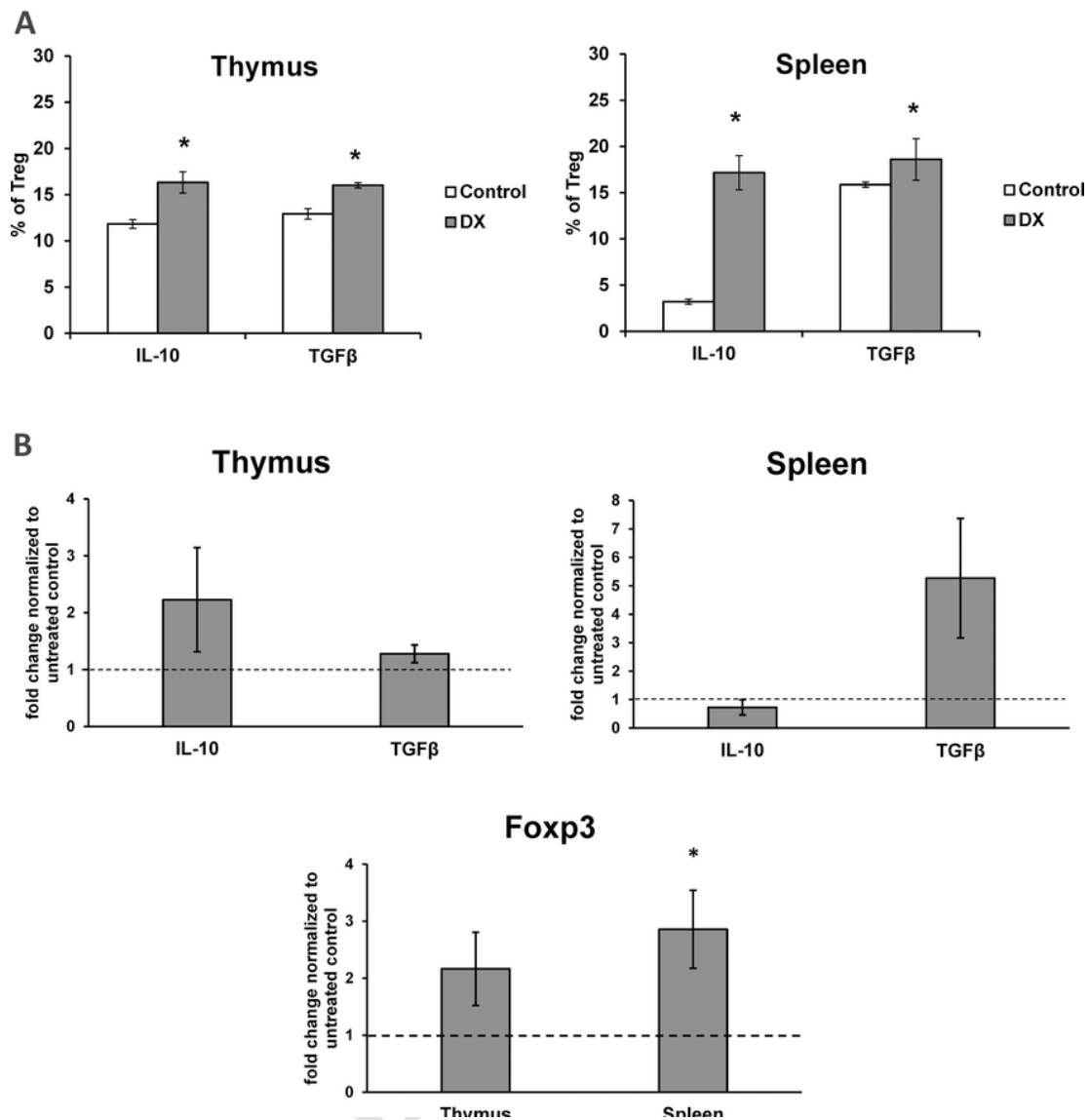


Fig. 3. (A) Effect of high-dose DX treatment on the ratio of IL-10 and TGFβ producing Treg cells detected by flow cytometry. The cytokines were detected on gated CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. The proportions of IL-10 and TGFβ positive thymic tTreg cells were similar in the control mice, while DX treatment resulted in significant increase in the ratio of both IL-10 and TGFβ cytokine positive Tregs. In the spleen of control mice the ratio of TGFβ-producing Treg cells was higher than the IL-10 producing Tregs, and DX treatment resulted in elevation of both IL-10 and TGFβ positive Treg cell ratios. Asterisks indicate statistically significant differences (* *p* < 0.05). Data are shown as mean ± SEM. (B) High-dose DX induced relative mRNA expression of IL-10, TGFβ and Foxp3 in tTreg and pTreg cells. Purified CD4⁺CD25^{high} thymic and splenic Tregs cells of control and DX treated animals were used to detect the relative mRNA expression of IL-10 and TGFβ (upper panels). DX induced elevated relative mRNA expression of IL-10 and TGFβ in tTreg cells and TGFβ of splenic pTregs while the IL-10 by splenic Tregs was unchanged. As a result of DX treatment the relative mRNA expression of Foxp3 increased slightly in thymic Tregs, while significant elevation (* *p* < 0.05) of Foxp3 mRNA expression was detected in splenic Treg cell (lower diagram). Data are shown as mean ± SEM.

sult of their survival. This suggests that the tTregs are resistant to GC-induced apoptosis.

