

GLUKOKORTIKOID-INDUKÁLT APOPTÓZIS VIZSGÁLATA ÉRETLEN ÉS ÉRETT T SEJT ALCSOPORTOKBAN

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



Dr. Prenek Lilla

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Klinikai Központ

Pécsi Tudományegyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

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

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pécs

2018

Rövidítések	4
1. Bevezetés	7
1.1 A glukokortikoid hormonok hatásai	7
1.2 A glukokortikoid receptor	8
1.3 A glukokortikoid receptor jelátviteli útvonalak	9
1.3.1 Genomikus hatások	9
1.3.2 Nem-genomikus hatások	9
1.4 T sejtek fejlődése és differenciálódása	11
1.4.1 A T sejtek fejlődése a thymusban	11
1.4.2 A T sejtek differenciálódása	13
1.4.3 A regulatórikus T sejtek fejlődése	15
1.4 Apoptózis	18
1.4.1 Caspase-ok általános jellemzése	19
1.4.2 Extrinsic apoptózis	20
1.4.3 Intrinsic apoptózis	21
1.4.4 Caspase-independens útvonal	23
1.5 Glukokortikoidok hatása thymocyták és T sejtek apoptózisára	23
2. Célkitűzések	26
3. Anyagok és módszerek	27
3.1 Egerek	27
3.2 Izolált thymocyták és lépsejtek <i>in vitro</i> GC-analóg kezelése	27
3.3 Antitestek	27
3.4 Annexin V jelölés	28
3.5 Mitotracker chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros) jelölés konfokális mikroszkópiára	29
3.6 Jelölés konfokális mikroszkópiára	29
3.7 GR-Foxp3 interakció vizsgálata konfokális mikroszkópiával	30
3.8 Konfokális mikroszkópia	30
3.9 Aktivált caspase-ok jelölése áramlási citometriára	31
3.10 Áramlási citometria	31
3.11 Szubcelluláris frakcionálás	31
3.12 Immunprecipitáció	32
3.13 Western blot	32
3.14 Blotok analízise	33
3.15 Statisztikai analízis	33
4. Eredmények	34

4.1 DX indukálta változások a GR és a Bcl-2 fehérjecsald tagjainak kolokalizációjában	34
4.2 A GR interakciója a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival a thymocyták citoplazmájában és mitokondriumában	36
4.3 A DX kezelés a Bax akkumulációját okozza a mitokondriumban	38
4.4 A caspase-ok aktivációjának kinetikája DP thymocytákban.....	39
4.5 DX-indukált caspase aktiváció és citokróm c felszabadulás thymocyták citoplazmájában ...	42
4.6 Annexin V vizsgálata CD4 ⁺ T sejtekben és regulatórikus T sejtekben.....	43
4.7 Caspase-ok aktivációjának vizsgálata CD4 ⁺ T sejtekben és regulatórikus T sejtekben	45
4.8 GR és Foxp3 közötti interakció vizsgálata konfokális mikroszkópiával	49
5. Összefoglalás, megbeszélés.....	51
6. Új eredmények összefoglalása	61
7. Publikációk.....	62
7.1 A tézis alapját képező közlemények	62
7.2 Előadások	62
7.3 Poszterek	63
8. Referenciák.....	64
9. Köszönetnyilvánítás	79
10. Mellékletek (a PhD-tézisek alapját képező közlemények).....	80

Rövidítések

- ACD** accidental cell death, véletlen, akaratlan sejthalál
- AHR** aryl hydrocarbon receptor, aromás szénhidrogén receptor
- AIF** apoptosis inducing factor, apoptózist indukáló factor
- ALL** akut lymphoblastos leukemia
- AP-1** activator protein-1
- Apaf-1** apoptosis protease-activating factor-1
- APC** allophycocyanin
- Bcl6** B-cell lymphoma 6 protein
- BH** Bcl-2 homology
- BH3** Bcl-2 homology 3
- BSA** bovine serum albumin
- cAMP** cyclic adenosine monophosphate, ciklikus adenzin monofoszfát
- CD** cluster of differentiation
- CMX-Ros** chloromethyl-X-rosamine
- CTL** cytotoxic T lymphocyte
- CTLA-4** cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
- cTEC** cortical thymic epithelial cell, kortikális thymus epitheliális sejt
- Cy3** cyanine3
- DC** dendritic cell, dendritikus sejt
- DIC** differential interference contrast
- DISC** death-inducing signaling complex
- DMSO** dimethyl sulfoxide
- DN** double negative, kettős negatív
- DP** double positive, kettős pozitív
- DR** death receptor, halálreceptor
- DX** dexamethasone
- EndoG** endonukleáz G
- FasR** Fas receptor
- FITC** fluoreszcein-izotiocianát
- Foxp3** forkhead box protein 3
- GALT** gut associated lymphoid tissue, bélrendszerhez asszociált lymphoid szövet

GATA3 GATA binding protein 3
GC glukokortikoid hormon
GILZ GC-induced leucine zipper
GR glukokortikoid receptor
GRE glucocorticoid response element
Hsp heat shock protein, hőszokkfehérje
IFN interferon
IL interleukin
IPEX Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
IRF4 interferon response factor 4
iTreg indukált regulatórikus T sejt
KO knock out
LAG3 lymphocyte activation gene 3
Lck leukocyte specific protein kinase
MHC major histocompatibility complex
mTEC medullary thymic epithelial cell, medulláris thymus epitheliális sejt
NF- κ B nuclear factor- κ B
NFAT nuclear factor of activated T-cells
NK natural killer
PBS phosphate buffered saline
PCD programmed cell death, programozott sejthalál
PE phycoerythrin
PECy5 phycoerythrin-cyanine5
PO peroxidáz
pTreg perifériás regulatórikus T sejt,
RA retinoic acid, retinsav
RCD regulated cell death, szabályozott sejthalál
ROR γ t retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t
RPMI RPMI-1640
SDS sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SP single positive, egyszerezsen pozitív

tBid truncated Bid, hasított Bid

TcR T cell receptor, T sejt receptor

TEC thymic epithelial cell, thymus epiteliális sejt

Tfh follikuláris T helper sejt

TGF β transforming growth factor β , transzformáló növekedési faktor β

Th helper T sejt

TNF tumor nekrozis faktor

TNFR tumor nekrozis faktor receptor

TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand

tTreg thymus eredetű regulatórikus T sejt

XIAP X-linked inhibitor of apoptosis protein

ZAP-70 zéta-lánc asszociált protein-70

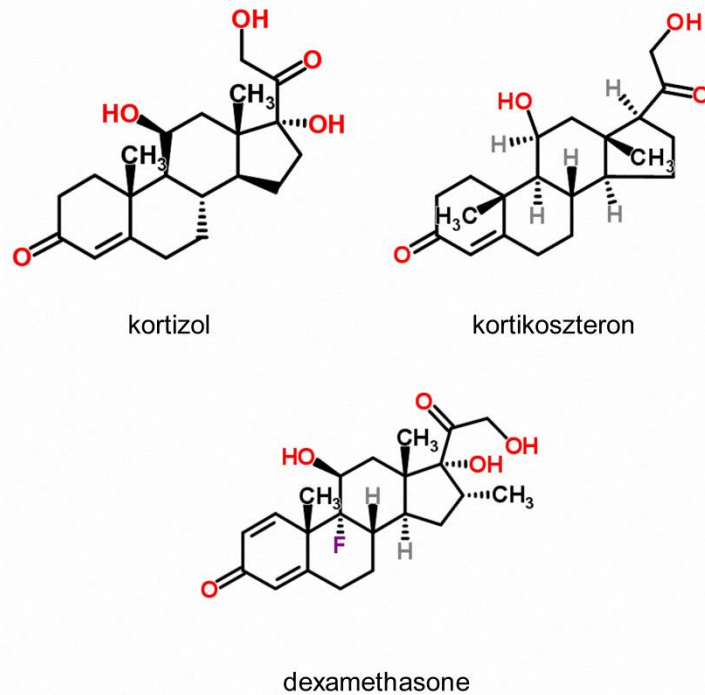
1. Bevezetés

1.1 A glukokortikoid hormonok hatásai

A glukokortikoid hormonokat (GC) a mellékvese-kéreg zona fasciculata sejtjei termelik. Emberben a legfontosabb GC a kortizol, rágcsálókban pedig a kortikoszteron (1. ábra). A hormonok elválasztását a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely szabályozza és mind pszichés, mind fizikai stressz kiválthatja. A GC-ok szekréciója pulzatis (ultradián) módon, 1-2 órás intervallumonként zajlik. Ezt követően a vérben kortikoszteroid-kötő fehérjék szállítják a GC-okat. A szabad kortizol a biológiailag aktív forma, amit a sejtekben található 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz kortizonná alakít (1,2). A GC-ok számos élettani hatással rendelkeznek; szerepet játszanak a szénhidrátok, zsírok, fehérjék anyagcseréjében, hatással vannak fejlődési folyamatokra, a víz- és elektrolit háztartásra, erek tónusára, illetve mindezek mellett befolyásolják az immunrendszer működését; a gyulladásos folyamatokat, az immunsejtek fejlődését, apoptózisát és aktivációját (3). Biológiailag aktív GC-ok extra-adrenális szövetekben is termelődnek (4), például a thymusban (5,6), belekben (7), bőrben, agyban (8,9) és a zsírszövetben (10).

A GC-ok jelentős hatással vannak az immunrendszer működésére. A thymusban befolyásolják a fejlődő thymocyták apoptózisát, szabályozzák a T sejt receptoron (TcR) keresztül érkező szignálokat (11,12). Újabb eredmények arra utalnak, hogy a GC-ok az érett T sejtek funkciójában is fontosak; szükségesek a megfelelő T sejt válasz fenntartásához, hiányukban a sejtek kevésbé képesek a patogénekkal szemben megvédeni a szervezetet (13).

Az immunrendszerre gyakorolt hatásaik miatt a szintetikus GC-analógokat (pl. dexamethasone (DX), 1. ábra) elterjedten alkalmazzák a klinikai gyakorlatban autoimmun betegségek, hematológiai malignitások és allergiák kezelésében (14–16). A GC-okról kimutatták, hogy elősegítik a leukémiás sejtek (3,14), illetve fejlődő thymocyták és bizonyos érett, aktivált T sejtek apoptózisát (17).



1. ábra Kortizol, kortikoszteron és dexamethasone szerkezeti képlete

(forrás: ChemSpider (18), ChemSpider ID5551, ID5550, ID5541)

1.2 A glukokortikoid receptor

A GC-ok intracelluláris GC receptoron (GR) keresztül fejtik ki hatásaikat. A GR a nukleáris receptor szupercsalád tagja, ligand-dependens transzkripciós faktor. A fehérje három fontos domént tartalmaz; egy ligandkötő domént, egy transzkripcionális aktiváló domént és egy cinkujj DNS-kötő domént (19). A GR jelentős mértéken konzervált fehérje; a humán, egér és patkány GR aminosavsorrendje közel 90%-ban megegyezik (19). A humán GR-nak több izoformáját írták le (pl. GR α , GR β , GR γ , GR-A, GR-P), melyek közül a legfontosabbak és leginkább ismertek a GR α és GR β . Ezek az izoformák alternatív splicing révén keletkeznek; az GR α izoforma a citoplazmában található, ez a domináns forma, a béta állandóan a sejtmagban helyezkedik el. A GR β izoforma funkciója kevésbé ismert (3). Feltehetően szerepet játszik a GR α funkciójának negatív szabályozásában, betegségek és GC rezisztencia kialakulásában (20). Egérben is sikerült bizonyítani a GR α és GR β jelenlétét. Itt is a GR α a fontosabb izoforma, a GR β szerepe hasonló, mint emberben (20). A GR a legtöbb sejtben, szövetben expresszálódik, nagy mennyiségben van jelen a májban, vázizomban, csontban, thymusban, tüdőben (21).

1.3 A glukokortikoid receptor jelátviteli útvonalak

A GC-ok hatásait főleg kétféle útvonalon keresztül fejtik ki. Ezen két útvonal a lassabban kialakuló genomikus hatásokat és a gyorsabban végbemenő nem-genomikus hatásokat foglalja magában. A GC-ok hatásait a 2. ábra foglalja össze.

1.3.1 Genomikus hatások

A GC-ok genomikus hatásait írták le először. A GR a citoplazmában, inaktív formában, fehérjekomplexhez (pl. hő sokkfehérje- (Hsp-) 90, Hsp-70, p23) kapcsolódva helyezkedik el (3). A GR ligand-kötődés hatására leválik a komplexről és dimerizálódva a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS meghatározott szakaszaihoz, GRE-ekhez (glucocorticoid responsive elements) kötődik és ezáltal a génexpressziót befolyásolja (3). A géntranszkripció változások megvalósulásához hosszabb időre, több órára, esetleg napra van szükség (3,22). Az aktivált GR képes transzkripció faktoroként direkt, illetve más transzkripció faktorokhoz kapcsolódva (pl. AP-1, NF- κ B, NFAT) indirekt módon befolyásolni számos gén expresszióját (3,22). Bizonyos gének átírását serkenti (pl. annexin-1, interleukin- (IL-) 10), másokét gátolja (pl. IL-2, IL-1 β) (3). A GC-ok DNS-ről való leválása is szigorúan szabályozott, azonban a szintetikus analógok esetében, mint pl. a dexamethasone, ez nem teljesen a fiziológiás módon valósul meg. A DX-nak erősebb affinitása a receptorhoz, ezáltal megváltoztatja a természetes receptorkomplex-DNS kölcsönhatást és módosítja a transzkripció programot (23).

1.3.2 Nem-genomikus hatások

A GC-ok néhány hatása, főleg azok, amelyeket nagy koncentrációban történő, vagy intraartikuláris alkalmazáskor figyeltek meg, jóval gyorsabbak voltak, mint hogy azok a genomikus hatásokkal magyarázhatóak lehettek volna. Ezek az ún. nem-genomikus hatások, amelyek akár percekben belül is kialakulhatnak (22,24). A nem-genomikus hatásokat nem közvetítik transzkripcionális változások, hanem egyéb alternatív útvonalakon keresztül valósulnak meg. A következő nem-genomikus hatásokat írták le eddig:

1. A GC-ok bizonyos sejttípusokon képesek direkt membránhatásuk révén membrántranszport-folyamatok befolyásolására (24,25). Nagy dózisú szteroid kezelés megváltoztatja a membrán lipidek mobilitását emlődaganaat sejtvonal esetében (26).

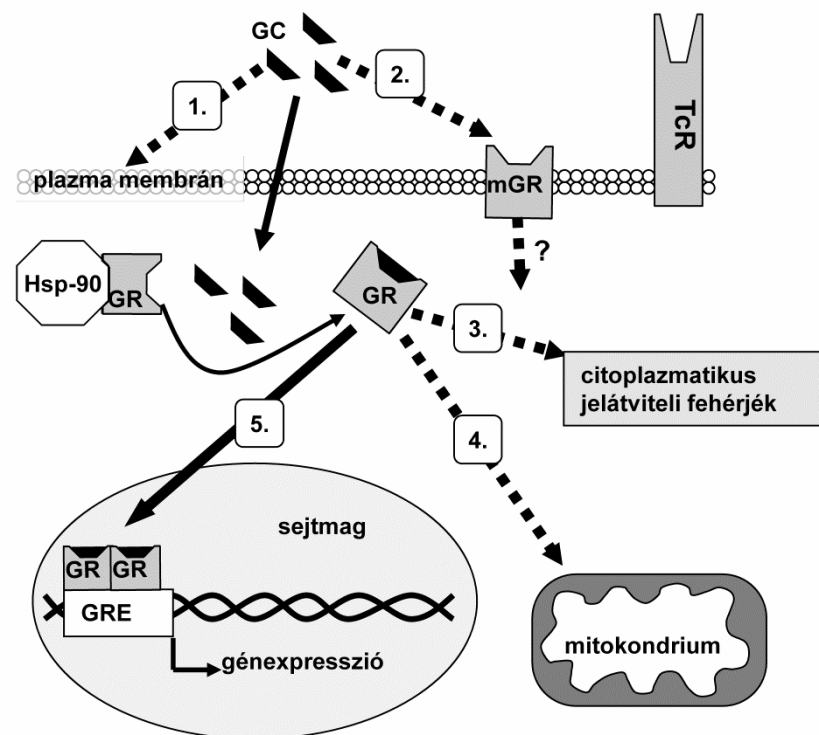
Konkanavalin-A stimulált patkány thymocytákban a metilprednizolon kezelés megakadályozta a Na^+ és Ca^{2+} membrán transzportját és növelte a H^+ felvételt a mitokondriumba (27). Ezeket az eredményeket a tanulmányok általában a GC-ok lipidoldékonyságával magyarázzák, aminek köszönhetően képesek, különösen nagy dózisban alkalmazva, befolyásolni a plazmamembrán fiziko-kémiai tulajdonságait.

2. A membrán GR-t (mGR) rácsáló és humán lymphoid sejtvonalakon és kétéltűek agyában is leírták (28–31). GC-indukált apoptózisa nem érzékeny sejteken, monocytákon és B sejteken is megfigyelték a mGR-t (32). Rheumatoid arthritisben és spondylitis ankylopoeticában szenvedők B sejtjein és monocytáin megemelkedik az expressziója, ezért elképzelhető, hogy ezen betegségekben patológias szerepet tölt be (33). A mGR-on keresztül megvalósuló jelátvitel megismerése azonban még további vizsgálatokat igényel.

3. A GR képes más citoplazmatikus fehérjékhez hozzákapcsolódva jelátviteli útvonalakat befolyásolni. Löwenberg és munkatársai leírták, hogy humán CD4^+ T sejtekben TcR stimulációt követően a GR asszociálódott TcR jelátviteli molekulákkal, az Lck-val és Fyn-nel. Rövid idejű DX kezelés gátolta a TcR aktiváció által indukált Lck/Fyn foszforilációt, ami a GR-TcR-Lck-Fyn multimolekuláris komplex szétesése miatt következett be (34,35). Kutatócsoportunk megfigyelte, hogy Jurkat, human T sejt vonalban 2-5 perc nagy dózisú DX kezelés TcR aktiváció nélkül átmeneti ZAP-70 tirozin foszforilációt okoz, melyet GR antagonistá, RU486-tal gátolni lehetett (36). Szintén Jurkat sejtekben figyeltük meg, hogy a GR a ZAP-70 kinázzal asszociálódott, illetve, a GR a ZAP-70 kinázzal és a Hsp-90-nel egy multimolekuláris komplexet hozott létre [35]. A GC-ok hatékonyan gátolják a T sejtek funkcióit, amelynek molekuláris hátterében a fent említett folyamatok is fontos szerepet játszanak.

4. Ligand kötődést követően az aktivált GR képes transzlokálódni a mitokondriumba lymphoid (38,39) és nem-lymphoid sejtekben (40,41) egyaránt, ahol hozzájárulhat az apoptotikus kaskád elindításához. Összefüggést figyeltek meg számos sejtben a GR mitokondriális transzlokációja és a sejtek apoptózis érzékenysége között (38,39). Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert, azonban leírták a mitokondriális membránpotenciál zavarát, és a citokróm c felszabadulását is (42,43). Kutatócsoportunk korábbi munkája során kettős pozitív (DP) thymocytákban figyelte meg, hogy 30 perc GC-analóg kezelés hatására a GR inkább a mitokondriumba vándorolt (transzlokálódott), mint a sejtmagba, és a bekövetkező mitokondriális membránpotenciál csökkenés jelezte, hogy az apoptózis folyamata is aktiválódott ezekben a sejtekben (44). Ez a transzlokáció jól korrelált a DP sejtek jelentős GC-indukált apoptózis érzékenységeivel (45–47). A

mitokondriumon keresztül az aktivált GR számos módon járulhat hozzá az apoptózis elindulásához. Ezen folyamatok lehetnek; mitokondriális membránpotenciál csökkenése (25,42,43), a GR kapcsolatba léphet a mitokondriális membránban található hőszokk fehérjékkel (pl. Hsp-60) (48), illetve a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival (41). A mitokondriális DNS-ben is találhatóak GRE-ek, melyek révén a GR direkt módon befolyásolhatja a mitokondriális génexpressziót (40,49–51), illetve indirekt módon más transzkripciós faktorok működését is módosíthatja (40,51). Ezen lehetséges mechanizmusok ellenére sem tudjuk, pontosan milyen módon járul hozzá a GR mitokondriális transzlokációja az erre érzékeny sejtek apoptózisához.



2. ábra Összefoglaló ábra a GC-ok nem-genomikus hatásairól

1: direkt membrán hatás, 2: membránhoz kapcsolt GR, 3: citoplazmatikus fehérjékkel való interakció, 4: mitokondriális transzlokáció, 5: genomikus hatás (átvéve (52))
(rövidítések: TcR: T sejt receptor, GR: glukokortikoid receptor, GC: glukokortikoid hormon, mGR: membrán GR, GRE: glucocorticoid response element)

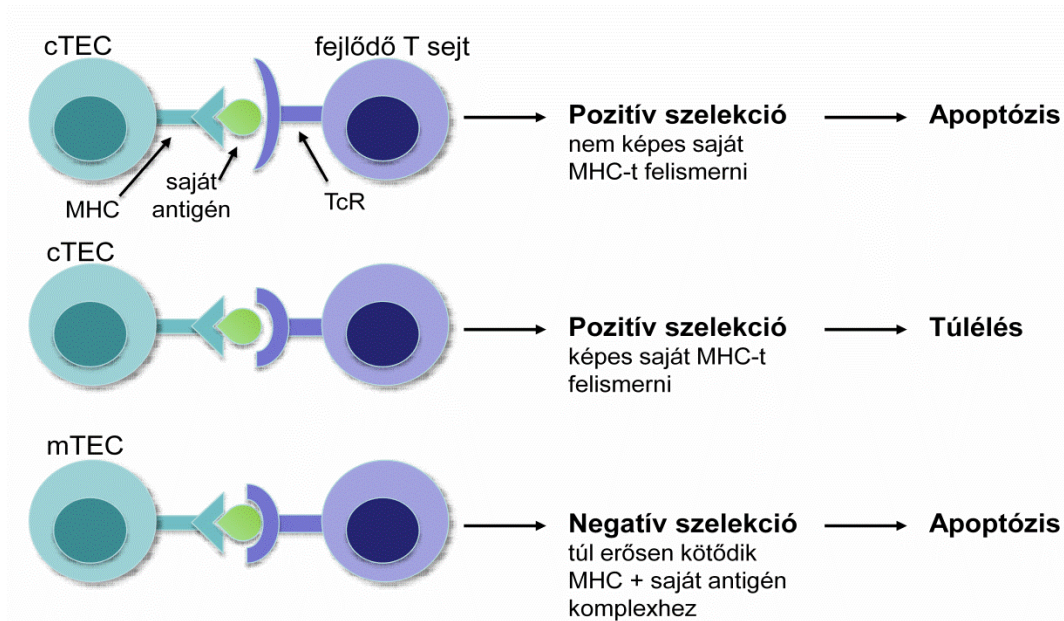
1.4 T sejtek fejlődése és differenciálódása

1.4.1 A T sejtek fejlődése a thymusban

A T sejtek a csontvelőben képződnek (csontvelői őssejtből származnak), azonban még korai fejlődési stádiumukban, progenitor T sejtékként a thymusba vándorolnak, ahol a

fejlődésüket befejezik. A thymus állományába a kortiko-medulláris junkció területén lépnek be (53). A thymus biztosítja az éretlen T sejtek fejlődéséhez elengedhetetlen mikrokörnyezetet. Két fő egységének, a kortexnek és medullának jól meghatározott szerepe van a thymocyták fejlődésében. Fő sejt elemek a lymphoid és stróma sejtek. A stróma sejtek közül a legfontosabbak a thymus epitheliális sejtek (TEC) és dendritikus sejtek (DC). A TEC-ek anti- és pro-apoptotikus szignálok, sejt-sejt kapcsolatok és szekretált molekulák (pl. citokinek, GC-ok) révén irányítják a sejtek érését, proliferációját, migrációját és szelekcióját (54,55). Régóta ismert, hogy a kor előre haladtával a thymus visszafejlődik, ez a folyamat az ún. thymus involúció, melynek végén a thymus helyén csak zsíros szövet marad vissza (56,57).

A thymocyták fejlődési stádiumai jól jellemezhetőek a CD4, CD8 sejt felszíni molekulák megjelenésével, vagy eltűnésével. A legéretlenebb sejtek a sem CD4-et, sem CD8-at nem expresszáló kettős negatív (DN) sejtek. Ezek a sejtek a thymus kortikális állományában, főleg az IL-7 hatására, jelentős mértékben osztódnak (58,59). A szelekciók (3. ábra) előtt a thymocyták CD4-et és CD8-at egyszerre kifejező DP sejtekké alakulnak, melyek ugyanakkor a véletlenszerű géntrendeződés révén keletkezett T sejt receptort is hordozzák a felszínükön (60). Elsőként a pozitív szelekcióra kerül sor, ahol azok a sejtek maradnak életben, amelyek funkcionális TcR-t expresszálnak, és képesek hozzákötődni a TEC felszínén lévő MHC + saját peptid komplexhez, mely kötődés révén a megkapják túlélésükhöz szükséges jelet (szignált) (61). Azok a sejtek, amik nem képesek a komplexhez kapcsolódni nem kapják meg a túlélésükhöz szükséges szignált és apoptózissal elpusztulnak („death by neglect”). A túlélő sejtek ezt követően tovább vándorolnak a medulla felé, és azok a thymocyták, amelyek a saját MHC + peptid komplex iránt nagy-affinitású TcR-t hordoznak aktiváció indukált apoptózis révén elpusztulnak (negatív szelekció). Ezen folyamatnak köszönhetően biztosított a T sejtek saját antigénnel szembeni toleranciája (62). A DP sejtek egyik fontos tulajdonsága, hogy apoptotikus stimulusra legérzékenyebb thymocytá csoportot képezik (63), beleértve a GC-indukált apoptózist is, annak ellenére, hogy az alcsoportok közül ezekben a sejtekben a legalacsonyabb a GR expressziója (45,64). A sejtek, amelyek túléltek a szelekciót, mint CD4 vagy CD8 egyszeresen pozitív (SP) T sejtek, kijuthatnak a perifériára, lymphoid és nem-lymphoid szervekbe, és készen állnak arra, hogy antigén hatására effektor sejtekké differenciálódjanak (65). A szelekciós folyamatok elengedhetetlenek a funkcionális T sejt készlet biztosításához, bármilyen hiba a folyamatban elégtelen immuntoleranciához és/vagy autoimmunitáshoz vezethet (66).



3. ábra T sejt szelekció a thymusban

Pozitív szelekció során azok a kettős pozitív (DP) sejtek maradnak életben, amelyek képesek felismerni a thymus epitheliális sejteken lévő saját MHC molekulát, azok a sejtek, amelyek erre képtelenek apoptózissal elpusztulnak. A negatív szelekciót pedig azok a sejtek nem élik túl, amelyek TcR-a túl erősen kötődik az MHC + saját antigén komplexhez (61,62)

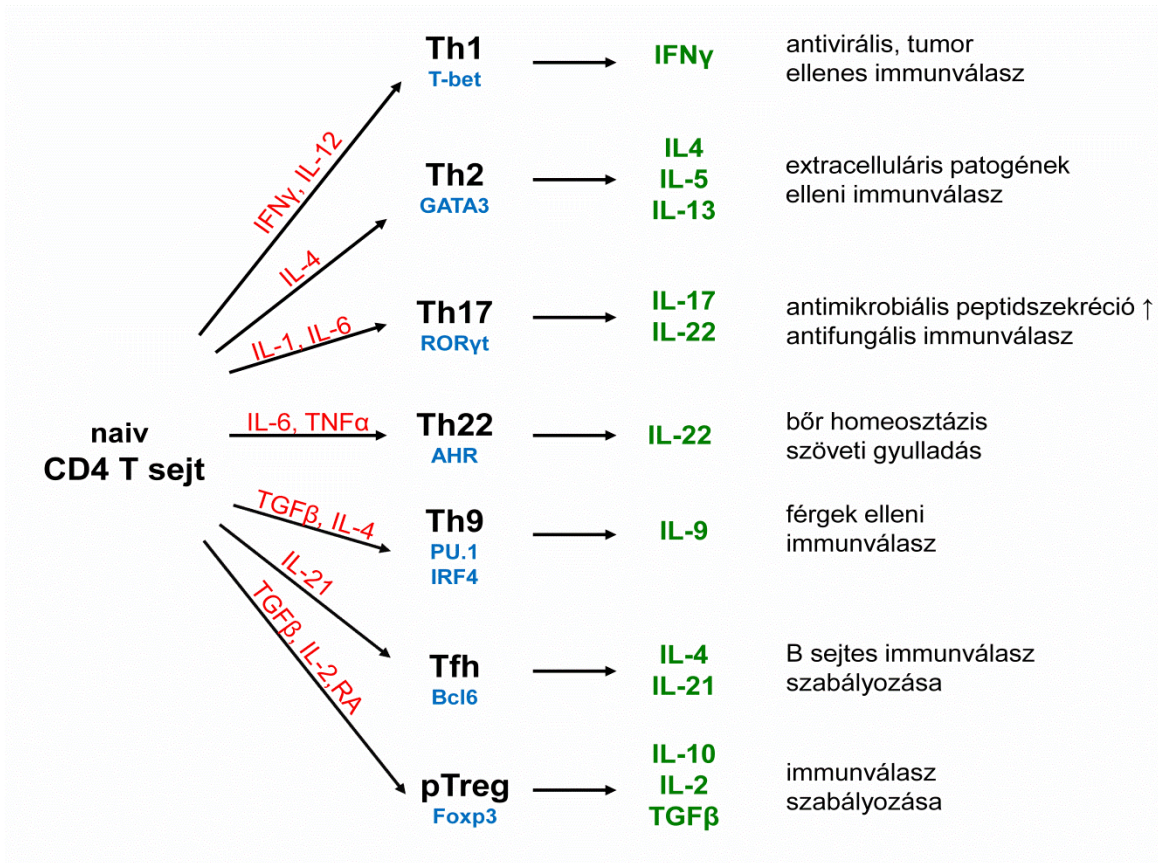
(rövidítések: cTEC: kortikális thymus epitheliális sejt, mTEC: medulláris thymus epitheliális sejt, TcR: T sejt receptor, MHC: major histocompatibility complex)

1.4.2 A T sejtek differenciálódása

Az érett, naiv $CD4^+$ és $CD8^+$ T sejtek a periférián képesek MHCI-gyel vagy MHCII-vel bemutatott antigénekhez kötődni, és aktiválódni. A $CD8^+$ T sejtek citotoxikus T sejtekké (CTL) differenciálódnak, melyek a fertőzött sejteket pusztítják el, a $CD4^+$ T sejtek pedig különböző helper T sejt (Th) alcsoportok irányába differenciálódnak, melyek a szabályozzák a T és B sejtek, NK sejtek, antigén prezentáló sejtek, fagociták és nem-lymphoid sejtek működését (67). A Th sejt alcsoportok kialakulását számos tényező befolyásolja; az immunválasz részeként termelődő citokinek, a patogén jellege, dózisa, az antigén prezentáló sejt típusa, az anatómiai lokalizáció (67). A naiv T sejtek differenciációja egy rendkívül komplex folyamat, amelyben szerepet játszik a sejtosztódás, strukturális és epigenetikai változások a genomban, gén transzkripciós módosulások, melyet különböző transzkripciós faktorok irányítanak. Ezeket között a faktorok között vannak nukleáris proteinek, ún. mester regulátorok, amelyek kulcsfontosságúak a T helper

alcsoportok transzkripció programjának szabályozásában, és ezáltal a sejtek differenciációjában (68,69).

A T helper alcsoportokat klasszikusan a citokintermelő képességeik alapján csoportosítják (68), illetve sok alcsoport esetében már azonosították a „mester regulátor” molekulát is. A legfontosabb alcsoportokat a 4. ábra foglalja össze. Th1 sejtek interferon γ (IFN γ)-t termelnek és az intracelluláris patogének, vírusok és daganatos sejtek elleni immunitásban fontosak, kialakulásukban a T-bet-nek (70) van kiemelkedő szerepe. A Th2 sejtek, melyek differenciációját a GATA3 (GATA binding protein 3) (71) segíti, IL-4, IL-5 és IL-13 termelés révén főleg az extracelluláris patogének ellen küzdenek és részt vesznek az allergia patomechanizmusában is. A Th17 sejtek IL-17-et és IL-22-t termelnek, amik elősegítik mukozális felszíneken az antimikrobiális peptidek szekrécióját, szerepük van az antifungális immunválaszban valamint gyulladásos és autoimmun folyamatokban (67). Kialakulásukat a ROR γ t (retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t) (72) szabályozza. A Th22 sejtek IL-6, TNF α hatására alakulnak ki, legfontosabb transzkripció szabályozó molekulájuk az aryl hydrocarbon receptor (AHR; aromás szénhidrogén receptor). Fő funkciójuk a bőr homeosztázisának fenntartása és a gyulladásos folyamatokban való részvétel (73). A folliculáris T helper sejtek (Tfh) regulátora a Bcl6 (B-cell lymphoma 6 protein) (74), IL-4 és IL-21 citokinekkal szabályozzák a B sejt immunválaszt (75). A Th9 sejtek IL-9-et termelnek és feltehetően a férgek elleni immunválaszban töltenek be fontos szabályozó szerepet (76). Kialakulásukat valószínűleg a PU.1 (77) és IRF4 (interferon response factor 4) transzkripció faktorok segítik elő (78). A Th alcsoportok közé sorolják a perifériás regulatórikus T sejteket is (pTreg), amelyek az immunválasz túlaktiválódását akadályozzák meg (79), differenciációjuk legfontosabb szabályozó molekulája a Foxp3 (forkhead box protein 3) (80). Az egyes alcsoportok jellegzetes citokintermelésük és regulátor molekulájuk mellett speciális migrációs mintázattal is rendelkeznek, melynek köszönhetően az immunválasz során a szervezetben a megfelelő helyre képesek vándorolni (67).



4. ábra Helper T sejt alcsoportok áttekintése

A kialakulásukat elősegíti citokinek (piros), a „mester regulátor” molekulák (kék), az általuk termelt legfontosabb citokinek (zöld) és az immunválaszban betöltött funkciójuk (fekete) (67)

(rövidítések: IFN γ : interferon γ , IL-: interleukin, TNF α : tumor nekrozis faktor α , TGF β : transzformáló növekedési faktor β , GATA3: GATA binding protein 3, ROR γ t: retineid-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t, AHR: aromás szénhidrogén receptor, IRF4: interferon response factor4, Bcl6: B-cell lymphoma 6 protein, Foxp3: forkhead box protein 3)

1.4.3 A regulatórikus T sejtek fejlődése

A két fő sejtcsoport, a CD4 és CD8 pozitív T sejtek mellett a thymusban képződnek regulatórikus T sejtek is (Treg), ezek az ún. természetes Treg-ek (tTreg), melyek fontos szerepet töltenek be az immunválasz szabályozásában, az autoimmunitás megelőzésében, fõto-maternális- és allograft toleranciában (81). A thymus medullájában keletkeznek azokból a thymocytaból, amelyek TcR-a relatív erős affinitással rendelkezik az MHC-vel bemutatott saját peptidek iránt. Ez a TcR szignál azonban nem elég erős ahhoz, hogy a sejtek apoptózisát elindítsa, viszont erősebb, mint a naiv CD4⁺ sejtek TcR-ának affinitása a saját peptidek iránt (82). A tTreg képződéséhez szükséges a TcR szignál megfelelő erőssége, IL-2 és TGF β (transforming growth factor β) molekulák jelenléte. Ezek a

tényezők együtt járulnak hozzá a Foxp3 transzkripciós faktor up-regulációjához, ezáltal a tTreg irányú elköteleződéshez (83).

Regulatórikus T sejtek keletkeznek a periférián is (pTreg) naiv CD4⁺ sejtekből (83,84). Fő képződési helyük valószínűleg a bélrendszer, ahol a kommenzális mikroorganizmusok által termelt rövid-láncú zsírsavak (pl. vajsav, propionsav) (85), a bélrendszerhez asszociált lymphoid szövetben (GALT) található dendritikus sejtek által termelt TGFβ és retinsav (86), és valószínűleg maga a mikrobiom is elősegítik a kialakulásukat (85).

Újabban az irodalom egy harmadik Treg csoportként említi, az *in vitro* differenciáltatott Treg-eket (iTreg), melyeket naiv CD4⁺ sejtekből differenciáltatnak TcR stimuláció, IL-2 és TGFβ segítségével laboratóriumi körülmények között (84). A pTreg-ek és iTreg-ek ugyanazon prekursorból származnak. Az iTreg-eknek külön csoportként való elkülönítése főleg annak a törekvésnek a következménye, hogy a Treg-eket terápiás céllal lehessen felhasználni különböző, elsősorban autoimmun betegségekben. (Legfontosabb Treg alcsoportok az 5. ábrán vannak összefoglalva.)

- | | |
|-------|--|
| tTreg | <ul style="list-style-type: none">• thymus eredet• képződésükhöz szükséges:<ul style="list-style-type: none">• mTEC, DC• IL-2, TGFβ• Foxp3 gén nem kódoló régiója demetilált• centrális tolerancia |
| pTreg | <ul style="list-style-type: none">• naiv CD4 T sejtekből képződnek• képződésükhöz szükséges:<ul style="list-style-type: none">• antigén stimuláció (DC, CD28)• IL-2, TGFβ, RA• Foxp3 gén nem kódoló régiója metilált• perifériás tolerancia |
| iTreg | <ul style="list-style-type: none">• <i>in vitro</i> naiv CD4 T sejtekből differenciáltatott• képződésükhöz szükséges:<ul style="list-style-type: none">• TcR stimuláció• IL-2, TGFβ• Foxp3 gén nem kódoló régiója metilált• terápiás céllal történő felhasználás |

5. ábra A legfontosabb Treg típusok, főbb jellemzőikkel (87)

(rövidítések: tTreg: thymus eredetű regulatórikus T sejt, pTreg: perifériás regulatórikus T sejt, iTreg: indukált regulatórikus T sejt, mTEC: medulláris thymus epitheliális sejt, DC: dendritikus sejt, IL-: interleukin, TGFβ: transzformáló növekedési faktor β, RA: retinsav, Foxp3: forkhead box protein 3, TcR: T sejt receptor)

A Foxp3 transzkripciós faktor a Treg-ek kialakulásáért felelős regulátor molekula. Fontosságát jól mutatja, hogy mutációja esetén egérben súlyos lympho-proliferatív betegségek és megrövidült élettartam figyelhető meg („scurfy” egér), emberben pedig az IPEX-szindróma alakul ki (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*) (88–90). A Foxp3 a forkhead transzkripciós faktor család tagja, és fontos szerepe van nem csak a Treg irányú elköteleződésében, de a sejtek szuppressziós funkciójának kialakításában is (91–93). A Foxp3 expressziójához feltétlenül szükséges az IL-2 és TGFβ jelenléte, azonban a jelátviteli folyamatok, amelyek elősegítik a Foxp3 expresszióját még intenzív kutatás tárgyát képezik (94).

A két fő Treg alcsoportot egymástól teljes bizonyossággal elkülönítő markert még nem írtak le. Az irodalomban sokáig tartotta magát a nézet, hogy a Helios (95) és a Neuropilin-1 (96,97) erre alkalmas molekulák lehetnek, azonban egyik sem bizonyult teljesen megbízhatónak (98). Az egyetlen biztos módszer a két alcsoport elkülönítésére a FOXP3 lókuszt nem-kódoló régiójának metilációs vizsgálata. Ez a tTreg-ekben teljesen demetilált, a pTreg-ekben, iTreg-ekben és konvencionális T sejtekben pedig metilált (99). Néhány tanulmány arra is rámutat, hogy a Treg-ek képesek elveszíteni regulatórikus T sejt identitásukat, és patogén-jellegű effektor CD4⁺ T sejté tudnak alakulni lymphopenias és pro-inflammatórikus körülmények között (100–102). Éppen ezért a pTreg és iTreg-eket a tTreg-ekhez képest instabil Treg fenotípusként szokták említeni, mert hiányzik bennük az epigenetikai változás, amely a tTreg-ekben megvan és biztosítaná az erős Treg irányú elköteleződésüket (103).

A tTreg-eknek feltehetően főleg a saját antigénekkal szembeni tolerancia, az ún. centrális tolerancia a fő feladatuk. Ugyanakkor a pTreg-ek inkább a nem-saját antigénekkel, mint a kommenzális mikrobiom, táplálék antigénekkel és a várandóság során az anyai szervezetbe kerülő apai alloantigénekkel szembeni immunválaszt kontrollálják, ez az ún. perifériás tolerancia (104). A regulatórikus T sejtek legfontosabb immunszuppresszív funkcióit a 6. ábra foglalja össze.

- **Citokin termelés:**
 - **TGFβ:** effektor T sejt differenciáció szuppressziója, T és B sejt proliferáció gátlása, makrofágok, DC-ek és NK sejtek gátlása, Treg differenciáció elősegítése
 - **IL-10:** gyulladáscsökkentő citokin termelés gátlása
 - **IL-35:** T helper sejtek szuppressziója, T sejtek és B sejtek regulatórikus sejtekké való differenciációjának segítése
 - **CD25^{high}:** kompetíció az effektor sejtekkel az IL-2-ért
 - **CD39, CD73:** ektoenzimek, adenzint képeznek ATP-ből, ami A2 receptoron keresztül gátolja az effektor sejteket
 - **CTLA-4:** kompetíció effektor sejtekkel CD80/86-ért
 - **granzyme B, perforin:** effektor sejt apoptózis
 - **cAMP:** proliferáció, differenciáció gátlása
 - **LAG3:** DC-ek tolerogén jellegűvé való differenciációját segíti Treg képződést elősegíti

6. ábra A Treg-ek immunszuppresszív funkcióinak összefoglalása

A regulatórikus T sejtek sokféle módon képesek gátolni az immunválasz megvalósulását. Képesek immunszuppresszív citokineket termelni, sejtfelszíni molekulákkal gátolni effektor sejteket, illetve apoptózist indukálni a célsejtekben (105) (rövidítések: TGFβ: transzformáló növekedési faktor β, IL-: interleukin, CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát, LAG3: lymphocyte activation gene 3)

1.4 Apoptózis

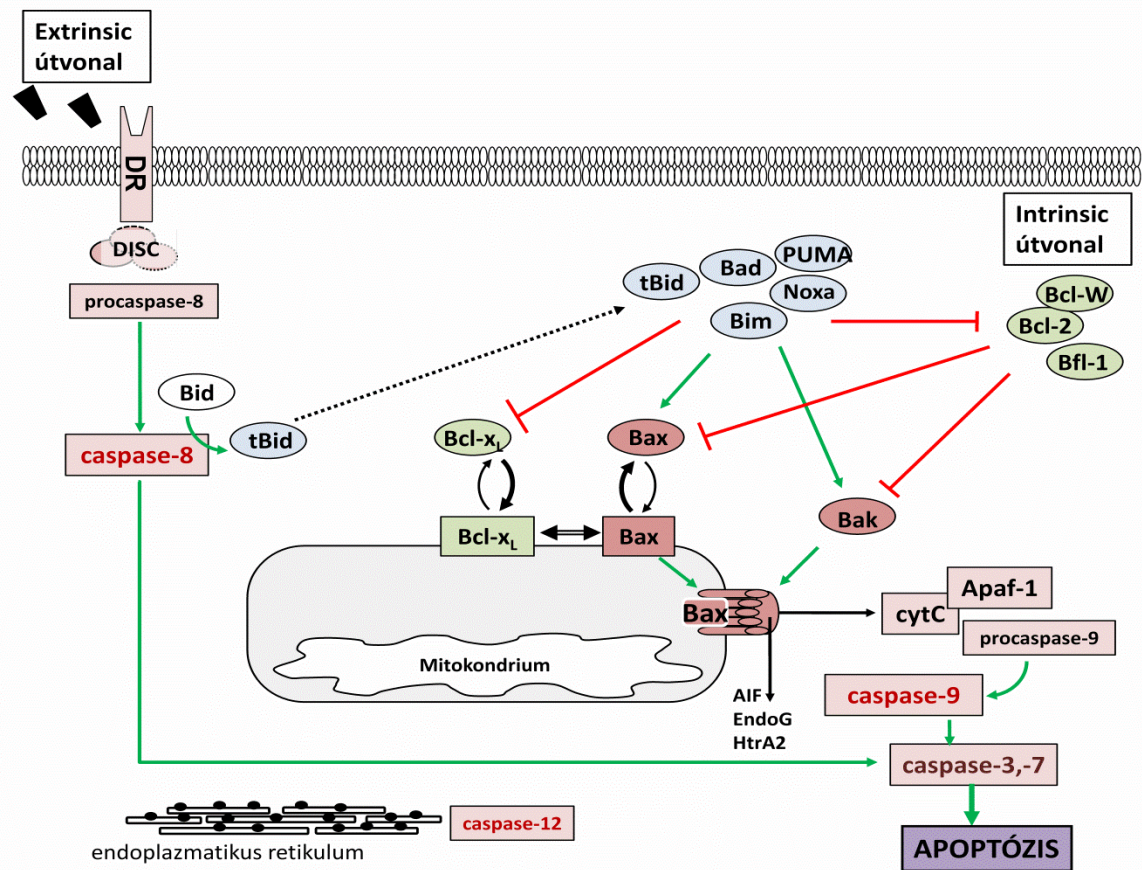
Az apoptózis, vagy programozott sejthalál, számos fiziológiai folyamatban szerepet játszik, beleértve az immunsejtek fejlődését és az immunválaszt is (106,107). A sejthalálnak sokféle formája ismert, amelyek mindegyike sok, komplex molekuláris folyamatot foglal magában. A sejthalált meghatározott morfológiai és molekuláris változások jellemzik. A morfológiai változások közé tartozik a pszeudopódiumok visszahúzódása, a sejt és sejtmag térfogatának csökkenése (pyknosis), sejtmag feldarabolódása (karyorrhexis), a sejtorganellumok strukturális változásai, valamint apoptotikus testek formálódása és leválása a sejtről (108,109).

Galluzzi és munkatársai a Nomenclature Committee on Cell Death-nek készített legújabb, 2018-as ajánlásukban 2 fő formáját különítették el a sejthalálnak; a véletlen, vagy akaratlan sejthalált (ACD; accidental cell death) és szabályozott sejthalált (RCD; regulated cell death) (110). ACD bekövetkezhet ha a sejtet extrém fizikai (pl. nagy nyomás, magas hőmérséklet, ozmotikus változás), kémiai (pl. pH változás) és mechanikai (pl. nyíróerő) hatások érik (111,112). A RCD egy szigorúan szabályozott, összetett folyamat. Ide tartozik az apoptózis is (112). A RCD különböző formáinak molekuláris folyamatai jelentősen átfednek, azonban alapvetően két okból következhet be; egyrészt az RCD egy beépített program, amely a szöveti homeosztázis fenntartásához szükséges (általánosságban ezt szokták programozott sejthalálnak nevezni (PCD; programmed cell death)), másrészt intra- vagy extracelluláris mikrokörnyezet zavarai is elindíthatják (112).

Három fő apoptotikus útvonalat (extrinsic, intrinsic és caspase-independens) különböztetnek meg, amelyek alapvetően három fázisra oszthatóak; az iniciációra vagy aktivációra, a végrehajtásra (execution) és a sejtpusztulásra (110).

1.4.1 Caspase-ok általános jellemzése

Az intrinsic és extrinsic apoptotikus útvonalaknak számos közös eleme van, melyek közül kiemelendők a caspase-ok. Ez egy aszpartát specifikus proteáz család, melynek tagjai cisztein jelenlétében képesek katalitikus hatásukat kifejteni. Innen ered az elnevezésük is; caspase: Cystein-dependent *AS*partate-specific peptid*ASE* (113). A caspase-okat funkciójuk alapján csoportosíthatjuk iniciátor caspase-ok (caspase-2,-8,-9,-10), effektor caspase-ok (caspase-3,-6,-7) és gyulladássos caspase-ok (caspase-1,-4,-5) csoportjába. Vannak caspase-ok, amelyeknek speciális funkciói vannak, pl. caspase 11 szeptikus sokkban szabályozza a citokinek elválasztását, caspase-12 az endoplazmatikus retikulumot érő stressz által aktivált apoptózist mediálja és a caspase-14, amit eddig csupán embrionális szövetben mutattak ki, főleg keratinocytákban (114–117). A caspase-ok zymogének formájában találhatóak a sejtekben, melyeknek vagy nincs vagy csak nagyon minimális ezimatisz aktivitása van. Ezeket a zymogén formákat procaspase-ként is szokták nevezni. Aktivációjuk kétféleképpen történhet; autoaktivációval, vagy egy másik caspase, esetleg másik molekula által (117).



7. ábra Az extrinsic és intrinsic apoptotikus útvonalak áttekintése

Az extrinsic útvonalat különböző ligandok halálreceptorokhoz (DR) való kötődése indítja el, amely a DISC-en (death-inducing signaling complex) keresztül a caspase-8 aktivációjához vezet. Az intrinsic útvonalat intracelluláris stressz aktiválja, és a Bcl-2 fehérjecsald tagjai szabályozzák. Ha aktiválódik a mitokondrium belső membránjából felszabadul a citokróm c, mely a citoplazmában hozzájárul a caspase-9 aktivációjához. Az aktivált caspase-8 és -9 a caspase-3-at aktiválják majd (110)

(rövidítések: cytC: citokróm c, Apaf-1: apoptosis protease-activating factor-1, AIF: apoptózist indukáló faktor, EndoG: endonukleáz G)

1.4.2 Extrinsic apoptózis

Az extrinsic útvonalat extracelluláris stressz szignálok indítják el, amelyeket a sejt felszínén található receptorok érzékelnek (7. ábra) (118–120). Ezeket a receptorokat gyakran nevezik halálreceptoroknak (DR, death receptor) is. A leginkább tanulmányozott receptorok: tumor nekrosis faktor (TNF) receptor (TNFR), Fas receptor (FasR), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (121,122). A halálreceptorok intracelluláris doménje, a haláldomén (death domain), a receptorok aktivációját követően kötőhelyet biztosít az intracelluláris fehérjéknek. A keletkező szupramolekuláris komplexet a death-inducing signaling complex (DISC) ismeri fel, mely ezt követően aktiválja a procaspase-8-

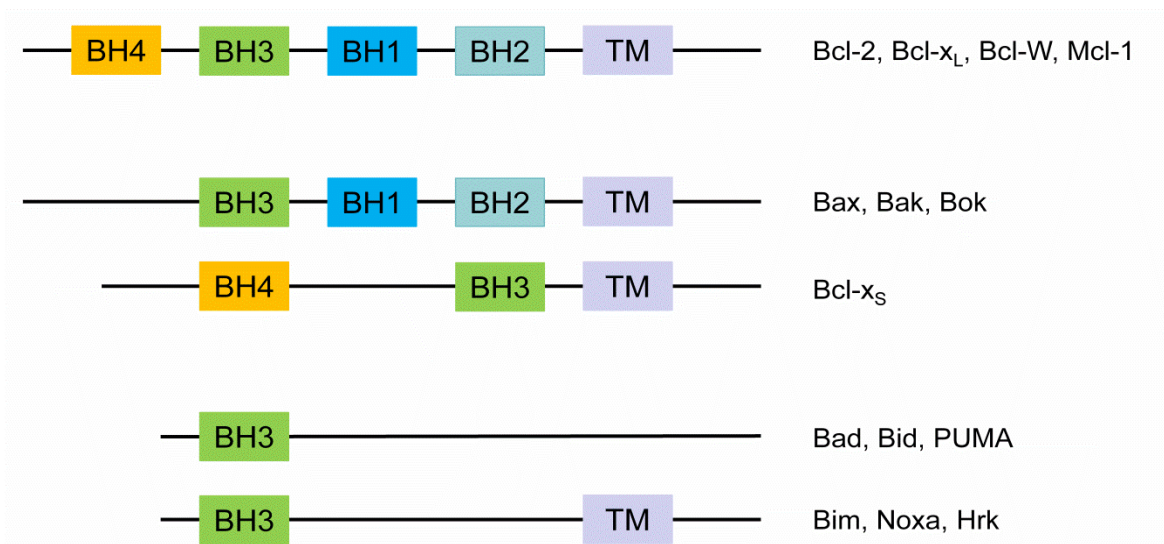
at (123). Majd kétféle útvonal aktiválódása figyelhető meg a különböző sejtekben, valószínűleg annak függvényében, hogy a sejtekben mennyi aktív caspase-8 képződik (124,125). Az ún. I-es típusú sejtekben (pl. érett lymphocyták) a nagy mennyiségű aktív caspase-8 aktiválja a caspase-3 és -7-et és ez elegendő a sejt elpusztulásához (125–127) Az ún. II-es típusú sejtekben (pl. hepatocyták, pancreas β sejtek, daganatos sejtek többsége) kevés aktív caspase-8 képződik (125), illetve a caspase-3 és -7 aktiválódását XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (128) gátolja. A sejt pusztulásához a caspase-8-nak hasítania kell a Bid-et. A hasított Bid (tBid) a mitokondriumhoz vándorol, és ott a „BH3-only” fehérjékkel elindítja az intrinsic apoptotikus útvonalat (129,130).

1.4.3 Intrinsic apoptózis

Az intrinsic útvonalat elindíthatja irreverzibilis DNS károsodás, magas citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció, oxidatív stressz, növekedési faktor megvonás, endoplazmatikus retikulumot erő stressz (131) (7. ábra). A szabályozásért a Bcl-2 fehérjecsald felelős. Ezeknek a fehérjéknek közös jellemzője, hogy legalább 1, maximum 4 konzervált Bcl-2 homology (BH) domént tartalmaznak. A fehérjecsald tagjait proapoptotikus (Bax, Bak, Bad, Bcl- x_S , Bid, Bik, Bim, Hrk) és anti-apoptotikus fehérjékre (Bcl-2, Bcl- x_L , Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1) lehet osztani az alapján, hogy az apoptózis folyamatát elősegítik vagy gátolják. A proapoptotikus fehérjéken belül két további alcsoportot lehet elkülöníteni az alapján, hogy hány BH domént tartalmaznak; a Bax, vagy multidomén proapoptotikus, fehérjéknek (Bax, Bak, Bok, Mtd) BH1-BH3 vagy BH1-BH4 doménjük van, a „BH3-only” alcsoportnak (Bim, Bid, Bad, PUMA, Noxa) csak egy BH3 doménjük van. Az anti-apoptotikus fehérjék 4 BH domént tartalmaznak (BH1-BH4) (110). A fehérjék szerkezetét a 8. ábra szemlélteti. A BH3-only fehérjék hatásukat feltehetően kétféle módon fejtik ki. Egyrészt direkt aktiválhatják a multidomén pro-apoptotikus fehérjéket, hogy azok pórust képezzenek a mitokondrium külső membránján. Másrészt indirekt módon gátolják az anti-apoptotikus fehérjék apoptózist gátló hatását.

Az aktivált Bax és Bak molekuláris komplexet hoznak létre, amellyel pórust formálnak a mitokondrium külső membránján (MOMP; mitochondrial outer-membrane permeabilization), és ezzel lehetővé teszik a citokróm c felszabadulását a mitokondrium belső membránjából. Az anti-apoptotikus fehérjék, mint a Bcl-2, Bcl- x_L ezen folyamat ellen dolgoznak, neutralizálva a pro-apoptotikus fehérjéket, megakadályozzák a citokróm c citoplazmába való kijutását (132,133). A mitokondrium külső membránján a pórus

kialakulása az apoptózis meghatározó lépése („point of no return”), mert ez több módon is a sejt pusztulásához vezet. A mitokondriális membránpotenciál csökkenése révén nehezíti az ATP szintézist, toxikus fehérjék szabadulnak ki a citoplazmába, mint pl. citokróm c, apoptózis indukáló faktor (AIF), endonukleáz G (EndoG), Smac (más néven Diablo), HtrA2 (más néven Omi), végül pedig a légzési lánc gátlásához és reaktív oxigén szabadgyökök felszaporodásához vezet (134,135). Ezek a változások már nagy valószínűséggel eldöntik a sejt sorsát. A Smac és HtrA2 gátolják a citoplazmában jelenlévő endogén caspase gátló XIAP-ot, ezzel segítik a caspase-ok működését (136). A citoplazmába került citokróm c asszociálódik az Apaf-1-el (apoptosis protease-activating factor-1) és a procaspase-9-el, ami így aktiválódik. Ezt a multimolekuláris komplexet apoptozómának nevezik. A caspase-9 pedig aktiválja a caspase-3 és caspase-7-et, amelyek a sejt halálához vezetnek (109).



8. ábra Bcl-2 fehérjék szerkezetének áttekintése

Az anti-apoptotikus fehérjék 4 BH domént tartalmaznak (BH1-BH4), a pro-apoptotikus multidomén fehérjék 3 vagy 4 doménnel rendelkeznek, a „BH3-only” csoport fehérjéinek csak BH3 doménjük van (110)

(rövidítések: BH: Bcl-2 homology domain, TM: transmembrane-targeting region)

Az intrinsic útvonal másik formája az endoplazmatikus retikulumot érő stressz által elindított apoptózis. Ez akkor indul el, ha az endoplazmatikus retikulumban a nem megfelelően képződött (misfolded) fehérjék elérnek egy kritikus koncentrációt (137) (7. ábra).

1.4.4 Caspase-independens útvonal

A harmadik apoptotikus útvonal, a caspase-independens útvonal, a mitokondrium károsodásakor felszabaduló molekulák (AIF, EndoG, HtrA2) pro-apoptotikus hatása révén megy végbe. Ezek képesek caspase-ok nélkül is elindítani az apoptózist. Az AIF és az EndoG enzimatikusan bontják a DNS-t, a HtrA2 pedig proteolitikus képessége révén tönkreteszi a citoszkeletont (138).

1.5 Glukokortikoidok hatása thymocyták és T sejtek apoptózisára

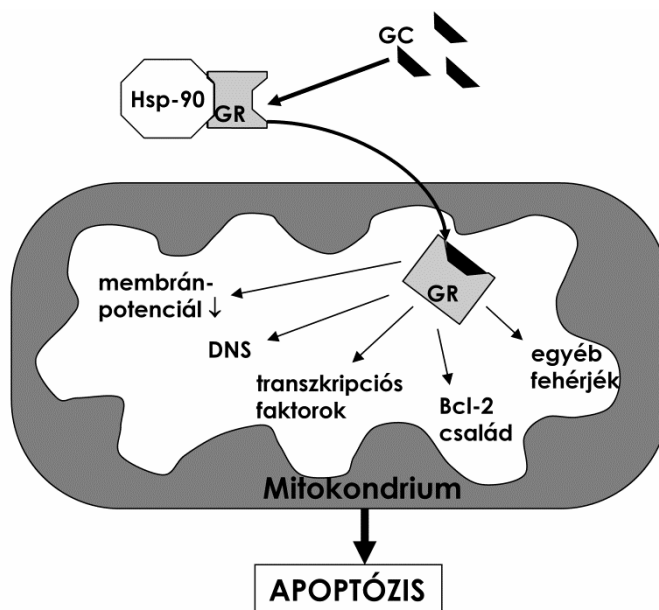
A GC-ok immunrendszerre kifejtett hatásai már régóta ismertek. Nagy dózisu GC beadása a thymus gyors involúcióját okozza a thymocyták és a TEC-ek depléciója révén (139,140). A thymocyták mellett a TEC-ek is rendelkeznek GR-ral, ezáltal rájuk is hatnak a szisztémásan jelenlévő GC-ok, és feltehetően befolyásolják ezen sejtek differenciációját, valamint a medulláris TEC esetében a tolerancia indukáló képességüket (139,141). Érdekes módon mind a thymocyták, mind a TEC képesek GC szintézisre. GC szintézist azonban nem találtak a SP thymocytákban, és a perifériás T sejtekben, sem nyugvó, sem aktivált formában (142,143). Úgy tűnik a GC szintézis a fejlődő thymocyták sajátos tulajdonsága.

A GC-ok nem csak a thymocyták apoptózisát okozhatják, de bizonyos körülmények között a TcR-on keresztül elindított apoptózissal szemben meg is védhetik a sejteket. Alacsonyabb koncentrációban a GC-ok képesek gátolni a TcR-on keresztül elinduló jelátvitelt a thymocytákban, amikor azok mindkét receptoron keresztül érkező szignált egyszerre kapják. Ez képes azokat a thymocytákat a TcR-on keresztül indukált apoptózistól megmenteni, amelyek egyébként a negatív szelekció során elpusztulnának (54). Ezt nevezik kölcsönös antagonizmus modellnek. A pontos mechanizmus még nem ismert, de intézetünkben végzett korábbi kutatások során megfigyelték, hogy ezekben a kétféle szignált egyidejűleg kapó thymocytákban a Bcl-2 fehérje up-regulálódik (43). Más kutatócsoport a kölcsönös antagonizmus modellt alapul véve bizonyította, hogy a GC-ok a pozitív szelekcióban is szerepet játszanak (11,144). Mindezek jól jelzik, hogy a GC-oknak fontos szerepe van nem csak a thymocyták apoptózisában, hanem fejlődésükben, szelekciójukban, ezáltal a megfelelő T sejt repertoár biztosításában is.

Más kutatócsoportok érett, naiv T sejtekben írták le a GR és a TcR jelátviteli molekulák közötti cross-talk-ot; a GC-ok gátolták az Lck, Fyn molekulákat (34,145) Azonban még nem tisztázott, hogy ez a gátló hatás a thymocytákban is megvalósul-e. A

GR-on keresztül végbemenő jelátvitelnek szerepet tulajdonítanak a naiv T sejtek működésében is; szükségesnek tartják a megfelelő T sejt válasz fenntartásához, hiányában a T sejtek kevésbé képesek megküzdeni a patogénekkal (13). Feltételezhető, hogy a mellékvese által termelt GC-ok elsősorban szisztémás immunválaszokat befolyásolnak, ugyanakkor a thymusban lokálisan képződő hormonok inkább helyileg befolyásolják a T sejtek érését (146).

A thymocyták közül a DP sejtek a legérzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra (63), annak ellenére, hogy ebben a thymocytá csoportban a legalacsonyabb a GR expressziója (45,46). Ezen érdekes együttállás helyezte figyelmünk középpontjába a DP thymocyták GC-indukált apoptózis érzékenységének alaposabb vizsgálatát. Korábbi munkánk során megfigyeltük DP thymocytákban DX hatására a GR mitokondriumba való transzlokációját és a mitokondriális membránpotenciál csökkenését (44). Egy TcR transzgenikus egérmodellen pedig kimutattuk, hogy azok a thymocyták, amelyek túlélnek a T sejt szelekciót, up-regulálják („felülszabályozzák”) az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjét. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a mitokondrium közvetlenül szerepet játszik a GC-indukált thymocytá apoptózis szabályozásában (43).



9. ábra Összefoglaló ábra a GC lehetséges mitokondriális hatásairól

A GR okozhatja a mitokondriális membránpotenciál csökkenését, befolyásolhatja a mitokondriális génexpressziót, transzkripciós faktorokon keresztül indirekt módon is képes a génexpressziót megváltoztatni, befolyásolja a Bcl-2 fehérjék működését. Mindezek a hatások hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az aktivált GR a mitokondriumon keresztül sejtek apoptózisát okozza (átvéve (52))

(rövidítések: GC: glukokortikoid hormon, GR: glukokortikoid receptor, Hsp: hőszokk fehérje)

Ezt a feltevésünket alátámasztják más kutatócsoportok eredményei is. Megfigyelték, hogy a Bax és a Bak fontos szerepet játszik a DX-indukált apoptózisban. (147,148) Thymocyták, amelyek kettős knock out (KO) Bax^{-/-} Bak^{-/-} egerekből származtak, rezisztensnek bizonyultak a GC-indukált apoptózissal szemben (149). A csak egyszeresen knock out Bim^{-/-} egérben a Bim hiánya a GC-indukált apoptózis zavarát okozta (150,151). A GC-okról kimutatták, hogy szabályozzák a Bcl-2 fehérjék expressziós szintjét is, genomikus hatásaik révén megváltoztatják a Bim és a Bcl-x_L expresszióját (17,152,153). Ezek az eredmények a sajátjainkkal együtt megerősítették annak a lehetőségét, hogy a DP thymocyták GC-indukált apoptózisában az intrinsic apoptotikus útvonal szerepet játszhat.

A GC-oknak nem csak a DP thymocytákra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Egy másik munkánk során *in vivo* DX beadását követően figyeltük meg a különböző nyirokszervek sejtes összetételében bekövetkező változásokat. Figyelmünket különös tekintettel az immunrendszer szabályozásában fontos szerepet játszó regulatórikus T sejtekre összpontosítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy a thymusban lévő regulatórikus T sejtek (tTreg) bizonyos fokú rezisztenciát mutattak a DX-indukált apoptózissal szemben, ezzel ellentétben a lépben található Treg-ek (pTreg) viszont érzékenyek voltak a DX-indukált apoptózisra (154). Ennek molekuláris hátterét azonban még nem ismerjük.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a GR mitokondriális transzlokációja, ezáltal nem-genomikus hatása, valószínűleg fontos szerepet játszik a thymocyták apoptózisában, habár ennek pontos folyamata még nem teljesen tisztázott. Ugyanakkor más sejtek eltérő reakciója az *in vivo* DX kezelésre felveti annak a lehetőségét, hogy bennük a GR talán más apoptotikus folyamatokat aktivál, esetleg más nem-genomikus folyamatok révén.

2. Célkitűzések

A GC-ok fontos szerepet játszanak az immunsejtek fejlődésében és apoptózisában, azonban a különböző sejtek eltérő mértékű érzékenységgel reagálnak a szteroid kezelésre. A thymocytá alcsoportok közül a DP thymocyták bizonyultak a legérzékenyebbnak a DX-indukált apoptózisra (64). Amelyért a GC-ok nem-genomikus hatásai közül feltehetően az aktivált GR mitokondriumba való transzlokációja és az ennek következtében bekövetkező mitokondriális membránpotenciál csökkenés a felelős (44). A folyamat molekuláris mechanizmusai azonban még nem ismertek.

Munkánk során a GC-ok DP thymocyták apoptotikus folyamatokra gyakorolt hatásait akartuk vizsgálni, különös tekintettel a GR-nak a Bcl-2 fehérjével való interakciójára, illetve a caspase-ok aktivációjára.

1. GR interakciójának vizsgálata Bcl-2 fehérjével DP thymocytákban
2. Bcl-2 fehérjék szubcelluláris eloszlásbeli változásainak megfigyelése rövid idejű DX kezelés hatására
3. Citokróm c citoplazmatikus megjelenésének detektálása
4. Caspase aktiváció kinetikájának jellemzése

Korábban végzett *in vivo* DX kezelés során megfigyeltük, hogy a különböző T sejt alcsoportok eltérő GC-indukált apoptózis érzékenységet mutatnak, a tTreg-ek különösen ellenállónak tűntek a többi sejthez képest (154).

Az ennek hátterében meghúzódó folyamatok azonban még nem ismertek, ezért szeretnénk volna őket alaposabban feltárni.

5. Korai apoptotikus jelek vizsgálata Annexin V segítségével CD4⁺ thymocytákban, tTreg-ekben, CD4⁺ lépsejtekben és pTreg-ekben
6. Caspase aktiváció kinetikájának nyomon követése CD4⁺ thymocytákban és lépsejtekben, valamint Treg-ekben
7. GR és Foxp3 közötti kolokalizáció vizsgálata pTreg-ekben és tTreg-ekben

3. Anyagok és módszerek

3.1 Egerek

A kísérletekhez 4-6 hetes *BALB/c* egereket használtunk. Az állatokat konvencionális körülmények között tartottuk, kereskedelmi forgalomban kapható egértápot és vizet *ad libitum* kaptak. Minden kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság előírásainak megfelelően hajtottuk végre (#BA 02/2000-16/2015). Az egereket a The Jackson Laboratory-tól (Bar Harbor, ME, USA) szereztük be.

3.2 Izolált thymocyták és lépsejtek *in vitro* GC-analóg kezelése

Az egerek feláldozását követően eltávolítottuk thymusukat és lépüket. Ezt követően a szerveket mechanikusan homogenizáltuk RPMI-1640 (RPMI) médiumban (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország), majd a sejteket átszűrtük, hogy a szöveti törmeléktől megszabaduljunk. A sejtszámoláshoz és a sejtek életképességének meghatározásához tripánkék festékkizárásos technikát alkalmaztunk. 5×10^7 thymocytát és lépsejtet kezeltünk (nagy dózisu) 10^{-6} M DX-nal (10^{-2} M törzsoldat dimetil-szulfoxidban feloldva (DMSO, Sigma-Aldrich)) szérum-mentes RPMI-ben 30 percig konfokális mikroszkópiához és ko-immunprecipitációhoz, 1 és 3 óráig Western blothoz, és 0,5, 1, 2, 3, 4 és 6 óráig áramlási citometriához 37°C -on. A kontroll mintákat azonos körülmények között tartottuk, azonos ideig inkubáltuk az oldószer jelenlétében. A GC-analóg kezelést jéghideg PBS-azid (phosphate buffered saline (Molar Chemicals, Budapest, Magyarország), 0,1% Na-azid tartalommal (Sigma-Aldrich)) hozzáadásával állítottuk le.

3.3 Antitestek

Áramlási citometriához a következő antitesteket használtuk: anti-CD4-phycoerythrin-Cyanine5 (PE-Cy5) (RM-4-5 klón), anti-CD4-phycoerythrin (PE) (H129.19 klón), anti-CD8-PE (53-6.7 klón), anti-CD8-PE-Cy5 (53-6.7 klón), anti-CD25-allophycocyanin (APC) (PC61 klón). Mindegyik antitest a BD Pharmingen-től (San Jose, CA, USA) került beszerzésre. Az aktivált, hasított caspase-ok vizsgálatához a következő antitesteket használtuk elsődleges antitestként: nyúl anti-caspase-3 (5A1E klón), nyúl anti-caspase-8 (D2B2 klón) és nyúl anti-caspase-9 (mind a Cell Signaling Technology-tól

(Danvers, MA, USA)), másodlagos antitestként a kecske anti-nyúl IgG-Alexa Fluor 488-t (Abcam, Cambridge, MA, USA) használtuk.

Konfokális mikroszkópiához anti-CD4-Pacific Blue (RM4-5 klón, BD Pharmingen), anti-CD8-Pacific Orange (5H10 klón, Life Technologies, Waltham, MA, USA), anti-GR-fluoreszcein-izotiocianát (FITC) (5E4-B1 klón, intézetünkben kifejlesztett (155)), anti-Foxp3-Alexa Fluor 647 (150D klón, BioLegend, San Diego, CA, USA) valamint nyúl anti-Bak, -Bax, -Bcl-x_L (mind a Santa Cruz Biotechnology-tól (Dallas, TX, USA)) és nyúl anti-Bim (C34C5 klón, Cell Signaling Technology) elsődleges és kecske anti-nyúl IgG-Cyanine3 (Cy3) (Abcam) valamint kecske anti-nyúl IgG-FITC (Sigma-Aldrich) másodlagos antitesteket használtuk.

Az aktivált caspase-ok Western blot vizsgálatához elsődleges antitestként nyúl anti-caspase-3, -8, -9-et (Cell Signaling Technology) 1:1000 hígításban használtuk, másodlagos antitestként anti-nyúl IgG-peroxidázt (PO) (intézetünkben előállított) 1:1000 hígításban. A citokróm c kimutatásához egér anti-citokróm c-t (7H8. 2C12 klón, BD Pharmingen) 1:2000 hígításban és anti-egér-PO-t (intézetünkben előállított) 1:1000 hígításban használtuk. A nyúl anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology) antitestet 1:500 hígításban anti-nyúl-PO-zal 1:1000 hígításban alkalmaztuk. Töltési kontroll vizsgálatához egér anti-β-aktin-t (AC-74 klón, Sigma-Aldrich, 1:5000) és anti-citokróm c-t használtuk anti-egér-PO másodlagos antitesttel.

Immunprecipitációhoz anti-GR-t (8E9 klón, intézetünkben előállított (155)) használtuk. Az immunprecipitált minták Western blot analíziséhez a következő antitesteket használtuk: egér anti-Bcl-x_L (BD Pharmingen) 1:1000 hígításban anti-egér-PO másodlagos antitesttel, nyúl anti-Bak, anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology) és nyúl anti-Bim (Cell Signaling Technology) 1:1000 hígításban anti-nyúl-PO másodlagos antitesttel. Töltési kontroll vizsgálatához anti-GR-t (5E4 klón, intézetünkben előállított (155)) 1:2000 hígításban és anti-egér-PO másodlagos antitestet használtuk.

3.4 Annexin V jelölés

Thymocytákban és lépsejtekben az apoptózis korai kimutatására Annexin V jelölést végeztünk a sejteken. 10⁶ kontroll és DX kezelt sejt sejtfelszíni anti-CD4-PE, anti-CD8-PE-Cy5 és anti-CD25-APC jelölését jelölőpufferben ((PBS, 0,1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich), 0,1% Na-azid (Sigma-Aldrich)) végeztük, majd ezt követően a sejteket Annexin V jelölőpufferben (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl és 2,5

mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich)), mostuk meg. Aztán a sejteket 100 µl Annexin V jelölöpufferben vettük fel és mintánként 5 µl Annexin V-FITC-et (BD Pharmingen) adtunk hozzájuk. A sejteket 15 percig, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 400 µl jelölöpufferrel egészítettük ki, végül a mintákat áramlási citométerrel analizáltuk.

3.5 Mitotracker chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros) jelölés konfokális

mikroszkópiára

A Mitotracker chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros, Invitrogen, Waltham, MA, USA) egy fluorescens festék, ami a mitokondriumok jelölésére alkalmas. Lipofilitásának köszönhetően átdiffundál a membránokon és akkumulálódik az aktív mitokondriumokban (156). 10⁶ thymocytát inkubáltunk 1 ml szérum-mentes RPMI-ben, amihez 10 µl CMX-Ros törzsoldatot (1µg/ml DMSO-ban) adtunk, 30 percig 37°C-on. A CMX-Ros jelölést a DX kezelés utolsó 30 percében kezdtük el, így a kezelés és a jelölés ideje egyszerre járt le. Az inkubáció után a sejteket tovább jelöltük konfokális mikroszkópos vizsgálatra. Konfokális mikroszkópiához sejtfelszíni anti-CD4-Pacific Blue, anti-CD8-Pacific Orange és intracelluláris nyúl anti-Bax és anti-nyúl IgG-FITC jelölést végeztünk. A jelölés menete ugyanaz volt, ahogy az a 3.6-os részben leírva olvasható. A jelölést követően a sejteket cytospin segítségével tárgylemezre centrifugáltuk, majd lefedtük PromoFluor Antifade Reagent-el (PromoCell, Heidelberg, Németország).

3.6 Jelölés konfokális mikroszkópiára

30 perc DX kezelést követően sejtfelszíni jelölést végeztünk anti-CD4-Pacific Blue és anti-CD8-Pacific Orange antitestekkel jelölöpufferben, ezt követően a sejteket fixáltuk 4% paraformaldehid oldatban 20 percig, majd megmostuk őket permeabilizáló pufferben (PBS, 0,1% BSA, 0,1% Na-azid és 0,1% szaponin (Sigma-Aldrich)). Az intracelluláris jelölést a permeabilizáló pufferben végeztük, nyúl anti-Bak, -Bax, -Bcl-x_L, és -Bim elsődleges antitestekkel, majd anti-nyúl IgG-Cy3 másodlagos antitesttel, végül 1µg/ml anti-GR-FITC antitesttel. A sejteket minden alkalommal 1 órát inkubáltuk az antitestekkel, amit aztán mosás követett a permeabilizáló pufferben. A jelölés végén a mintákat kétszer megmostuk a szaponin pufferrel, majd egyszer PBS-ben. Végül a sejteket cytospin segítségével tárgylemezre centrifugáltuk és lefedtük PromoFluor Antifade Reagent-el.

3.7 GR-Foxp3 interakció vizsgálata konfokális mikroszkópiával

Az előzőleg negatívan szeparált CD4 pozitív (EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit, StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada) thymocytaikat és lépsejteket tovább szeparáltuk pozitívan CD25-re (EasySep Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit, StemCell Technologies). A sejteket 30 perc DX kezelést követően használtuk fel konfokális mikroszkópiára a GR-Foxp3 interakció vizsgálata érdekében. A sejteket 30 percig jelöltük jelölőpufferben anti-CD4-Pacific Blue antitesttel. Majd az intracelluláris jelölést anti-GR-FITC és anti-Foxp3-Alexa Fluor 674-tel Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. Röviden, a sejteket először 30 percig jégen inkubáltuk a fixáló és permeabilizáló pufferben, majd megmostuk a mosópufferrel. Mosás után az antitesteket 100 µl mosópufferben hígítva adtuk a sejtekhez, 30 percig jégen inkubáltuk a mintákat, majd újabb mosás következett a mosópufferrel, végül a sejteket FACS-Fixben (Sigma-Aldrich) vettük fel, és cytospin segítségével tárgylemezre centrifugáltuk őket. A mintákat PromoFluor Antifade Reagent-el fedtük le.

3.8 Konfokális mikroszkópia

A minták vizualizálása és analízise Olympus Fluoview 300 konfokális mikroszkóppal (Olympus, Shinjuku, Tokió, Japán) történt, a Olympus Fluoview FV1000S-IX81 Image Acquisition Software System (Olympus) segítségével. Az adatokat a következő csatornában gyűjtöttük; differenciál interferencia kontraszt (DIC), UV közeli csatornában a CD4-et (Pacific Blue) virtuális vörösben a CD8-at (Pacific Orange), FITC csatornában a GR-t (FITC), vörös csatornában a Bak, Bax, Bcl-x_L és Bim (Cy3) fehérjéket, illetve másik kísérleti elrendezésben a vörös csatornában a mitokondriumokat (CMX-Ros) és a FITC csatornában a Bax-ot (FITC). A GR-Foxp3 interakció vizsgálatakor: differenciál interferencia kontraszt (DIC), UV közeli csatornában a CD4-et (Pacific Blue), FITC csatornában a GR-t (FITC), és távoli vörös csatornában Foxp3 (Alexa Fluor 647). A képek készítése során szekvenciális pásztázási módot használtunk. A jeleket 3-3 látótérben gyűjtöttük és a Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim fehérjék és a GR, valamint a Bax-CMX-Ros (mitokondrium) közötti, továbbá a GR-Foxp3 közötti kapcsolatot, kolokalizációt,

analizáltuk ImageJ szoftver co-localisation plug-in-ja segítségével (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). A kolokalizációt az eredeti, nem módosított képeken vizsgáltuk. A pixel fluoreszcencia intenzitás 0 és 255 között változhat ezért, hogy a specifikus jelet a háttértől elkülönítsük 50-es küszöbértéktől értékeltük az adatokat (157,158). 100 kontroll és 100 DX kezelt sejtből elemeztük a kolokalizált pixeleket a Cy3-GR, a CMX-Ros-Bax és a GR-Foxp3 között. A reprezentatív képek világosságát és kontrasztját Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc, San Jose, California) programmal módosítottuk.

3.9 Aktivált caspase-ok jelölése áramlási citometriára

10^6 thymocytát és lépsejtet kezeltünk DX-nal 0,5, 1, 2, 3 és 6 óráig. A sejtfelszíni jelölést anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-PE és anti-CD25-APC segítségével végeztük. A sejteket 30 percig inkubáltuk jelölőpufferben, majd az intracelluláris jelölést a 3.6-os részben leírtak szerint végeztük. Elsődleges antitestként nyúl anti-caspase-3, -8, -9-et használtunk, másodlagosként pedig anti-nyúl IgG-Alexa Fluor 488-at. A jelölést követően a mintákat áramlási citométerrel analizáltuk.

3.10 Áramlási citometria

A mintákat FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) áramlási citométerrel és a CellQuest Pro (Becton Dickinson) programmal mértük le és analizáltuk. Thymocyta és lépsejt szubpopulációkat külön analizáltuk a sejtfelszíni CD4, CD8 és CD4 és CD25 együttes expressziójuk alapján. A populációkban az Annexin V-FITC-et és Alexa Fluor 488-at az FL1 csatornában detektáltuk. Fluoreszcencia hisztogramok segítségével határoztuk meg a különböző mintákban az aktív caspase-3, -8, -9-et expresszáló sejtek (Alexa Fluor 488 pozitív sejtek), illetve az Annexin V pozitív sejtek arányát.

3.11 Szubcelluláris frakcionálás

Thymocytákból mitokondriális, citoplazmatikus és nukleáris frakciók izolálásához Mitochondrial Isolation Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtunk, követve a gyári előírásokat, kisebb módosításokkal (159). Röviden; az izolált thymocytákat DX kezelést követően megmostuk hideg PBS-aziddal, majd lizáltuk őket. Először 10 percig 800g-vel centrifugáltuk a mintákat, hogy a nukleáris pelletet elválasszuk. A poszt-nukleáris

szupernatánst 15 percig 3000g-vel centrifugáltuk, és az így kapott felülúszót használtuk citoplazmatikus frakcióként. A pelletet megmostuk, majd 5 percig 12 000g-vel centrifugáltuk. Az így kapott pelletet használtuk mitokondriális frakcióként. A citoplazmatikus és mitokondriális frakciókat vagy közvetlenül Western blotra használtuk, vagy immunprecipitációra. Western blotra a mintákat SDS (sodium dodecyl sulfate) mintapuffer ((125 mM Tris, 4% SDS, 10% 2-merkaptotanol, 0,006% brómfenolkék (Sigma-Aldrich) és 10% glicerin (Molar Chemicals)) hozzáadása után 10 percig forraltuk. Immunprecipitációhoz a mitokondriális pelletet tovább lizáltuk TEGM lízis pufferben (10 mM Tris base, 4 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 50 mM NaCl, 20 mM nátrium-molibdát (Molar Chemicals), 10% glicerin, pH 7,6, frissen kiegészítve proteáz inhibitorral és Na-ortovanadáttal (Sigma-Aldrich)). A mintákat 5 alkalommal fagyasztottuk le, majd olvasztottuk fel, cseppfolyós nitrogénben, ezt követően 30 percig jégen inkubáltuk, majd 10 percig 13 000 rpm-el centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk fel immunprecipitációhoz.

3.12 Immunprecipitáció

A citoplazmatikus és mitokondriális frakciókat a precipitáló antitesttel, anti-GR (8E9 klón), egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on, folyamatos forgatás mellett blokkoló pufferben ((10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4, 10% BSA (Sigma-Aldrich)). Másnap Protein-G-t (Santa Cruz Biotechnology) adtunk a mintákhoz és további 2 órán át forgattuk őket. Ezt követően a mintákat ötször megmostuk PBS-ben, majd a Protein-G-ről az immunkomplexeket 3 percig SDS mintapufferben való forralással távolítottuk el, centrifugálást követően a felülúszót használtuk fel a Western blotra.

3.13 Western blot

A mitokondriális és citoplazmatikus frakciókkal, SDS mintapufferben való forralás után, SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk 10 vagy 15%-os géllal. A géleket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) blottoltuk 2 órán keresztül Mini Trans-Blot Cell blotting segítségével (Bio-Rad). A nitrocellulóz membránokat ezt követően blokkoló pufferrel inkubáltuk (2% BSA vagy 1% tejpor (Bio-Rad), 10 mM Tris, 100 mM NaCl és 0,1% Tween 20 (Molar Chemicals), pH 7,4), majd az elsődleges antitesteket adtuk hozzá; anti-caspase-3, -8, -9 és anti-Bax, az immunprecipitált

minták esetében: anti-Bak, -Bax, -Bcl-x_L, -Bim és anti-GR. A blotok töltési kontroll vizsgálatát anti-β-aktin és anti-citokróm c antitestek segítségével végeztük, hogy a minták tisztaságát és egyenlő mennyiségét ellenőrizzük. A blotokat ezt követően a megfelelő másodlagos antitesttel inkubáltuk; anti-egér-PO vagy anti-nyúl-PO. A mintákat Western blot mosópufferben mostuk (10 mM Tris, 100 mM NaCl és 0,1% Tween 20 (pH 7,4) az antitestekkel való inkubációk között és a másodlagos antitest után. A blotok vizualizálásához kemilumineszcens módszert használtunk (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Thermo Fischer Scientific) a gyártó utasításai szerint. A jelet Fujifilm LAS 4000 Blot Documentary System (Fujifilm Corporation, Tokió, Japán) segítségével detektáltuk.