Then we measured the Treg cell ratios in the peripheral blood and in lymphoid organs and found a much higher ratio of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells than in the thymus. Of note, the relative numbers of Treg cells in the peripheral blood showed time-dependent kinetics after 1–48 h of a single high-dose DX treatment. A transitory increase in percentage of Treg cells was observed, which peaked at ~4–8 h after DX treatment, and then returned to pre-treatment levels after 24 h. This may be a result of Treg mobilization from various lymphatic organs to the blood which suggests that DX treatment may lead to a possible redistribution of Treg cells. Since Tregs may play a role during various microbial infections (Belkaid and Rouse, 2005), an increase of Treg cell relative numbers may affect the susceptibility

of the host to infectious diseases. In peripheral lymphoid organs upon repeated high-dose DX treatment, the ratio of pTregs slightly decreased in the spleen, and the absolute number of pTreg cells also decreased. Based on these results we hypothesized that tTregs and pTregs differ in their sensitivity to GC.

As mentioned earlier, Foxp3(+) Tregs are primarily generated in the thymus (tTreg), but also may be generated extrathymically at peripheral sites (pTreg) (Shevach and Thornton, 2014). Additionally, Treg cell trafficking occurs between various organs, including migration of tTreg cells from the thymus to the periphery (Mailloux and Young, 2010). As a result, peripheral organs and blood may contain Tregs of different phenotypes, and therefore it may be desirable to distinguish between different Tregs in the periphery. CD127 (IL-7R alpha) has been suggested as a marker to identify mouse Tregs, because CD127 expression levels are lower in Tregs than in