3.14 Blotok analízise

A blotok denzitometriás analízisét az Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) segítségével végeztük. A caspase-ok és a citoplazmatikus Bax relatív denzitását a β-aktin denzitásához, a mitokondriális Bax relatív denzitását a citokróm c denzitásához viszonyítottuk. Az immunprecipitáció után végzett Western blotok esetében Bim, Bak, Bcl-x_L denzitása a GR denzitásához volt normalizálva. Az adatokat az eredeti, nem módosított képek felhasználásával kaptuk. A reprezentatív képek világosságát és kontrasztját módosítottuk Adobe Photoshop CS6 program segítségével.

3.15 Statisztikai analízis

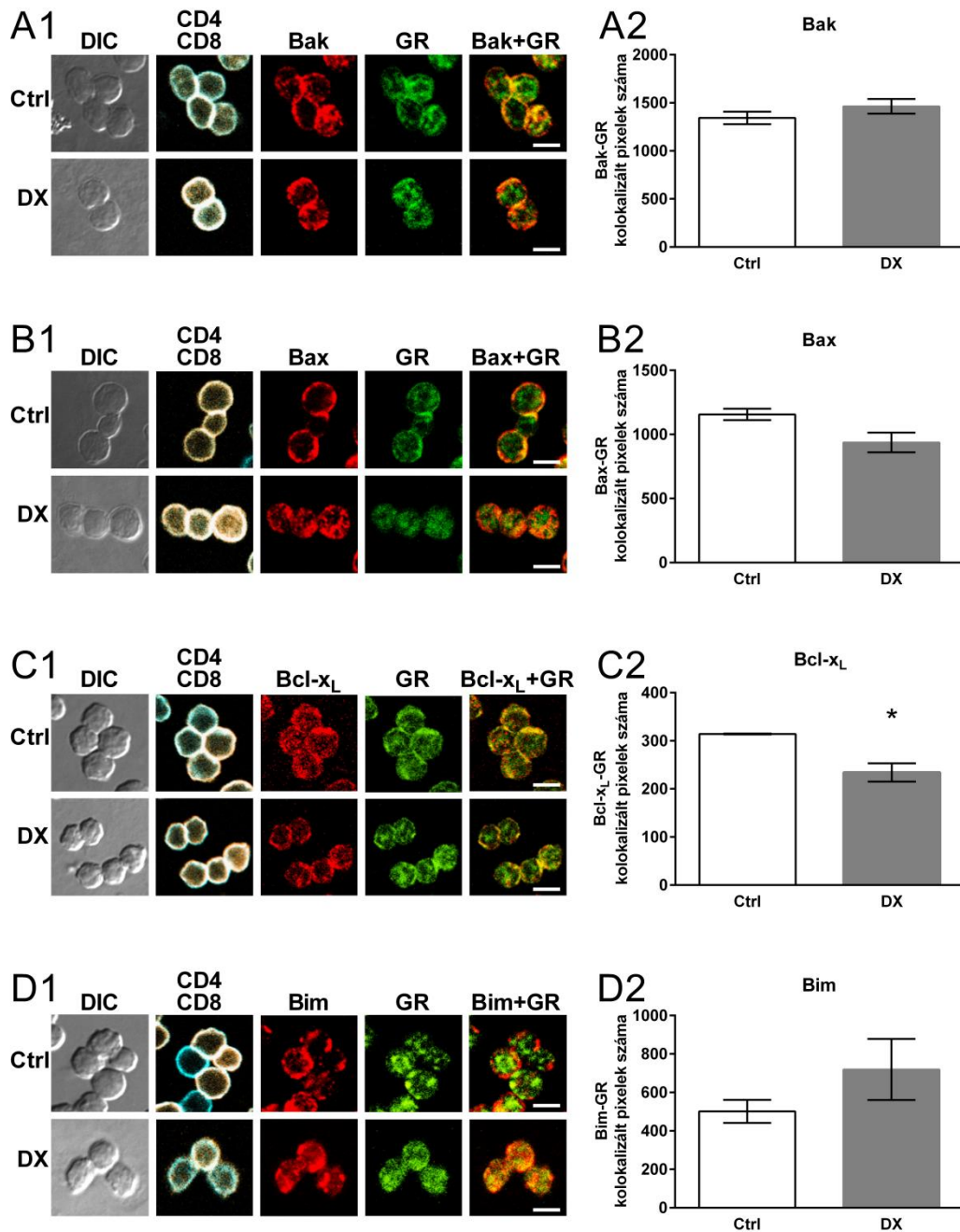
GraphPad Prism (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA) programot használtuk az ábrák készítéséhez és a statisztikai analízis, Student-féle *t* próba, elvégzéséhez. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat mint átlag ± SEM ábráztuk.

4. Eredmények

4.1 DX indukálta változások a GR és a Bcl-2 fehérjecsald tagjainak kolokalizációjában

Korábbi tanulmányok, beleértve mások és a mi munkacsoportunk munkáját, kimutatták a Bcl-2 fehérjék, elsősorban a Bax, Bak és Bim fontosságát a DX-indukált apoptózisban (147–151). Munkánk során, egy TcR transzgenikus modellben, mi is megfigyeltük, hogy azokban DP thymocytákban, amelyek túléltek a T sejt szelekciót, up-regulálódott a Bcl-2 fehérje szintje (43). Továbbá azt is bizonyítottuk, hogy DP thymocytákban 30 perces *in vitro* GC expozíció hatására az aktiválódott GR a mitokondriumba transzlokálódott, és ezt a transzlokációt a mitokondrium membránpotenciáljának csökkenése kísérte (44), mely arra utalt, hogy a nem-genomikus hatások és a mitokondriális apoptotikus útvonal együttesen fontos szerepet játszanak a thymocyták GC-indukált apoptózisában.

Ezért ezen előzetes eredményekből kiindulva, jelen munkánk során azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy az aktivált GR-nak potenciális molekuláris partnereket kerestünk, amelyek szerepet játszhatnak a mitokondriális, intrinsic, apoptotikus útvonalban a GC-indukált apoptózis során. Ehhez megvizsgáltuk a lehetséges fehérje interakciókat a GR és a Bcl-2 fehérjecsald egyes tagjai között. Ezek a fehérjék felelősek a mitokondrium membránpotenciáljának szabályozásáért (160). A hipotézisünk teszteléséhez megvizsgáltuk a GR és a Bak, Bax, Bcl-x_L és a Bim kolokalizációját kontroll és 30 percig nagy dózisú DX-nal kezelt DP thymocytákban konfokális mikroszkóp segítségével (10. ábra). Megfigyeltük, hogy a GR bizonyos mértékig kolokalizálódott mind a négy vizsgált Bcl-2 fehérjével (10. ábra A1-D1). Viszont az asszociáció mértéke és annak változása DX kezelés hatására eltérő volt a különböző Bcl-2 fehérjék esetében. A DX kezelés hatására a GR-Bak asszociáció minimális változását mutatott (10. ábra A1), a GR-Bax, GR-Bcl-x_L asszociáció csökkent (10. ábra B1-C1), egyedül a GR-Bim asszociáció mutatott emelkedést (10. ábra D1).



10. ábra GR és a Bcl-2 fehérjék; Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim kolokalizációja DP thymocytákban

A reprezentatív konfokális mikroszkópos képeken a GR-Bak (A1), GR-Bax (B1), GR-Bcl-x_L (C1) és a GR-Bim (D1) kolokalizáció látható kontroll (Ctrl) és 30 percig DX-nal kezelt sejtekben. A következő csatornákból származó képek láthatóak; DIC, CD4 (kék csatorna) és CD8 (virtuális vörös csatorna) egymásra vetítve, intracellulárisan GR (zöld csatorna) és Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim (vörös csatorna). A GR és a Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim fehérjék kolokalizációját az egymásra vetített képeken a sárga területek jelzik. Az oszlopdiagramok (A2-D2) a GR és a Bcl-2 fehérjék kolokalizációjának kvantifikálásával készültek, az oszlopok a kolokalizált pixelek számát jelenítik meg. Az átlagokat ± SEM legalább három független kísérletből, kezelésként 100 DP sejt eredményeiből számítottuk. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$) (rövidítések: DIC: differenciál interferencia kontraszt, GR: glukokortikoid receptor)

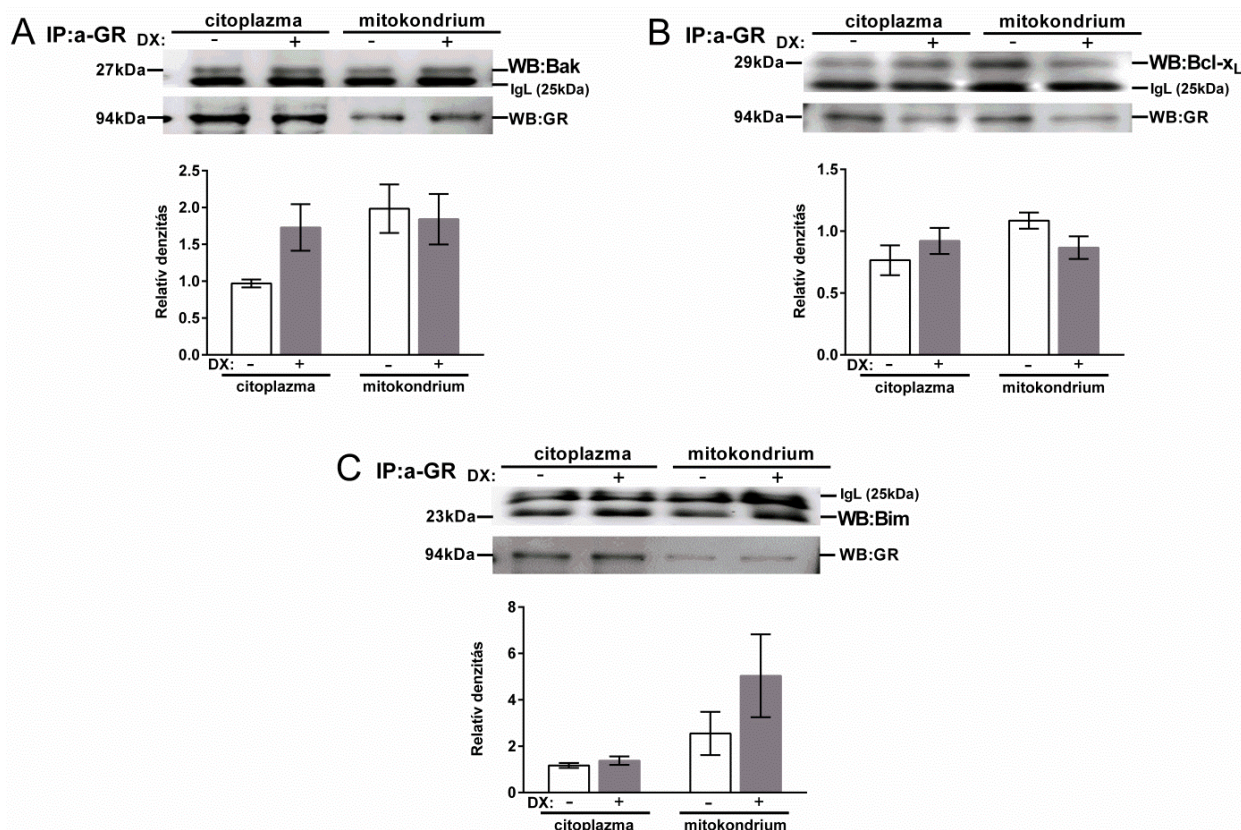
A kolokalizáció mértékének kvantifikálásához meghatároztuk és összehasonlítottuk a kolokalizált pixelek számát a kontroll és a 30 percig DX-nal kezelt DP thymocytákban. DX kezelést követően a kolokalizált pixelek száma minimálisan változott a GR és Bak között (1463 ± 76 versus 1342 ± 65 a kontrollban) (10. ábra A2), enyhén csökkent a GR és a Bax esetében (937 ± 77 versus 1156 ± 44 a kontrollban) (10. ábra B2). A GR és a Bcl-x_L kolokalizációja szignifikánsan csökkent DX kezelés hatására (234 ± 19 versus 314 ± 1 a kontrollban) (10. ábra C2). Továbbá jelentős emelkedést figyeltünk meg a GR és a Bim kolokalizációjában 30 perc DX kezelést követően (719 ± 159 versus 501 ± 60 a kontrollban) (10. ábra D2), amely azonban nem volt statisztikailag szignifikáns.

4.2 A GR interakciója a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival a thymocyták citoplazmájában és mitokondriumában

A konfokális mikroszkóppal kapott eredményeinket megerősítendő megvizsgáltuk a GR és a Bcl-2 fehérjecsald tagjai; a Bak, Bax, Bcl-x_L és a Bim fehérjék interakcióját ko-immunprecipitációs kísérletekben. Ezekben a kísérletekben a precipitációhoz anti-GR antitestet használtunk. Azt is vizsgálni akartuk, hogy a DX kezelés okoz-e valamilyen változást a GR-Bcl-2 fehérje komplexek szubcelluláris eloszlásában. Hogy ezt kiderítsük szubcelluláris frakcionálást végeztünk és izoláltuk szeparátlan, kontroll és 30 percig DX-nal kezelt thymocyták citoplazmáját és mitokondriumát. (A immunprecipitációs és Western blot-os kísérleteinkben használt thymocyták nem voltak szeparálva sejtfelszíni CD4/CD8 expressziójuk alapján, azonban a 3-4 hetes *BALB/c* egerek thymocytáinak 70-80%-a DP thymocytá (161), ezért az eredményeink jól reprezentálják a DP sejtekben zajló folyamatokat.)

A szubcelluláris frakcionálást követően anti-GR antitest segítségével immunprecipitációt végeztünk. A mintákat ezt követően tovább vizsgáltuk Western blottal, hogy megállapítsuk az anti-GR-ral koprecipitálódott Bcl-2 fehérjecsald elemeit. Az eredmények számszerűsítéséhez denzitometriás kvantifikációt végeztünk; a Bcl-2 család fehérjéinek mennyiségét összehasonlítottuk a kezeletlen és DX kezelt mintákban. A reprezentatív kísérleti eredményeink a 11. ábrán láthatóak. A ko-immunprecipitációs kísérletek megerősítették a konfokális mikroszkóppal kapott eredményeinket; a GR asszociálódott a Bak, Bim, Bcl-x_L fehérjékkel, az asszociációjuk mind a citoplazmatikus mind a mitokondriális frakcióban megfigyelhető volt a kezelt és kezeletlen thymocytákban

egyenként (11. ábra A, B, C). Egyedül a Bak nem mutatott direkt asszociációt a GR-ral sem a citoplazmatikus, sem a mitokondriális frakcióban (eredményt nem tüntettük fel).



11. ábra GR asszociációja a Bcl-2 fehérjékkel thymocytaiban

Anti-Bak (A), -Bcl-x_L (B) és -Bim (C) Western blotok thymocytaiban citoplazmatikus és mitokondriális frakciójából anti-GR antitesttel történő precipitáció után, DX kezelés előtt és azt követően. Töltési kontroll vizsgálatot anti-GR antitesttel végeztünk.

Az ábrán reprezentatív blotok láthatóak, a denzitometriás adatok legalább három független kísérletből kalkuláltak. Az oszlopdiagramok a Bak, Bcl-x_L és a Bim relatív denzitását mutatják a citoplazmában és a mitokondriumban, mindkét esetben GR denzitására normalizálva. Az oszlopok az átlag relatív denzitásokat ± SEM mutatják

(rövidítések: IgL: immunglobulin könnyű lánc, IP: immunprecipitáció, a-GR: anti-glukokortikoid receptor antitest, WB: Western blot)

A Bak koprecipitálódott a GR-ral és DX kezelést követően a Bak-GR koprecipitáció mértéke megemelkedett a citoplazmatikus és kis mértékben a mitokondriális frakcióban is (11. ábra A). Megfigyeltük a Bim és a Bcl-x_L, valamint a GR koprecipitációját is (11. ábra B, C).

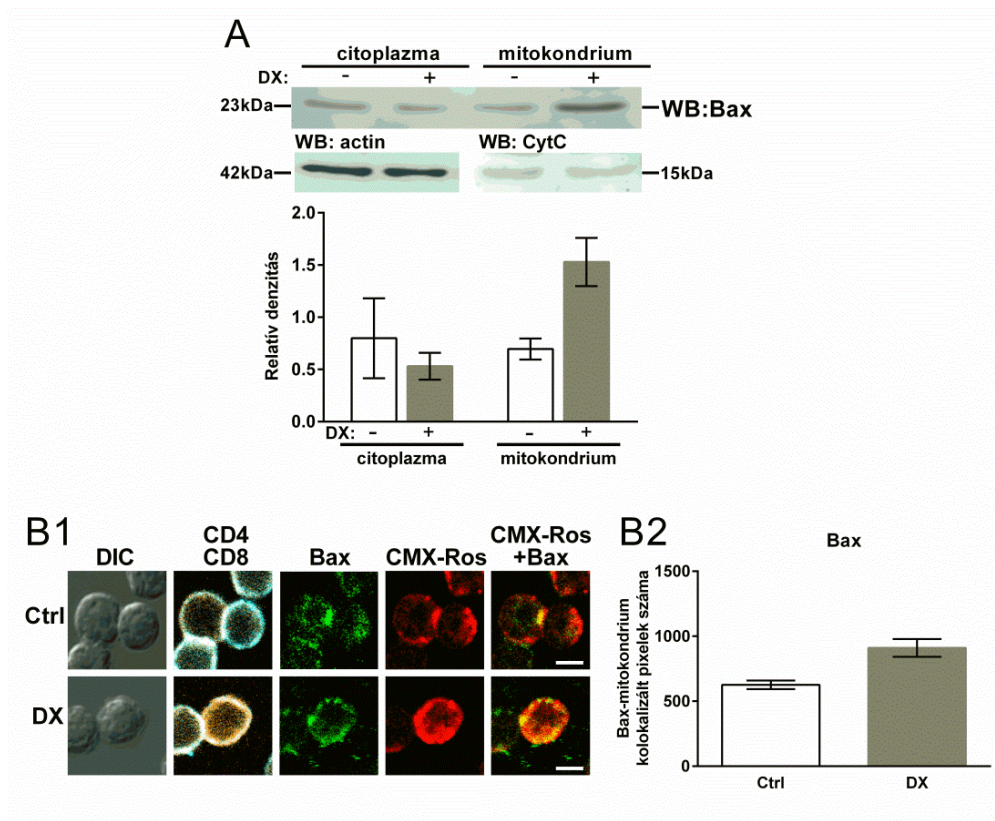
A GR-Bcl-x_L koprecipitáció mértéke emelkedett a citoplazmatikus és csökkent a mitokondriális frakcióban a kontrollhoz képest.

A GR-Bim asszociáció csak minimálisan változott a citoplazmatikus frakcióban, viszont jelentősen emelkedett a mitokondriálisban. A Bim jelentős mitokondriális felhalmozódása jelezheti potenciális szerepét a GC-indukált thymocytá apoptózis mitokondriális (intrinsic) apoptotikus útvonalában.

4.3 A DX kezelés a Bax akkumulációját okozza a mitokondriumban

A Bax a mitokondriális apoptotikus útvonal egy kulcsfontosságú pro-apoptotikus fehérjéje. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a Bax állandó körforgást mutat a mitokondrium és citoplazma között (162), illetve hogy fontos szerepet játszik a Bak-kal együtt a GC-indukált apoptózisban (147–149). A Bax esetében nem tudtuk megerősíteni a konfokális mikroszkóppal kapott kolokalizációs eredményeket ko-immunprecipitációval.

Ezért ko-immunprecipitáció nélkül vizsgáltuk meg, hogy a nagy dózisu DX kezelés okoz-e változást a Bax citoplazmatikus és mitokondriális eloszlásában. Megfigyeltük, hogy a Bax DX kezelésre akkumulálódott a thymocyták mitokondriális frakciójában 30 perc DX kezelést követően (12. ábra). Ezt az eredményt sikerült konfokális mikroszkóppal is megerősítenünk (12. ábra B1), a Bax-CMX-Ros kolokalizálódott pixelek száma megemelkedett a DX kezelést követően (910 ± 68 versus 626 ± 33 a kontrollban) (12. ábra B2).



12. ábra Bax szubcelluláris eloszlása thymocytákban DX kezelés hatására

A: Western bloton látható a Bax DX-indukált mitokondriális redisztribúciója. A blotok töltési kontroll vizsgálatát anti- β -aktin és anti-citokróm c segítségével végeztük. Egy reprezentatív blotot mutatunk be az ábrán, a denzitometriás adatokat legalább három független kísérletből számítottuk. Az oszlopdiagramok a Bax relatív denzitását mutatják a citoplazmában (β -aktin-ra normalizálva) és a mitokondriumban (citokróm c-re normalizálva). Az oszlopok az átlag relatív denzitásokat \pm SEM mutatják.

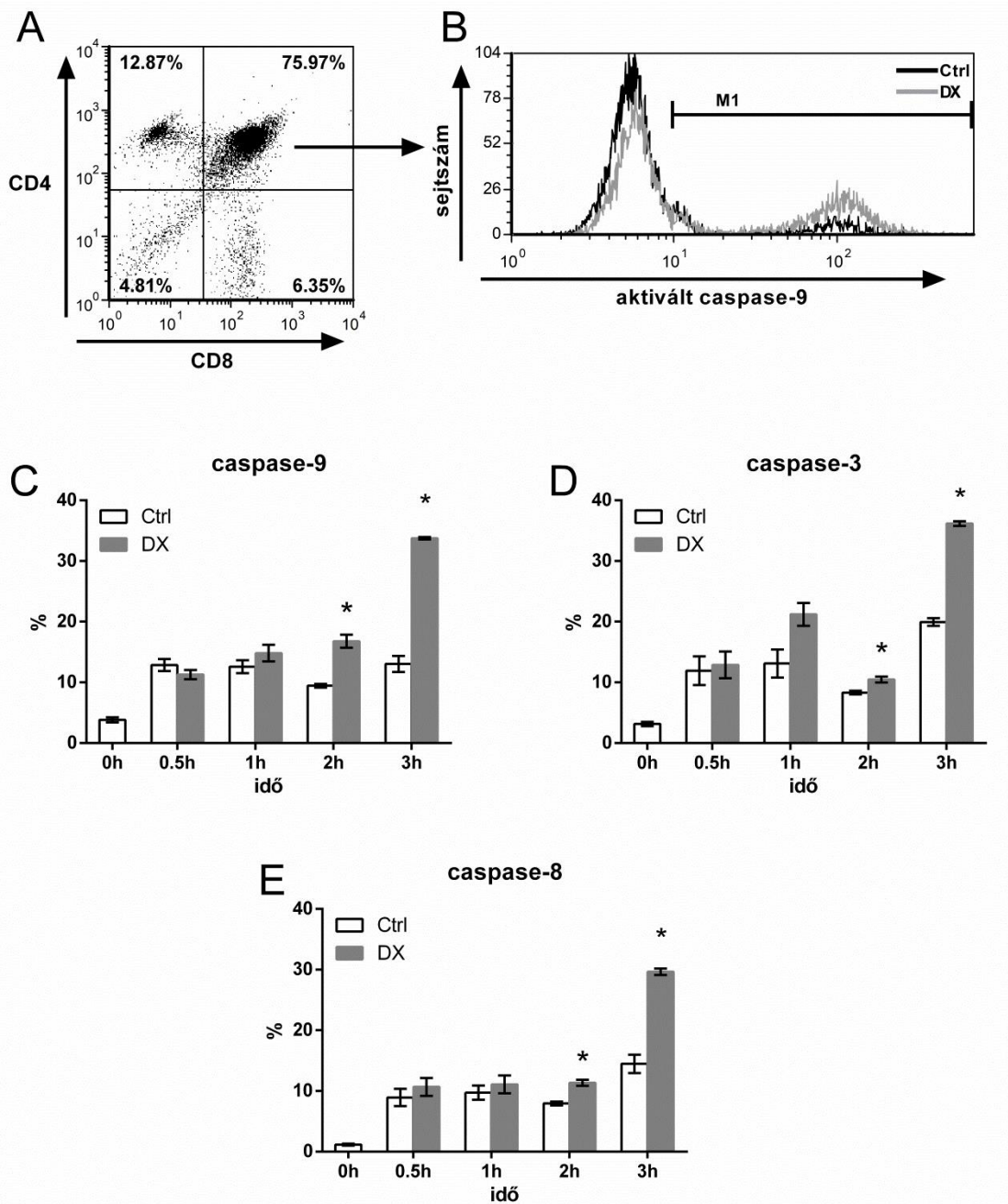
B: A Bax mitokondriális transzlokációja DP thymocytákban. B1: Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek, melyek a CMX-Ros-Bax kolokalizációt mutatják kontroll és 30 percig DX-nal kezelt sejtekben. A következő csatornákból származó képek láthatóak; DIC, CD4 (kék csatorna) és CD8 (virtuális vörös csatorna) egymásra vetítve, intracellulárisan mitokondrium (CMX-Ros, vörös csatorna) és Bax (zöld csatorna). A mitokondrium és a Bax kolokalizációját a sárga területek jelzik. Az oszlopdiagram (B2) a mitokondrium és a Bax fehérjék kolokalizációjának kvantifikálásával készültek, az oszlopok a kolokalizált pixelek számát jelenítik meg. Az átlagokat \pm SEM legalább három független kísérletből, kezelésenként 100 DP sejt eredményeiből számítottuk (rövidítések: WB: Western blot, CMX-Ros: chloromethyl-X-rosamine)

4.4 A caspase-ok aktivációjának kinetikája DP thymocytákban

Korábban knock-out (KO) modelleken végzett vizsgálatok bizonyították az intrinsic apoptotikus útvonal fontosságát a GC-indukált thymocyta apoptózisban (163,164). Más eredmények inkább a caspase-8 és az extrinsic apoptotikus útvonal fontosságát hangsúlyozták (165,166). A munkacsoportunk korábbi munkája során megfigyelte a GR

mitokondriumba való transzlokációját, melyet a mitokondriális membránpotenciál csökkenése kísért (44), ez az eredmény inkább a mitokondriális, intrinsic, apoptotikus útvonal fontosságát sugallja a rövid idejű, nagy dózisú GC-kezelés által indukált thymocytá apoptózisban.

Ezért, hogy a többi thymocytá alcsoporttól függetlenül, csak a DP thymocytákban tudjuk megvizsgálni a caspase-ok aktivációját DX kezelést követően áramlási citometriás méréseket végeztünk. Megfigyeltük a caspase-3, -8, -9 aktivációját 30 perc, 1, 2, és 3 óra DX kezelést követően a DP thymocytákban (13. ábra). Az aktivált, hasított caspase-9-et tartalmazó sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett 2 és 3 óra DX kezelést követően (13. ábra C). Az aktivált caspase-3-at tartalmazó DP sejtek aránya már 1 óra kezelést követően emelkedett, és 2, 3 óra DX kezelést követően ez az arány már szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest (13. ábra D). A caspase-9 és caspase-3 aktivációja DX kezelést követően az intrinsic apoptotikus útvonal aktivációját jelzi. Az aktív caspase-8-at tartalmazó DP sejtek aránya 30 perc és 1 óra DX kezelést követően enyhén emelkedett, és ez emelkedés szignifikánssá vált 2 és 3 óra kezelést követően, hasonló tendenciát mutatva a caspase-9 aktivációjához (13. ábra E). A caspase-9 aktivációban megfigyelhető változások kifejezettebbnek tűnnek, mint a caspase-8 esetében 2 és 3 óra DX kezelést követően, ami a caspase-9 fontosabb szerepét jelzi a DX-indukált thymocytá apoptózisban.



13. ábra Caspase-ok aktivációjának áramlási citometriás vizsgálata DP thymocytaiban

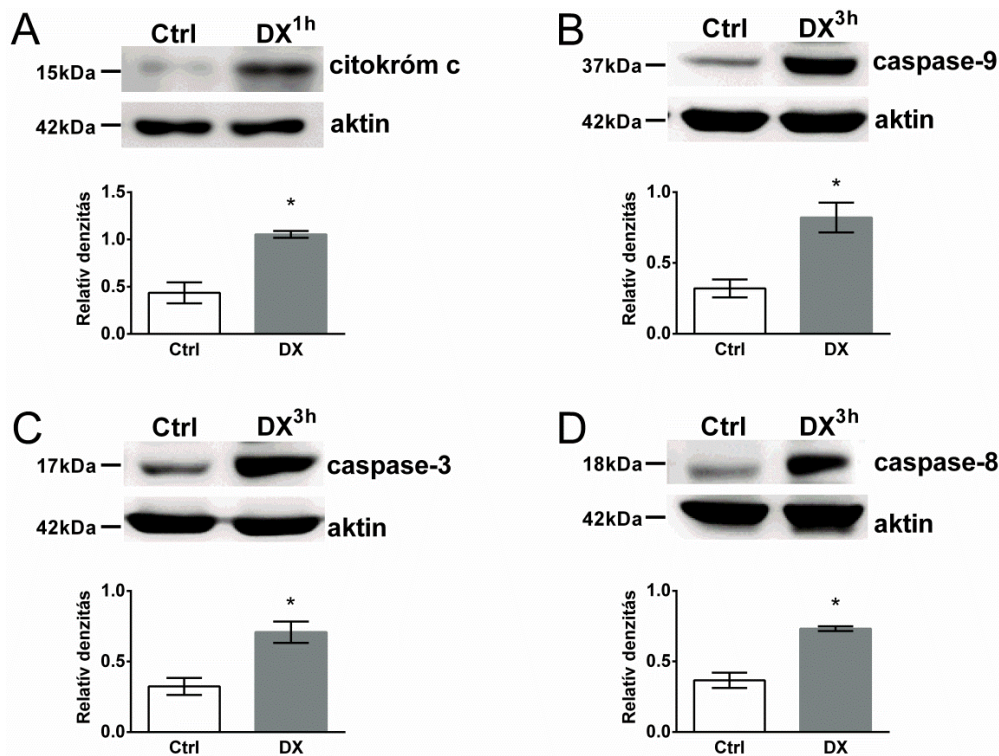
A: A thymocyta szubpopulációkat a CD4/CD8 expressziójuk alapján különítettük el. B: Hisztogram mutatja az aktív caspase-9-et tartalmazó DP thymocyta százalékos arányát 3 óra DX kezelés előtt és után. Oszlopdiagramok legalább három független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják.

Az oszlopok az aktív caspase-9 (C), -3 (D), -8 (E)-at tartalmazó DP sejtek százalékos arányát mutatják kontroll és 30 perctől 3 óráig DX-nal kezelt mintákban. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$)

4.5 DX-indukált caspase aktiváció és citokróm c felszabadulás thymocyták citoplazmájában

Az áramlási citometriás eredmények megerősítése érdekében az aktivált caspase-okat megvizsgáltuk Western blottal szeparálatlan thymocyták citoplazmájában 3 óra DX kezelést követően, amely időpontnál a legmagasabb mértékű aktivációt figyeltük meg áramlási citometriával (13. ábra). *In vitro* DX kezelt és kezeletlen thymocyták sejtlizátumában összehasonlítottuk az aktív caspase-3, -8, -9 és citokróm c szinteket (14. ábra). A citokróm c citoplazmába való felszabadulását 1 óra DX kezelést követően vizsgáltuk.

Egy óra, nagy dózisú DX kezelés szignifikáns emelkedést okozott a citokróm c citoplazmatikus szintjében (14. ábra A). Megfigyeltük az aktív caspase-9, -3 szintek szignifikáns emelkedését (14. ábra B, C) a kontrollhoz képest 3 óra DX kezelést követően. Ezeknek a caspase-oknak az aktivációja jelzi a mitokondriális (intrinsic) apoptotikus útvonal aktivációját. Érdekes módon az extrinsic útvonal iniciátor molekulája, a caspase-8 aktivációja is szignifikánsan emelkedett a DX kezelés hatására (14. ábra D), ami egyrészt jelezeti a két fő apoptotikus útvonal közötti cross-talk lehetőségét, másrészt felvetheti más apoptotikus útvonal részvételét is a GC-indukált thymocytá apoptózisban.



14. ábra Thymocytákban citokróm c felszabadulás a mitokondriumból és caspase-ok aktivációja DX kezelés hatására

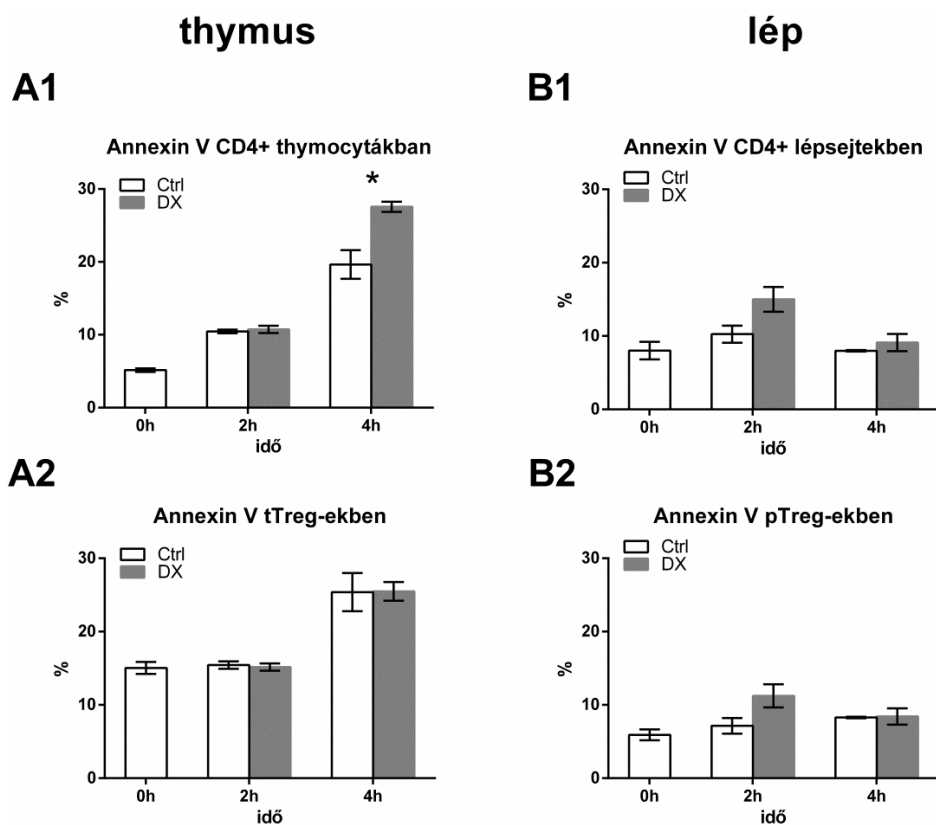
A citokróm c citoplazmatikus jelenlétét és az aktivált caspase-okat Western blot segítségével mutattuk ki thymocyták lizátumából. A blotok töltési kontroll vizsgálatát β -aktin-nal végeztük. Az ábrán reprezentatív blotok láthatóak. Az oszlopdiagramok a citokróm c és a caspase-ok β -aktin-ra normalizált denzitását mutatják be kontroll és DX kezelt mintákban, a denzitásokat legalább három független kísérletből számítottuk. Az oszlopok az átlagokat \pm SEM mutatják. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$)

4.6 Annexin V vizsgálata CD4⁺ T sejtekben és regulatórikus T sejtekben

Korábbi munkánk során, ahol DX-nal *in vivo* kezelt egerek nyirokszerveinek sejtes összetételében bekövetkező változásokat vizsgáltuk, azt találtuk, hogy amíg thymusban a tTreg-ek bizonyos mértékig rezisztensnek bizonyultak a DX-indukált apoptózissal szemben, addig a lépben a pTreg-ek aránya a többi lépsejthez hasonlóan csökkent (154). Mindezek azt a gondolatot vetik fel, hogy egyrészt a CD4⁺ T sejtek és a Treg-ek a DP thymocytákhoz képest másképp reagálnak a GC-indukált apoptózisra, valamint, hogy a tTreg-ek és a pTreg-ek túlélésében megfigyelhető különbségek a sejtek eltérő GC-indukált apoptózis érzékenységre utalhatnak. Ezért megvizsgáltuk a korai apoptotikus folyamatokat mind thymus, mind lép eredetű CD4⁺ T sejtekben és Treg-ekben.

Sejtfelszíni CD4, CD8, CD25 jelölés után Annexin V jelölést végeztünk thymocytákon és lépsejteken kezelés előtt és 0, 2 és 4 óra DX kezelés után (15. ábra). Így

külön tudtuk vizsgálni a thymus eredetű CD4⁺ T sejteket, Treg-eket, illetve a lép eredetű CD4⁺ T sejteket és Treg-eket. A thymus eredetű CD4⁺ T sejtekben 4 óra DX kezelést követően szignifikánsan megemelkedett az Annexin V pozitív sejtek aránya. A tTreg-ek esetében még 4 óra elteltével sem figyeltük meg a DX apoptózis indukáló hatását (15. ábra A1-A2). A lép eredetű CD4⁺ T sejteknél már kettő óránál emelkedett az Annexin V pozitív sejtek aránya, 4 óránál az emelkedés továbbra is fennállt, habár kisebb mértékű volt. A pTreg-ek esetében szintén kettő óránál láttunk emelkedést, 4 óránál a kezelt és a kezeletlen mintában nem volt kimutatható különbség (15. ábra B1-B2). Érdekes, hogy a kontrol CD4⁺ thymocytákban és a tTreg-ekben is emelkedik 4 óra után az Annexin V pozitív sejtek aránya. Ez a jelenség azonban nem figyelhető meg a kezeletlen CD4⁺ lépsejtek és a pTreg-ek esetében (15. ábra).



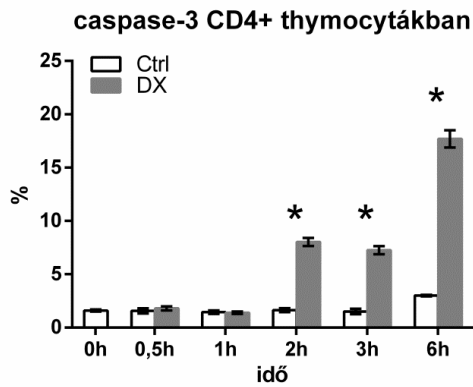
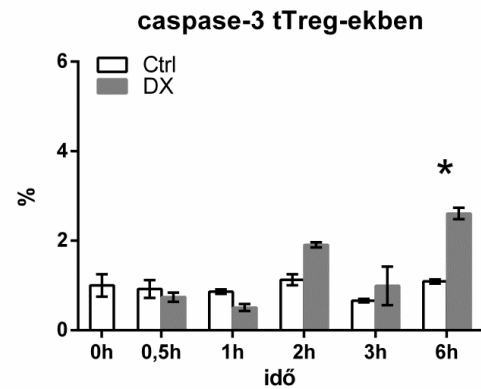
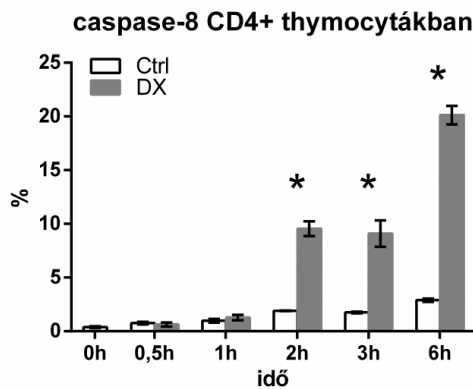
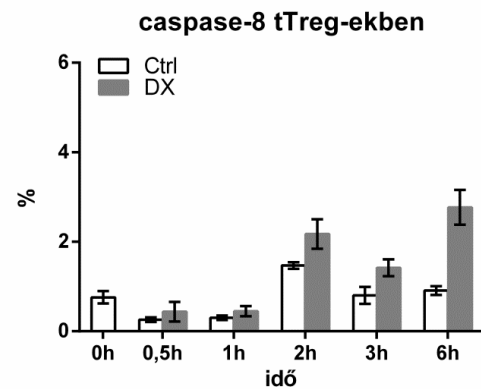
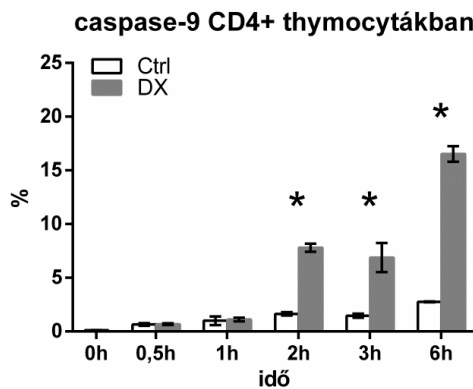
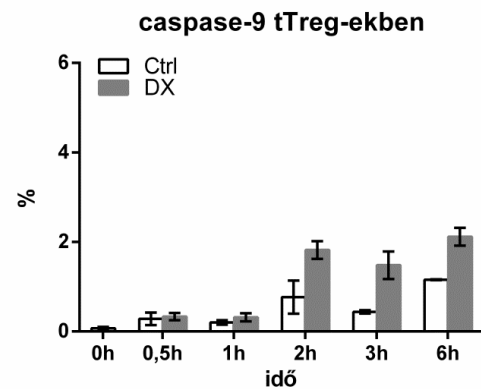
15. ábra Annexin V pozitív sejtek áramlási citometriás vizsgálata thymocytákban és lépsejtekben

A thymocytákat és lépsejteket a CD4, CD8 illetve CD4 és CD25 együttes expressziójuk alapján különítettük el CD4⁺ T sejteket és Treg-eket. Hisztogram segítségével határoztuk meg az Annexin V pozitív sejtek arányát a sejtpopulációkon belül DX kezelés előtt és után. Az oszlopdiagramok legalább három független kísérlet átlagát ± SEM mutatják. A1-A2 illetve B1-B2 diagramok az Annexin V pozitív sejtek százalékos arányát mutatják thymus és lép eredetű CD4⁺ sejtekben és Treg-ekben kontroll és 2 és 4h DX kezelt mintákban. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$)

4.7 Caspase-ok aktivációjának vizsgálata CD4⁺ T sejtekben és regulatórikus T sejtekben

Thymocytaikon és lépsejteken is elvégeztük az aktív caspase-ok jelölését (16. és 17. ábra). Ez alkalommal is CD4, CD8, CD25 sejtfelszíni jelölést alkalmaztunk a vizsgálni kívánt populációk elkülönítésére. Mind a thymus, mind a lép eredetű sejtek esetében elmondható, hogy az aktivált caspase-okat tartalmazó sejtek aránya minden esetben jóval alacsonyabb volt a DP thymocytaikban megfigyelteknél.