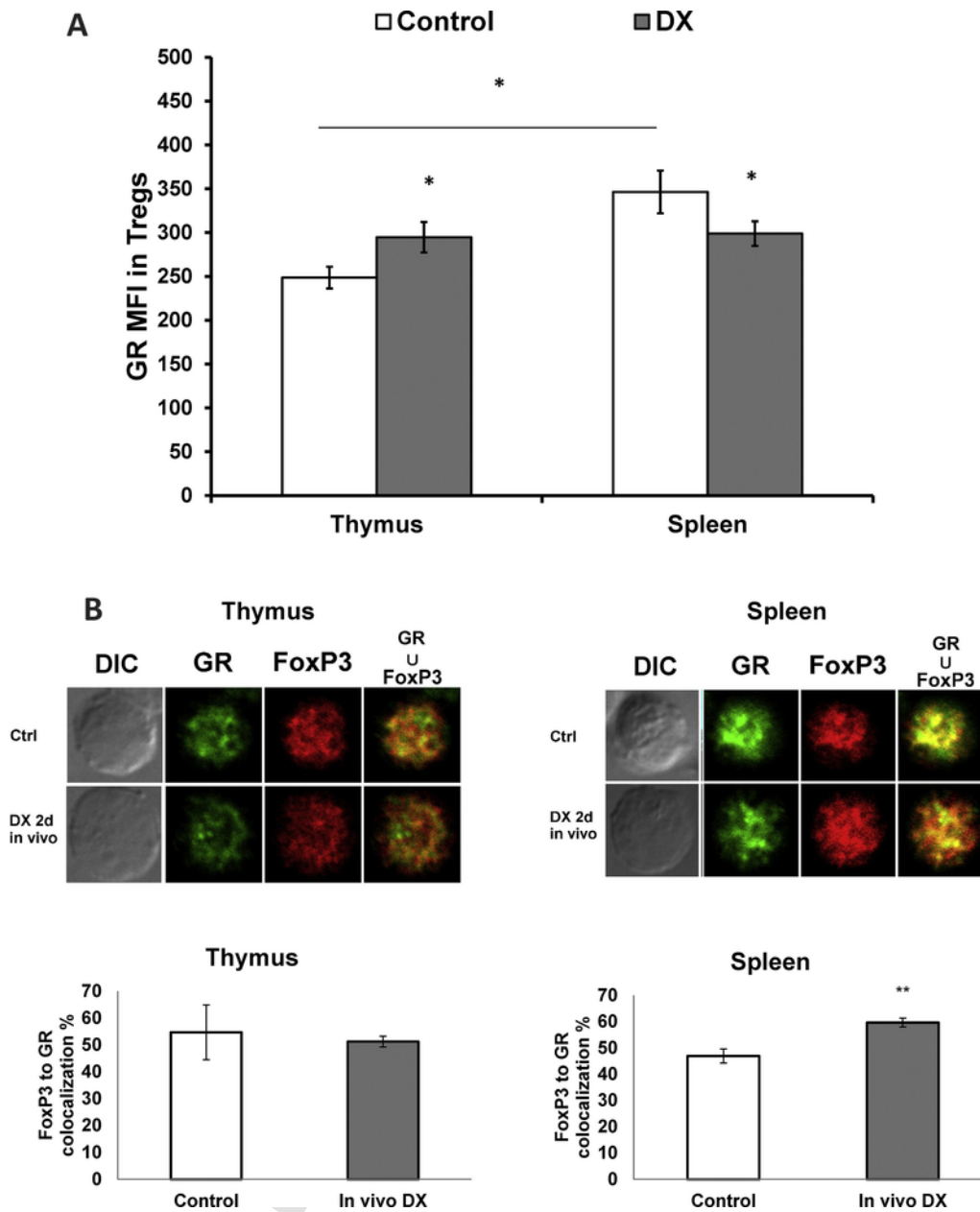


Fig. 4. (A) Effect of DX treatment on the glucocorticoid receptor (GR) expression of Treg cells. Intracellular anti-GR-FITC antibody staining was performed for flow cytometric detection of GR expression (MFI: FL-1 mean fluorescence intensity) in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells. MFI values of GR histograms were compared. In control animals the GR level of thymic Tregs was significantly lower than in the spleen (* p < 0.05). Treatment with DX resulted in GR upregulation in tTregs (* p < 0.05), whereas in splenic Tregs a downregulation of GR was observed (* p < 0.05). Data are shown as mean ± SEM. (B) Confocal microscopic images of GR and Foxp3 staining in Treg cells. CD4⁺ T cells were negatively selected from the thymus and spleen of DX-treated and control BALB/c mice and stained with anti-GR-FITC and anti-Foxp3-Alexa647 antibodies. Representative images show GR (green) and Foxp3 (red) staining of Treg cells and their strong nuclear colocalization in the merged images as indicated by yellow areas (upper panels). In the thymus the colocalization of GR and Foxp3 did not change after DX treatment, whereas in the spleen we observed a significant increase in GR and Foxp3 colocalization (* p < 0.05) (lower diagrams). DIC, differential interference contrast. Data are shown as mean ± SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