DX kezelés hatására a thymus eredetű CD4⁺ T sejtekben 2 és 3 óra DX kezelés után szignifikáns volt az aktivált caspase-okat tartalmazó sejtek aránya, 6 óra után pedig jelentős emelkedés figyelhető meg az aktivált caspase-okat tartalmazó sejtek arányában (6 óra után a caspase-3 pozitív sejtek aránya 3-ról 17%-ra, a caspase-8 pozitív sejtek aránya 2,9-ről 20%-ra, a caspase-9 pozitív sejtek aránya pedig 2,76-ról 16,53%-ra emelkedett). A tTreg-ek esetében csak minimális emelkedést figyeltünk meg DX kezelés hatására, amely még 6 óra után is jelentősen elmaradt a CD4⁺ T sejteknél tapasztalt emelkedéstől. Csak a caspase-3 pozitív sejtek aránya volt szignifikáns 6 óra kezelés után (caspase-3 pozitív sejtek aránya 1,09-ről 2,61%-ra emelkedett) (16. ábra).

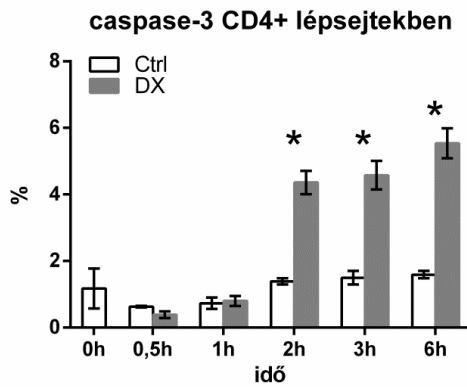
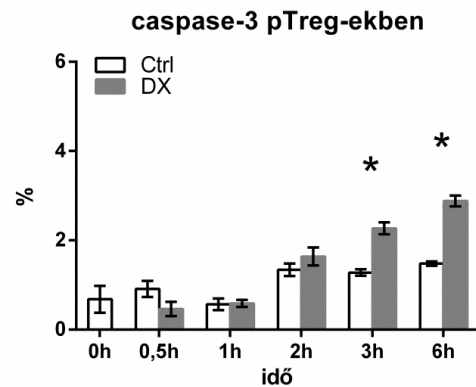
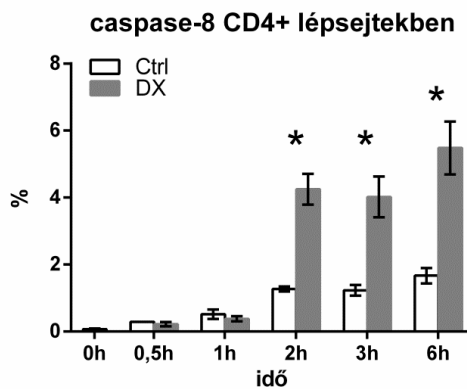
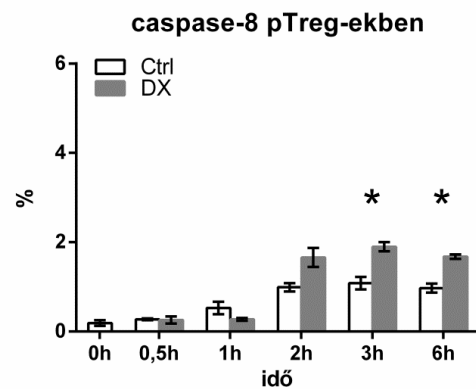
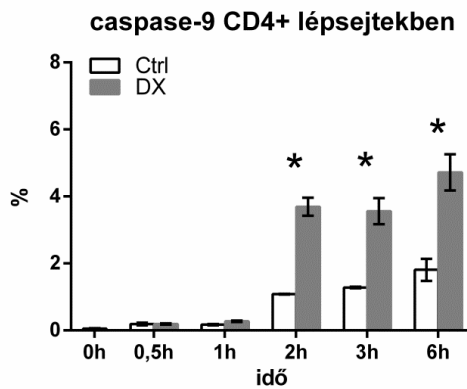
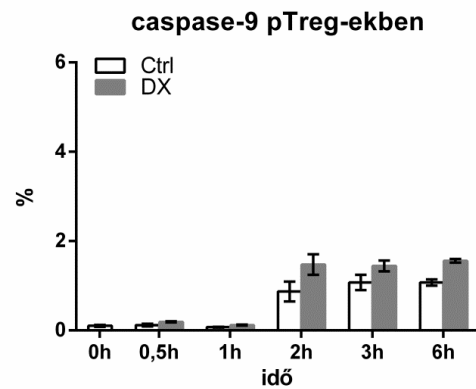
A1**B1****A2****B2****A3****B3**

16. ábra Aktivált caspase-ok áramlási citometriás vizsgálata thymocytákban

A thymocytákon belül a CD4, CD8 illetve CD4 és CD25 együttes expressziójuk alapján különítettük el CD4⁺ T sejteket és Treg-eket. Hisztogram segítségével határoztuk meg az aktív caspase pozitív sejtek arányát a sejtpopulációkon belül DX kezelés előtt és után. Az oszlopdiaagramok legalább három független kísérlet átlagát ± SEM mutatják. A1-A3 illetve B1-B3 diagramok az aktivált caspase-3, -8, -9 pozitív sejtek százalékos arányát mutatják thymus eredetű CD4⁺ T sejtekben és Treg-ekben DX kezelés előtt és után. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$) (tTreg: thymus eredetű regulatórikus T sejt)

A lép eredetű CD4⁺ T sejtek a thymus eredetű T sejtekhez hasonlóan 2 és 3 óra DX kezelés után már szignifikánsan magasabb arányban tartalmaztak aktivált caspase-okat, és ez a tendencia 6 óra kezelés után is hasonló maradt (6 óra után a caspase-3 pozitív sejtek aránya 1,59-ről 5,54%-re, a caspase-8 pozitív sejtek aránya 1,67-ről 5,48%-ra, a caspase-9 pozitív sejtek aránya pedig 1,81-ről 4,72%-re emelkedett), de az emelkedés mértéke nem volt olyan mértékű, mint a thymus eredetű CD4⁺ sejtek esetében. Összességében az aktivált caspase-okat tartalmazó lép eredetű CD4⁺ T sejtek aránya minden vizsgált időpontban kevesebb volt, mint a thymus eredetű CD4⁺ sejtek esetében. A pTreg-ek esetében csak 3 óra DX kezelés után figyeltük meg az aktivált caspase-3 és -8-at tartalmazó sejtek arányának szignifikáns emelkedését, ami további emelkedést mutatott 6 óra kezelés után, de ez az emelkedés kisebb volt, mint amit a lép eredetű CD4⁺ sejtek esetében láttunk ((6 óra után a caspase-3 pozitív sejtek aránya 1,48-ről 2,88%-ra, a caspase-8 pozitív sejtek aránya 0,97-ről 1,68%-ra emelkedett) (17. ábra).

A pTreg-ek esetében hamarabb, már 3 óra DX kezelés után szignifikánsan magasabb volt a caspase-3 és -8-at tartalmazó sejtek aránya, ezzel szemben a tTreg-ek esetében csak 6 óra kezelés után volt a caspase-3 pozitív sejtek aránya szignifikánsan magasabb. Az eredmények arra utalnak, hogy a pTreg-ek érzékenyebbek a DX kezelésre, mint a tTreg-ek. Ugyanakkor a thymus eredetű CD4⁺ T sejtek viszont a lép eredetű CD4⁺ sejteknél bizonyultak jóval érzékenyebbnak. Ezek a megfigyelések támogatják a korábbi eredményeinket, ahol az *in vivo* DX hatást vizsgáltuk a nyirokszervekben. Itt azt tapasztaltuk, hogy a tTreg-ek bizonyos fokú rezisztenciát mutattak a DX kezeléssel szemben a többi thymocytához, illetve a pTreg-ekhez képest. Úgy tűnik, hogy ennek a jelenségnek a hátterében álló apoptotikus folyamatokat sikerült részben feltárnunk.

A1**B1****A2****B2****A3****B3**

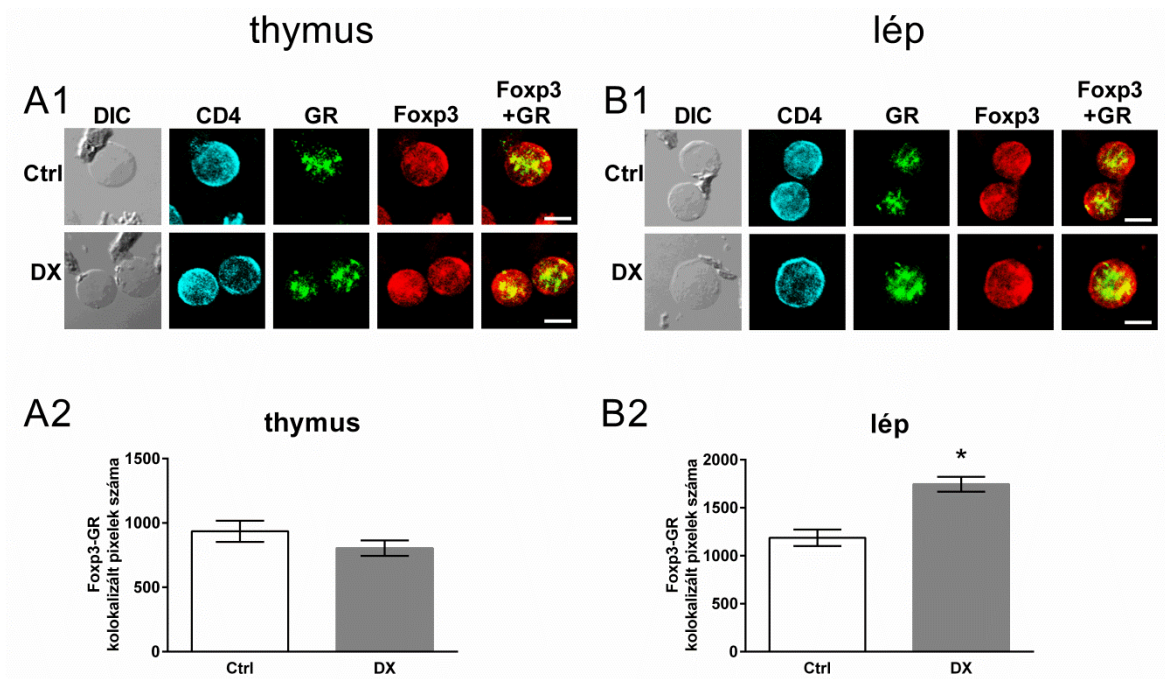
17. ábra Aktivált caspase-ok áramlási citometriás vizsgálata lépsejteken

A lépsejteken belül a CD4, CD8 illetve CD4 és CD25 együttes expressziójuk alapján különítettük el CD4⁺ T sejteket és Treg-eket. Hisztogram segítségével határoztuk meg az aktív caspase pozitív sejtek arányát a sejtpopulációkon belül DX kezelés előtt és után. Az oszlopdiaagramok legalább három független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják. A1-A3 illetve B1-B3 diagramok az aktivált caspase-3, -8, -9 pozitív sejtek százalékos arányát mutatják lép eredetű CD4⁺ T sejteken és Treg-ekben DX kezelés előtt és után. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$) (pTreg: perifériás regulatórikus T sejt)

4.8 GR és Foxp3 közötti interakció vizsgálata konfokális mikroszkópiával

Egy sejt GC hormon érzékenységét nagyban meghatározzák a GR aktivációját követően végbemenő nem-genomikus folyamatok (167). Korábban megfigyeltük, hogy a DP thymocytákban a legalacsonyabb a GR expresszió, mégis ezek a sejtek a legérzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra (64). A regulatórikus T sejtek esetében a DP thymocytákhoz képest jelentősen eltérő érzékenységet tapasztaltunk a GC-indukált apoptózis tekintetében. A tTreg-ekben alacsonyabb GR szintet találtunk, mint a pTreg-ekben (154). A GC-ok nem-genomikus hatásairól ismert, hogy szerepet játszhatnak sejtek apoptózisában (39,44). Ezért megvizsgáltuk, hogy van-e valamilyen kapcsolat a GR és a Treg-ek esetében központi fontosságú Foxp3 transzkripciós faktor (168–170) között, és ez változik-e DX kezelésre.

Ehhez tTreg-ekben és pTreg-ekben 30 perc DX kezelés előtt és után vizsgáltunk konfokális mikroszkóppal a GR-Foxp3 kolokalizációt. DX kezelés nélkül a GR és a Foxp3 jelentős kolokalizációt mutatott mind a thymus, mind a lép eredetű regulatórikus T sejtekben (18. ábra), a DX kezelés hatására ez a kolokalizáció tovább emelkedett a pTreg-ekben (18. B ábra), de a tTreg-ekben nem mutatkozott változás (18. A ábra).



18. ábra GR-Foxp3 kolokalizáció vizsgálata thymus és lép eredetű Treg-ekben

A reprezentatív konfokális mikroszkópos képeken a GR-Foxp3 (A1) tTreg-ekben és GR-Foxp3 (A2) pTreg-ekben kolokalizáció látható kontroll (Ctrl) és 30 percig DX-nal kezelt sejtekben. A következő csatornákból származó képek láthatóak; DIC, CD4 (UV csatorna), intracellulárisan GR (zöld csatorna) és Fxp3 (távoli vörös csatorna). A GR és a Fxp3 fehérjék kolokalizációját az egymásra vetített képeken a sárga területek jelzik.

Az oszlopdigramok (A2-B2) a GR és a Fxp3 kolokalizációjának kvantifikálásával készültek, az oszlopok a kolokalizált pixelek számát jelenítik meg. Az átlagokat \pm SEM legalább három független kísérletből, kezelésenként 100 DP sejt eredményeiből számítottuk. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változást ($p < 0,05$)

(rövidítések: DIC: differenciál interferencia kontraszt, GR: glukokortikoid receptor, Fxp3:forkhead boks3 protein 3)

5. Összefoglalás, megbeszélés

A GR fontos szerepet játszik az immunsejtek szelekciójában és apoptózisában (22,38,44). A nukleáris transzlokációja mellett a ligand kötött GR mitokondriális transzlokációja szoros összefüggést mutat a sejtek apoptózis érzékenységgel (44,152) (171–176). Korábbi munkáinkban megfigyeltük, hogy a GC-indukált apoptózisra a thymocytá alcsoportok közül leginkább érzékeny DP thymocytákban (45,47,64), rövid idejű *in vitro* GC kezelés hatására a GR inkább a mitokondriumba transzlokálódott és nem a nukleuszba (44). Ehhez kapcsolódóan sikerült azt is megfigyelnünk ugyanezen sejtcsoportban, hogy a DX kezelés hatására a sejtek mitokondriális membránpotenciálja szignifikánsan csökkent (44), ami az apoptózis egyik korai és meghatározó eseménye. A GR DX hatására bekövetkező mitokondriális transzlokációja csak GC-indukált apoptózis érzékeny sejtekben figyelhető meg, mint amilyenek a DP thymocyták is (38). A GC-ok mitokondriális funkciót befolyásoló képességét más munkacsoport is megfigyelték (38). A DX-indukált apoptózist thymocytákban meg lehetett akadályozni spermine-nel, ami gátolta a DX-indukált mitokondriális membránpotenciál csökkenést (177). Illetve DX-nal kezelt thymocytákban leírtak emelkedett H_2O_2 szintet, mely a mitokondriumból származott. A H_2O_2 által okozott oxidatív károsodás szintén proapoptotikus hatással bír (178). Mindezekből arra következtettünk, hogy a GR mitokondriális felhalmozódása, a mitokondriális membránpotenciál csökkenése szoros összefüggésben áll ezen sejtek GC-indukált apoptózis érzékenységgel és, hogy a mitokondriális, intrinsic, apoptotikus útvonal kiemelten fontos a GC-indukált apoptózisban. Mivel a folyamat pontos molekuláris háttere még nem ismert, ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk milyen módon szabályozhatja a GR a mitokondriális apoptotikus útvonalat.

Megfigyeltük, hogy a thymocytákban a Bak asszociálódott a GR-ral (10., 11. ábra). Ez az asszociáció nem változott a mitokondriális frakcióban, de megemelkedett a citoplazmában rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés hatására. Apoptotikus stimulusra a Bax transzlokálódik a mitokondriumba, ahol a Bak-kal komplexet alkotva együtt formálnak pórust a mitokondrium külső membránján (179). Az eredményeink arra utalnak, hogy a Bax-nak van elsődleges szerepe a thymocyták DX indukált apoptózisában, annak ellenére, hogy nem asszociálódik direkt módon a GR-ral. A Bak GC-indukált apoptózisban betöltött esetleges szerepét nem tudjuk kizárni az eredményeink alapján, de elképzelhető, hogy az apoptózis egy későbbi fázisában aktiválódik, mint amit mi vizsgáltunk. Ezt a feltevésünket mások korábbi eredményei is alátámasztják, Bax/Bak kettős KO egerek teljesen

rezisztensnek bizonyultak a GC-indukált apoptózissal szemben, ugyanakkor a Bax vagy Bak egyszeresen KO egerek thymocytái megőrizték GC érzékenységet (149). Bak/Bim kettős KO egerek esetében fejlődési rendellenességet nem találtak szemben a Bax/Bim kettős KO egérrel, ahol az ujjak közötti szövet nem szívódott fel, és az állatok élettartama rövidebb volt, mint a vad típusúaké. Mindkét egérből izolált thymocyták rezisztensek voltak az intracelluláris stressz indukálta apoptózissal szemben. Míg a thymocyták szelekciója Bax/Bim KO egér esetében felgyorsult, zavart szenvedett, addig a Bak/Bim KO egér esetében inkább a vad típusú egérére hasonlított. Ez arra utal, hogy a Bax és a Bak is részt vesznek a thymocyták apoptózisában, de a Bak önmagában nem elegendő a folyamat véghezviteléhez (180). Ehhez hasonló következtetést vonhatunk le a GC-indukált apoptózis esetében is; a Bak is fontos szerepet játszik benne, de inkább a Bax szerepe az elsődleges, esetenként viszont a Bax és a Bak egymás hiányát kompenzálhatják (149).

Munkánk során sikerült kimutatnunk a Bim, egy „BH3-only” fehérje, és a GR asszociációját, ami a DX kezelés hatására jelentősen megemelkedett a mitokondriális frakcióban (10., 11. ábra). Feltehetően a Bim ezt követően aktiválja a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjéket, vagy gátolja az anti-apoptotikusokat, és ezzel elindítja az intrinsic apoptotikus útvonalat. Korábban Bim knock out egérben a GC-indukált apoptózis zavarát írták le, ami a Bim fontos, de nem kizárólagos szerepére utal a folyamatban (150,151,181). Két vagy 3 óra DX kezelést követően a GC-ok képesek a Bim expresszióját fokozni rágszálók thymocytáiban, ezt a megnövekedett expressziót összefüggésbe hozták a GC-indukált apoptózis érzékenységgel (152,153). A Bim fontos szerepet játszik a thymocyták negatív szelekciójában is, hiányában rezisztenssé válnak a sejtek a TcR-on keresztül indukált apoptózissal szemben. A negatív szelekció során intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés következik be, ami az intrinsic apoptotikus útvonalat indítaná el, azonban ez a Bim hiányában nem tud megvalósulni (182). A Bim hiányos egerekben lymphadenopátiát és autoimmun folyamatokat írtak le, mert a Bim nélkül az autoreaktív thymocyták deléciója elégtelen (182,183). A Bim-nek a B sejtek esetében is hasonló szerepe van; a nem toleráns sejtek eliminációjának elősegítése (184,185). Ezek az eredmények jól jelzik, hogy a Bim-nek a thymocyták apoptózisában kiemelkedő szerepe van. Érdekes módon Bim hiányos NOD (non-obese diabetic) egerekben a Bim hiánya megvédte az állatokat a diabetes kialakulásától. A Bim nélkül magasabb Treg számot figyeltek meg, ezek a Treg-ek nagy számban voltak pro-inzulinra specifikusak. Feltehetően azért, mert a negatív szelekció elmaradása miatt több T sejt, melyek erős TcR szignált kaptak, fejlődött Treg irányba

(186). Elképzelhető, hogy a Bim-nek a regulatórikus T sejtekben kevésbé jelentős szerepe van, ami részben magyarázhatja ezen sejtek eltérő GC érzékenységét.

A GC-okat lymphocyta elpusztító képességük miatt gyakran alkalmazzák lymphoid malignitások kemoterápiás protokolljában, különösen gyermekkori akut lymphoblastos leukémiában (ALL). A betegség kedvezőbb kimenetelét összefüggésbe hozták a betegek egy részében azzal, hogy a GC kezelés képes-e a Bim transzkripcióját elősegíteni (187), a Bim megnövekedett expressziója ugyanis korrelált a GC-indukált apoptózis szenzitivitással (188,189). Kísérleti körülmények között csak GC érzékeny ALL sejtvonalakban tudta a DX a Bim expresszióját fokozni, GC rezisztensekben nem (190). Ezt az eredményt később sikerült egy munkacsoportnak gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek biopsziájából kinyert sejteken történő vizsgálatokkal is alátámasztani (191). A GC rezisztenciát a korábbi széles körben elfogadott nézettel szemben, inkább az apoptotikus folyamatok zavarára vezetik vissza, mint a GR valamilyen hibájára (192). Ezért vannak, akik a Bim-et gyermekkori ALL-ben a GC kezelésre adott válasz prognosztikus markerének javasolják (193). A Bim génjének hibás szabályozása előfordul hematológiai malignitásoknál (194) Csökkent expressziója (195), illetve bizonyos single nucleotid polimorfizmusai rosszabb anti-tumor terápiás válasszal hozhatóak összefüggésbe (196–198). Más tumorokban a Bim génjében előforduló deléciós polimorfizmusok esetében a betegek tirozin kináz inhibitorokra rosszabb terápiás választ mutattak (199). A mi eredményünk is azt a tényt erősíti, hogy a Bim-nek fontos szerepe van szteroid érzékeny, DP thymocyták GC-indukált apoptózisának iniciálásában; a Bim megnövekedett asszociációja a GR-ral a mitokondriumban elősegítheti a Bax aktivációját és oligomerizációját a mitokondrium külső membránjában, ezáltal a mitokondriális apoptotikus útvonal elindítását.

A Bim jelenléte lényeges az immunválasz leállításában is az antigén aktivált T sejtek apoptózisának mediálása révén (200,201). A Bim hiánya az aktivált T sejtek hosszabb élettartama miatt, autoimmun folyamatok kialakulásához járul hozzá, pl. fokozódik az autoantitestek termelődése, ami autoimmun glomerulonephritishez vezethet (150). Azonban a Bim hiánya nem csak autoimmun betegségek melegágya lehet; hiányát kimutatták köpenysejtes lymphomában, Burkitt lymphomában, melanomában, vastagbél daganatban és világos sejtes veserákban is (202,203). A Bim szuppressziója elősegíti a daganatok metasztázis képzését, valamint kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciájuk kialakulását, mivel a gyógyszerek egy része a Bim aktiválásán keresztül fejtené ki tumorölő hatását (197).

Érdekes módon a GR interakcióba lépett az anti-apoptotikus Bcl-x_L fehérjével is. A Bcl-x_L-ről kimutatták, hogy képes visszahelyezni (retrotranszlokálni) a Bax-ot a mitokondriumból a citoplazmába azáltal, hogy hozzákapszolódik és gátolja pro-apoptotikus hatását (204). Feltételezzük, hogy a GR és a Bcl-x_L közötti kapcsolat gátló hatással van a Bcl-x_L ezen funkciójára. 30 perc DX kezelés után a GR-Bcl-x_L komplex aránya megemelkedett a citoplazmában és csökkent a mitokondriumban (11. ábra), ami arra utal, hogy miután a Bcl-x_L áthelyeződött a citoplazmába a mitokondriumból, hozzákötődött GR-hoz és ez gátolta a Bcl-x_L apoptotikus folyamatra kifejtett gátló hatását. Ezen feltevésünket támogatja más kutatócsoport eredménye is, ahol megfigyelték, hogy a Bcl-x_L expressziója csökkent 2 vagy 3 óra DX kezelést követően (153). Tehát a DX Bcl-x_L-t gátló hatása nem csak fehérje, hanem génexpresszió szinten is megfigyelhető. Bcl-x_L-t overexpresszáló humán folliculáris lymphoma sejtekben a DX nem volt képes apoptózist kiváltani, ami jól jelzi, hogy a GC-indukált apoptózis mitokondrium-dependens, és benne a GR-nak a Bcl-x_L-re kifejtett negatív hatásának is szerepe van (205).

Jóllehet a Bcl-x_L és a GR kolokalizációja szignifikánsan csökkent a DX kezelést követően (10. ábra), ez azonban származhat abból, hogy a kolokalizációs eredmények csak DP sejtekből származtak és egy össz-kolokalizációt mutatnak mind a citoplazmában, mind a mitokondriumban, ugyanakkor a ko-immunprecipitációhoz szeparálatlan thymocyttakat használtunk és a citoplazmát és a mitokondriumot külön vizsgáltuk.

A Bax citoplazma és mitokondrium közötti ingázása fontos szabályozója az intrinsic (mitokondriális) apoptotikus útvonalnak (179,206,207). Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a GR és Bax közötti kolokalizáció alig változott DX kezelés hatására (10. ábra), és nem tudtuk a kolokalizációs eredményeket megerősíteni ko-immunprecipitációval. Ennek oka lehet, hogy a kolokalizáció csak molekulák közelségét mutatja meg, de nem feltétlenül utal közvetlen molekuláris interakcióra, asszociációra két molekula között. A Bax és a GR esetében, ahol nem sikerült a kolokalizációt megerősítenünk, ez arra utal, hogy a két molekula nagyon közel volt egymáshoz, de nem volt közöttük közvetlen kapcsolat. A GR egy 94 kDa molekulatömegű fehérje, ami más Bcl-2 fehérjékkel asszociálódik, melyek a Bax közelében vannak. Mások munkájából ismert, hogy a Bcl-2 fehérjék egymással interakcióba lépnek (204,208–210). Ezek alapján a közvetlen kapcsolat nélküli kolokalizáció könnyen elképzelhető a Bax és a GR között, mivel a GR más Bcl-2 fehérjével való asszociációját sikerült kimutatnunk.

Mindezek mellett, ko-immunprecipitáció nélkül, megfigyeltük a Bax felhalmozódását a mitokondriumban (12. ábra), amely eredmény jól korrelált másokéval

(147,148), és arra utal, hogy a Bax fontos szerepet játszik a thymocyták DX-indukált apoptózisában. A Bax mitokondriális külső membránban való oligomerizációja révén egy pórust formál, ami a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozza (179), ahogy azt a korábbi munkánk során már megfigyeltük (44).

A Bcl-2 fehérjék apoptózisban betöltött fontos szerepük miatt a gyógyszerfejlesztés célpontjaivá is váltak. Daganatos sejtekben a leggyakrabban az intrinsic apoptotikus útvonal zavarát figyelték meg, továbbá azt, hogy a kemoterápiás szerek egy jelentős része a daganatos sejteket úgy pusztítja el, hogy aktiválják azok apoptotikus folyamatait, leggyakrabban az intrinsic útvonalat. Ezen útvonal gyakori zavara a kemoterápiára adott kedvezőtlen válasz egyik fontos oka, ezért az új terápiás szerek specifikusan a mitokondriális apoptózist célozzák meg, és önmagukban, vagy más kemoterápiás szerekkel együtt alkalmazva próbálják őket bevetni olyan esetekben, amikor a hagyományos kezelés elégtelennek bizonyult (136). Ez vezetett a BH3-mimetikumok kifejlesztéséhez, amilyen pl. az ABT-737, ABT-263, melyek a Bcl-2, Bcl-xL és az MCL-1 fehérjéket gátolták (211,212), de mellékhatásként thrombocytopeniát okoztak (213,214). A csak Bcl-2-t gátló ABT-199, vagy venetoclax, ígéretes eredményeket hozott krónikus lymphocytás leukémiában szenvedő betegeknél (215). Kezdetben sok betegnél okozott tumor lízis szindrómát a masszív apoptózis-indukáló hatása miatt, később ezt a dózis beállításával kiküszöbölték (216). A gyógyszerfejlesztés másik irányvonala a Bax aktivátorok fejlesztése, melyeknél a kutatók legnagyobb félelme az egészséges szövetekben jelentkező esetleges toxicitása (217).

A caspase-ok mind az extrinsic, mind az intrinsic apoptotikus útvonalak fontos szabályozói (115,218). A kísérleteink során megvizsgáltuk a caspase-ok aktivációját 30 perc, 1, 2, és 3 óra DX kezelést követően. Megfigyeltük, hogy szignifikánsan emelkedett az aktív caspase-3, -8, -9-et tartalmazó DP thymocyták aránya 2 és 3 óra DX kezelést követően. 1 óra után a caspase-3 aktivációja lehetett a caspase-9 aktiváció következménye, ami a mitokondriális membránpotenciál 30 perc DX kezelést követő csökkenése (44) után következett be. Ugyanakkor részben okozhatta más apoptotikus útvonal aktiválódása is, mint például a ceramid és szfingozin képződése, amik szintén képesek a caspase-3-at aktiválni (165,219). A caspase-9 prominens aktivációját (2 óra DX kezelést követően) jelentős caspase-3 aktiváció követte (3 óra DX kezelés után). Az aktivált caspase-9-et tartalmazó DP sejtek aránya majdnem kétszeresére emelkedett 2 óra kezelést követően. Az aktív caspase-8-at tartalmazó DP thymocyták számának emelkedése is szignifikáns volt, de nem annyira jelentős, mint a caspase-9 esetében, ami arra utalhat, hogy a caspase-9

aktivációja elsődleges a caspase-8-éval szemben. Ez tovább erősíti azt az elgondolásunkat, hogy a mitokondriális apoptotikus útvonal kiemelt szerepet játszik a DP thymocyták DX-indukált apoptózisában.

Ezen eredményeinket más kutatócsoportok munkája is alátámasztja. Néhány eredmény a caspase-9 elsődleges szerepét hangsúlyozza a GC-indukált apoptózisban (163,164), mások épp az ellenkezőjét állítják (165,220). Caspase-9 KO thymocyták rezisztensek voltak DX-indukált apoptózisra, de továbbra is érzékenyek maradtak TNF- α , a-CD95 által indukált sejthalálra (163). Apaf^{-/-} KO thymocyták csak részleges rezisztenciát mutattak a DX-indukált apoptózissal szemben, de érzékenyek maradtak a Fas ligáció révén indukált apoptózisra (164). Ezzel szemben a caspase-8 deléciónak nem okozott a thymocyták GC-indukált apoptózisában változást (221). Érdekes módon a caspase-3 hiányos egérben sem írtak le zavart a GC-indukált apoptózisban (222). Ezzel szöges ellentétben áll a caspase-3 gátlókkal kapott eredmény, mely a caspase-3 fontosságát emeli ki a folyamatban (165). Elképzelhető, hogy a caspase fehérjecsaldó egyes elemei képesek kompenzálni egymást ilyen körülmények között. Ugyanakkor a peptid inhibitorok alkalmazásakor végzett tanulmányok, a caspase-3 és -8 fontosságát hangsúlyozzák a GC-indukált thymocyták apoptózisban (165,166), habár ezen inhibitorok specificitása olykor megkérdőjelezhető (223–225). A GC-indukált apoptózis semmilyen zavarát nem észlelték Bid deficiens egérben, ami utalhat az extrinsic apoptotikus útvonal kevésbé fontos szerepére a GC-indukált sejthalálban (226). A caspase-8 aktivációja lehet a caspase-9 aktivációjának a következménye is, a cathepsin B (227) vagy a caspase-3 aktivációja révén, ami aztán a caspase-6-ot majd a caspase-8-at aktiválja (228). De az aktivációját okozhatja más apoptotikus útvonalak aktivációja is; pl. ceramid szfingozin produkció, cyclin-dependens kináz 2 aktiváció, cathepsin B lizoszómákból való felszabadulása (165,220,227,229). Esetleg a GILZ (GC-induced leucine zipper) is szerepet játszhat benne. A GC-ok fokozzák a GILZ expresszióját, ami elősegíti a caspase-8 aktivációját, az aktivált caspase-8 pedig megvédi a GILZ-t a lebomlástól (230). A caspase-ok GC-indukált aktivációja nem a génexpressziójuk fokozódásának a következménye, mert akkor is megfigyelték, amikor mRNS- és fehérjeszintézis gátlókkal együtt történt a GC kezelés (231).

Kísérleteinkben, ahol az *in vivo* beadott DX hatását vizsgáltuk a nyirokszervek sejtes összetételére nézve, azt tapasztaltuk, hogy a thymusban a regulatórikus T sejtek aránya jelentősen megnőtt a DX kezelés hatására, azonban ez csak aránybeli növekedés volt, amely a többi sejt, elsősorban a GC érzékeny DP thymocyták, másrészt a CD4, CD8

egyszeresen pozitív thymocyták pusztulása miatt következett be (154). Ez arra utalt, hogy a tTreg-ek bizonyos fokú rezisztenciát mutatnak a GC-indukált apoptózissal szemben. A lép esetében nem tudtuk megfigyelni a regulatórikus T sejtek arányának növekedését. A lép össz-sejtszáma jelentősen csökkent DX kezelés hatására, és a pTreg-ek egy része a CD4⁺ T sejtekhez hasonlóan elpusztultak (154). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a lépben található pTreg-ek GC érzékenysége eltér a thymusban található tTreg-ekétől.

Ezért szeretnénk volna megvizsgálni és összehasonlítani a lép és thymus eredetű CD4⁺ T sejtek és Treg-ek korai apoptotikus eseményeit egymással és a DP thymocytákéval. Ehhez a sejteken Annexin V és aktivált caspase-ok jelölését végeztük el különböző idejű DX kezelés előtt és után. Az *in vitro* DX kezelésnél tapasztalt eredményeink alátámasztani látszanak az *in vivo* DX kezelés során megfigyelt sejtpusztulást és sejtarány változást.

A thymusban lévő CD4⁺ sejtek már 2 óra DX kezelés után szignifikánsan nagyobb arányban tartalmaztak aktivált caspase-3, -8, -9 –et, és 4 óra elteltével az Annexin V pozitív sejtek aránya is szignifikánsan megemelkedett. Ezzel szemben a tTreg-ek esetében ugyanezen időpontoknál csak minimális caspase aktivációt figyeltünk meg, Annexin V jelölésnél pedig nem tapasztaltunk változást (15., 16. ábra). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a tTreg-ek kevésbé érzékenyek a DX-indukált apoptózisra, mint a CD4⁺ thymocyták vagy a DP sejtek. A lép esetében szintén 2 és 3 óra DX kezelés után már szignifikánsan megemelkedett az aktivált caspase-okat tartalmazó CD4⁺ T sejtek aránya, és 3 óra elteltével a pTreg-ekben is szignifikánsan nagyobb arányban fordultak elő az aktivált caspase-3, és -8-at tartalmazó sejtek, valamint mindkét sejtpopuláció Annexin V pozitivitása emelkedett 2 óra DX kezelés után (15., 17. ábra). Ezek alapján a lépben lévő Treg-ek apoptózis érzékenysége kifejezettebb volt, mint a tTreg-eké, és inkább a lépben lévő CD4⁺ sejtekéhez volt hasonló.

Az apoptotikus folyamatokat vizsgáló kísérletekből származó megfigyeléseink alátámasztják a korábbi eredményeinket, melyek az *in vivo* DX hatást vizsgálták a nyirokszervekben. Azaz, hogy a thymusban lévő Treg-ek ellenállóbbak a DX kezelésnek a thymus többi sejtes eleméhez illetve a pTreg-ekhez képest, továbbá, hogy a lépben lévő T sejtek kevésbé pusztultak el a DX hatására, mint a thymus sejtjei. A thymus CD4⁺ sejtjei mutatták a legnagyobb mértékű caspase aktivációt a vizsgált populációkban, jóval nagyobbat, mint a lép CD4⁺ T sejtjei. Ugyanakkor a tTreg-ekben a caspase aktiváció mértéke elmaradt a pTreg-ekhez képest. Ezek alapján a tTreg-ek rezisztensebbnek tűnnek a

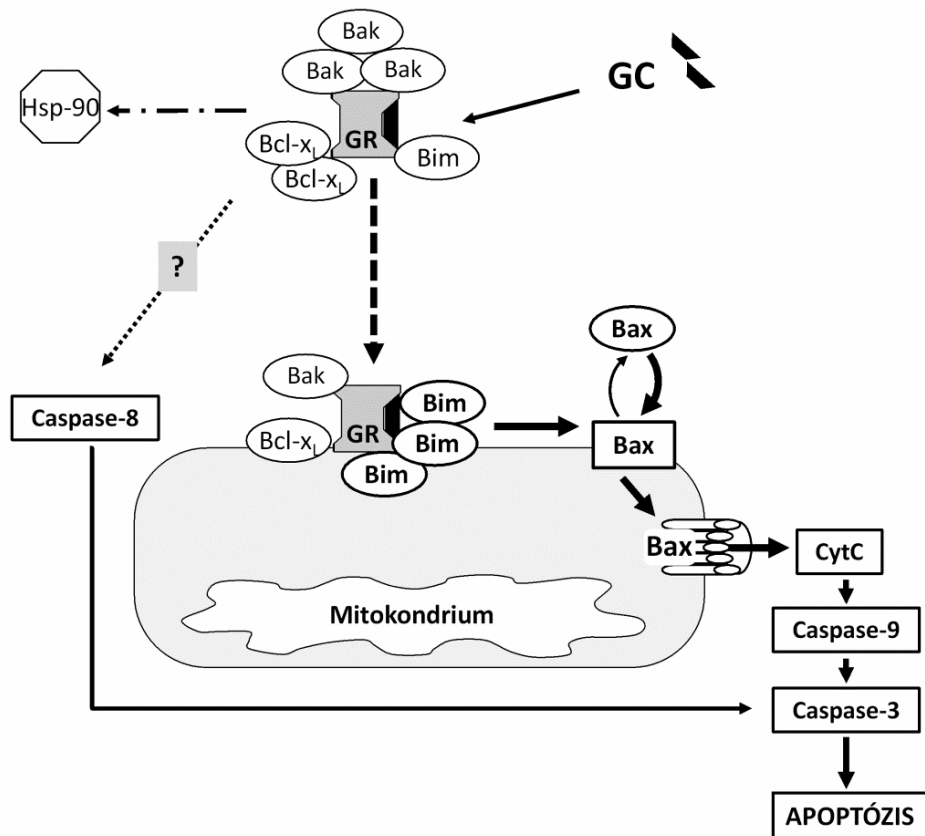
DX-indukált apoptózissal szemben, mint a pTreg-ek, illetve a Treg-ek minden esetben ellenállóbank bizonyultak, mint a CD4⁺ T sejtek.

A GC-ok regulatórikus T sejtek apoptózisára gyakorolt hatásával, különösen az aktiválódó apoptotikus útvonalak vizsgálatával, kevés tanulmány foglalkozik. A legtöbb ráadásul valamilyen betegségmodellben vizsgálja a GC-ok Treg-ek számára gyakorolt hatását, azonban ezek az eredmények néha ellentmondóak. Rágcsálókban megfigyelték, hogy a DX hatására megemelkedett a Treg-ek aránya perifériás vérben és a másodlagos nyirokszervekben (232,233). Ugyanakkor asthma (234) és sclerosis multiplex (235) egérmodellekben a GC-ok a Treg-ek számának csökkenését okozták. A humán eredmények is ellentmondásosak: asthmás betegek szteroiddal történő kezelése során először a keringő Treg-ek számának növekedését írták le (236), és hasonló jelenséget figyeltek meg autoimmun betegeknél is; szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek vérében, akik GC kezelést kaptak, magasabb CD25⁺ T sejt számot figyeltek meg, mint a GC kezelésben nem részesülő betegek esetében, vagy az egészséges kontrollokban (237–240). Más kutatócsoportok viszont a GC-ok ellenkező hatását tapasztalták hasonló betegeknél (241,242). Human perifériás vérből izolált Treg-ek vizsgálatánál egy kutatócsoport azt találta, hogy a Treg-ek érzékenyebbek a DX-indukált apoptózisra, mint az effektor T sejtek. Azonban ezt az érzékenységet minimális dózisu IL-2 ellensúlyozni tudta, valószínűleg a rajtuk expresszáldó nagy számú IL-2 receptornak (CD25) köszönhetően (243). Az eredmények összehasonlíthatóságát nehezíti, hogy különböző modellekben, eltérő szteroid dózissal végezték a GC kezeléseket, illetve a Treg-ek azonosítására használt markerek is eltérőek voltak.

A GR expressziója a különböző CD4⁺ T sejt alcsoportokban nagyjából megegyezik. Így valószínűleg nem ebben rejlik a válasz arra, hogy miért hatnak a GC-ok másképp a T sejt alcsoportokra (243). Ezért is tartjuk fontosnak, hogy a GC-ok Treg-ek apoptózisára gyakorolt hatásának molekuláris mechanizmusát alaposabban feltárjuk. Ennek részét képezi az a kísérlet, amelyben a GR és Foxp3 interakcióját vizsgáltuk. Már a kezeletlen tTreg-ekben és pTreg-ekben megfigyeltük a két molekula kolokalizációját, amit a DX kezelés csak a pTreg-ek esetében növelt meg, a tTreg-ek esetében a kolokalizáció mértéke nem változott (18. ábra). Ezen molekuláris kölcsönhatás ténye, és annak DX kezelésre bekövetkezett változása további kérdéseket vet fel a GC regulatórikus T sejtekre gyakorolt hatásával kapcsolatban.

Összefoglalva az eredményeink jól mutatják a GC-indukált korai apoptotikus folyamatok komplexitását DP thymocytákban (19. ábra). Ligand kötődés nélkül is

megfigyelhető némi asszociáció a GR és a Bcl-2 fehérjék között (Bak, Bim, Bcl-x_L). Nagy dózisú DX kezelés hatására azonban az aktiválódott GR megváltoztatja a Bcl-2 fehérjék egyensúlyát olyan módon, hogy az elősegítse az apoptózist. A GR transzlokálódik a mitokondriumba, ahol az interakciója jelentősen megnövekszik a Bim-mel. A Bim feltehetően aktiválja a Bax-ot, ami a Bax mitokondriális akkumulációját okozza és a mitokondrium külső membránjában pórust formál, mely a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez vezet, valamint a citokróm c felszabadulásához (11. ábra) és a caspase-9 aktivációjához. A Bcl-x_L Bax pórusformálására kifejtett negatív hatását a GR-ral való megnövekedett citoplazmatikus asszociációja gátolja. A GR-Bak asszociáció szerepének megértése még tovább vizsgálatokat igényel. A caspase-8 aktiváció lehet a GR-nak más apoptotikus útvonalakkal való interakciójának a következménye (165,220,227,229). Összességében elmondhatjuk, hogy az eredményeink megerősítik a mitokondriális apoptotikus útvonal és a nem-genomikus hatások fontosságát a thymocyták GC-indukált apoptózisában. A CD4⁺ sejtek és a regulatórikus T sejtek esetében tapasztalt, a DP sejtekénél kisebb, apoptózis érzékenység lehet más, nem-genomikus útvonalak, aktiválódásának következménye, és szükség van az ezt feltáró, további, alaposabb vizsgálatok elvégzésére.



19. ábra Thymocyták GC-indukált apoptózisának feltételezett modellje

Nagy dózisú GC kezelés hatására a GR transzlokálódik a mitokondriumba (szaggatott vonal) ahol interakciója megnövekszik a Bcl-2 fehérjékkel, különösen a Bim-mel. Majd feltehetően a Bim aktiválja a Bax-ot, ami pórust formál a mitokondrium külső membránján, hozzájárulva a citokróm c citoplazmába való felszabadulásához. A citokróm c ezt követően elindítja a caspase-kaszád aktivációját. A Bax mitokondriális felhalmozódását elősegíti, hogy a GR a citoplazmában hozzákapcsolódik a Bcl-x_L-hez, ezáltal gátolja a Bax-ra kifejtett gátló hatását. A GR-Bak asszociáció szerepe további vizsgálatokat igényel. A caspase-8 aktiváció lehet a GR-nak más apoptotikus útvonalakkal való interakciójának következménye (pontosított vonal)

(rövidítések: GR: glukokortikoid receptor, GC: glukokortikoid hormon, CytC: citokróm c, Hsp-: hőszokk fehérje)

6. Új eredmények összefoglalása

1. Megfigyeltük, hogy DP thymocytákban az aktivált GR kolokalizálódott a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival; a Bax, Bak, Bcl-x_L és Bim fehérjékkel, illetve jellemeztük, hogy a kolokalizáció mértéke hogyan változott 30 perc DX kezelés hatására.
2. Immunprecipitációval sikerül alátámasztanunk a kolokalizációs eredményeinket. A Bak, Bcl-x_L és a Bim precipitálódott a GR-ral, a Bax azonban nem. Jellemeztük továbbá, hogy DX kezelés hatására hogyan változott a fehérjék megoszlása a DP sejtek citoplazmája és mitokondriuma között.
3. Immunprecipitáció nélkül tanulmányoztuk, hogy hogyan változik a Bax szubcelluláris eloszlása DX kezelés hatására. A Bax felhalmozódott a mitokondriumban.
4. Kimutattuk, hogy 1 óra DX kezelés után a citokróm c szintje szignifikánsan megemelkedett DP sejtek citoplazmájában, annak következményeként, hogy a mitokondrium külső membránjában a pro-apoptotikus fehérjék pórust formáltak.
5. Jellemeztük a caspase-3, -8 és -9 aktivációját különböző időtartamú DX kezelést követően. 2 óra DX kezelést követően már szignifikáns változást tudunk kimutatni. A caspase-9 aktivációja kifejezettebb volt, mint a caspase-8-é.
6. Az áramlási citometriával végzett caspase aktivációs kísérleteinket sikerült Western blottal is megerősítenünk. 3 óra DX kezelést követően a DP sejtek citoplazmájában szignifikánsan magasabb volt az aktivált caspase-ok mennyisége.
7. CD4⁺ thymocytákban szignifikánsan magasabb Annexin V szintet figyeltünk meg 4 óra DX kezelést követően, mint a kontrollban. A lép eredetű CD4⁺ sejtekben, a tTreg-ekben és a pTreg-ekben az Annexin V pozitivitás jóval alacsonyabb volt.
8. Jellemeztük a caspase-3,-8 és -9 aktivációjának kinetikáját thymus és lép eredetű CD4⁺ sejtekben és tTreg-ekben valamint pTreg-ekben. A tTreg-ek jelentős rezisztenciát mutattak a DX-indukált apoptózissal szemben.
9. Kimutattuk a GR és a Foxp3 kolokalizációját konfokális mikroszkóppal tTreg-ekben és pTreg-ekben.

7. Publikációk

7.1 A tézis alapját képező közlemények (összesített impakt faktor: 4,649)

1. 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)
2. 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**
3. Ugor E, Prenek L, Pap R, Berta G, Ernszt D, Najbauer J, Németh P, Boldizsár F, Berki T
Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression
IMMUNOBIOLOGY 223:(4-5) pp. 422-431. (2018) **IF: 2,702 (ebből 0,816 IF-t használtam a tézishez)**

Egyéb publikáció:

Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Prenek L, Berki T, Balogh P, Boldizsar F
Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knockout mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes.
CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY & p. &. (2018) IF: 3,410

7.2 Előadások

Nemzetközi konferenciák:

1. Lilla Prenek, Réka, Kugyelka, Katalin Olasz, Ferenc Boldizsár, Péter Németh, Tímea Berki: Functional role of dexamethasone pre-treated regulatory T cell transfer in the development of murine autoimmune arthritis. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal 2018

Hazai konferenciák:

1. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea: Activation of mitochondrial apoptotic pathway in glucocorticoid-induced apoptosis of mouse thymocytes. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence 2015

2. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea: Glukokortikoid receptor Bcl-2 fehérjével való interakciójának vizsgálata glukokortikoid indukált egér thymocyta apoptózisban. 46. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg 2016

7.3 Posztterek

Nemzetközi konferenciák:

1. Lilla Prenek, Ferenc Boldizsár, Tímea Berki: Investigation of glucocorticoid-induced apoptosis in mouse thymocytes. 4th European Congress of Immunology Vienna, 2015
2. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea: Investigation of glucocorticoid receptor interaction with Bcl-2 proteins in glucocorticoid-induced apoptosis of immature and mature T cells. 3rd Meeting of Middle European Society for Immunology and Allergology (MESIA), Budapest 2016
3. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea: Comparison of glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes and mature T cells. 5th European Congress of Immunology Amsterdam, 2018

Hazai konferenciák:

1. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea: Glukokortikoid indukált intrinsic apoptózis útvonalak vizsgálata egér thymocytákon. 45. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg 2015
2. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea: Role of glucocorticoid receptor collaboration with Bcl-2 proteins in glucocorticoid-induced apoptosis of developing T cells. Magyar Immunológiai Társaság 45. Vándorgyűlése, Velence 2016
3. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Berki Tímea: Glukokortikoid indukált apoptózis összehasonlítása érett és éretlen T sejtekben. 47. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg 2017
4. Prenek Lilla, Kugyelka Réka, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea: Comparison of glucocorticoid-induced apoptosis in mature and developing T cells. Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Velence 2017

8. Referenciák

1. Lightman SL, Wiles CC, Atkinson HC, Henley DE, Russell GM, Leendertz JA, et al. The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol.* 2008;583(2–3):255–62.
2. Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;349(1):20–9.
3. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. Vol. 125, *Mechanisms of Ageing and Development.* 2004. p. 697–706.
4. Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;380(1–2):89–98.
5. Jondal M, Pazirandeh A, Okret S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? Vol. 25, *Trends in Immunology.* 2004. p. 595–600.
6. Talaber G, Jondal M, Okret S. Local glucocorticoid production in the thymus. *Steroids.* 2015;103:58–63.
7. Cima I, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, et al. Intestinal Epithelial Cells Synthesize Glucocorticoids and Regulate T Cell Activation. *J Exp Med.* 2004;200(12):1635–46.
8. Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(1):E11–24.
9. Talaber G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013/05/28. 2013;380:89–98.
10. Li J, Daly E, Campioli E, Wabitsch M, Papadopoulos V. De novo synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes. *J Biol Chem.* 2014;289(2):747–64.
11. 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):1327–33.
12. Ashwell JD, King LB, Vacchio MS. Cross-talk between the T cell antigen receptor and the glucocorticoid receptor regulates thymocyte development. *Stem Cells.* 1996/09/01. 1996;14:490–500.
13. Mittelstadt PR, Monteiro JP, Ashwell JD. Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2384–94.
14. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1711–23.
15. Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;275(1–2):71–8.
16. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Vol. 8, *Clinical Cancer Research.* 2002. p. 1681–94.
17. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci.* 2005/11/30. 2006;63:60–72.

18. ChemSpider | Search and share chemistry [Internet]. [cited 2018 Aug 8]. Available from: <http://www.chemspider.com/>
19. Stolte EH, Verburg van Kemenade BML, Savelkoul HFJ, Flik G. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. Vol. 190, *Journal of Endocrinology*. 2006. p. 17–28.
20. Hinds TD, Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, et al. Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol*. 2010;24(9):1715–27.
21. Kalinyak JE, Dorin RI, Hoffman AR, Perlman AJ. Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J Biol Chem*. 1987;262(22):10441–4.
22. Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. Vol. 13, *Trends in Molecular Medicine*. 2007. p. 158–63.
23. Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, et al. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1093–102.
24. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002/04/19. 2002;67:529–34.
25. Buttgereit F, Burmester G-R, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today*. 2000;21(4):194–9.
26. Van Bommel T, Marsen T, Bojar H. Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res*. 1987/11/01. 1987;7:1217–23.
27. Buttgereit F, Krauss S, Brand MD. Methylprednisolone inhibits uptake of Ca²⁺ and Na⁺ ions into concanavalin A-stimulated thymocytes. *Biochem J*. 1997;326 (Pt 2):329–32.
28. Gametchu B. Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science (80-)*. 1987/04/24. 1987;236:456–61.
29. Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids*. 1999/05/14. 1999;64:107–19.
30. Evans SJ, Moore FL, Murray TF. Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998;67(1):1–8.
31. Evans SJ, Murray TF, Moore FL. Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000/05/24. 2000;72:209–21.
32. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb j*. 2004/01/14. 2004;18:70–80.
33. Tryc AB, Spies CM, Schneider U, Kunkel D, Berki T, Sieper J, et al. Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2006/09/09. 2006;33:2249–53.

34. Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgerit F, van Deventer S, et al. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood*. 2005/05/19. 2005;106:1703–10.
35. Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J van, Buttgerit F, Peppelenbosch MP, et al. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep*. 2006;7(10):1023–9.
36. Bartis D, Boldizsár F, Szabó M, Pálincás L, Németh P, Berki T. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;98(2–3):147–54.
37. Bartis D, Boldizsár F, Kvell K, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P, et al. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007/01/16. 2007;354:253–8.
38. Sionov R V, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med*. 2006/01/05. 2006;203:189–201.
39. Sionov R V, Kfir S, Zafir E, Cohen O, Zilberman Y, Yefenof E. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle*. 2006/05/12. 2006;5:1017–26.
40. Psarra AM, Solakidi S, Trougakos IP, Margaritis LH, Spyrou G, Sekeris CE. Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005/08/04. 2005;37:2544–58.
41. Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009/02/10. 2009;106:3543–8.
42. Buttgerit F, Grant A, Muller M, Brand MD. The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur J Biochem*. 1994/07/15. 1994;223:513–9.
43. Palinkas L, Talaber G, Boldizsár F, Bartis D, Nemeth P, Berki T. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*. 2008/01/22. 2008;213:39–50.
44. Talaber G, Boldizsár F, Bartis D, Palinkas L, Szabo M, Berta G, et al. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol*. 2009/09/10. 2009;21:1269–76.
45. Wieggers GJ, Knoflach M, Bock G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, et al. CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol*. 2001/07/31. 2001;31:2293–301.
46. Berki T, Pálincás L, Boldizsár F, Németh P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol*. 2002;14(5):463–9.
47. Boldizsár F, Palinkas L, Czompoly T, Bartis D, Nemeth 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*. 2006/11/23. 2006;211:785–96.

48. Pratt WB, Toft DO. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones ¹. *Endocr Rev.* 1997;18(3):306–60.
49. Demonacos C V, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiroyiotis C, Spandidos DA, Sekeris CE. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids.* 1996/04/01. 1996;61:226–32.
50. Berdanier CD. Mitochondrial gene expression: influence of nutrients and hormones. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(10):1593–601.
51. Psarra AM, Sekeris CE. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim Biophys Acta.* 2008/12/23. 2009;1787:431–6.
52. Boldizar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology.* 2009/11/13. 2010;215:521–6.
53. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006/02/24. 2006;6:127–35.
54. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol.* 2000/06/03. 2000;18:309–45.
55. Alves NL, Huntington ND, Rodewald H-R, Di Santo JP. Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell “cradle.” *Trends Immunol.* 2009;30(10):468–74.
56. Boehm T, Swann JB. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat Rev Immunol.* 2013;13(11):831–8.
57. Dooley J, Liston A. Molecular control over thymic involution: From cytokines and micro **RNA** to aging and adipose tissue. *Eur J Immunol.* 2012;42(5):1073–9.
58. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180(5):1955–60.
59. Bunting MD, Comerford I, McColl SR. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):185–96.
60. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don’t see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377–91.
61. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):833–44.
62. Siggs OM, Makaroff LE, Liston A. The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(2):175–83.
63. Ryan JA, Brunelle JK, Letai A. Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4+ CD8+ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):12895–900.
64. Berki T, Palinkas L, Boldizar F, Nemeth P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol.* 2002/04/30. 2002;14:463–9.

65. Stritesky GL, Jameson SC, Hogquist KA. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):95–114.
66. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2010;11(1):14–20.
67. Coquet JM, Rausch L, Borst J. The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(9):780–8.
68. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(2):91–105.
69. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012;151(2):289–303.
70. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655–69.
71. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 1997;89(4):587–96.
72. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006;126(6):1121–33.
73. Plank MW, Kaiko GE, Maltby S, Weaver J, Tay HL, Shen W, et al. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J Immunol.* 2017;198(5):2182–90.
74. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science.* 2009;325(5943):1006–10.
75. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012;209(7):1241–53.
76. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010;20(1):4–12.
77. Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2014;35(2):61–8.
78. Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev.* 2013;252(1):104–15.
79. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity.* 2009;30(5):646–55.
80. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(27):12204–9.
81. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol.* 2009;10(7):689–95.
82. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* 2009;30(5):616–25.
83. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):531–64.

84. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-J, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875–86.
85. Arpaia N, Rudensky AY. Microbial metabolites control gut inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):2058–9.
86. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo C V, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204(8):1757–64.
87. Wang YM, Ghali J, Zhang GY, Hu M, Wang Y, Sawyer A, et al. Development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nephrology*. 2016;21(2):81–5.
88. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20–1.
89. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, 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.
90. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18–20.
91. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* (80-). 2003;299(5609):1057–61.
92. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330–6.
93. Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337–42.
94. Maruyama T, Konkel JE, Zamarron BF, Chen W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol*. 2011;23(6):418–23.
95. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, 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):3433–41.
96. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2012;209(10):1723–42.
97. Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(10):1713–22, S1-19.
98. Singh K, Hjort M, Thorvaldson L, Sandler S. Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naïve mice. *Sci Rep*. 2015;5(1):7767.
99. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, 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):2378–89.

100. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009;10(9):1000–7.
101. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008;29(1):44–56.
102. Duarte JH, Zelenay S, Bergman M-L, Martins AC, Demengeot J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol.* 2009;39(4):948–55.
103. Okada M, Hibino S, Someya K, Yoshmura A. Regulation of regulatory T cells: epigenetics and plasticity. *Adv Immunol.* 2014;124:249–73.
104. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. 2017;4(9):721–5.
105. Arce-Sillas A, Álvarez-Luquín DD, Tamaya-Domínguez B, Gomez-Fuentes S, Trejo-García A, Melo-Salas M, et al. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *J Immunol Res.* 2016;2016.
106. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature.* 2000/10/26. 2000;407:796–801.
107. Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol.* 2006/03/25. 2006;6:308–17.
108. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239–57.
109. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
110. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486–541.
111. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015;22(1):58–73.
112. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11–12):2405–10.
113. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231–41.
114. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science (80-).* 1998/08/28. 1998;281:1312–6.
115. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2006/11/04. 2007;14:32–43.
116. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013/06/05. 2013;5.
117. McLuskey K, Mottram JC. Comparative structural analysis of the caspase family with other

- clan CD cysteine peptidases. *Biochem J.* 2015;466(2):219–32.
118. Wajant H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* (80-). 2002;296(5573):1635–6.
 119. Schütze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(8):655–62.
 120. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence Receptors: From Basic Research to Drug Development. *Sci Signal.* 2011;4(157):mr2-mr2.
 121. Koshio O, Nagao T, Mabuchi A, Ono Y, Suzuki K. Apoptotic signaling in endothelial cells with neutrophil activation. *Mol Cell Biochem.* 2012;363(1–2):269–80.
 122. Janssen WJ, Barthel L, Muldrow A, Oberley-Deegan RE, Kearns MT, Jakubzick C, et al. Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(5):547–60.
 123. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(2):265–7.
 124. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem.* 1999/07/31. 1999;274:22532–8.
 125. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo j.* 1998/05/02. 1998;17:1675–87.
 126. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 Type I/Type II model. *Semin Immunol.* 2003;15(3):185–93.
 127. Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 1995;14(24):6136–47.
 128. Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DCS, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature.* 2009;460(7258):1035–9.
 129. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998/09/04. 1998;94:491–501.
 130. Huang K, Zhang J, O'Neill KL, Gurumurthy CB, Quadros RM, Tu Y, et al. Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate the BH3-only Protein Bid during TRAIL-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 2016;291(22):11843–51.
 131. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):87.
 132. Frenzel A, Grespi F, Chmelewskij W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis.* 2009;14(4):584–96.
 133. Walensky LD. From Mitochondrial Biology to Magic Bullet: Navitoclax Disarms BCL-2 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(5):554–7.
 134. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49–63.
 135. Pihán P, Carreras-Sureda A, Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* 2017;24(9):1478–87.

136. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 2015;112(6):957–62.
137. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):20–33.
138. Solano-Gálvez S, Abadi-Chiriti J, Gutiérrez-Velez L, Rodríguez-Puente E, Konstat-Korzenny E, Álvarez-Hernández D-A, et al. Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease. *Med Sci*. 2018;6(3):54.
139. Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, et al. Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells Against Dexamethasone-Induced Senescence. *Rejuvenation Res*. 2011;14(3):241–8.
140. Fletcher AL, Lowen TE, Sakkal S, Reiseger JJ, Hammett M V, Seach N, et al. Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment. *J Immunol*. 2009;183(2):823–31.
141. Dardenne M, Itoh T, Homo-Delarche F. Presence of glucocorticoid receptors in cultured thymic epithelial cells. *Cell Immunol*. 1986;100(1):112–8.
142. Qiao S, Chen L, Okret S, Jondal M. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. *Exp Cell Res*. 2008/07/22. 2008;314:3027–35.
143. Qiao S, Okret S, Jondal M. Thymocyte-synthesized glucocorticoids play a role in thymocyte homeostasis and are down-regulated by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology*. 2009/05/02. 2009;150:4163–9.
144. Vacchio MS, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med*. 1997;185(11):2033–8.
145. Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgereit F, Peppelenbosch MP, et al. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep*. 2006/08/05. 2006;7:1023–9.
146. Talaber G, Tuckermann PJ, Okret S. ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids. *FASEB J*. 2015;29(6):2526–34.
147. Hoijman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology*. 2003/09/23. 2004;145:418–25.
148. Tan YJ, Teng E, Ting AE. A small inhibitor of the interaction between Bax and Bcl-X(L) can synergize with methylprednisolone to induce apoptosis in Bcl-X(L)-overexpressing breast-cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003/07/29. 2003;129:437–48.
149. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol*. 2002/09/24. 2002;3:932–9.
150. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science (80-)*. 1999/11/27. 1999;286:1735–8.
151. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*. 2005/08/25. 2005;106:4131–8.

152. Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS, Distelhorst CW. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2003/04/05. 2003;278:23861–7.
153. Bianchini R, Nocentini G, Krausz LT, Fettucciari K, Coaccioli S, Ronchetti S, et al. Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006/08/18. 2006;319:887–97.
154. Ugor E, Prenek L, Pap R, Berta G, Ernszt D, Najbauer J, et al. Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression. *Immunobiology*. 2018;223(4–5):422–31.
155. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods*. 1998/08/06. 1998;214:19–27.
156. Pendergrass W, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytom A*. 2004/09/24. 2004;61:162–9.
157. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol*. 2004/06/25. 2004;165:35–52.
158. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest*. 2006/10/04. 2006;116:2610–21.
159. Stasik I, Rapak A, Ziolo E, Strzadala L. The mitochondrial localization of RelB and NFATx in immature T cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2008/05/09. 2008;13:493–501.
160. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol*. 2002/11/05. 2003;21:71–105.
161. Oh SH, Kim K. Expression of interleukin-1 receptors in the later period of foetal thymic organ culture and during suspension culture of thymocytes from aged mice. *Immunol Cell Biol*. 1999/11/26. 1999;77:491–8.
162. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997/04/15. 1997;94:3668–72.
163. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*. 1998/08/26. 1998;94:339–52.
164. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 1998/09/30. 1998;94:739–50.
165. Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood*. 2002/10/24. 2003;101:585–93.
166. McColl KS, He H, Zhong H, Whitacre CM, Berger NA, Distelhorst CW. Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol*. 1998/08/15. 1998;139:229–38.

167. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action from Sensitivity to Resistance. In: *Endocrine development*. 2013. p. 41–56.
168. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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*. 1995;155(3):1151–64.
169. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect*. 2004;6(8):745–51.
170. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1219–27.
171. Forsthoefel AM, Thompson EA. Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells. *Mol Endocrinol*. 1987/12/01. 1987;1:899–907.
172. Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, et al. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Int Immunol*. 2003/05/17. 2003;15:741–9.
173. Malone MH, Wang Z, Distelhorst CW. The glucocorticoid-induced gene tdag8 encodes a pro-apoptotic G protein-coupled receptor whose activation promotes glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2004/10/16. 2004;279:52850–9.
174. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F, Distelhorst CW. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem*. 2003/05/09. 2003;278:27053–8.
175. Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem*. 2004/10/29. 2004;279:55809–17.
176. Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, et al. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001/09/27. 2001;98:11318–23.
177. Hegardt C, Andersson G, Oredsson SM. Spermine prevents cytochrome c release in glucocorticoid-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Cell Biol Int*. 2003;27(2):115–21.
178. Tonomura N, McLaughlin K, Grimm L, Goldsby RA, Osborne BA. Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J Immunol*. 2003;170(5):2469–78.
179. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2010/12/15. 2011;1813:508–20.
180. Hutcheson J, Scatizzi JC, Bickel E, Brown NJ, Bouillet P, Strasser A, et al. Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J Exp Med*. 2005/06/22. 2005;201:1949–60.
181. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease. 2015;6(27).
182. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*. 2002;415(6874):922–6.

183. Villunger A, Marsden VS, Zhan Y, Erlacher M, Lew AM, Bouillet P, et al. Negative selection of semimature CD4(+)8(-)HSA+ thymocytes requires the BH3-only protein Bim but is independent of death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):7052–7.
184. Enders A, Bouillet P, Puthalakath H, Xu Y, Tarlinton DM, Strasser A. Loss of the Pro-Apoptotic BH3-only Bcl-2 Family Member Bim Inhibits BCR Stimulation–induced Apoptosis and Deletion of Autoreactive B Cells. *J Exp Med*. 2003;198(7):1119–26.
185. Gray DHD, Kupresanin F, Berzins SP, Herold MJ, O’Reilly LA, Bouillet P, et al. The BH3-only proteins Bim and Puma cooperate to impose deletional tolerance of organ-specific antigens. *Immunity*. 2012;37(3):451–62.
186. Krishnamurthy B, Chee J, Jhala G, Trivedi P, Catterall T, Selck C, et al. BIM Deficiency Protects NOD Mice From Diabetes by Diverting Thymocytes to Regulatory T Cells. *Diabetes*. 2015;64(9):3229–38.
187. Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Achmuller C, et al. Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005/11/19. 2006;107:2061–9.
188. Harada M, Pokrovskaja-Tamm K, Soderhall S, Heyman M, Grander D, Corcoran M. Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012/04/06. 2012;53:2041–50.
189. Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17~92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Mol Endocrinol*. 2011/01/18. 2011;25:409–20.
190. Zhao Y, Guo X, Ma Z, Gu L, Ge J, Li Q. Pro-apoptotic protein BIM in apoptosis of glucocorticoid-sensitive and -resistant acute lymphoblastic leukemia CEM cells. *Med Oncol*. 2011;28(4):1609–17.
191. Jing D, Bhadri VA, Beck D, Thoms JAI, Yakob NA, Wong JWH, et al. Opposing regulation of BIM and BCL2 controls glucocorticoid-induced apoptosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. 2015;125(2):273–83.
192. Heidari N, Miller A V, Hicks MA, Marking CB, Harada H. Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells. *Cell Death Dis*. 2012;3(7):e349.
193. Jiang N, Koh GS, Lim JY, Kham SK, Ariffin H, Chew FT, et al. BIM is a prognostic biomarker for early prednisolone response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2011;39(3):321–9, 329.e1-3.
194. Piñon JD, Labi V, Egle A, Villunger A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene*. 2008;27(Suppl 1):S41–52.
195. Kelly JL, Novak AJ, Fredericksen ZS, Liebow M, Ansell SM, Dogan A, et al. Germline variation in apoptosis pathway genes and risk of non-Hodgkin’s lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010/09/22. 2010;19:2847–58.
196. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko TK, Teo ASM, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 2012;18(4):521–8.
197. Akiyama T, Dass CR, Choong PF. Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther*. 2009/11/26. 2009;8:3173–80.

198. Faber AC, Ebi H, Costa C, Engelman JA. Apoptosis in targeted therapy responses: the role of BIM. *Adv Pharmacol.* 2012/09/11. 2012;65:519–42.
199. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med.* 2012/03/20. 2012;18:521–8.
200. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity.* 2002;16(6):759–67.
201. Pellegrini M, Belz G, Bouillet P, Strasser A. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14175–80.
202. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1325–38.
203. Pinon JD, Labi V, Egle A, Villunger A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene.* 2009/07/31. 2008;27 Suppl 1:S41-52.
204. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 2011/04/05. 2011;145:104–16.
205. Nuutinen U, Ropponen A, Suoranta S, Eeva J, Eray M, Pellinen R, et al. Dexamethasone-induced apoptosis and up-regulation of Bim is dependent on glycogen synthase kinase-3. *Leuk Res.* 2009;33(12):1714–7.
206. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1998/01/07. 1997;139:1281–92.
207. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2001/01/14. 2001;276:11615–23.
208. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (80-).* 2001/04/28. 2001;292:727–30.
209. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2001/10/05. 2001;8:705–11.
210. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell.* 2005/02/22. 2005;17:525–35.
211. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 2005;435(7042):677–81.
212. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* 2008;68(9):3421–8.
213. Josefsson EC, James C, Henley KJ, Debrincat MA, Rogers KL, Dowling MR, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to

- survive and produce platelets. *J Exp Med*. 2011;208(10):2017–31.
214. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res*. 2008;68(9):3421–8.
 215. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013;19(2):202–8.
 216. Ng SY, Davids MS. Selective Bcl-2 inhibition to treat chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(4):224–9.
 217. Gavathiotis E, Reyna DE, Bellairs JA, Leshchiner ES, Walensky LD. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol*. 2012;8(7):639–45.
 218. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*. 2016/04/10. 2016;
 219. Wang J, Zhen L, Klug MG, Wood D, Wu X, Mizrahi J. Involvement of caspase 3- and 8-like proteases in ceramide-induced apoptosis of cardiomyocytes. *J Card Fail*. 2000/09/21. 2000;6:243–9.
 220. Lepine S, Lakatos B, Courageot MP, Le Stunff H, Sulpice JC, Giraud F. Sphingosine contributes to glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes independently of the mitochondrial pathway. *J Immunol*. 2004/09/10. 2004;173:3783–90.
 221. Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*. 2003/03/26. 2003;17:883–95.
 222. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C-Y, Yang D, Karasuyama H, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 1996;384(6607):368–72.
 223. Talanian R V, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, et al. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem*. 1997/04/11. 1997;272:9677–82.
 224. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997/07/18. 1997;272:17907–11.
 225. Poreba M, Strozyk A, Salvesen GS, Drag M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013/06/22. 2013;5:a008680.
 226. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. 1999/09/07. 1999;400:886–91.
 227. Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol*. 2006/01/21. 2006;176:1695–702.
 228. Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ*. 2009/03/28. 2009;16:1053–61.
 229. Granes F, Roig MB, Brady HJ, Gil-Gomez G. Cdk2 activation acts upstream of the mitochondrion during glucocorticoid induced thymocyte apoptosis. *Eur J Immunol*. 2004/09/16. 2004;34:2781–90.

230. Pozzesi N, Fierabracci A, Liberati AM, Martelli MP, Ayroldi E, Riccardi C, et al. Role of caspase-8 in thymus function. *Cell Death Differ.* 2013/11/26. 2014;21:226–33.
231. Bruscoli S, Di Virgilio R, Donato V, Velardi E, Baldoni M, Marchetti C, et al. Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2005/12/06. 2006;529:63–70.
232. 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):859–69.
233. 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):2139–49.
234. Stock P, Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J Immunol.* 2005;175(11):7380–7.
235. Wüst S, van den Brandt J, Tischner D, Kleiman A, Tuckermann JP, Gold R, et al. Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008;180(12):8434–43.
236. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Rückert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(6):1425–33.
237. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4⁺ CD25^{high} T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(11):1512–7.
238. Azab NA, Bassyouni IH, Emad Y, Abd El-Wahab GA, Hamdy G, Mashahit MA. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol.* 2008;127(2):151–7.
239. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006;116(1):146–55.
240. Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA, Nichols C, Fahey AJ, Showe L, et al. Glucocorticoids increase CD4⁺CD25⁺ cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2009;119(4):239–45.
241. Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea A-M, et al. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity.* 2009;42(1):41–9.
242. Majak P, Rychlik B, Stelmach I. The effect of oral steroids with and without vitamin D3 on early efficacy of immunotherapy in asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(12):1830–41.
243. Pandolfi J, Baz P, Fernández P, Discianni Lupi A, Payaslián F, Billordo LA, et al. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by Dexamethasone. *Clin Immunol.* 2013;149(3):400–10.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy lehetővé tette a kutatómunkába való bekapcsolódásomat az Immunológia és Biotechnológiai Intézetben, és támogatta munkám megvalósulását.

Köszönet Dr. Boldizsár Ferencnek tudományos diákköri, majd PhD hallgatói munkám segítéséért.

Köszönöm Dr. Szabó Mariannak, hogy segítette a kísérleti módszerek elsajátítását.

Hálásan köszönöm a segítségét Prof. Dr. Balogh Péternek, akihez mindig bizalommal fordulhattam a kísérletek megvalósításával kapcsolatos kérdéseimmel.

Köszönet illeti Dr. Berta Gergelyt, a konfokális mikroszkópos felvételek készítésében nyújtott sok segítségéért.

Köszönöm az Immunológia és Biotechnológiai Intézet minden munkatársának, hogy segítettek a munkám során.

Köszönöm barátomnak és munkatársamnak Kugyelka Rékának, hogy velem volt a munkám során, végig segítette azt, meghallgatta és építő kritikával illette ötleteimet és, hogy tüzetesen elolvasta kéziratomat.

Köszönöm szépen barátaimnak és családomnak, akik türelmesen támogattak a munkám során, mindvégig mellettem álltak tanulmányaim alatt, és akik nélkül nem sikerült volna elképzeléseimet megvalósítanom.

Munkám a következő támogatások segítségével valósult meg:

OTKA K105962, K101493, EFOP-3.6.1.-16-2016-00004; GINOP 2.3.2-15-2016-00050.
TÁMOP 4.2.2.B-15 KONV-2015-0011

10. Mellékletek (a PhD-tézisek alapját képező közlemények)

The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells

Lilla Prenek¹ · Ferenc Boldizsár¹ · Réka Kugyelka¹ · Emese Ugor¹ · Gergely Berta² · Péter Németh¹ · Timea Berki¹

Published online: 26 November 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Glucocorticoids (GC) are important in the regulation of selection and apoptosis of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes. The pronounced GC-sensitivity of DP thymocytes, observed earlier, might be due to the combination of classical (genomic) and alternative (non-genomic) glucocorticoid receptor (GR) signaling events modifying activation or apoptotic pathways. In particular, the previously demonstrated mitochondrial translocation of activated GR in DP thymocytes offered a fascinating explanation for their pronounced GC-induced apoptosis sensitivity. However, the fine molecular details how the mitochondrial translocation of GR might regulate apoptosis remained unclear. Therefore, in the present study, we intended to examine which apoptotic pathways could be involved in GC-induced thymocyte apoptosis. Furthermore

we investigated the potential relationship between the GR and Bcl-2 proteins. Using an in vitro test system, thymocytes from 4-week-old *BALB/c* mice, were treated with the GC-analogue dexamethasone (DX). Bax accumulated in mitochondria upon DX treatment. Mitochondrial GR showed association with members of the Bcl-2 family: Bak, Bim, Bcl-x_L. Elevated Cytochrome C, and active caspase-3, -8, and -9 levels were detected in thymocytes after DX treatment. These results support the hypothesis that in early phases of GC-induced thymocyte apoptosis, the mitochondrial pathway plays a crucial role, confirmed by the release of Cytochrome C and the activation of caspase-9. The activation of caspase-8 was presumably due to cross-talk between apoptotic signaling pathways. We propose that the GC-induced mitochondrial accumulation of Bax and the interaction between the GR and Bim, Bcl-x_L and Bak could play a role in the regulation of thymocyte apoptosis.

✉ Timea Berki
berki.timea@pte.hu

Lilla Prenek
prenek.lilla@pte.hu

Ferenc Boldizsár
boldizsar.ferenc@pte.hu

Réka Kugyelka
kugyelka.reka@pte.hu

Emese Ugor
ugor.emese@pte.hu

Gergely Berta
gergely.berta@aok.pte.hu

Péter Németh
nemeth.peter@pte.hu

Keywords Glucocorticoid receptor · Glucocorticoid hormone · Non-genomic pathway · Mitochondria · Thymocyte apoptosis · Bcl-2 proteins

Introduction

Despite their multiple side effects and broad organ-specificity, high-dose synthetic glucocorticoid hormone (GC) analogues are frequently used in the therapy of autoimmune diseases, hematological malignancies and allergies [1, 2]. GC analogues have been shown to promote apoptosis of leukemic cells and to trigger complex anti-inflammatory actions by targeting both the molecular and cellular components of the immune system [3, 4]. GCs induce apoptotic death of immature, developing thymocytes and also some groups of mature, activated T-cells [5]. In mouse models,

¹ Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs Medical Center, Szigeti út. 12., Pécs 7624, Hungary

² Department of Medical Biology, University of Pécs Medical School, Szigeti út. 12., Pécs 7624, Hungary

GCs cause robust thymocyte depletion, primarily by the induction of CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) thymocyte apoptosis [6–9].

Most of the GCs therapeutic actions are the results of their genomic effects mediated by the ligand-induced nuclear translocation of the cytoplasmic glucocorticoid receptors (GR) leading to the transactivation or -repression of numerous genes [10–13]. However, some effects, especially those at high GC concentrations, for example, used for intravenous pulse therapy or intraarticular injections, are too rapid to be mediated by changes at the genomic level which take hours or even days to develop. These “non-genomic”/alternative GC actions include the physico-chemical interactions of the GC hormone with biological membranes [14] and the effects mediated by the glucocorticoid–glucocorticoid receptor (GC-GR) complex. These latter involves non-nuclear actions like rapid eNOS (endothelial nitrogen oxide synthase) activation or alterations in signaling events and effector mechanisms of the cells [15], for example the interaction of the activated GR with cytoplasmic proteins like NF- κ B (nuclear factor-kappaB) [16], or with molecules of the TCR (T-cell receptor) signaling pathway like Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), Fyn [17] and ZAP-70 (zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa) [18]. The third non-genomic GC action is the translocation of GR to the mitochondria, which correlates to the sensitivity of a given cell type to GC-induced apoptosis [19, 20]. The GC-induced mitochondrial apoptotic pathway leads to the disruption of the mitochondrial membrane-potential and the release of key apoptosis inducing factors like Cytochrome C [21, 22]. This study focuses on this third type of accidental apoptotic cell death and its regulation.

The mitochondrial, or intrinsic, apoptotic pathway is regulated by pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family at the level of the mitochondria [23]. Within the pro-apoptotic members of the Bcl-2 family there are the Bcl-2 homology 3 (BH3)-only group proteins such as Bim, Bid, Bad, PUMA, Noxa, which transmit the apoptotic stimuli by activating Bax and Bak. The anti-apoptotic members such as Bcl-2 and Bcl-x_L counteract this process by binding and neutralizing the pro-apoptotic proteins. After Bax and Bak formed pores on the mitochondrial outer membrane, Cytochrome C is released and it participates in the formation of the apoptosome with Apaf1 and caspase-9 and activates caspase-3 [23, 24]. Caspase-3 can also be activated by caspase-8 after the initiation of the extrinsic apoptotic pathway [25, 26].

In a preliminary work, in a TCR transgenic mouse model, we have shown that thymocytes surviving during T cell selection up-regulated their mitochondrial anti-apoptotic Bcl-2 protein, suggesting that the mitochondria were directly involved in the regulation of thymocyte apoptosis

[22]. Other studies with murine models have demonstrated the importance of Bax, Bak, Bim and Bcl-x_L in mediating dexamethasone (DX)-induced apoptosis [27, 28]. Previously we have shown, that upon short-term in vitro exposure of DP thymocytes to GCs the GR translocated to the mitochondria within 30 min, having a direct effect on the mitochondrial function and decreasing the mitochondrial membrane potential [6]. Taking these preliminary data together, we hypothesize that the mitochondrial GR translocation could play an important role in the GC-induced apoptosis of thymocytes. On the other hand the relation of Bcl-2 family proteins like Bak, Bax, Bim or Bcl-x_L with the GR has not been investigated so far in the GC-induced mitochondrial apoptotic pathway of thymocytes.

Therefore, in this study, we analyzed the short term in vitro DX treatment-induced interactions between the GR and Bcl-2 family member proteins in mouse thymocytes, paying special attention to their distribution between the cytoplasm and mitochondria. Parallel with this we characterized the activation of different caspases as markers of apoptosis. Here, we provide evidence for the activation of the mitochondrial apoptotic pathway as well as direct association between the GR and Bak, Bim, and Bcl-x_L after short term GC analogue treatment in thymocytes.

Materials and methods

Mice

3–4 weeks old *BALB/c* mice (obtained from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were kept under conventional conditions and provided with pelleted rodent chow and water ad libitum. All animal experiments were carried out in accordance with the regulations of Committee on Animal Experimentations of University of Pécs (#BA 02/2000–16/2015).

Short-term in vitro GC-analogue treatment of isolated thymocytes

After sacrifice, thymi were removed and homogenized mechanically in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) followed by filtration through nylon mesh. Cell viability was determined by trypan-blue dye exclusion test using a hemocytometer. 5×10^7 thymocytes were treated with 10^{-6} M DX (synthetic steroid compound, which has primarily GC-like effects), 10^{-2} M stock dissolved in dimethyl sulfoxide [(DMSO), both from Sigma-Aldrich] in serum-free RPMI for 1 and 3 h for western blotting, 0.5 h for confocal microscopy and for 0.5, 1, 2 and 3 h for flow cytometry at 37 °C. Control samples were kept under the same conditions for the same time in the presence

of the solvent alone. The treatment was stopped by adding ice-cold phosphate buffered saline (PBS), containing 0.1 % NaN₃ (Sigma-Aldrich).

Antibodies

The following antibodies (Abs) were used for flow cytometry: anti-CD4-Phycoerythrin-Cyanine5 (PE-Cy5) (clone# RM4–5) and anti-CD8-Phycoerythrin (PE) (clone# 53–6.7) (all from BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), for analysis of activated (cleaved) caspases rabbit anti-caspase-3 (clone# 5A1E), rabbit anti-caspase-8 (clone# D5B2) and rabbit anti-caspase-9 (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were used with anti-rabbit IgG-Fluorescein (FITC) (Sigma-Aldrich) as secondary Ab.