CD4⁺CD25⁻ cells, and the depletion of Tregs through anti-CD25 antibodies leads to a 90% reduction of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells (Rodríguez-Perea et al., 2016). However, the use of this marker may be controversial since there is a subpopulation of activated CD4⁺Foxp3⁺ Tregs with high expression of CD127; in particular, Tregs that express CD103 (integrin αE) and the inducible co-stimulatory molecule (ICOS) (Simonetta et al., 2010). Our experiments in the current study also support the notion that CD127 low expression or negativity is not suitable for distinguishing between tTregs and pTregs since both in the thymus and spleen of mice we found that 93–95% of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells were CD127 negative (data

not shown). Other markers, such as Helios (a transcription factor of the Ikaros family) and neuropilin-1 (a surface molecule) also have been suggested as Treg marker, but their use is still controversial (Szurek et al., 2015). We also found that Helios staining was not suitable for distinguishing between tTregs and pTregs (data not shown). Thymic tTregs could be distinguished from pTregs by identification of epigenetic changes in a non-coding sequence within the FOXP3 locus named TSDR (Treg-specific demethylated region), which is demethylated in tTregs, contrary to pTregs in which TSDR is methylated. However, this strategy requires cell lysis and DNA extraction, thus it is not suitable for use in flow cytometry measurements.

IL-10, TGF β and the recently described IL-35 (Collison et al., 2007) are major mediators of inhibitory activity exerted by Treg cells on effector T cells and other cell types of the immune system. All of these 3 cytokines possess immunosuppressive activity (Ng et al., 2013; Saraiva and O'Garra, 2010), and TGF β has been called a 'purveyor of immune privilege' (Wahl et al., 2006). Importantly we found increased ratios of IL-10 and TGF β -producing Treg cells after DX treatment both in thymus and spleen. Of note in untreated animals, we found lower percentages of IL-10 producing Treg cells in the spleen than in the thymus, but DX caused a robust increase of IL-10 producing splenic pTreg percentages. These data support that the IL-10 producing splenic pTregs may selectively survive after DX treatment. The DX induced relative expression of these cytokines at the mRNA level in purified CD4⁺CD25^{high} Tregs also showed an increase, except in the case of IL-10 mRNA in the spleen. The lack of correlation between IL-10 protein and mRNA expression in the spleen can be due to the fact that among sorted CD4⁺CD25^{high} cells of the control animals activated IL-10-producing T helper cells may also be present which do not belong to the Treg lineage (Ng et al., 2013; Saraiva and O'Garra, 2010). Such activated IL-10 producing CD4⁺CD25⁺ cells may not be present after DX treatment, therefore the DX induced changes of IL-10 are not visible at mRNA level. In contrast by flow cytometry we detected cytokines in the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ gated Treg cells only. These data suggest that the immunological milieu dictated in part by Treg cells in the thymus and the spleen may be shifted towards an immunosuppressive direction due to GC treatment (Kadmiel and Cidlowski, 2013; Ramamoorthy and Cidlowski, 2013) by promoting selective survival of tTreg cells and elevation of Treg immunosuppressive function (cytokine production and Foxp3 expression).

The GC sensitivity of a given cell type is dependent on its level of GR expression and its cross-talk with different signaling pathways (Herold et al., 2006; Kadmiel and Cidlowski, 2013; Ramamoorthy and Cidlowski, 2013). TCR signaling inhibits GC-induced apoptosis in murine thymocytes depending on the stage of development, namely TCR signaling increasingly reverses GC-induced apoptosis as thymocyte development progresses (Erlacher et al., 2005). Previous research by our group showed that the immature DP thymocytes express the lowest level of GR in the thymus, and despite this, they are the most sensitive cell population to GC-induced apoptosis (Berki et al., 2002a; Talabér et al., 2009). The mature peripheral lymphocytes are more resistant to treatment with GC analogues and a significant downregulation of the originally higher expression of GR can be observed in such cells (Du et al., 2009). Our current data shows that the GR expression of tTregs in the thymus is lower than in the splenic pTregs of control animals, which may be a consequence of local microenvironmental influences in the thymus (e.g. local GC production) (Talabér et al., 2013). Upon GC treatment the GR expression increased in thymic tTreg cells, while it was downregulated in the spleen, which may underlie the mechanism of different GC sensitivity of tTregs in the thymus and pTregs in the peripheral lymphoid organs. However, the signaling pathways activated by GC in Treg cells need further investigation. A recent report by Almanzar et al. showed expression of 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) enzyme in human thymus (Almanzar et al., 2016), whereas earlier studies showed expression of type 2 and the type 1 enzyme (11 β -HSD1) in the mouse immune system, including the thymus (Chapman et al., 2006; Moore et al., 2000; Zhang et al., 2005). Both enzymes are high affinity dehydrogenases which rapidly inactivate physiologically-active glucocorticoids to protect key cell populations and tissues. Thus, it can be hypothesized that in addition to differential GR expression described above, the levels of 11 β -HSD1 and

11 β -HSD2 enzymes may also play a role in determining GC-sensitivity of Treg cell subpopulations.

Since we detected different GR levels and GC sensitivity in tTregs and pTregs, we studied the localization of GR in the thymic and splenic Treg cells by confocal microscopy. We found largely nuclear localization of GR in Tregs of both control and DX treated animals. Then we investigated the colocalization of GR and Foxp3 in Treg cells and found a high colocalization already in control cells, which further increased upon DX treatment in splenic pTreg cells. These data suggest that GR and the Foxp3 transcription factors may be recruited to certain regions of chromatin, where these molecules may regulate gene transcription, either individually or in collaboration. Further studies are required to find evidence for the crosstalk between GR and Foxp3 signaling pathways. Relevant to this, genome-wide ChIPseq and microarray analysis was used to identify GR-binding sites in DX-treated mouse cells. Among many genes, the FOXP3 gene was identified as a gene that contained a GR-binding region (Kuo et al., 2012). This suggests that GR may affect the activity of the FOXP3 gene in mammalian cells, and Foxp3 may in turn regulate the activity of multiple target genes (Marson et al., 2007; Sadlon et al., 2010). Our data showing colocalization of GR and Foxp3 proteins in Treg cells may support the hypothesis that glucocorticoids may directly modify FOXP3 gene activity in Tregs, and thus may influence a major regulatory arm of the immune system.

Another interesting question, based on the present data, is whether there could be an additive or synergistic effect between the increased expression of Foxp3, IL-10 and TGF β in Treg cells. We hypothesize that such effects may exist based on the known crosstalk between these factors at the genome (epigenome) level and protein signaling pathways. First, expression of Foxp3 at low levels induces a limited Treg cell phenotype with little or no suppressive function, and the full suppressive effect is only gained when Foxp3 is highly expressed (Sakaguchi et al., 2010). Second, Foxp3 gene induction in Treg cells is promoted by TGF β signaling (via Smad2/3 binding to the CNS1 region of the Foxp3 gene) and TGF β is part of a positive feedback loop in the generation of Foxp3⁺ Treg cells (Kanamori et al., 2016; Sabat et al., 2010). Third, IL-10 acts in a paracrine manner on Treg cells to maintain their Foxp3 expression (Murai et al., 2009). Data obtained in human subjects suggests that glucocorticoid therapy increases Treg cell ratio and/or function in various disease conditions. For example, glucocorticoids increase CD4⁺CD25^{high} cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis, and it has been suggested that this may be a mechanism whereby steroids expedite recovery from relapses in such patients (Braithwaite et al., 2009). In patients with Graves' disease, dexamethasone therapy improved the function of Treg cells (Hu et al., 2012), whereas in patients with nickel allergy, oral glucocorticosteroid therapy resulted in enhanced Treg response in the skin (Stary et al., 2011).

Taken together, our data suggest that thymic tTreg cells are resistant to repeated high dose GC treatment. Further, both thymic and splenic Tregs cells produce enhanced levels of immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF β after DX treatment accompanied by elevated Foxp3 mRNA expression of the cells that may reflect on a stronger Treg lineage commitment. These findings support that GCs influence the regulatory arm of the immune system, and may have relevance to clinical conditions where enhancement of Treg cell activity is expected to be beneficial.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Hungarian National Scientific Research Fund, OTKA K 105962) and by GINOP-232-15-2016-00050 and EFOP 361-16-2016-00004 grants. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.010>.