For confocal microscopy the following Abs were used: anti-CD4-Pacific Blue (clone# RM4–5, BD Pharmingen), anti-CD8-Pacific Orange (clone# 5H10, Life Technologies, Waltham, MA, USA), anti-GR-FITC (clone# 5E4-B1, produced in our laboratory) [29] and rabbit anti-Bak, -Bax, -Bcl-x_L (all from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and -Bim (clone# C34C5, Cell Signaling Technology) with goat anti-rabbit IgG-Cyanine3 (Cy3) secondary Ab and goat anti-rabbit IgG-FITC secondary Ab (Sigma-Aldrich).

For western blot analysis of the activated (cleaved) caspases in the subcellular fractions the following Abs were used: rabbit anti-caspase-3, -8, and -9 (all from Cell Signaling Technology) in 1:1000 dilutions. The pro-apoptotic proteins were detected with mouse anti-Cytochrome C (clone# 7H8.2C12, BD Pharmingen) in 1:2000 dilution, rabbit anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology) in 1:500 dilution. For reprobing mouse anti-β-actin (clone# AC-74, Sigma-Aldrich) in 1:5000 dilution and anti-Cytochrome C Abs were used.

For immunoprecipitation, anti-GR (clone# 8E9, produced in our laboratory) [29] was used. For western-blot analysis of immunoprecipitated samples the following primary Abs were used: anti-Bak, anti-Bax (both from Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Bcl-x_L (BD Pharmingen) in 1:1000 dilution, rabbit anti-Bim (Cell Signaling Technology) in 1:1000 dilution and mouse anti-GR (clone# 5E4, produced in our laboratory) in 1:2000 dilution [29].

For visualization of the western blots peroxidase conjugated anti-mouse- or anti-rabbit IgG (produced in our laboratory) were used as secondary Abs in 1:1000 dilutions.

Subcellular fractionation

Mitochondria Isolation Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) was used to separate cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fraction from thymocytes, according to manufacturer's instructions, with minor modifications according to

Stasik et al. [30]. Briefly, isolated solvent control and DX-treated thymocytes were washed in cold PBS-azide (PBS containing 0.1 % NaN₃) and lysed. After centrifugation at 800×g for 10 min, the nuclear pellet was separated. The post-nuclear supernatant was centrifuged first at 3000×g for 15 min and then at 12,000×g for 5 min. The pellet containing mitochondria was either dissolved in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (125 mM Tris, 4 % SDS, 10 % mercaptoethanol, 0.006 % bromo-phenol-blue (all from Sigma-Aldrich) and 10 % glycerol (Molar Chemicals, Budapest, Hungary)) or used for immunoprecipitation and the clear supernatant was used as a cytosolic fraction. The supernatant was either used for immunoprecipitation or boiled immediately in SDS sample buffer for 10 min. To use mitochondria for immunoprecipitation the pellet was lysed in TEGM lysis buffer (10 mM Tris base, 4 mM EDTA (all from Sigma-Aldrich), 50 mM sodium chloride, 20 mM sodium molybdate (Molar Chemicals), 10 % glycerol, pH 7.6) complemented freshly with protease inhibitor and Na-orthovanadate (both from Sigma-Aldrich). The samples were frozen and thawed five times in liquid nitrogen and then incubated for 30 min on ice and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and the supernatant was used for immunoprecipitation.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation, the cytosolic and mitochondrial fractions were incubated overnight under continuous rotation with the appropriate amount of precipitating antibodies (see in “Antibodies” section) in blocking buffer (10 mM Tris, 100 mM sodium chloride, pH 7.4 containing 10 % bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich)); then Protein-G (Santa Cruz Biotechnology) was added to the samples and they were incubated for additional 2 h under continuous rotation. Finally, samples were washed five times in PBS and immune complexes were removed from the Protein-G with boiling for 3 min in SDS sample buffer.

Western blotting

Cell fractions were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10 or 15 % gel. The gels were blotted for 2 h to nitrocellulose membranes using Mini Trans-Blot Cell blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After transfer, nitrocellulose membranes were soaked in blocking buffer (2 % BSA or 1 % non-fat dry milk (Bio-Rad), 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1 % Tween 20 (Molar Chemicals), pH 7.4) and then incubated with the appropriate primary antibodies. Anti-β-actin and anti-Cytochrome C antibodies were used to control the equal loading and purity of the fractions. Blots were then probed with the

appropriate secondary Abs. Blots were washed in a buffer containing 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20 (pH 7.4). Western blot visualization was performed by enhanced chemiluminescence as described in the manufacturer's instructions (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Pierce). Luminescent light signals were detected with Fujifilm LAS 4000 blot documentary system.

Analysis of blots

Densitometry of blots was done with the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Densitometric data was calculated using the original, unmodified images. Relative densities of caspases and cytoplasmic Bax blots were normalized to the relative densities of β -actin, the mitochondrial fraction of Bax to Cytochrome *C* to determine the relative expression in the subcellular fractions. Relative densities of Bim, Bak, and Bcl-x_L immunoprecipitation blots were normalized to the relative densities of GR. Brightness and contrast of representative images have been adjusted.

Labeling cells for confocal laser scanning microscopy

After 30 min DX treatment CD4-Pacific Blue and CD8-Pacific Orange labeling of thymocytes was performed in binding buffer (PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃) then cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and washed in permeabilization buffer (PBS containing 0.1% BSA, 0.1% NaN₃ and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich)). The intracellular labeling of the cells was performed in saponin buffer with rabbit anti-Bak, Bax, Bcl-x_L, and Bim as primary Abs and anti-rabbit IgG-Cy3 as secondary Ab then with 1 μ g/ml anti-GR-FITC antibody [29]. The cells were incubated for 1 h with the Abs and washed twice in saponin buffer. After the labelling the cells were washed again twice in saponin buffer and once with PBS then cytospined onto slides. The excess fluid was carefully aspirated and the slides were covered using Promofluor Antifade Reagent (PromoKine, Heidelberg, Germany).

Mitotracker chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros) staining of mitochondria for confocal laser scanning microscopy

CMX-Ros (Invitrogen, Waltham, MA, USA) is a cell-permeant lipophilic reagent, which diffuses through the plasma membrane and accumulates in active mitochondria due to normal mitochondrial membrane potential [31]. Briefly, 10⁶ thymocytes were incubated in 1 ml serum-free RPMI containing 10 μ l CMX-Ros stock solution (1 μ g/ml in DMSO) for 30 min at 37°C, following the manufacturer's

instructions, parallel with 1 μ M DX treatment. Cell surface labelling with anti-CD4-Pacific Blue and anti-CD8-Pacific Orange and intracellular labeling with rabbit anti-Bax as primary Ab, and anti-rabbit IgG-FITC as secondary Ab was performed as indicated in “Labeling cells for confocal laser scanning microscopy” section.

Confocal microscopic image acquisition and analysis

Visualization and analysis of the samples were carried out using an Olympus Fluoview 300 confocal microscope with an Olympus Fluoview FV1000S-IX81 image acquisition software system. Data were collected in four separate channels, including differential interference contrast (DIC), UV for CD4, virtual red for CD8, FITC for GR, red for Bak, Bax, Bcl-x_L, and Bim or red for mitochondria and FITC for Bax. Sequential scanning was used for image acquisition. Signals were collected from cells in 3–3 frames and Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim-GR and CMX-Ros-Bax morphological association was analyzed with the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) using co-localization plug-in. Co-localization data was calculated using the original, unmodified images. Based on the analysis of pixel fluorescence intensities, ranging from 0 to 255, specific staining was distinguished from background by using a threshold value of 50 as described elsewhere [32, 33]. Then, co-localized pixels between Cy3-GR and CMX-Ros-Bax were counted. One hundred DP cells per sample were analyzed altogether using this approach. Brightness and contrast of representative images have been adjusted.

Labeling cells for flow cytometry

10⁶ cells were treated with DX for 0.5, 1, 2 and 3 h. Cell surface labelling with CD4-PECy5 and CD8-PE and intracellular labelling with rabbit anti-caspase-3, -8, -9 as primary antibodies and with anti-rabbit IgG-FITC as secondary antibody was performed as indicated in “Labeling cells for confocal laser scanning microscopy” section followed by flow cytometric analysis.

Flow cytometric data acquisition and analysis

Samples were measured and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using the CellQuest Pro software. Thymocyte subpopulations were analyzed separately based on their cell surface CD4/CD8 expression for FITC intensity detected in the FL1 channel. Fluorescent histogram plots were used to compare the ratio of active caspase-3, -8, -9 expressing cells (FITC positive) of different samples.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. GraphPad Prism (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA) program was used to create the artwork and perform the statistical analysis using Student's *t* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

DX-induced changes in the co-localization between GR and members of Bcl-2 protein family

Previous studies have shown the importance of Bax, Bak and Bim in mediating DX-induced apoptosis [27, 28, 34–36] and in our preliminary work, in a TCR transgenic model, we have observed that thymocytes, surviving T cell selection, up-regulated their Bcl-2 protein level [22]. We have also shown, that upon in vitro exposure of DP thymocytes to GC the activated GR translocated to the mitochondria within 30 min which was followed by the decrease of the mitochondrial membrane potential [6], indicating the importance of non-genomic effects and the mitochondrial apoptotic pathway in the GC-induced apoptosis of thymocytes. Therefore, now we set out to find potential molecular partners for the activated GR in the mitochondrial apoptotic pathway. To this end we investigated possible protein interactions between the GR and Bcl-2 family proteins, which are responsible for the control of the mitochondrial membrane potential [37]. To test our hypothesis the co-localization of GR and Bak, Bax, Bcl-x_L or Bim was analyzed in DP thymocytes before and after 30 min of high dose DX treatment (Fig. 1). We found that the GR co-localized to some extent with all four investigated Bcl-2 family proteins (Fig. 1a1–d1). Upon DX treatment the GR-Bak association showed minimal change (Fig. 1a1), the GR-Bax, -Bcl-x_L association decreased (Fig. 1b1, c1), while the GR-Bim association increased (Fig. 1d1).

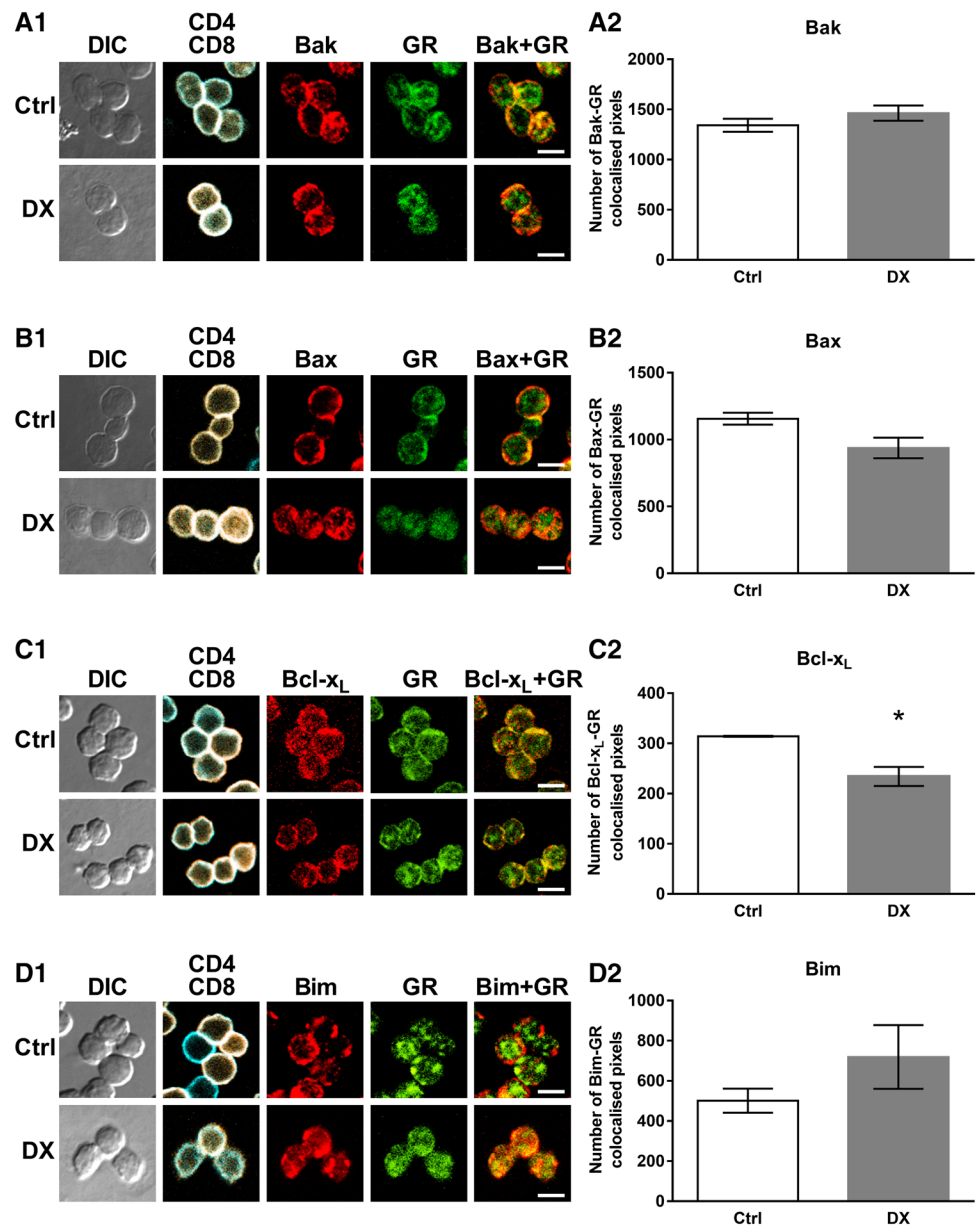
To quantify the rate of co-localization, we calculated and compared the number of co-localized pixels in individual DP cells after 30 min of DX treatment to their controls. After DX treatment the co-localized pixel number minimally changed between Bak and GR (1463 ± 76 versus 1342 ± 65 in the control) (Fig. 1a2) but decreased slightly between Bax and GR (937 ± 77 versus 1156 ± 44 in the control) (Fig. 1b2). The co-localization between GR and Bcl-x_L decreased significantly after DX treatment (234 ± 19 versus 314 ± 1 in the control) (Fig. 1c2). We observed a remarkable, but statistically not significant, increase in the co-localization of Bim and GR upon 30 min DX treatment (719 ± 159 versus 501 ± 60 in the control) (Fig. 1d2).

The GR interacts with members of the Bcl-2 protein family in the cytoplasm and the mitochondria of thymocytes

To confirm our confocal microscopic results, we investigated the interaction of the GR with Bcl-2 family member proteins: Bak, Bax, Bcl-x_L and Bim proteins in thymocytes using co-immunoprecipitation with anti-GR antibody. We also wanted to elucidate whether the high dose DX treatment changed the active GR-Bcl-2 family protein complexes' subcellular distribution. Therefore, we performed subcellular fractionation and isolated cytoplasmic and mitochondrial fractions from 30 min DX or vehicle-treated, unseparated thymocytes. After subcellular fractionation immunoprecipitation was performed with anti-GR antibody and then the samples were further analyzed by western blot to visualize the co-precipitated Bcl-2 family proteins. Densitometric quantification of western blots was carried out. The Bcl-2 family protein levels were compared in both untreated and DX-treated samples. Note: although thymocytes were not separated, based on their cell surface phenotype, in these experiments, 70–80% of the cells are DP in 3-to-4-week-old *BALB/c* mice [38]; therefore the results from our immunoprecipitation and western blot experiments give a good impression about the DP cells. Results of representative experiments are shown in Fig. 2. Confirming our confocal microscopic data (see “DX-induced changes in the co-localization between GR and members of Bcl-2 protein family” section), association of the GR with Bak, Bim, Bcl-x_L proteins could be observed both in the cytoplasmic and mitochondrial fractions of both untreated and DX-treated thymocytes (Fig. 2a–c, respectively), however, Bax protein did not show any direct association with the GR (data not shown).

Bak co-precipitated with the GR, and upon DX treatment the Bak-GR co-precipitation increased in the cytoplasmic and slightly changed in the mitochondrial fraction (Fig. 2a). We also observed the co-precipitation of Bim with the GR (Fig. 2b). Bcl-x_L also co-precipitated with GR (Fig. 2b). The rate of their co-precipitation increased in the cytoplasmic and decreased in the mitochondrial fraction upon DX treatment in comparison to the control (Fig. 2b). Finally, the GR-Bim association changed only minimally in the cytoplasmic fraction, but remarkably increased in the mitochondrial compartment (Fig. 2c). This pronounced mitochondrial accumulation of Bim suggests its potential role in the mitochondrial (intrinsic) apoptotic pathway in the GC-induced thymocyte apoptosis.

Fig. 1 Co-localization of the GR with members of the Bcl-2 protein family: Bak, Bax, Bcl-x_L and Bim in DP thymocytes. Representative confocal microscopic images from at least three independent experiments showing GR-Bak (A1), GR-Bax (B1), GR-Bcl-x_L (C1) and GR-Bim (D1) co-localization in control (Ctrl) and 30 min DX-treated cells. DIC, CD4 (blue channel) and CD8 (virtual red channel) overlaid, intracellular GR (green channel) and Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim (red channel) images are shown. The co-localization of the GR with Bak, Bax, Bcl-x_L and Bim (GR-Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim merged images) is indicated by the yellow areas. Scale bars 8 μm each. Bar diagrams show the quantification of the changes in the GR-Bak (A2), GR-Bax (B2), GR-Bcl-x_L (C2) and GR-Bim (D2) co-localization in DP thymocytes after in vitro DX treatment. Bars represent the number of co-localized pixels per cell as calculated by the co-localization plugin of the ImageJ software. The mean ± SEM was calculated from the data of 100 DP cells per treatment, respectively. Significant changes ($p < 0.05$) in DX-treated cells versus controls are indicated by asterisk. (Color figure online)



DX treatment-induced mitochondrial accumulation of Bax

Bax is a key pro-apoptotic protein in the mitochondrial apoptotic pathway. It has been shown earlier, that Bax has a constant turnover between the mitochondrial membrane and the cytoplasm [39] and it has also been demonstrated to be important in GC-induced apoptosis together with Bak [27, 28, 34]. In the case of Bax we could not confirm the co-localization, observed by confocal microscopy, with co-immunoprecipitation (data not shown). Therefore, we investigated whether the high dose DX treatment caused any redistribution of Bax between the cytoplasmic and mitochondrial fractions of thymocytes, and we have found

that Bax accumulated in the mitochondrial fraction after 30 min of DX treatment, compared to the control (Fig. 3a). This result was confirmed by confocal microscopy (Fig. 3b1); the number of Bax-CMX-Ros co-localized pixel number increased upon 30 min of DX treatment (910 ± 68 versus 626 ± 33 in the control) (Fig. 3b2).

Kinetics of caspases' activation in DP thymocytes

Preceding studies with knock-out (KO) models have shown the importance of the intrinsic apoptotic pathway in GC-induced apoptosis of thymocytes [40, 41]. However, others have emphasized the role of caspase-8 and the extrinsic pathway in this process [42, 43]. In our

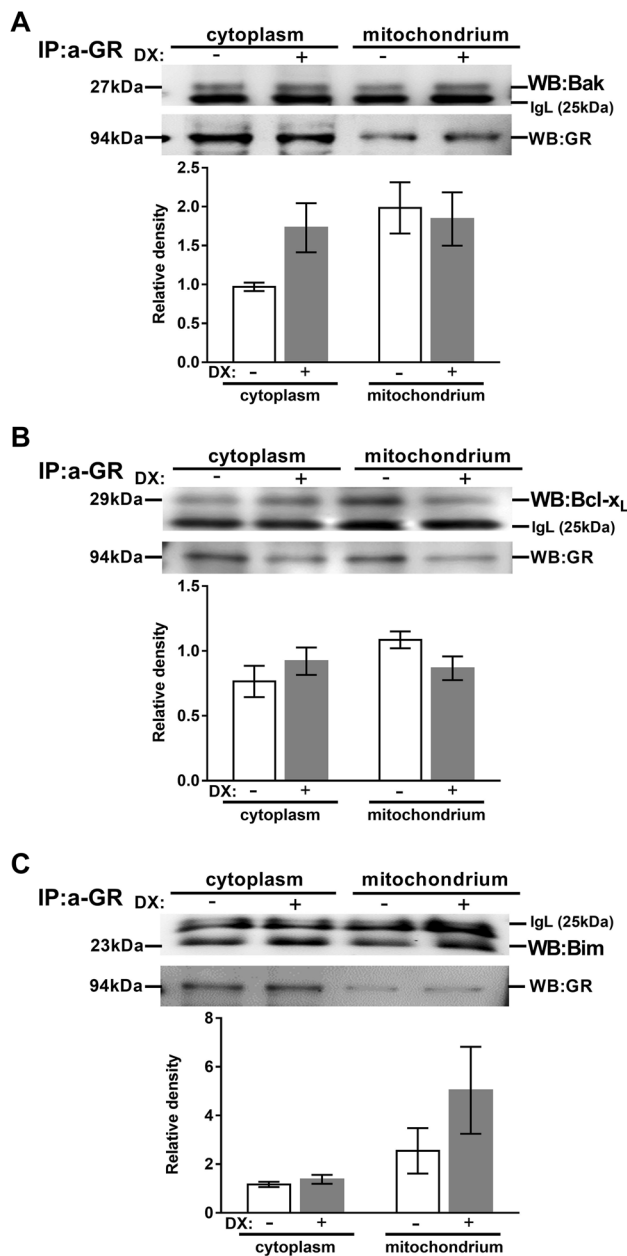


Fig. 2 Association of the GR with members of the Bcl-2 family in thymocytes. Anti-Bak (a), Bcl-x_L (b) and Bim (c) western blots are shown from cytoplasmic and mitochondrial fractions of thymocyte lysates after anti-GR precipitation with or without DX treatment. Blots were reprobbed with anti-GR antibody to confirm equal loading of the samples. The figure shows representative blots and densitometry data of at least three independent experiments. *Diagrams below each blot* show the relative Bak, Bcl-x_L and Bim levels in the cytoplasm (normalized to GR) and the mitochondria (normalized to GR). *Bars* represent the mean \pm SEM of relative densities compared with the controls. IgL: immunoglobulin light chain

previous research, with DP thymocytes, we have shown that the translocation of GR to the mitochondria was followed by the decrease of the mitochondrial membrane

potential [6], which supported the significance of the mitochondrial apoptotic pathway in DP thymocyte apoptosis induced by GCs.

Hence, now to investigate the activation of caspases in DP thymocytes, separately from other thymocyte subpopulations, we examined the activation of caspase-3, -8, and -9 after 0.5, 1, 2 and 3 h of DX treatment in DP thymocytes (Fig. 4). The ratio of DP cells containing cleaved caspase-9 increased significantly after 2 and 3 h of DX treatment (Fig. 4c). The percentage of DP cells in which active caspase-3 was detected showed increase already after 1 h of DX treatment, and after 2 and 3 h of DX treatment the rate of DP cells having active caspase-3 increased significantly (Fig. 4d). The activation of caspase-9 together with the cleavage of caspase-3 implied the activation of the intrinsic, mitochondrial apoptotic pathway upon DX treatment. The ratio of active caspase-8 containing DP cells was slightly elevated upon 0.5 and 1 h of DX treatment, and this increase continued and became significant after 2 and 3 h DX treatment showing a similar tendency to the active caspase-9 (Fig. 4e). The changes in caspase-9 activation seemed to be more pronounced than in the case of caspase-8 after 2 and 3 h of DX treatment, which may suggest a pivotal role of caspase-9 in DX-induced thymocyte apoptosis.

DX-induced caspase activation and Cytochrome C release to the cytoplasm in thymocytes

To confirm our flow cytometric results we performed western blot analysis of activated caspases in unseparated thymocytes (70–80% of the cells are DP [38]) upon 3 h of DX treatment (which was the peak activation seen with flow cytometry, see Fig. 4) together with the analysis of Cytochrome C release to the cytoplasm after 1 h DX treatment. Cell lysates of untreated, control, and in vitro DX-treated thymocytes were compared for active caspase-3, -8, -9 and Cytochrome C levels (Fig. 5). 1 h, high dose DX treatment caused the significant increase of Cytochrome C level in the cytoplasm (Fig. 5a). We observed the significant elevation of active caspase-9, -3 levels (Fig. 5b, c, respectively) compared to the control after 3 h of high dose DX treatment which are characteristic signs of the activation of the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway. Interestingly, the initiator caspase-8 of the extrinsic pathway was also significantly elevated upon DX treatment (Fig. 5d), which might reflect a cross-talk between the intrinsic- and extrinsic pathways or may indicate the activation of another parallel apoptotic pathway.

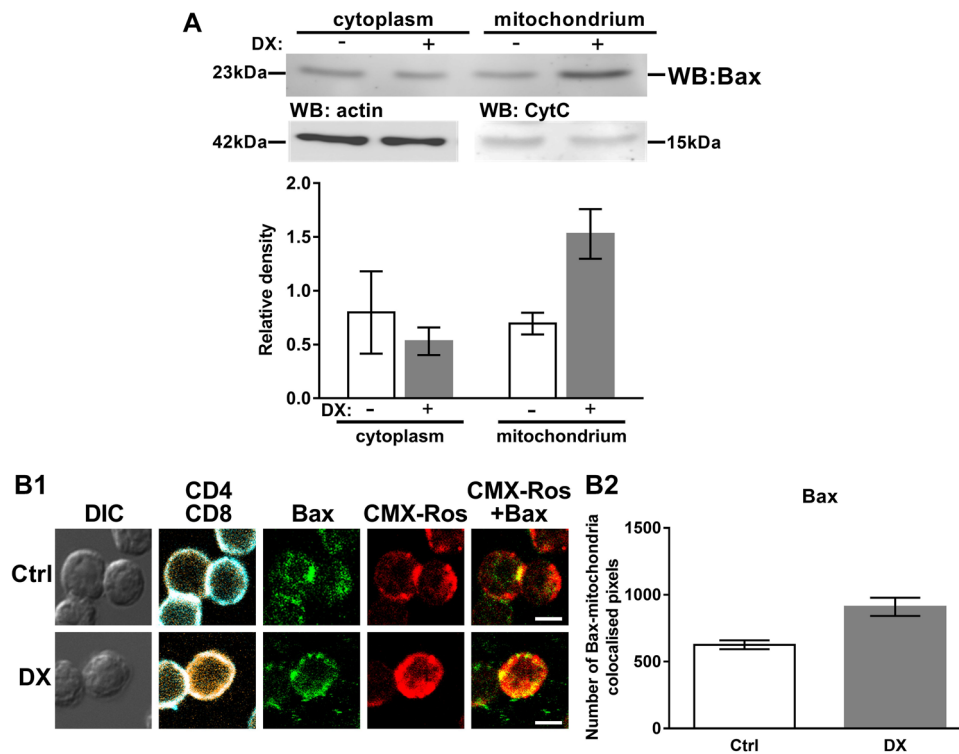


Fig. 3 Subcellular distribution of Bax in thymocytes upon DX treatment. **a** Western blot shows the DX treatment-induced redistribution of Bax between the cytoplasmic and mitochondrial fractions of thymocytes. Blots were reprobbed with anti- β -actin or anti-Cytochrome C (Cyt C) antibodies to confirm the purity of the cytoplasmic and mitochondrial fractions, respectively. The figure shows a representative blot and the densitometry data of at least three independent experiments. The diagram shows the relative Bax expression in the cytoplasm (normalized to β -actin) and the mitochondria (normalized to Cytochrome C). Bars represent the mean \pm SEM of relative densities compared to the controls. **b** Mitochondrial translocation of Bax in DP thymocytes. **b1** Representative confocal microscopic images

of at least three independent experiment showing CMX-Ros-Bax co-localization in control (Ctrl) and 30 min DX-treated cells. DIC, CD4 (blue channel) and CD8 (virtual red channel) overlaid, mitochondria (CMX-Ros, red channel) and Bax (green channel) images are shown. The co-localization of mitochondria with Bax (CMX-Ros-Bax merged images) is indicated by yellow areas. Scale bars are 8 μ m each. **b2** Quantification of the changes in the CMX-Ros-Bax co-localization in DP thymocytes after in vitro DX treatment was performed using the co-localization plugin of the ImageJ software. Bars represent the number of co-localized pixels. The mean \pm SEM was calculated from the data of 100 DP cells per treatment, respectively. (Color figure online)

Discussion

Glucocorticoid receptor (GR) signaling plays an important regulatory role in the selection and apoptosis of thymocytes [6–8]. Besides the nuclear-, mitochondrial translocation of the ligand-bound GR might dictate GC-induced apoptosis sensitivity of the cells [6, 44–49]. In a previous study, we followed the ligand-induced GR trafficking in GC-sensitive CD4⁺CD8⁺ DP thymocytes [50–52] upon short term in vitro GC treatment and demonstrated the GR translocation into the mitochondria, which correlated well with their pronounced GC-induced apoptosis sensitivity [6, 51]. However, the molecular events following the short-term GC treatment-induced mitochondrial translocation remained to be elucidated. In our present work we clarified that the GR regulates the mitochondrial apoptotic pathway of thymocytes in close collaboration with the Bcl-2 family proteins.

We observed both co-localization and direct molecular association of Bak with GR (Figs. 1, 2). After DX treatment this association was unchanged in the mitochondrial fraction but increased in the cytoplasm of thymocytes upon high-dose short-term DX treatment. Upon apoptotic stimuli, Bax translocates to the mitochondria where it forms a complex with Bak leading to mitochondrial pore formation [24]. Our findings suggest that Bax has a primary role in the early phase of DX-induced apoptosis of thymocytes, although not associating directly with the GR. We cannot rule out the possibility that Bak also plays a role in GC-induced apoptosis, but probably joins at a later stage than we examined in our work. This is supported by earlier observations in thymocytes from Bax/Bak double KO mice which were completely resistant to GC-induced apoptosis, whereas Bax or Bak single KO mice thymocytes were still sensitive to GCs [34]. These studies, with knock-out mice, have strengthened the importance of Bak in GC-induced

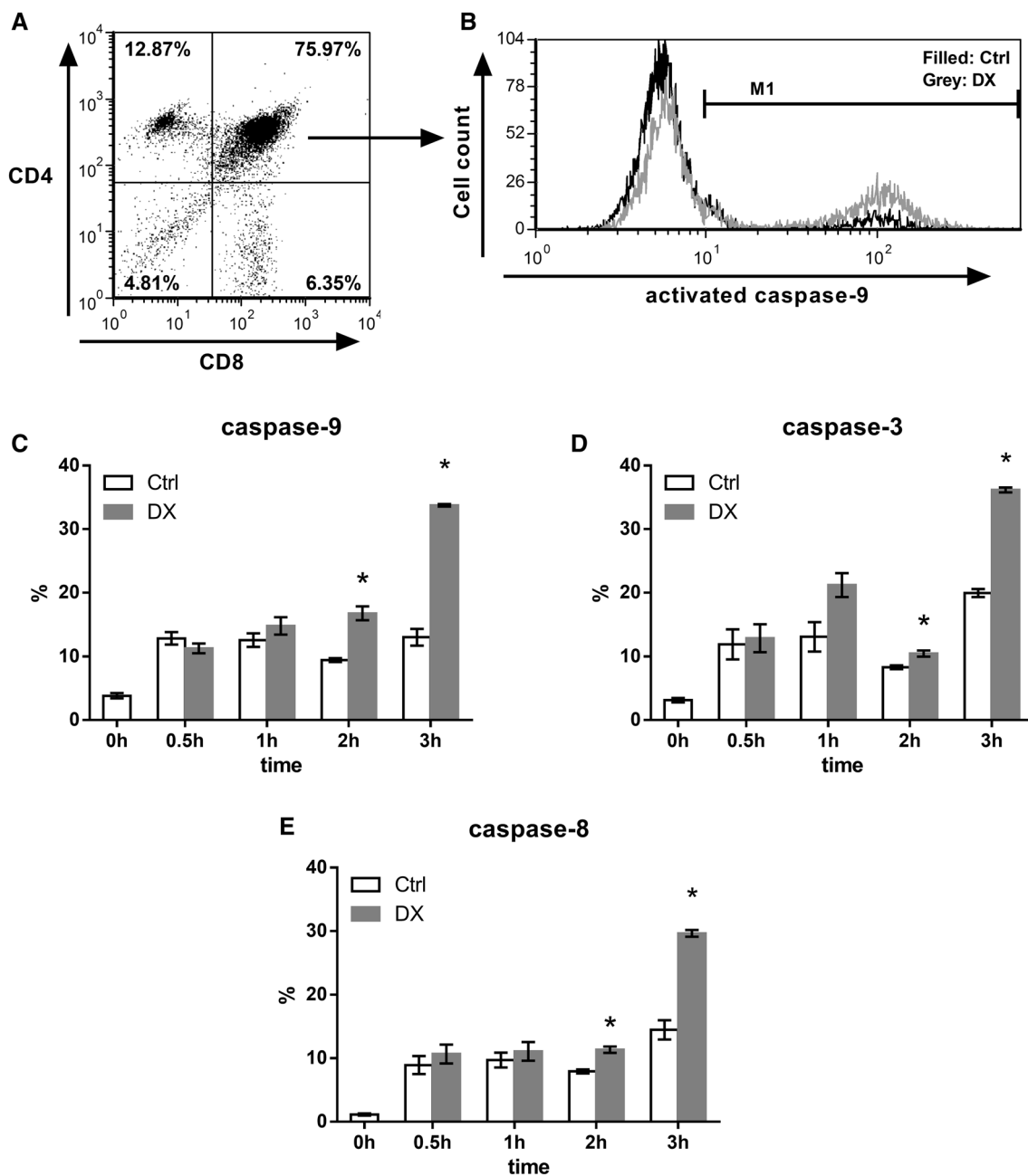


Fig. 4 Flow cytometric analysis of the kinetics of caspase activation in DP thymocytes upon 30 min to 3 h of DX treatment. **a** Thymocyte subpopulations were gated based on their CD4/CD8 expression. **b** The representative fluorescent histogram plot shows the active caspase-9 positive percentage of DP thymocyte subpopulation before and after 3 h of DX treatment. *Bar diagrams* show the mean \pm SEM

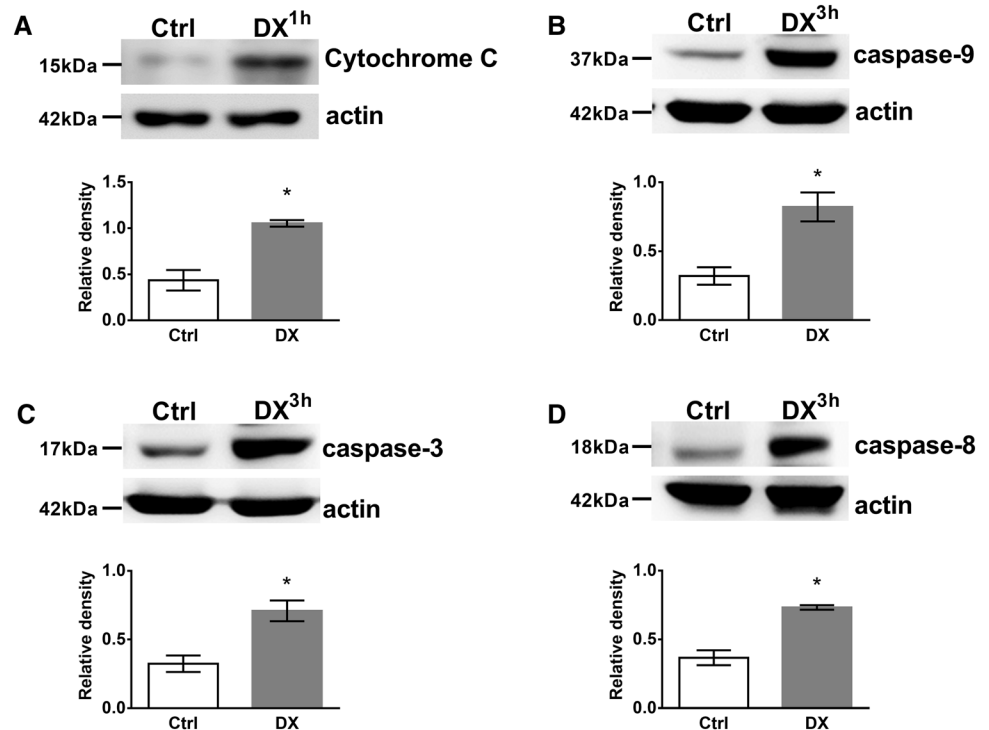
of cleaved, active caspase-9 (**c**), -3 (**d**) and -8 (**e**) positive percentage of cells (calculated from the data of three animals) in the DP thymocyte population and its changes upon 30 min to 3 h of DX treatment. Significant ($p < 0.05$) differences compared to the untreated controls are indicated by *asterisk*

apoptosis, but also have suggested that Bax and Bak may compensate for each other [34].

Our results showed the association of Bim, a BH3-only protein, with GR and their interaction increased especially in the mitochondrial fraction upon DX treatment (Figs. 1, 2). Bim^{-/-} knock-out mice showed impaired GC-induced

apoptosis [35, 36] showing its important but not exclusive participation in this death process. This is also supported by the results of other research groups [53]. GCs have been found to induce the expression of Bim in murine thymocytes after 2 or 3 h of DX treatment [47, 54]. Increased expression of Bim has correlated with increased sensitivity

Fig. 5 Western blot analysis of DX treatment induced Cytochrome *C* release to the cytoplasm and caspase-3, -8, -9 activation in thymocytes. The cytoplasmic presence of Cytochrome *C* (a), active (cleaved)-caspase-9 (b), -3 (c) and -8 (d) were detected in thymocyte lysates by western blot. Blots were reprobed with anti- β -actin antibody to confirm equal loading of the samples. The figure shows representative blots and the densitometry data of at least three independent experiments. Diagrams below each blot show the relative Cytochrome *C* and caspase-9, -3, -8 levels (normalized to β -actin). Bars represent the mean \pm SEM of relative densities compared to the untreated controls. Significant ($p < 0.05$) differences are indicated by asterisk



to GC-induced apoptosis [55, 56], dysregulation of its gene expression has been found in solid and hematopoietic malignancies [57], where reduced expression correlated with increased disease risk [58], and single nucleotide polymorphisms have been associated with impaired responsiveness to anticancer therapies [59–61]. Our results also support that Bim plays a crucial role in the initiation of GC-induced apoptosis of DP thymocytes; the increased association of Bim with the GR in the mitochondria may promote the activation and oligomerization of Bax in the mitochondrial outer membrane.

Interestingly, we also observed interaction between Bcl-x_L, an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, and the GR during the DX-induced apoptotic processes. Bcl-x_L has been shown to retrotranslocate Bax from the mitochondria to the cytoplasm by binding to it and thus inhibiting its pro-apoptotic activity [62]. We hypothesize that the interaction between the GR and Bcl-x_L would cause the inhibition of this particular Bcl-x_L function. After 30 min DX treatment the GR bound ratio of Bcl-x_L increased in the cytoplasmic but decreased in the mitochondrial fraction (Fig. 2) which suggests that Bcl-x_L, after translocating to the cytoplasm from the mitochondria, binds to the GR, and this sequestration could abolish its antagonistic effect on the apoptotic process. This hypothesis about the inhibitory effect of the GR on Bcl-x_L is supported by the result of another research group where it has been observed that the expression of Bcl-x_L decreased significantly after 2 or 3 h of DX treatment [54]. However, the co-localization

between Bcl-x_L and the GR decreased significantly after DX treatment (Fig. 1), which might be due to the fact that the co-localization results are only from DP cells and it gives the overall ratio of co-localization, both in the cytoplasm and the mitochondria, while unseparated thymocytes were used for the co-immunoprecipitation experiment and the cytoplasmic and mitochondrial fractions were analyzed separately.

The rate of co-localization between Bax and the GR slightly changed upon DX treatment (Fig. 1), but we could not confirm the co-localization, observed by confocal microscopy, with co-immunoprecipitation experiments. Co-localization expresses molecular proximity, but does not reflect necessarily direct molecular interaction between two molecules. In the case of Bax, where the co-localization with the GR was not confirmed by co-immunoprecipitation, the results suggest that the two molecules were very close to each other, but there were no direct interaction between them. According to our results GR, a 94 kDa molecule, associates with other members of the Bcl-2 protein family, which are in the vicinity of Bax. It is known from the work of others [62–65] that these Bcl-2 proteins interact with each other, which may explain the proximity of the GR to Bax without direct association. Besides we detected a clear redistribution of Bax from the cytoplasm to the mitochondria (Fig. 3) which correlated with the results of others [27, 28] suggesting the central role of Bax in DX-induced apoptosis of thymocytes. Bax trafficking between the mitochondrial outer membrane and the cytoplasm is a

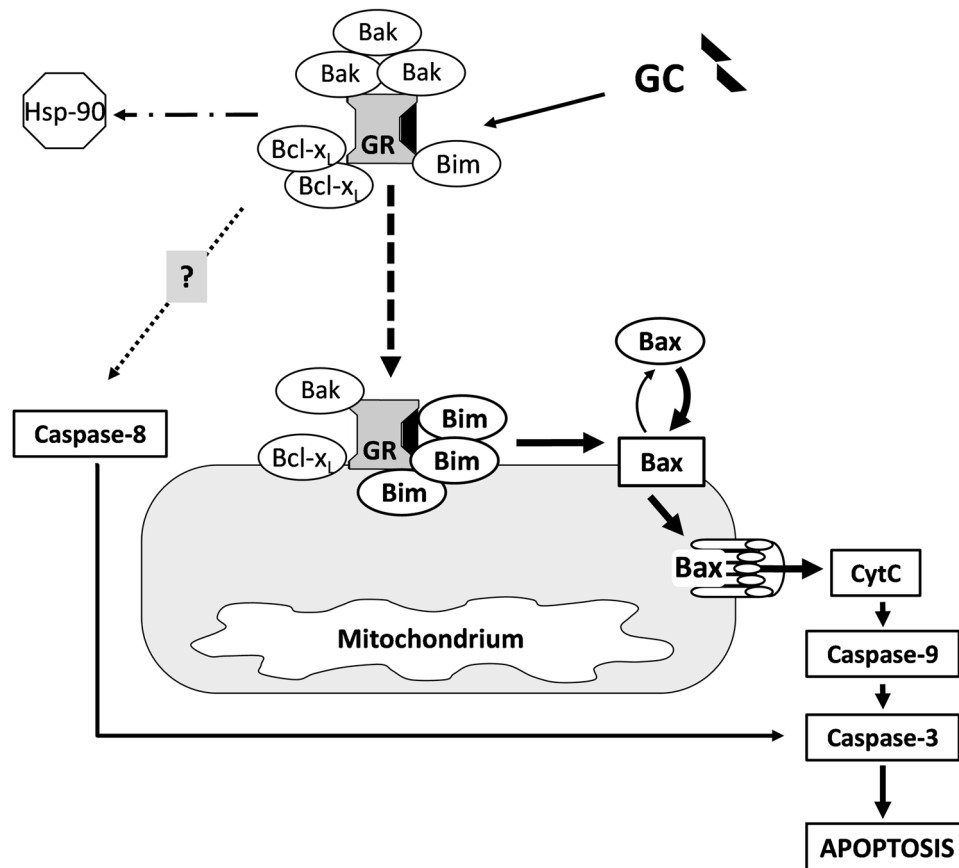


Fig. 6 Hypothetical model of the GC-induced apoptosis of thymocytes via the regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by members of Bcl-2 protein family. Upon high dose GC treatment the GR translocates to the mitochondria (*dashed arrow*) where its interaction increases with Bcl-2 family proteins, especially with Bim. Then Bax is presumably activated by Bim, leading to permeability pore formation in the mitochondrial outer membrane, and the leakage of Cytochrome C into the cytoplasm, which triggers the caspase-cas-

cade. The accumulation of Bax in the mitochondrial outer membrane is most likely further enhanced by the increased cytoplasmic association of the liganded GR and the Bcl-x_L which suspends the latter's inhibitory effect on the mitochondrial pore formation by Bax. The role of the GR-Bak association remains to be elucidated. Caspase-8 activation (extrinsic pathway) may be the result of the interaction between the GR and other apoptotic pathways (*dotted arrow*)

key regulator of the intrinsic (mitochondrial) pathway of apoptosis [24, 39, 66]. Bax oligomerization in the mitochondrial membrane leads to the formation of a permeability pore, which causes the decrease of the mitochondrial membrane potential [24], as it has been detected in our previous experiments [6].

Caspases are important effectors of both, intrinsic and extrinsic, apoptotic pathways [23, 26]. In our experiments we analyzed the kinetics of caspases' activation from 0.5 to 3 h of DX treatment. We observed significantly increased number of DP thymocytes containing active, cleaved caspase-3, -8, -9 after 2 and 3 h of DX treatment. After 1 h of DX treatment, the caspase-3 activation was probably the result of caspase-9 activation following the decrease of the mitochondrial membrane potential observed after 30 min DX treatment in our previous work [6]. But the activation of caspase-3 after 1 h of DX treatment may be partially

the result of the activation of parallel apoptotic pathways. These include ceramide and sphingosine generation which were reported to be able to induce caspase-3 activation in a mitochondria independent manner [42, 67]. The prominent caspase-9 activation after 2 h DX treatment was followed by remarkable caspase-3 activation after 3 h DX treatment. The number of DP cells containing activated caspase-9 was almost doubled after 2 h and the number of cleaved caspase-8 containing DP cells increased significantly but to a lesser extent than caspase-9. This observation suggests that the activation of caspase-9 may be prior to caspase-8 activation and strengthen the importance of the mitochondrial apoptotic pathway in DX-induced apoptosis of DP thymocytes.

Our results are supported by the work of other research groups. Several knock-out models have been generated already, where one or more members of the Bcl-2 family

or caspases were inactivated and thus, the deficiency of these proteins can be studied effectively. These models have provided an important insight into the different apoptotic pathways. For example, caspase-9^{-/-} KO thymocytes have been found to be resistant to DX-induced apoptosis, but remained sensitive to apoptosis induced by TNF- α , α -CD95 [40]. Apaf^{-/-} KO thymocytes have shown only partial resistance to DX-induced apoptosis and impaired procaspase-8 processing, but were sensitive to apoptosis induced by Fas ligation [41]. GC-induced thymocyte apoptosis has been unaffected in Bid-deficient mice suggesting the dispensable role of the extrinsic apoptotic pathway in GC mediated cell death [68]. On the other hand, using small peptide inhibitors of caspases have shown the importance of caspase-3 and -8 in GC-induced thymocyte apoptosis [42, 43], but the specificity of these inhibitory molecules might be unclear [69–71]. Some results have suggested the primary role of caspase-9 in GC-induced apoptosis [40, 41]. However, others have not supported these findings [42, 72]. The activation of caspase-8 could also be the result of the activation of caspase-9 either through the release of cathepsin B from lysosomes leading to caspase-8 activation [73] or through the activation of caspase-3 and -6, which then cleaves caspase-8 [74]. But the activation of caspase-8 can be the result of the induction of other apoptotic pathways activated by GCs including; ceramide and sphingosine production, Cyclin-dependent kinase 2 activation, or as already mentioned above, the lysosomal release of cathepsin B [42, 72, 73, 75].

In conclusion, our results demonstrate the complexity of early steps of the DX-induced mitochondrial apoptotic pathway in GC sensitive, DP thymocytes (Fig. 6). In the absence of its ligand some association could be observed between the GR and members of the Bcl-2 family (Bak, Bim, Bcl-x_L) proteins. There is a constant turnover of the pro-apoptotic Bax between the mitochondrial outer membrane and the cytoplasm. When no apoptotic stimuli are present Bcl-x_L retrotranslocates Bax from the mitochondrial outer membrane, thus the majority of Bax is located in the cytoplasm in an inactive conformation [62]. Upon high dose GC treatment the liganded GR changes the equilibrium between the Bcl-2 family proteins, in such a way, which promotes apoptosis. GR translocates to the mitochondria where its interaction increases especially with Bim. Bim presumably activates Bax leading to the accumulation and permeability pore formation of Bax in the mitochondrial outer membrane, causing the decrease of the mitochondrial membrane potential [6], the release of Cytochrome C and the activation of caspase-9 (Fig. 6). The pore formation of Bax in the mitochondrial outer membrane might be supported by the increased cytoplasmic association of the activated GR with Bcl-x_L, which

interferes with the latter's inhibitory effect on the mitochondrial pore formation by Bax. The role of the GR-Bak association needs further investigations. Caspase-8 activation (extrinsic pathway) may be the result of the interaction of GR and other apoptotic pathways [42, 72, 73, 75]. Taken together, our results emphasize the importance of the mitochondrial apoptotic pathway and the non-genomic effects in GC-induced thymocyte apoptosis.

Acknowledgments This work was supported by research grants from the Hungarian National Scientific Research Fund for T. Berki (OTKA K 105962) and F. Boldizsár (OTKA K 101493). F. Boldizsár received a Janos Bolyai Scholarship (BO/00086/12/5) from the Hungarian Academy of Sciences. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST (2002) Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* 8(6):1681–1694
- Ahmad N, Kumar R (2011) Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 300(1):1–9. doi:10.1016/j.canlet.2010.09.008
- Ramamoorthy S, Cidlowski JA (2016) Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. *Rheum Dis Clin North Am* 42(1):15–31. doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002
- Petta I, Dejager L, Ballegeer M, Lievens S, Tavernier J, De Bosscher K, Libert C (2016) The interactome of the glucocorticoid receptor and its influence on the actions of glucocorticoids in combatting inflammatory and infectious diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(2):495–522. doi:10.1128/mmb.00064-15
- Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM (2006) Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63(1):60–72. doi:10.1007/s00018-005-5390-y
- Talaber G, Boldizsár F, Bartis D, Palinkas L, Szabo M, Berta G, Setalo G Jr., Nemeth 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(11):1269–1276. doi:10.1093/intimm/dxp093
- Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E (2006) Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 203(1):189–201. doi:10.1084/jem.20050433
- Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW (2007) Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* 13(4):158–163. doi:10.1016/j.molmed.2007.02.001
- Talaber G, Tuckermann JP, Okret S (2015) ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids. *Faseb J* 29(6):2526–2534. doi:10.1096/fj.14-268508

10. Drouin J, Sun YL, Tremblay S, Lavender P, Schmidt TJ, de Lean A, Nemer M (1992) Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 6(8):1299–1309
11. Berg JM (1989) DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57(7):1065–1068
12. Xavier AM, Anunciato AK, Rosenstock TR, Glezer I (2016) Gene Expression Control by Glucocorticoid Receptors during Innate Immune Responses. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:31. doi:10.3389/fendo.2016.00031
13. Meijising SH (2015) Mechanisms of glucocorticoid-regulated gene transcription. *Adv Exp Med Biol* 872:59–81. doi:10.1007/978-1-4939-2895-8_3
14. Van Bommel T, Marsen T, Bojar H (1987) Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res* 7(6):1217–1223
15. Stahn C, Buttgerit F (2008) Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(10):525–533. doi:10.1038/ncprheum0898
16. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, De Bosscher K (2013) How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol* 380(1–2):41–54. doi:10.1016/j.mce.2012.12.014
17. Talaber G, Jondal M, Okret S (2013) Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 380(1–2):89–98. doi:10.1016/j.mce.2013.05.007
18. Bartis D, Boldizsar F, Kvell K, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P, Monostori E, Berki T (2007) Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun* 354(1):253–258. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.211
19. Sionov RV, Kfir S, Zafir E, Cohen O, Zilberman Y, Yefenof E (2006) Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5(10):1017–1026
20. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T (2010) Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 215(7):521–526. doi:10.1016/j.imbio.2009.10.003
21. Buttgerit F, Grant A, Muller M, Brand MD (1994) The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur J Biochem* 223(2):513–519
22. Palinkas L, Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, Nemeth P, Berki T (2008) Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology* 213(1):39–50. doi:10.1016/j.imbio.2007.06.004
23. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*. doi:10.1007/s13277-016-5035-9
24. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW (2011) BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813(4):508–520. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.11.024
25. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013) Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(6). doi:10.1101/cshperspect.a008672
26. Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14(1):32–43. doi:10.1038/sj.cdd.4402060
27. Hoijman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A (2004) Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 145(1):418–425. doi:10.1210/en.2003-0764
28. Tan YJ, Teng E, Ting AE (2003) A small inhibitor of the interaction between Bax and Bcl-X(L) can synergize with methylprednisolone to induce apoptosis in Bcl-X(L)-overexpressing breast-cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 129(8):437–448. doi:10.1007/s00432-003-0464-4
29. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P (1998) Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods* 214(1–2):19–27
30. Stasik I, Rapak A, Ziolo E, Strzadala L (2008) The mitochondrial localization of RelB and NFATx in immature T cells. *Cell Mol Biol Lett* 13(4):493–501. doi:10.2478/s11658-008-0019-4
31. Pendergrass W, Wolf N, Poot M (2004) Efficacy of MitoTracker green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 61(2):162–169. doi:10.1002/cyto.a.20033
32. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freimark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM (2006) Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 116(10):2610–2621. doi:10.1172/jci24612
33. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, Hu-Lowe DD, Shalinsky DR, Thurston G, Yancopoulos GD, McDonald DM (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 165(1):35–52. doi:10.1016/s0002-9440(10)63273-7
34. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB (2002) Deficiency in Bax and Bcl-2 perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* 3(10):932–939. doi:10.1038/ni834
35. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286(5445):1735–1738
36. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106(13):4131–4138. doi:10.1182/blood-2005-04-1595
37. Marsden VS, Strasser A (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 21:71–105. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141029
38. Oh SH, Kim K (1999) Expression of interleukin-1 receptors in the later period of foetal thymic organ culture and during suspension culture of thymocytes from aged mice. *Immunol Cell Biol* 77(6):491–498. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00852.x
39. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139(5):1281–1292
40. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94(3):339–352
41. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94(6):739–750
42. Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C (2003) Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 101(2):585–593. doi:10.1182/blood-2002-06-1779

43. McColl KS, He H, Zhong H, Whitacre CM, Berger NA, Distelhorst CW (1998) Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol* 139 (1–2):229–238
44. Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, Inobe M, Iwabuchi K, Miyazaki T, Onoe K, Iwata M, Uede T (2003) Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Int Immunol* 15(6):741–749
45. Malone MH, Wang Z, Distelhorst CW (2004) The glucocorticoid-induced gene *tdag8* encodes a pro-apoptotic G protein-coupled receptor whose activation promotes glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279(51):52850–52859. doi:10.1074/jbc.M408040200
46. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F, Distelhorst CW (2003) Dexamethasone-induced gene 2 (*dig2*) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem* 278(29):27053–27058. doi:10.1074/jbc.M303723200
47. Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS, Distelhorst CW (2003) Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278(26):23861–23867. doi:10.1074/jbc.M301843200
48. Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E (2004) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem* 279(53):55809–55817. doi:10.1074/jbc.M411767200
49. Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T (2001) Expression of *bbc3*, a proapoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20):11318–11323. doi:10.1073/pnas.201208798
50. Boldizar F, Palinkas L, Czompoly T, Bartis D, Nemeth 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(10):785–796. doi:10.1016/j.imbio.2006.06.005
51. Berki T, Palinkas L, Boldizar F, Nemeth P (2002) Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 14(5):463–469
52. Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R, Wick G (2001) CD4⁺ CD8⁺ TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 31 (8):2293–2301. doi:10.1002/1521-4141(200108)31:8<2293::aid-immu2293>3.0.co;2-i
53. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z (2015) Regulation of Bim in health and disease. *Oncotarget* 6(27):23058–23134. doi:10.18632/oncotarget.5492
54. Bianchini R, Nocentini G, Krausz LT, Fettucciari K, Coaccioli S, Ronchetti S, Riccardi C (2006) Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4⁺ CD8⁺) thymocytes following dexamethasone treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 319(2):887–897. doi:10.1124/jpet.106.108480
55. Harada M, Pokrovskaja-Tamm K, Soderhall S, Heyman M, Grander D, Corcoran M (2012) Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 53(10):2041–2050. doi:10.3109/10428194.2012.678004
56. Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW (2011) Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17 ~ 92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Mol Endocrinol* 25(3):409–420. doi:10.1210/me.2010-0402
57. Pinon JD, Labi V, Egle A, Villunger A (2008) Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* 27(Suppl 1):S41–S52. doi:10.1038/onc.2009.42
58. Kelly JL, Novak AJ, Fredericksen ZS, Liebow M, Ansell SM, Dogan A, Wang AH, Witzig TE, Call TG, Kay NE, Habermann TM, Slager SL, Cerhan JR (2010) Germline variation in apoptosis pathway genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(11):2847–2858. doi:10.1158/1055-9965.epi-10-0581
59. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC Jr, Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK, Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT, Ruan Y, Ong ST (2012) A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 18(4):521–528. doi:10.1038/nm.2713
60. Akiyama T, Dass CR, Choong PF (2009) Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther* 8(12):3173–3180. doi:10.1158/1535-7163.mct-09-0685
61. Faber AC, Ebi H, Costa C, Engelman JA (2012) Apoptosis in targeted therapy responses: the role of BIM. *Adv Pharmacol* 65:519–542. doi:10.1016/b978-0-12-397927-8.00016-6
62. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ (2011) Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145(1):104–116. doi:10.1016/j.cell.2011.02.034
63. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517):727–730. doi:10.1126/science.1059108
64. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8(3):705–711
65. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17(4):525–535. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.003
66. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276(15):11615–11623. doi:10.1074/jbc.M010810200
67. Wang J, Zhen L, Klug MG, Wood D, Wu X, Mizrahi J (2000) Involvement of caspase 3- and 8-like proteases in ceramide-induced apoptosis of cardiomyocytes. *J Card Fail* 6(3):243–249. doi:10.1054/jcaf.2000.9502
68. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400(6747):886–891. doi:10.1038/23730
69. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272(15):9677–9682

70. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272(29):17907–17911
71. Poreba M, Strozyk A, Salvesen GS, Drag M (2013) Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(8):a008680. doi:[10.1101/cshperspect.a008680](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008680)
72. Lepine S, Lakatos B, Courageot MP, Le Stunff H, Sulpice JC, Giraud F (2004) Sphingosine contributes to glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes independently of the mitochondrial pathway. *J Immunol* 173(6):3783–3790
73. Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM (2006) Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 176(3):1695–1702
74. Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM (2009) Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ* 16(7):1053–1061. doi:[10.1038/cdd.2009.29](https://doi.org/10.1038/cdd.2009.29)
75. Granes F, Roig MB, Brady HJ, Gil-Gomez G (2004) Cdk2 activation acts upstream of the mitochondrion during glucocorticoid induced thymocyte apoptosis. *Eur J Immunol* 34(10):2781–2790. doi:[10.1002/eji.200425154](https://doi.org/10.1002/eji.200425154)



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 Ernszt^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/glycocorticoid 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 (Kisilewicz 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., 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

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

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.010>

Received 31 May 2017; Received in revised form 18 September 2017; Accepted 3 October 2017

Available online 06 October 2017

0171-2985/ © 2017 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

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 synergistic 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^{flox}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-PE-Cy7 (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 × 10⁶ 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 10⁶ 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-PECy7, 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 10⁸ 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 cytopinned 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 10⁵ 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 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 (Reverse) 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-

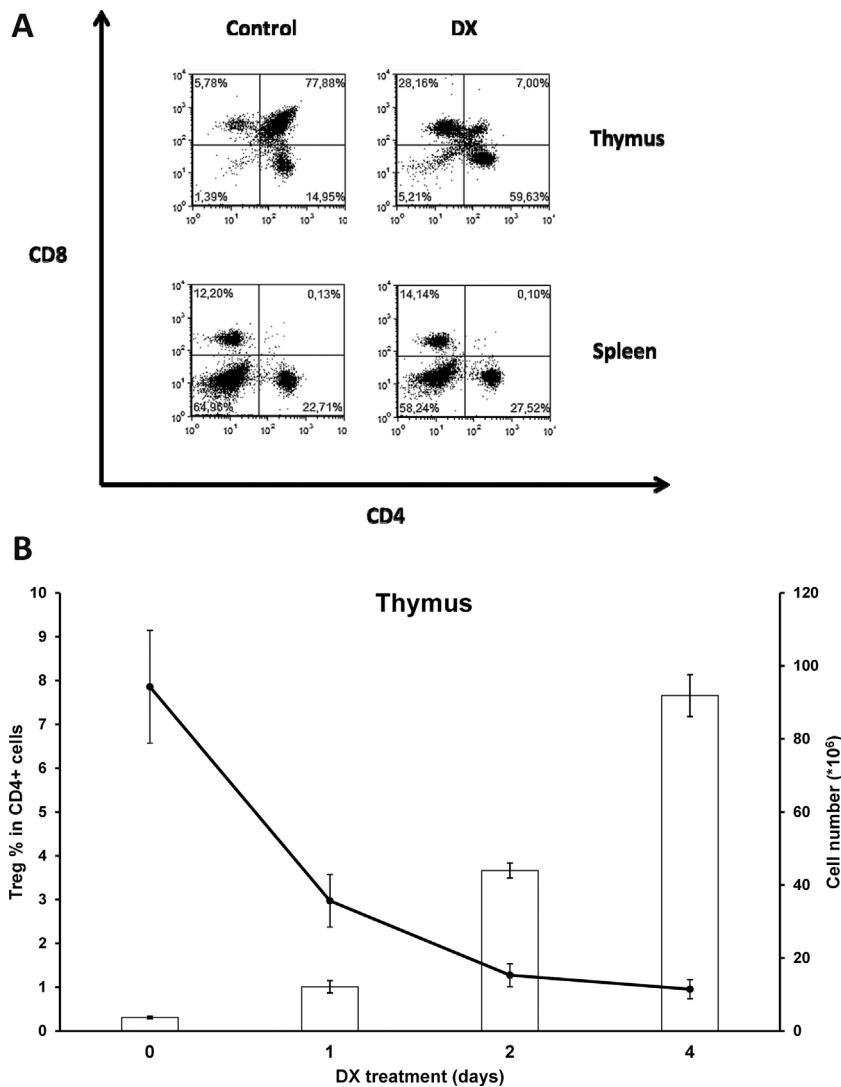


Fig. 1. (A) Effect of repeated (2x) high-dose (20 mg/kg) DX treatments on the lymphoid cell composition of the thymus and spleen. In the thymus we observed increased proportions of double-negative and single-positive cells as a result of almost complete depletion of double-positive cells after repeated 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.

fold, CD8 SP: 4.9-fold) (Fig. 1A, upper 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.

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 TGF β production and Foxp3 expression by tTreg and pTreg cells.

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

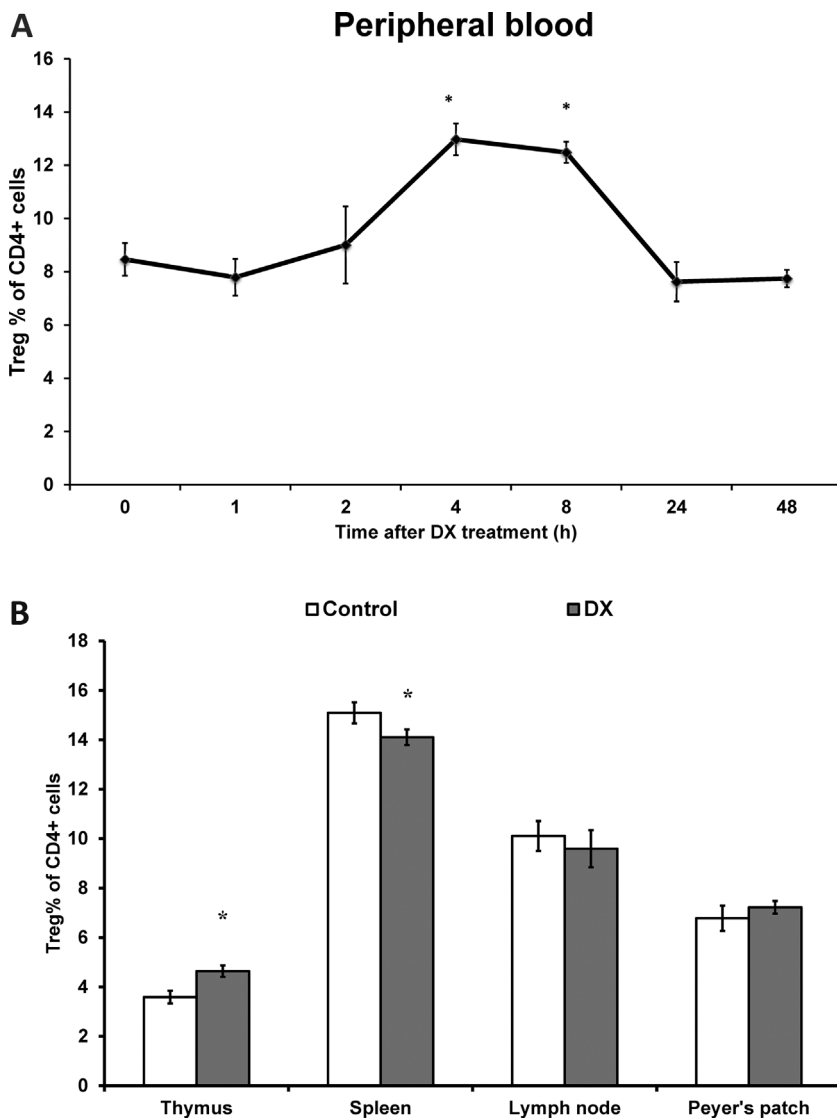


Fig. 2. (A) Time kinetics Tregs in the peripheral blood after single injection of high-dose DX. Single DX treatment induced a significant elevation of the ratio of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells at 4–8 h in the peripheral blood, and returned to starting levels only after 24 h. Data are shown as mean ± SEM. (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 ± SEM.

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

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.

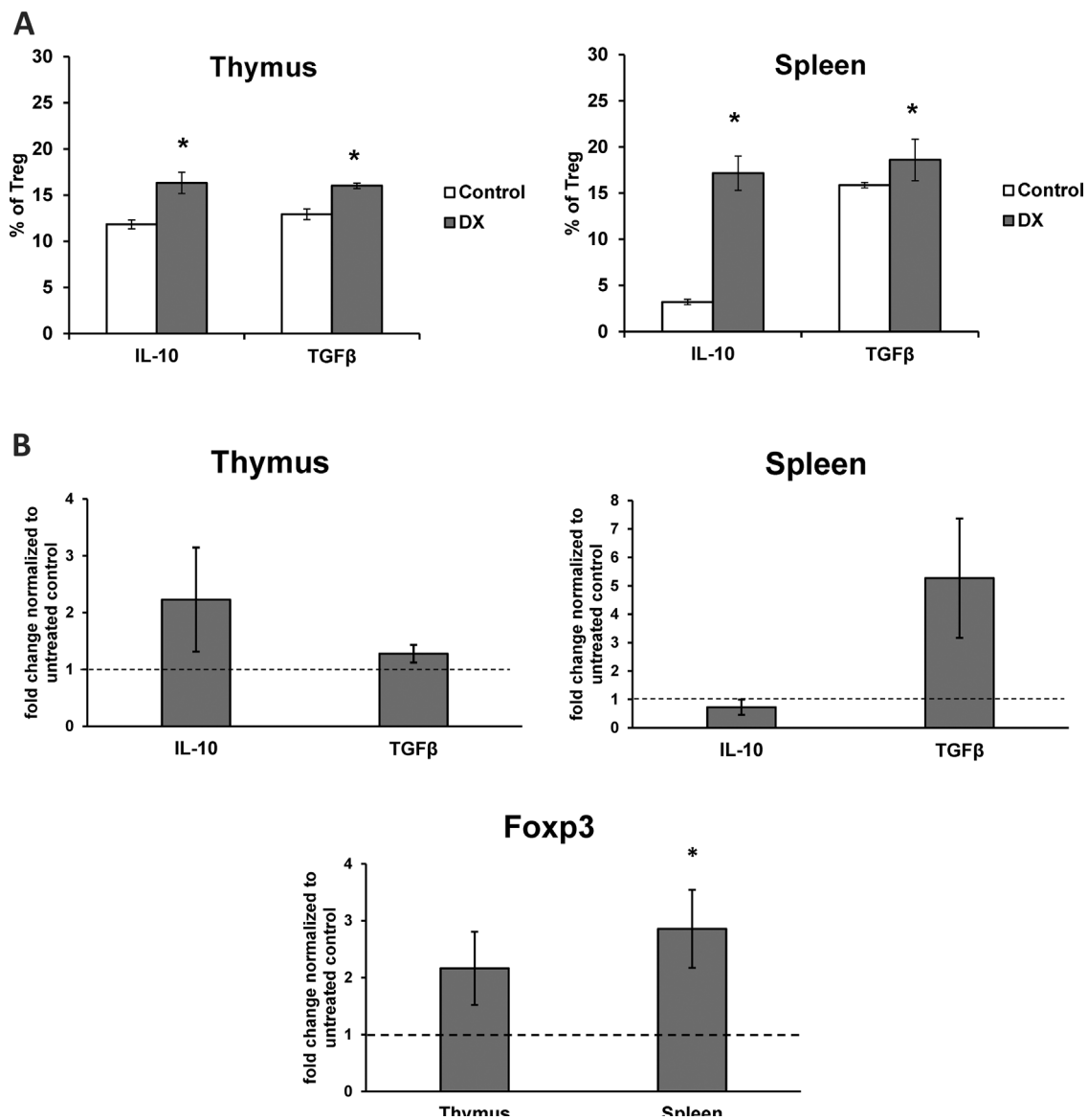


Fig. 3. (A) Effect of high-dose DX treatment on the ratio of IL-10 and TGFβ producing Treg cells detected by flow cytometry. The cytokines were detected on gated CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. The proportions of IL-10 and TGFβ positive thymic tTreg cells were similar in the control mice, while DX treatment resulted 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.

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).

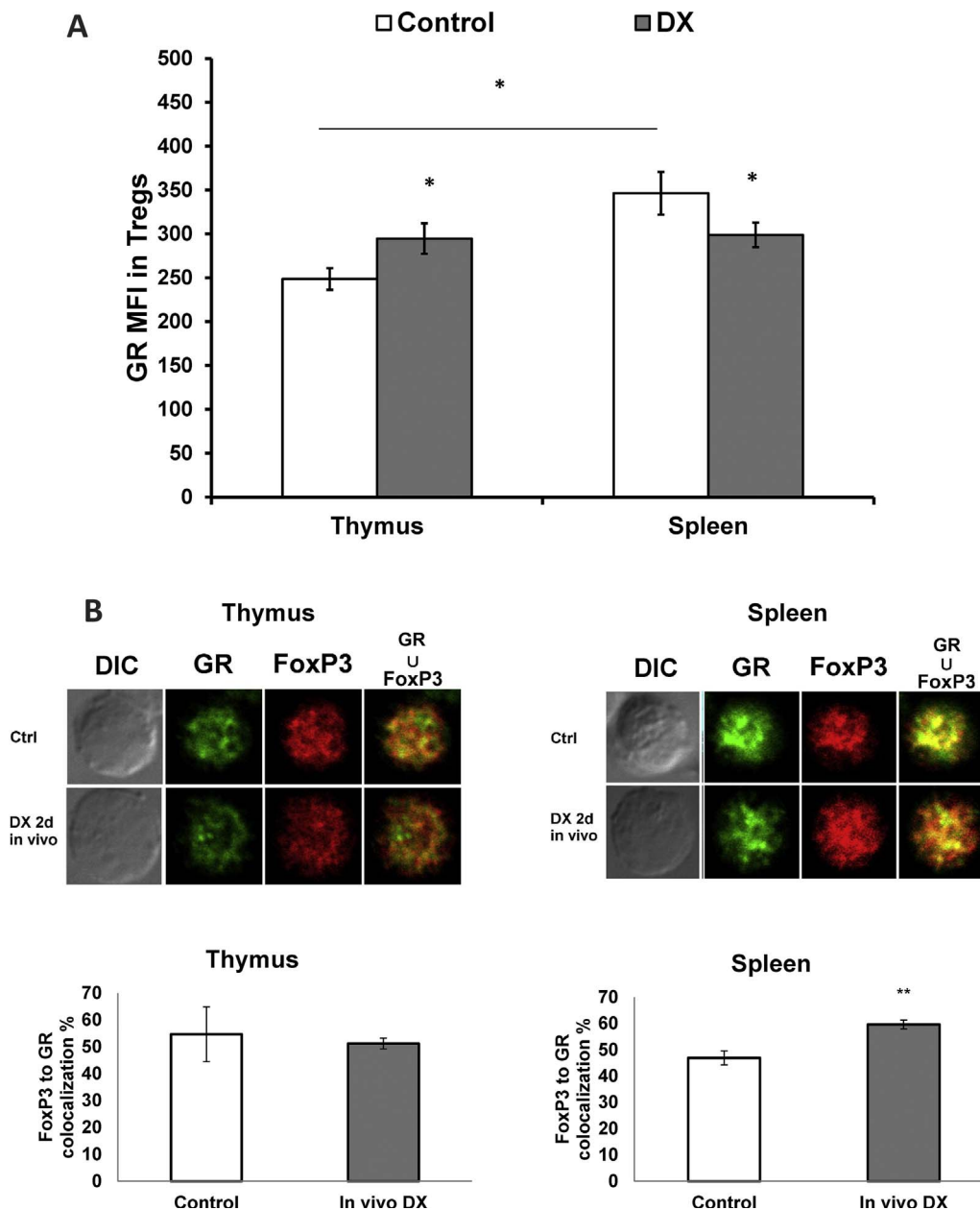


Fig. 4. (A) Effect of DX treatment on the glucocorticoid receptor (GR) expression of Treg cells. Intracellular anti-GR-FITC antibody staining was performed for flow cytometric detection of GR expression (MFI: FL-1 mean fluorescence intensity) in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells. MFI values of GR histograms 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.

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 result 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 (Maillox 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 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 α E) 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 TGFβ signaling (via Smad2/3 binding to the CNS1 region of the Foxp3 gene) and TGFβ 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 (Braithc 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 TGFβ 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., Pálincás, L., Boldizsár, F., Németh, P., 2002a. 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., 2002b. Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients. *Transpl. Int.* 15, 132–138.
- Boldizsár, F., Pálincás, 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.
- Braithc, M., Harikrishnan, 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.
- Calmelte, 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 cell 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., Sehoy, 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. Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications. *Trends Immunol.* 37 (11), 803–811.
- 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., Schaefer, 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., MacIsaac, 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., Gorochov, 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., Hoang, 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., Warszawska, 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., Lühder, 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 I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J. Immunol.* 174, 879–889.

Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knock-out mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes

R. Kugyelka, Z. Kohl, K. Olasz,
L. Prenek, T. Berki, P. Balogh and
F. Boldizsár 
*Department of Immunology and Biotechnology,
Medical School, University of Pecs, Pecs,
Hungary*

Summary

The tyrosine kinase zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70) plays a key role in T cell development and signalling. In the absence of ZAP-70, T cell development is arrested in the CD4⁺CD8⁺ double-positive stage, thus ZAP-70 homozygous knockout (ZAP-70^{-/-}) mice have no mature T cells in their peripheral lymphoid organs and blood, causing severe immunodeficiency. We investigated the early kinetics and long-term effects of wild-type thymocyte transfer on T cell repopulation in ZAP-70^{-/-} mice. We used a single intraperitoneal (i.p.) injection to deliver donor thymocytes to the recipients. Here, we show that after i.p. injection donor thymocytes leave the peritoneum through milky spots in the omentum and home to the thymus, where donor-originated CD4⁻CD8⁻ double-negative thymocytes most probably restore T cell development and the disrupted thymic architecture. Subsequently, newly developed, donor-originated, single-positive αβ T cells appear in peripheral lymphoid organs, where they form organized T cell zones. The established chimerism was found to be stable, as donor-originated cells were present in transferred ZAP-70^{-/-} mice as late as 8 months after i.p. injection. We demonstrate that a simple i.p. injection of ZAP-70^{+/+} thymocytes is a feasible method for the long-term reconstitution of T cell development in ZAP-70-deficient mice.

Keywords: homing, immunodeficiency, repopulation, T cell development, thymus

Accepted for publication 6 February 2018
Correspondence: F. Boldizsár, Department of
Immunology and Biotechnology, University of
Pecs, Szigeti ut 12, Pecs H7624, Hungary.
E-mail: boldizsar.ferenc@pte.hu

Introduction

ZAP-70, a T cell receptor zeta chain-associated protein of 70 kDa was identified by Chan and colleagues [1] in T cell receptor (TCR)-stimulated Jurkat cells. This tyrosine kinase plays a central role in signal transduction through the antigen receptor during T cell activation [2]. ZAP-70 is also indispensable in T cell differentiation: in its absence, the maturation of T cells in the thymus is blocked at the double-positive (DP: CD4⁺CD8⁺) stage, and as a consequence, no mature T cells can be found in the peripheral lymphoid organs, leading to severe combined immunodeficiency (SCID) in both humans and mice [3,4].

In the first ZAP-70 knock-out mice the whole protein kinase-coding gene was deleted [5]. Unlike human SCID patients, ZAP-70 knock-out mice have no mature CD4⁺ or CD8⁺ single-positive (SP) thymocytes; only DP cells can be found in their thymus [5]. Using flow cytometry, it was also shown that no functional TCR-αβ-expressing cells

were present in their spleen, while the number of B220⁺ B cells was elevated [5]. These knock-out mice are immunodeficient, but under specific pathogen-free (SPF) conditions they live up to 10 months [5].

Later, a second strain of ZAP-70-deficient mice was established with the deletion of a segment of the ZAP-70 coding gene [6]. The phenotype of these latter mice was consistent with the earlier study [5]; additionally, it was reported that the lymph nodes of ZAP-70 knock-out mice contained some CD3⁺ T cells, which expressed mainly TCR-γδ [6].

Several attempts have been made to restore the impaired T cell development in ZAP-70 knock-out mice; Adjali and colleagues [7] injected a T cell-specific lentiviral vector encoding human ZAP-70 directly into the thymi of ZAP-70-deficient mice, after which CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes appeared in 7–13 weeks and mature, functional T cells could be detected in the peripheral blood, spleen and lymph nodes.

To overcome the safety issues of the lentiviral gene delivery system, direct electroporation of the thymus was also tested in ZAP-70-deficient animals using a ZAP-70 coding expression vector [8]. They observed restored T cell differentiation in the thymus and detected mature T cells in the peripheral lymphoid organs 3 weeks following the transfer [8]. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells exhibited normal functional properties *in vivo* [8].

Previous adoptive transfer studies in ZAP-70-deficient mice used bone marrow (BM)-originated precursors as donor cells. Comparing intravenous (i.v.) and intrathymic routes of delivery of lineage-negative, haematopoietic stem cells (HSC), intrathymic transfer was found to be more efficient in terms of both kinetics and required cell numbers [9]. Upon intrathymic injection, SP thymocytes appeared in the thymus 4 weeks after the transfer with significantly higher numbers of mature T cells in the spleen and lymph nodes compared to the i.v. injection [9]. In contrast to the i.v. transfer, where no SP thymocytes were detected 13 weeks after the transfer, intrathymic transplantation of HSCs resulted in maintained T cell differentiation even 13–14 weeks post-transplantation [9].

Vicente and colleagues [10] investigated the long-term reconstitution, i.e. 20–25 weeks after i.v. or intrathymic transplantation of lineage-negative HSCs. Intrathymic transfer resulted in significantly higher numbers of peripheral T cells [10]. Furthermore, it was proved that intrathymic HSC transfer provides long-term donor thymopoiesis with donor-derived progenitors contributing to all stages of T cell differentiation, but not to the differentiation of non-T-lineage haematopoietic lineages [10]. Additionally, the architecture of the thymi of intrathymically reconstituted mice was restored [10].

In preliminary experiments, we have also tried various methods to reconstitute T cells in ZAP-70^{-/-} mice, including intrahepatic injection of wild-type (WT) BM in newborn mice or i.v. and intraperitoneal (i.p.) injection of WT thymocytes at 3–4 weeks of age. We managed to detect the presence of T cells after both intrahepatic BM transfer and i.p. thymocyte transfer, but i.v. injection of thymocytes was less effective: no mice survived more than 1 month after the transfer and we could not detect T cells in their blood in this period (our unpublished observations). Moreover, as ZAP-70^{-/-} mice are severely immunocompromised, and thus their lifespan under conventional housing is only 7–10 weeks (our own observation), the transfer has to be applied in a relatively narrow time-frame, i.e. between 3 and 5 weeks of age for best results. Based on technical considerations (accessibility of donor tissue, required cell numbers, route of administration) and the scarcity of studies investigating adoptive transfer of thymocytes [11–13], we decided that the i.p. thymocyte transfer was the simplest and most promising method to be tested further.

Herein, we show that a single i.p. injection of ZAP-70^{+/+} thymocytes into ZAP-70^{-/-} recipients corrected the T cell

deficiency permanently: T cells appeared in the peripheral lymphoid organs, the thymic T cell development showed normalization and, most importantly, the average lifespan of mice increased significantly.

Materials and methods

Mice

Mice deficient for the ZAP-70 kinase (B6.129X1-Zap70tm1Weis/J) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and bred in the transgenic mouse facility of the Department of Immunology and Biotechnology under conventional conditions. Mice were genotyped routinely from tail DNA with primers recommended by Jackson Laboratories, which could differentiate reliably between all three potential genotypes using three primers (ZAP-70 WT: 5'-AATTAGTCCATCCGCCTTCA-3', ZAP-70 mut: 5'-GCTATCAGGACATAGCGTTGG-3', ZAP-70 common: 5'-CATATGCACTGTCCCTGGTCT-3'). Breeding was conducted on a heterozygous basis.

In some experiments, we used green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice as thymocyte donors, where the GFP is expressed ubiquitously by most somatic cells, including thymocytes, under the control of the human elongation factor 1 α (EF1 α) promoter [14].

All experimental animals were kept and bred in the transgenic mouse facility of the Department of Immunology and Biotechnology under conventional, non-SPF conditions at 24 \pm 2°C with a controlled 12 h/12 h light/dark cycle. Animals used for the experiments were housed in cages in groups of five and they received food and drinking water *ad libitum*.

All animal experiments were performed in accordance with the regulations set out by the Animal Welfare Committee of the University of Pecs (BA02/2000-3/2012 to F.B.).

Thymocyte transfer

For adoptive transfer experiments, homozygous ZAP-70^{-/-} recipient mice were collected. As donors for thymocytes, we used either WT (ZAP-70^{+/+}) littermates or GFP-transgenic mice. Briefly, thymi were isolated from donor mice and cells were released by mechanical dissociation then washed once in phosphate-buffered saline (PBS). Recipients received 5–10 \times 10⁶ thymocytes with a single i.p. injection at the age of 3–4 weeks. We took blood from the transferred animals regularly to check the appearance of CD3⁺ T cells, which was the ultimate sign of the successful adoptive transfer. At the end of the experiments mice were killed and we isolated the thymus, spleen, lymph nodes and Peyer's patches for histological and flow cytometric analysis.

In some experiments, before the i.p. injection, we labelled the donor thymocytes with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Budapest, Hungary) *in vitro*, according to the manufacturer's instructions. Briefly, CFSE (50-mM stock in dimethylsulphoxide; Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) was diluted to a final concentration of 0.5 μ M and the cells were incubated for 30 min at 37°C while shaking. Then cells were washed with warm 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) in PBS and incubated in this buffer for another 30 min at 37°C. Cells were resuspended in sterile PBS for the intraperitoneal injection.

Antibodies

For immunofluorescent detection of B and T cells, anti-B220-Alexa Fluor 647 (clone: 6.B2; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) and anti-CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone: KT3; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) rat anti-mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used, respectively.

In thymic sections anti-CD4-phycoerythrin (PE) (clone: H129.19; BD Biosciences, Budapest, Hungary) and anti-CD8-FITC (clone: IBL-3/25; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) rat anti-mouse mAbs were applied to visualize the thymocyte composition.

For the discrimination of the cortex and medulla in the thymus, anti-Ly51-PE (clone: 6C3; eBioscience, Vienna, Austria) and anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1)-FITC (clone G8.8; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) rat anti-mouse antibodies were used.