References

- Almanzar, G., Mayerl, C., Seitz, J.C., Höfner, K., Brunner, A., Wild, V., Jahn, D., Geier, A., Fassnacht, M., Prelog, M., 2016. Expression of 11beta-hydroxysteroid-dehydrogenase type 2 in human thymus. *Steroids* 110, 35–40.
- Apostolou, I., von Boehmer, H., 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* 199, 1401–1408.
- Belkaid, Y., Rouse, B.T., 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* 6, 353–360.
- Berki, T., Németh, P., 1998. Novel method for in vitro depletion of T cells by monoclonal antibody-targeted photosensitization. *J. Immunol. Methods* 211, 139–146.
- Berki, T., Pálkás, L., Boldizsár, F., Németh, P., 2002. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int. Immunol.* 14, 463–469.
- Berki, T., Tavakoli, A., Nagy, K.K., Nagy, G., Németh, P., 2002. Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients. *Transpl. Int.* 15, 132–138.
- Boldizsár, F., Pálkás, L., Czömpöly, T., Bartis, D., Németh, P., Berki, T., 2006. Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology* 211, 785–796.
- Braithwaite, M., Hari Krishnan, S., Robins, R.A., Nichols, C., Fahey, A.J., Showe, L., Constantinescu, C.S., 2009. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 119, 239–245.
- Buttgereit, F., Scheffold, A., 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529–534.
- Calmette, J., Ellouze, M., Tran, T., Karaki, S., Ronin, E., Capel, F., Pallardy, M., Bachelier, F., Krzysiek, R., Emilie, D., et al., 2014. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo. *J. Immunol.* 193, 5863–5872.
- Chapman, K.E., Gilmour, J.S., Coutinho, A.E., Savill, J.S., Seckl, J.R., 2006. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1—a role in inflammation?. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248, 3–8.
- Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J.J., Howard, O.M., 2004. Differential response of murine CD4 + CD25+ and CD4 + CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 34, 859–869.
- Chen, X., Oppenheim, J.J., Winkler-Pickett, R.T., Ortaldo, J.R., Howard, O.M., 2006. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)/CD4(+)/CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur. J. Immunol.* 36, 2139–2149.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehry, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.
- De Bosscher, K., Haegeman, G., 2009. Minireview: latest perspectives on anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 23, 281–291.
- Du, J., Li, M., Zhang, D., Zhu, X., Zhang, W., Gu, W., Feng, Y., Zhai, X., Ling, C., 2009. Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Res. Ther.* 11, R108.
- Erlacher, M., Knoflach, M., Stec, I.E., Böck, G., Wick, G., Wieggers, G.J., 2005. TCR signaling inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in murine thymocytes depending on the stage of development. *Eur. J. Immunol.* 35, 3287–3296.
- Herold, M.J., McPherson, K.G., Reichardt, H.M., 2006. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 60–72.
- Hori, S., Sakaguchi, S., 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 6, 745–751.
- Hu, Y., Tian, W., Zhang, L.L., Liu, H., Yin, G.P., He, B.S., Mao, X.M., 2012. Function of regulatory T-cells improved by dexamethasone in Graves' disease. *Eur. J. Endocrinol.* 166, 641–646.
- Kadmiel, M., Cidlowski, J.A., 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 518–530.
- Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., Yoshimura, A., 2016, 803–811. Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications. *Trends Immunol.*
- Katoh, H., Zheng, P., Liu, Y., 2013. FOXP3: genetic and epigenetic implications for autoimmunity. *J. Autoimmun.* 41, 72–78.
- Kim, C.H., 2009. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 665, 17–29.
- Kisilewicz, A., Schaier, M., Schmitt, E., Hug, F., Haensch, G.M., Meuer, S., Zeier, M., Sohn, C., Steinborn, A., 2010. A distinct subset of HLA-DR + regulatory T cells is involved in the induction of preterm labor during pregnancy and in the induction of organ rejection after transplantation. *Clin. Immunol.* 137, 209–220.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., von Boehmer, H., 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6, 1219–1227.
- Kuo, T., Lew, M.J., Mayba, O., Harris, C.A., Speed, T.P., Wang, J.C., 2012. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11160–11165.
- Mailloux, A.W., Young, M.R., 2010. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Crit. Rev. Immunol.* 30, 435–447.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169, 375–382.
- Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., Maclsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von Boehmer, H., Young, R.A., 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445, 931–935.
- Mathian, A., Jouenne, R., Chader, D., Cohen-Aubart, F., Haroche, J., Fadlallah, J., Claër, L., Musset, L., Gorochoy, G., Amoura, Z., et al., 2015. Regulatory T cell responses to high-dose methylprednisolone in active systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 10, e0143689.
- Moore, X.L., Hoong, I., Cole, T.J., 2000. Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene in the mouse. *Kidney Int.* 57, 1307–1312.
- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., Kronenberg, M., 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* 10, 1178–1184.
- Ng, T.H., Britton, G.J., Hill, E.V., Verhagen, J., Burton, B.R., Wraith, D.C., 2013. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front. Immunol.* 4, 129.
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 1033–1044.
- Prenek, L., Boldizsár, F., Kugyelka, R., Ugor, E., Berta, G., Németh, P., Berki, T., 2017. The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. *Apoptosis* 22, 239–253.
- Ramamoorthy, S., Cidlowski, J.A., 2013. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr. Dev.* 24, 41–56.
- Ratman, D., VandenBerghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I.M., DeBosscher, K., 2013. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol.* 380, 41–54.
- Rodríguez-Perea, A.L., Arcia, E.D., Rueda, C.M., Velilla, P.A., 2016. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin. Exp. Immunol.* 185, 281–291.
- Rudra, D., deRoos, P., Chaudhry, A., Niec, R.E., Arvey, A., Samstein, R.M., Leslie, C., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R., Rudensky, A.Y., 2012. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.* 13, 1010–1019.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszwaska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J., 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331–344.
- Sadlon, T.J., Wilkinson, B.G., Pederson, S., Brown, C.Y., Bresatz, S., Gargett, T., Melville, E.L., Peng, K., D'Andrea, R.J., Glonek, G.G., et al., 2010. Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J. Immunol.* 185, 1071–1081.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Sakaguchi, S., Wing, K., Yamaguchi, T., 2009. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol.* 39, 2331–2336.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A., 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490–500.
- Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181.
- Schmetterer, K.G., Neunkirchner, A., Pickl, W.F., 2012. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 26, 2253–2276.
- Selvaraj, R.K., 2013. Avian CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 397–402.
- Shevach, E.M., Thornton, A.M., 2014. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* 259, 88–102.
- Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C., Bourgeois, C., 2010. Increased CD127 expression on activated FOXP3 + CD4 + regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 2528–2538.

- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E., 2006. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 203, 189–201.
- Stary, G., Klein, I., Bauer, W., Koszik, F., Reininger, B., Kohlhofer, S., Gruber, K., Skvara, H., Jung, T., Stingl, G., 2011. Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF- β and expand regulatory T cells. *J. Immunol.* 186, 103–112.
- Stock, P., Akbari, O., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., 2005. Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J. Immunol.* 175, 7380–7387.
- Szurek, E., Cebula, A., Wojciech, L., Pietrzak, M., Rempala, G., Kisielow, P., Ignatowicz, L., 2015. Differences in expression level of helios and neuropilin-1 do not distinguish thymus-derived from extrathymically-induced CD4 + Foxp3+ regulatory t cells. *PLoS One* 10, e0141161.
- Talabér, G., Boldizsár, F., Bartis, D., Pálkás, L., Szabó, M., Berta, G., Sétáló, G., Németh, P., Berki, T., 2009. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int. Immunol.* 21, 1269–1276.
- Talabér, G., Jondal, M., Okret, S., 2013. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 380, 89–98.
- Veiga-Parga, T., Sehrawat, S., Rouse, B.T., 2013. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol. Rev.* 255, 182–196.
- Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.
- Vila, J., Isaacs, J.D., Anderson, A.E., 2009. Regulatory T cells and autoimmunity. *Curr. Opin. Hematol.* 16, 274–279.
- Wüst, S., van den Brandt, J., Tischner, D., Kleiman, A., Tuckermann, J.P., Gold, R., Lühdler, F., Reichardt, H.M., 2008. Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 180, 8434–8443.
- Wahl, S.M., Wen, J., Moutsopoulos, N., 2006. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol. Rev.* 213, 213–227.
- Wang, Y.M., Ghali, J., Zhang, G.Y., Hu, M., Wang, Y., Sawyer, A., Zhou, J.J., Hapudeniya, D.A., Cao, Q., Zheng, G., et al., 2016. Development and function of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nephrology (Carlton)* 21, 81–85.
- Zhang, T.Y., Ding, X., Daynes, R.A., 2005. The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J. Immunol.* 174, 879–889.