For quantitative immunohistochemistry, anti-EpCAM1 (clone G8.8; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology) was used with anti-rat immunoglobulin (Ig)-peroxidase secondary antibody (Histols-Rat, cat. no. 30011.Rat50; Histopathology Ltd, Pécs, Hungary). Positive staining was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako-Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) colour reaction.

Omentum preparations for confocal microscopy were stained with rabbit anti-fibronectin (ab23750; Abcam, Cambridge, UK) and goat anti-rabbit IgG-cyanin 3 (Cy3) (ab6939; Abcam) antibodies.

Cells were labelled for flow cytometry with anti-CD3-allophycocyanin (APC)-Cy7, anti-B220-PE-Cy7, anti-CD4-PE and anti-CD8-PE-Cy5.5 (all from BD Biosciences) mAbs.

The distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in various tissues of transferred mice was detected using anti-CD3-FITC (clone: KT3; University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology), anti-TCR- $\alpha\beta$ -Alexa Fluor 700

and anti-TCR- $\gamma\delta$ -Brilliant Violet 421 mAbs (both from BD Biosciences).

For Western blotting, purified mouse anti-phosphotyrosine (clone: PY20, BD Biosciences) and anti- β -actin (clone no. AC-74, Sigma-Aldrich) primary antibodies were used, which were visualized with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology).

Flow cytometry

Cell surface markers of peripheral blood, lymph nodes, spleen and Peyer's patches were analysed by multi-colour flow cytometry, as described [15]. Briefly, anti-coagulated blood was haemolyzed while the solid lymphoid organs were homogenized in PBS containing 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) first, and then filtered. After washing with PBS containing 0.1% sodium azide and 0.1% BSA (Sigma-Aldrich) 10^6 cells were labelled with fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min in the dark; cells were then resuspended in PBS containing 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Data acquisition and analysis were performed on a FACS Canto II flow cytometer using FACS Diva Software (both from BD Biosciences).

Cell populations were defined as follows: CD3⁺: T cells; B220⁺: B cells; CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺: $\alpha\beta$ T cells; CD3⁺ TCR- $\gamma\delta$ ⁺: $\gamma\delta$ T cells; CD4⁺CD8⁻: DN thymocytes; CD4⁺CD8⁺: DP thymocytes; CD4⁺CD8⁻: CD4 SP thymocytes; and CD8⁺CD4⁻: CD8 SP thymocytes. Percentages of the different cell populations were quantified using two-dimensional density plots; GFP expression was analysed on histograms.

Immunohistochemistry and fluorescent microscopy

Multiple immunofluorescent staining of frozen, acetone-fixed sections from thymi, spleens and peripheral lymph nodes was performed as described earlier [16]. Acetone-fixed, frozen sections were blocked for 20 min with PBS containing 5% BSA (Sigma-Aldrich), followed by a 45-min incubation with the appropriate antibody cocktails. After washing with PBS, samples were mounted and analysed.

For immunohistochemistry, frozen thymus sections were blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS. Then, samples were treated with 1 mg/ml phenylhydrazine (Sigma-Aldrich) in PBS for 10 min. After 45-min incubation with unlabelled anti-EpCAM1, rat anti-mouse mAb samples were washed with PBS and anti-rat Ig peroxidase was used as secondary antibody for 1 h at room temperature. The sections were developed by DAB (Dako) colour reaction.

Immunofluorescent and immunohistochemical samples were analysed using an Olympus BX61 fluorescent microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan). The acquisition of digital images was performed with a CCD camera using analySIS software. Photos were overlaid using Adobe Photoshop CS2 software (Adobe Systems Inc., San Jose,

CA, USA), with adjustments for brightness, contrast and black level applied equally to all images.

Omenta were processed for whole-mount immunohistochemistry as described [17]. Briefly, harvested omenta were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and, after washing with 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS, were blocked with PBS containing 5% BSA (Sigma-Aldrich) and 0.1% saponin for 2 h. After washing three times for 20 min, samples were incubated with rabbit anti-fibronectin (Abcam) at 4°C overnight, then washed three times for 20 min. Anti-rabbit-Cy3 (Abcam) was used as secondary antibody (3 h at 4°C). Samples were viewed using an Olympus Fluo-View FV-1000 laser scanning confocal imaging system (Olympus).

cDNA synthesis and polymerase chain reaction (PCR)

After isolating total RNA from BM and thymi using the RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), cDNA was prepared with the RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Subsequent PCR was performed using primer pairs for GFP: 5'-GACGTAACGGCCACAAGTT-3' and 5'-CCTCCTTGAA GTCGATGCC-3'.

T cell isolation and *in-vitro* activation

T cells were isolated from the spleens of wild-type (WT) or transferred mice using the EasySep™ mouse T cell isolation kit (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), according to the manufacturer's instructions. Purified T cells were then stimulated *in vitro* using MACSiBead™ particles (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) loaded with CD3 and CD28 antibodies for 48 h (bead/cell ratio 2 : 1). Proliferation capacity of the stimulated T cells (20 000 cells/well in a 96-well plate) was assessed using Promega CellTiter 96® non-radioactive cell proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

Western blot

Some activated T cells were processed for Western blotting. Briefly, cells were lysed in Triton X lysis buffer [50 mM HEPES, 10 mM Na-pyrophosphate, 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Na-fluoride, 10% glycerol, 1% Triton X] complemented freshly with protease inhibitor and Na-orthovanadate (all from Sigma-Aldrich). After centrifugation at 16 000 g for 10 min, the supernatant was boiled immediately in sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer for 10 min. Samples were separated with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a 10% gel. The gels were blotted for 2 h to nitrocellulose membranes using the Mini Trans-Blot cell blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After transfer, nitrocellulose membranes were soaked in blocking buffer [2% BSA (Sigma-Aldrich), 10 mM Tris, 100 mM

sodium chloride and 0.1% Tween 20 (Molar Chemicals, Halásztelek, Hungary), pH 7.4] and then incubated with purified mouse anti-phosphotyrosine primary antibody (clone: PY20; BD Biosciences). Anti-β-actin (clone no. AC-74; Sigma-Aldrich) was used as loading control. Blots were then probed with peroxidase-conjugated anti-mouse-IgG (University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology). Blots were washed in a buffer containing 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20 (pH 7.4). Western blots were visualized using enhanced chemiluminescent reagent (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate; Thermo Scientific), as described in the manufacturer's instructions. Luminescent light signals were detected with Fujifilm LAS 4000 blot imaging system (Fuji, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Data are presented as means ± standard error of the mean (s.e.m.). Statistical significance was determined using the unpaired, two-sample Student's *t* test. *P* < 0.01 was considered statistically significant.

Results

T cell reconstitution in ZAP-70^{-/-} mice after i.p. thymocyte transfer

Instead of performing a conventional BM transplantation to correct the T cell deficiency in ZAP-70^{-/-} mice (for detailed reasons see Introduction above), we tested whether a simple i.p. transfer of WT thymocytes was a feasible method for the reconstitution of T cells in ZAP-70^{-/-} mice. To that end, we injected 5–10 × 10⁶ thymocytes into the peritoneal cavity of 3–4-week-old recipient mice and subsequently analysed blood and peripheral lymphoid organs for T cells. As ZAP-70^{-/-} mice have virtually no mature T cells in the peripheral lymphoid organs [5,6] (Supporting information, Figs S1 and S2), the appearance of T lymphocytes is a reliable sign of the successful adoptive transfer. First, for follow-up, we monitored the ratio of T cells in the peripheral blood: 10 days after the i.p. injection of thymocytes T cells had already appeared in the blood (~4%), and their ratio remained steady at between 4 and 6% during the 120 days of the monitoring (Fig. 1a). Four months after the i.p. thymocyte transfer, we killed recipient mice and performed a histological analysis of the peripheral lymph nodes (Fig. 1b) and spleen (Fig. 1b) which showed that, indeed, T cells appeared in the periphery, as the organs of mice receiving i.p. thymocyte transfer showed restored T cell areas (Fig. 1b A,C) in contrast to ZAP-70^{-/-} mice, where no peri-arteriolar lymphatic sheath (PALS) was seen in the spleen and lymph nodes also lacked defined T cell zones (Fig. 1b B,D and Supporting information, Fig. S1b).

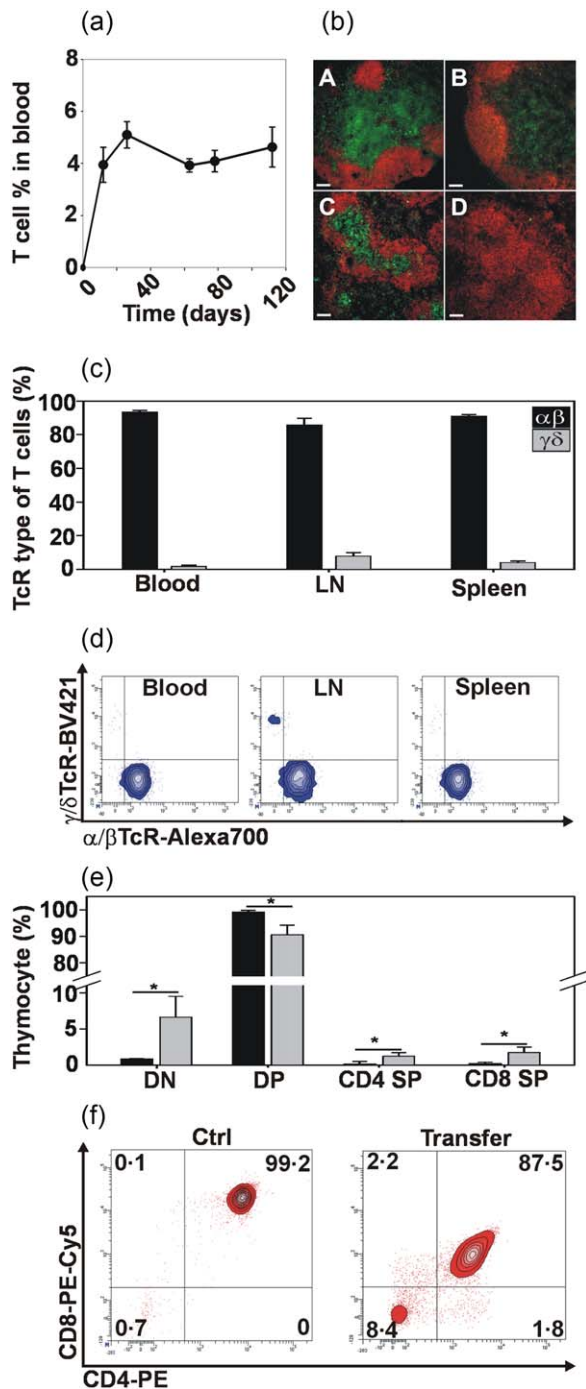


Fig. 1. Intrapерitoneal (i.p.) thymocyte transfer from wild-type (WT) mice reconstituted T cells on the long run in the peripheral lymphatic organs of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice. ZAP-70^{-/-} mice were injected with 10⁷ WT thymocytes i.p. at 3 weeks of age and observed up to several months. (a) Kinetics of T cell reconstitution. T cell percentage was assessed regularly by flow cytometric CD3 staining from peripheral blood samples until 4 months from the time of the transfer. Data points represent mean \pm standard error of mean (s.e.m.) values calculated from the data of seven mice. (b) Representative immunohistochemistry panels show lymph node (LN) (A) or spleen (C) isolated from mice, which underwent thymocyte transfer 4 months before killing. CD3⁺ T cells (green) and B220⁺ B cells (red) are shown at $\times 10$ magnification. ZAP-70^{-/-} LN (B) and spleen (D) sections are shown as negative controls. (c) T cell receptor (TCR) type was determined using antibodies against the $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ forms of the TCR by flow cytometric analysis. Bar diagram shows the percentages of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the blood, lymph nodes and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer. Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four mice. (d) Representative flow cytometric contour plots show the typical distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the blood, LN and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer 4 months before killing. (e) Composition of thymocytes was determined using anti-CD4/CD8 staining by flow cytometry [also see (f)]. Bar diagram shows the percentages of the four major thymocyte subpopulations (DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4 SP = CD4⁺ single-positive; CD8 SP = CD8⁺ single-positive) in control ZAP-70^{-/-} mice (black bars) and in those ZAP-70^{-/-} mice which received i.p. thymocyte transfer 4–8 months before killing (grey bars). Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four control and seven transferred mice. Statistically significant ($P < 0.01$) differences between groups of mice using unpaired Student's *t*-test are indicated (*). (f) Representative flow cytometric contour plots show the distribution of thymocytes based on their CD4 and CD8 staining. The left panel shows the typical thymocyte composition of a ZAP-70^{-/-} mouse, the right panel shows the thymus of a ZAP-70^{-/-} mouse, which received i.p. thymocyte transfer 8 months before killing. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Normally, the majority of mature T cells leaving the thymus carry TCR- $\alpha\beta$ [18]; however, in ZAP-70^{-/-} animals, where the T cell development is impaired [5], those few T cells that are present in the periphery (mainly the lymph nodes) express TCR- $\gamma\delta$ [6]. Here, we found that the TCR expression was normalized in recipients receiving thymocyte transfer: more than 80% of T cells expressed TCR- $\alpha\beta$ in the blood, lymph nodes and spleen (Fig. 1c,d).

Although we show here the results obtained 4 months after the i.p. thymocyte transfer (Fig. 1), in several cases we

monitored mice up to 12 months after the transfer and found that the T cell reconstitution remained stable even for these extended periods of time (data summarized in Supporting information, Fig. S3), which suggested the successful reconstitution of T cell development. The normalized lifespan of ZAP-70^{-/-} mice, which are otherwise seriously immunocompromised and susceptible to early death due most probably to infections, was further important evidence for the success of T cell repopulation. According to our experience, ZAP-70^{-/-} mice have a life expectancy of 7–10 weeks on average under conventional, non-SPF conditions (our observation).

To verify that the i.p. thymocyte transfer had indeed the potential to restore thymic T cell development in ZAP-70^{-/-} mice, thymocyte subpopulations were assessed 4–8 months after the transfer (Fig. 1e,f). We observed that, compared to the ZAP-70^{-/-} mice, where virtually all

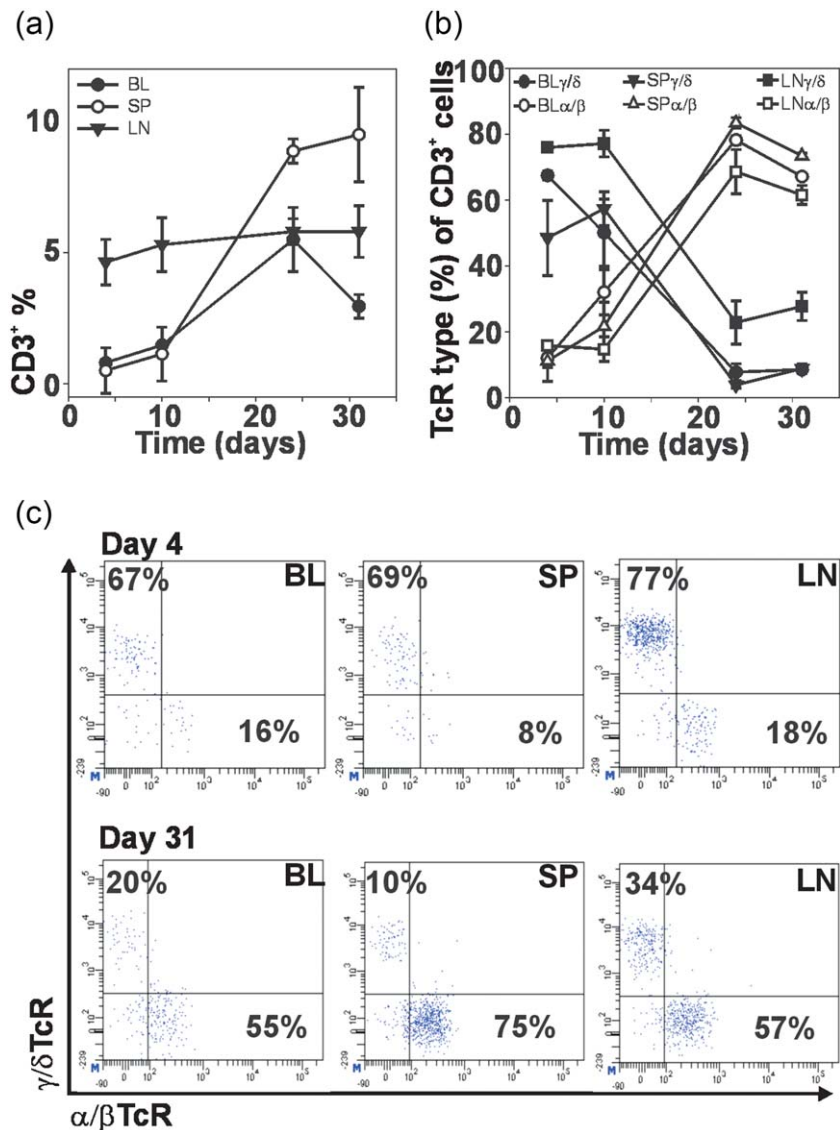


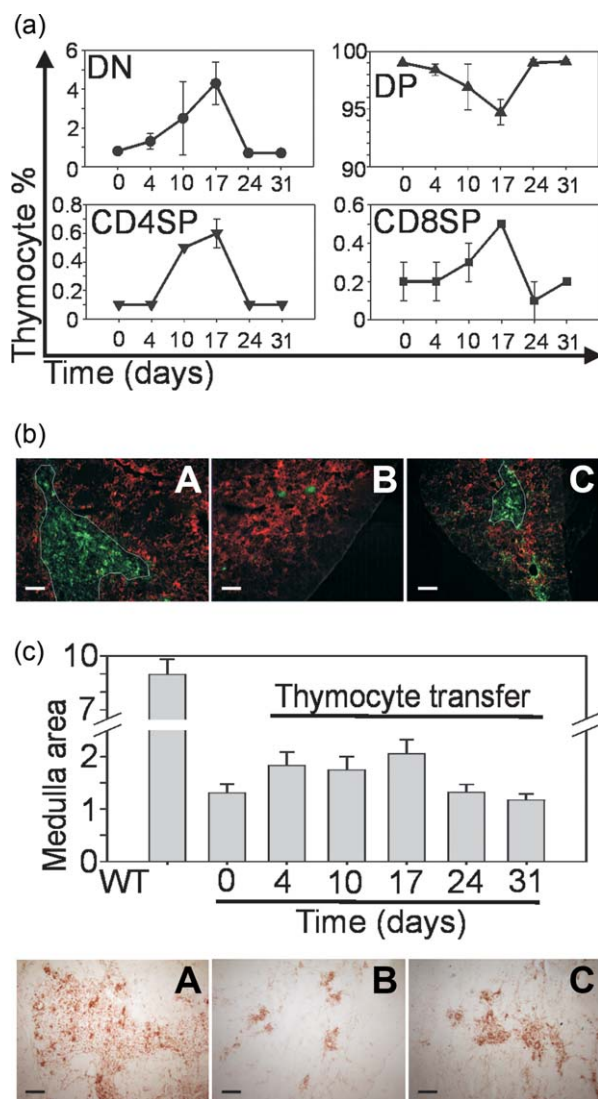
Fig. 2. Early time kinetics (1 month) of the T cell reconstitution of peripheral lymphoid organs in zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} recipient mice following an intraperitoneal (i.p.) thymocyte transfer from wild-type (WT) donor mice. (a) The number of T cells was assessed at days 4, 10, 24 and 31 in the blood (filled circles), lymph nodes (triangles) and spleen (empty circles) of recipient mice by staining with anti-CD3 antibody for flow cytometry. The diagram shows the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values calculated from the data of three mice killed at each time-point. (b) The T cell receptor (TCR) type of T cells was determined at days 4, 10, 24 and 31 in the blood (circles), lymph nodes (squares) and spleen (triangles) of recipient mice by staining with anti- $\alpha\beta$ (empty symbols) and $\gamma\delta$ (filled symbols) TCR-specific antibodies for flow cytometry. The diagram shows the mean \pm s.e.m. values calculated from the data of three mice killed at each time-point. (c) Representative flow cytometric dot-plots show the T cell distribution with anti- $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR-specific antibody staining in the blood (BL), spleen (SP) and lymph nodes (LN) at days 4 and 31 after the i.p. thymocyte injection. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

thymocytes are DP [5,6] (Supporting information, Figs S1 and S2), after transfer the thymocyte composition shifted: the ratio of DP thymocytes decreased from 99 ± 0.7 to 90.5 ± 3.7 , accompanied by a significant increase in CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes (from ~ 0 to 1.2 ± 0.6 and 1.7 ± 0.8 , respectively) (Fig. 1e,f). These findings implied that in the thymi of transferred mice some thymocytes were able to make the transition from DP to SP stage successfully.

Early kinetics of the T cell reconstitution in peripheral lymphoid organs after i.p. thymocyte transfer

First we observed that, in the blood, T cells already appeared 10 days after the i.p. thymocyte transfer. Thus, in the next set of experiments, we investigated the early kinetics of T cell reconstitution: the ratio of T cells was

assessed at days 4, 10, 24 and 31 after i.p. thymocyte transfer in the peripheral lymphoid organs of ZAP-70^{-/-} recipient mice (Fig. 2a). In the peripheral blood, the ratio of T cells reached 5.5% at day 24 and decreased slightly to 3% by day 31 (Fig. 2a). In the spleen, we observed a sudden increase between days 10 and 24 (from 1.1 to 8.9%), with the T cell ratio increasing further to 9.5% by day 31 (Fig. 2a). We think that this increase could be the combined result of both the increased immigration of T cells from the thymus (see next part of Results and Fig. 3) and local expansion of T cells in the spleen, which could be verified using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labelling or CD25 as proliferation/activation marker (data not shown). We detected only a slight increase in the T cell ratio (from 4.6% at day 4 to 5.8% at day 31) in the lymph nodes during the period assessed (Fig. 2a); however, the initial ratio of T cells was highest in the lymph nodes (due most probably to the presence



of $\gamma\delta$ T cells [6] (Supporting Information, Figs S1 and S2) (Fig. 2b,c).

Next, we investigated the kinetic changes in the distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the blood and peripheral lymphoid organs (Fig. 2b,c). At day 4, the majority of the T cells were $\gamma\delta$ T cells in the blood, spleen and lymph nodes ($67.4 \pm 1.3\%$, $48.5 \pm 11.4\%$ and $75.9 \pm 1\%$, respectively) (Fig. 2b,c). The ratio of $\gamma\delta$ T cells decreased constantly until day 24 ($7.7 \pm 2.6\%$) in the blood, while in the spleen and lymph nodes this change started only after day 10 (Fig. 2b,c). By day 24, the ratio dropped to $3.8 \pm 0.9\%$ in the spleen, but in the lymph nodes the percentage of $\gamma\delta$ T cells did not fall below $22.8 \pm 6.6\%$ (Fig. 2b,c). In parallel, the ratio of $\alpha\beta$ T cells increased steadily from $12 \pm 2.8\%$ (day 4) to $78.2 \pm 1.3\%$ (day 24) in the blood, and from $11.1 \pm 6.2\%$ (day 4) to $83.4 \pm 1.6\%$ (day 24) in the spleen (Fig. 2b,c). In the lymph nodes, the ratio of $\alpha\beta$ T cells did not change until day 10 ($15.8 \pm 1.1\%$ at day 4 *versus* $14.7 \pm 3.8\%$ at day 10), when an increase began ($68.6 \pm 6.7\%$ at day 24) (Fig. 2b,c).

Fig. 3. Early time kinetics (1 month) of the cellular changes in the thymus of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} recipient mice following an intraperitoneal (i.p.) thymocyte transfer from wild-type (WT) donor mice. (a) Changes in the thymocyte subpopulations were assessed at days 0, 4, 10, 17, 24 and 31 after anti-CD4 and anti-CD8 labelling using flow cytometry. The diagram shows the changes in the percentages of the four major thymocyte subpopulations (DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4 SP = CD4⁺ single-positive; CD8 SP = CD8⁺ single-positive) in ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer. The diagram shows the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values calculated from the data of three mice killed at each time-point. (b) Histological compartments of the thymi were analysed with immunohistochemistry using anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1) (green) and anti-Ly51 (red) antibodies specific for the medulla and the cortex, respectively. Representative thymus sections from wild-type (WT) (A), ZAP-70^{-/-} (B) and ZAP-70^{-/-} mice after i.p. thymocyte transfer (C) are shown at $\times 10$ magnification. Medullary regions are highlighted by white borderline. (c) The area of the thymic medulla was analysed by immunohistochemistry using anti-EpCAM1 with peroxidase-labelled secondary antibody at days 0, 4, 10, 17, 24 and 31 after the i.p. thymocyte transfer. Four serial sections from thymi of WT, ZAP-70^{-/-} and ZAP-70^{-/-} mice were stained on the same slide and 20 images were taken from each sample and the EpCAM1-positive areas were analysed using the ImageJ image analysis software. Diagram shows the mean \pm s.e.m. values calculated from the data of three mice killed at each time-point. Representative EpCAM1 immunohistochemistry images from WT (A), ZAP-70^{-/-} (B) and ZAP-70^{-/-} mice after i.p. thymocyte transfer (C) are shown at $\times 10$ magnification. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

After day 24, we measured a slight drop in the ratio of $\alpha\beta$ T cells in all organs until day 31 (Fig. 2b,c).

Investigation of the early changes in the thymus following i.p. thymocyte transfer

To assess the changes taking place in the thymus during the first 4 weeks following i.p. thymocyte transfer, thymocyte subpopulations were assessed at 0, 4, 10, 17, 24 and 31 days after the transfer. As already mentioned above, in ZAP-70^{-/-} mice the thymus is composed of almost only DP cells [5,6] (Fig. 1e,f, Supporting information, Figs S1 and S2.) Upon i.p. thymocyte transfer, we observed changes already in the thymocyte composition as early as 10–17 days (Fig. 3a). The ratio of CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) thymocytes elevated from 0.8 ± 0.1 to 4.3 ± 1.1 by day 17 while, simultaneously, the ratio of CD4⁺CD8⁺ DP cells dropped from 99 ± 0.7 to 94.7 ± 1.1 (Fig. 3a). In parallel, the ratio of mature SP cells started to increase after day 4, and reached a peak at day 17 in both the CD4⁺ ($0.6 \pm 0.1\%$) and CD8⁺ ($0.5 \pm 0.1\%$) SP subpopulations, indicating the restoration of thymic T cell development (Fig. 3a). Interestingly, the ratios reverted to the starting point in all thymocyte subpopulations by day 24 (Fig. 3a).

These results have raised the question of whether the observed changes were also mirrored by changes in the morphology of the thymus. The thymi of ZAP-70^{-/-} mice are characterized by the lack of distinct medullary regions [5] (Supporting information, Fig. S1, Fig. 3b B). Seventeen days after the i.p. thymocyte transfer, patches of reorganized medullary regions appeared (Fig. 3b C). Quantitative measurements (Fig. 3c) revealed that the area of the medullary regions changed parallel to that detected in the thymocyte subpopulations: i.e. an initial expansion of the medullary area until day 17 (from 1.3 ± 0.17 to 2.05 ± 0.27) was followed by a reduction in the size of the medulla (1.17 ± 0.12).

Detection of donor-derived T cells using GFP-transgenic thymocyte transfer

To confirm that the above-described T cell repopulation after i.p. thymocyte transfer in ZAP-70^{-/-} mice was indeed due to the development of stable chimerism, in the next experiments we used thymocytes derived from GFP-transgenic mice [14] as donors (Fig. 4). In this way we could trace the donor-originated cells in the lymphoid organs of recipients during the reconstitution of T cells. The ratio of T cells in peripheral blood was $31.6 \pm 6.4\%$ and $27.1 \pm 4.4\%$ at weeks 7 and 12 weeks after the transfer, respectively, $83.6 \pm 3.9\%$ and $78.5 \pm 6\%$ of which were GFP⁺, respectively (Fig. 4a). We investigated the cellular composition of the peripheral lymphoid organs of reconstituted mice and found that the percentage of T cells ranged between 16 and 24% in peripheral lymph nodes, mesenteric lymph nodes, spleen and Peyer's patches (Fig. 4b). Approximately 70% of the T cells were present in lymph nodes, while 87 and 90% of the T cells in the Peyer's patches and spleen were GFP⁺ donor cells, respectively (Fig. 4b). Fluorescent microscopic images supported the flow cytometric findings, as GFP⁺ cells could be visualized only in the T cell-rich PALS areas of the spleen, but not in the B cell follicles (Fig. 4c,d). We confirmed strong GFP expression in thymocytes isolated from the i.p. transferred-recipients using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), but only very low expression in the bone marrow of the same mice (Fig. 4e).

T cell reconstitution led to the development of functional T cells

Although, as already mentioned, the significantly elongated lifespan of the transferred mice clearly showed the recapitulation of the immune system by the newly developed T cells, we wanted to elaborate T cell functions directly. Therefore, we performed *in-vitro* T cell activation tests on isolated T cells from transferred mice (Fig. 5). We assessed cell proliferation and activation of donor T cells upon anti-CD3/CD28 stimulation (Fig. 5). We could detect similar tyrosine phosphorylation patterns and proliferative

capacity in the T cells from transferred mice as in T cells deriving from WT mice (Fig. 5a,b). These data showed clearly that the activation and proliferation of the donor-derived T cells was normal.

Donor thymocytes leave the peritoneal cavity through the milky spots of the omentum

The next interesting question regarded which pathways the injected thymocytes use to exit from the peritoneum. To address this, we injected CFSE-labelled thymocytes intraperitoneally (Fig. 6). After analysing various organs in the peritoneal cavity and the draining lymph nodes (mediastinal, inguinal, axillary) 12, 24, 48 and 72 h after the transfer (data not shown), we identified the omentum as the main collection site for thymocytes, as 45% of the lymphocytes isolated from the omentum were of donor origin (CFSE⁺) (Fig. 6a). Interestingly, the majority of these CFSE⁺ lymphocytes were of the CD4⁺CD8⁻ DN (86%) phenotype; only 12% were CD8⁺ SP (Fig. 6a). Whole mount images have shown that the CFSE⁺ donor cells were not scattered randomly in the omentum, but they formed aggregates at specific sites (Fig. 6b). To identify these specific entry zones, we performed immunofluorescent staining with a fibronectin-specific antibody, which revealed that the CFSE⁺ cell aggregates were localized in the lymphoid compartments of the omentum (known as 'milky spots') (Fig. 6c,d).

Discussion

ZAP-70 is an essential molecule in T cell development, as illustrated by ZAP-70^{-/-} mice [5,6], and those rare SCID patients who have mutations in this molecule [4] leading to the absence of mature T cells in the periphery, resulting in severe immunodeficiency. In our present work we demonstrated that, with the i.p. adoptive transfer of ZAP-70^{+/+} (WT) thymocytes, T cells can be reconstituted stably, thus correcting the immunodeficiency in ZAP-70^{-/-} mice.

Most T cell reconstitution studies so far have concentrated on analysing the reconstitution of T cells after the transfer of BM HSC into irradiated hosts [19–22]; furthermore, adoptive transfer of cells isolated from fetal liver or neonatal spleen [23], committed T cell progenitors [24], double-positive thymocytes [11], isolated thymocytes [12,13] and *in-vitro*-generated T cell precursors (reviewed in [20]) have also been studied. Here, we have shown that with a single, simple i.p. injection of 5–10 million thymocytes from WT (ZAP-70^{+/+}), donor mice corrected the T cell deficiency effectively in the long term. The correction of the immunodeficiency was shown clearly by the significantly longer survival of transferred ZAP-70^{-/-} animals: ZAP-70^{-/-} mice usually have a short lifespan (see above); however, some of the transferred animals were alive even 8–10 months after the i.p. injection. The efficacy of long-

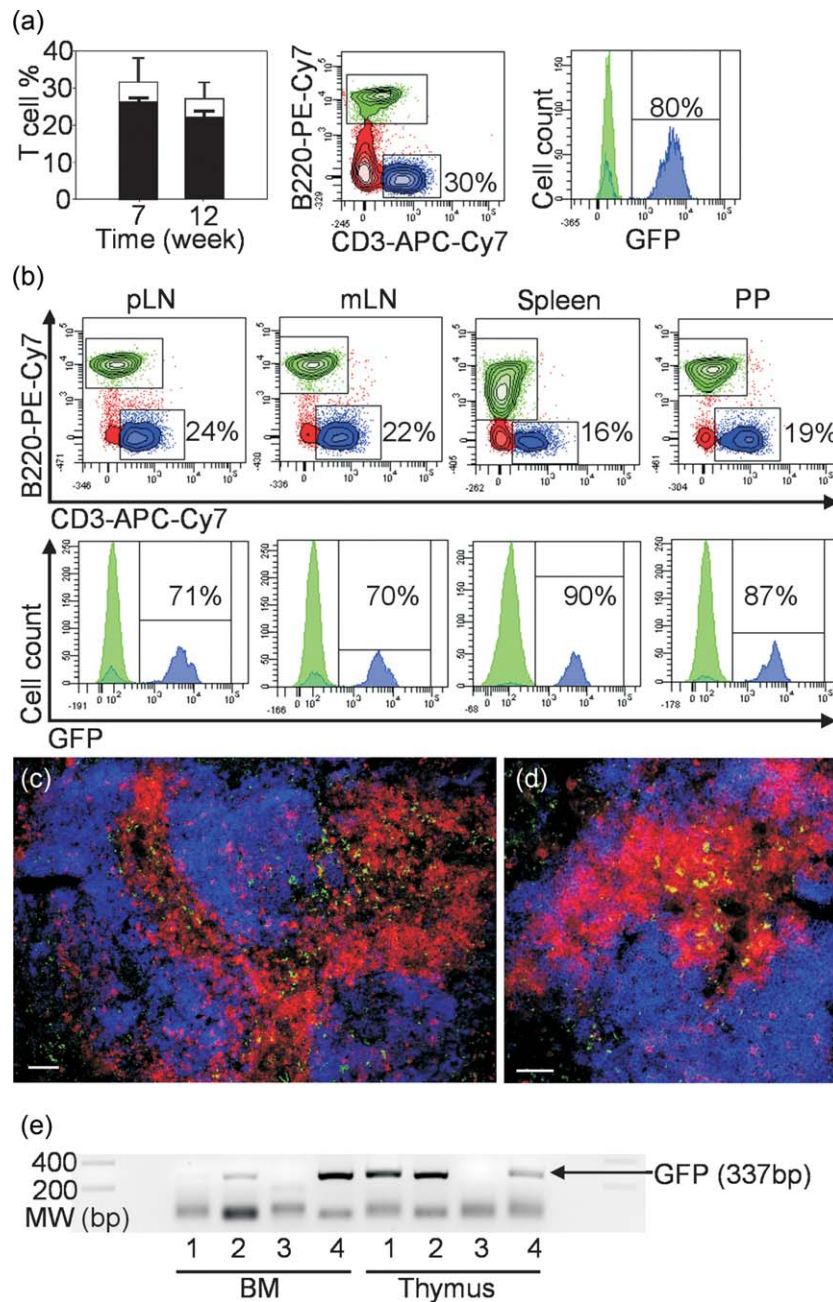


Fig. 4. Characterization of the T cell reconstitution using green fluorescent protein (GFP)-expressing donor thymocytes. (a) Zeta chain-associated protein of 70 kDa ($ZAP-70^{-/-}$) mice were injected intraperitoneally (i.p.) with thymocytes from GFP-transgenic donor mice. Blood lymphocytes were evaluated 7 and 12 weeks after the injection for CD3 and B220 staining as well as GFP expression. Bar diagram shows the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values of the T cell percentage (open bar) and the corresponding GFP⁺ fraction (black bar) of T cells calculated from the data of six mice killed at each time-point. Representative flow cytometric plots show the distribution of B (B220⁺; green population) and T (CD3⁺; blue population) cells (contour plot) and their GFP expression (histogram) in the blood. (b) Representative flow cytometric plots show the GFP expression of B (B220⁺; green population) and T (CD3⁺; blue population) cells in the peripheral (pLN) or mesenteric lymph nodes (mLN), the spleen and the Peyer's patches (PP) from $ZAP-70^{-/-}$ mice, which were transferred with thymocytes from GFP-transgenic donor mice. (c,d) Representative images (at $\times 10$ and $\times 20$ magnification, respectively) from the spleen of a $ZAP-70^{-/-}$ mouse, which was transferred with thymocytes from GFP-transgenic donor mice, show immunohistochemistry using anti-CD5-phycoerythrin (PE) (red) and anti-B220-AlexaFluor670 (blue) antibodies. GFP-positive cells (green) appear mainly in the T cell-rich areas (red) of the periarteriolar lymphatic sheath (PALS). (e) Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) image shows the GFP expression of bone marrow cells and thymocytes isolated from two GFP-thymocyte-transferred $ZAP-70^{-/-}$ (lanes 1 and 2), one BALB/c (lane 3) and one GFP-transgenic (Tg) mice (lane 4). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

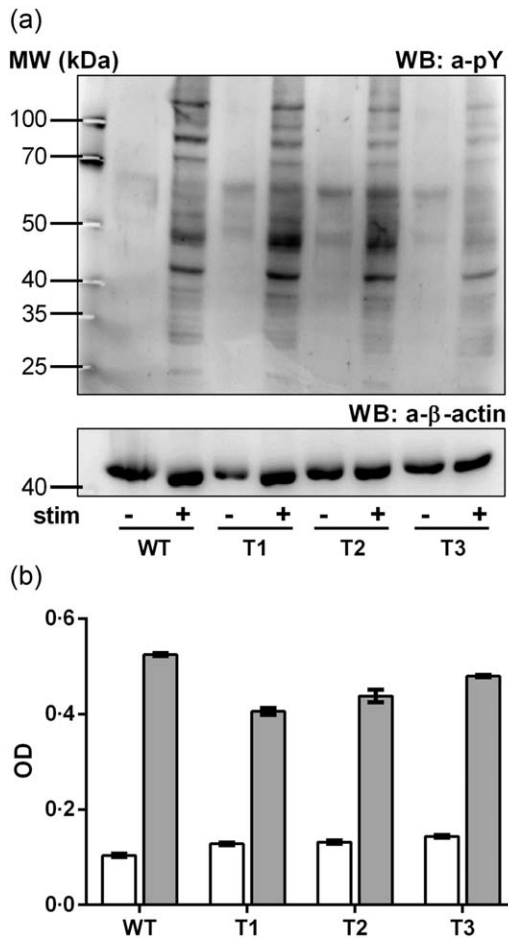


Fig. 5. *In-vitro* functional testing of donor T cells. (a) Western blot shows the anti-CD3/CD28-induced tyrosine phosphorylation. Cell lysates from non-stimulated and stimulated T cells derived from wild-type (WT) or transferred mice (T1, T2, T3) were separated on 10% sodium dodecyl sulphide-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized with anti-phosphotyrosine (aPY) antibody (upper panel). Equal sample loading was verified by reprobng the same blot with anti- β -actin antibody (lower panel). (b) *In-vitro* proliferation test of activated T cells was assessed with Promega CellTiter 96[®] non-radioactive cell proliferation assay. The diagram shows the optical density values (OD) of non-stimulated (white) and anti-CD3/CD28-stimulated (grey) samples. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values calculated from triplicates of each sample.

term T cell reconstitution was confirmed by the presence of mature $\alpha\beta$ T cells up to several months after the transfer in blood and peripheral lymphoid organs, with the majority expressing TCR- $\alpha\beta$. Histological analysis revealed that the lymph node and spleen microstructure in transferred animals was similar to WT, suggesting that transfer-originated T cells were able to restore the disrupted morphology of ZAP-70^{-/-} peripheral lymphoid organs to normal. Furthermore, using GFP-transgenic thymocytes we could demonstrate clearly that the T cell repopulation was donor-derived.

The long-term stability of our chimeras suggested a continuous T cell production; thus, the possibility of thymic repopulation was also investigated. We have already observed SP thymocytes appearing in the thymus of ZAP-70^{-/-} recipient mice 17 days after the i.p. injection of WT thymocytes accompanied by an increase in the area of the medullary region, indicating that the thymic T cell development was reset by the treatment. Cross-talk between thymic epithelial cells and thymocytes during T cell

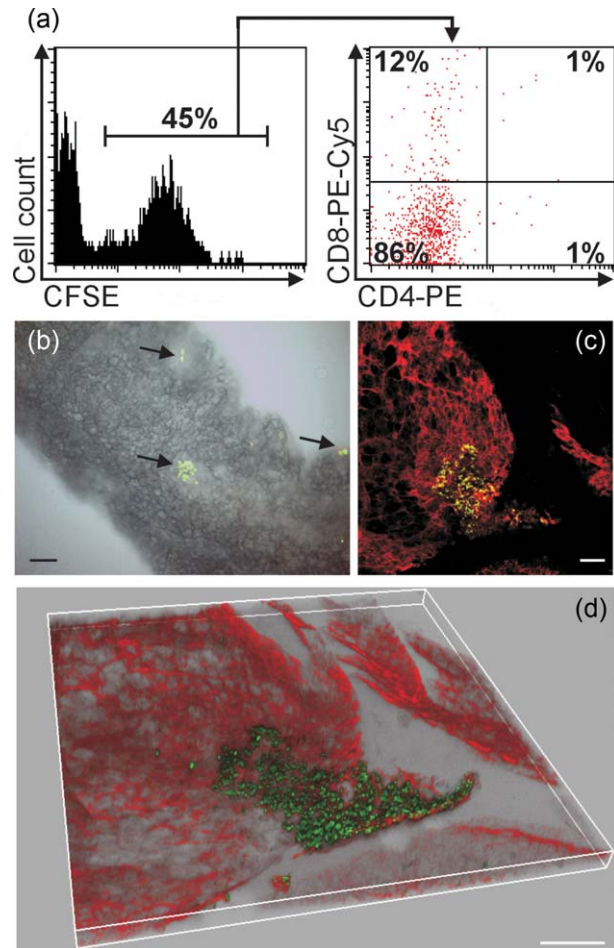


Fig. 6. Donor thymocytes exit from the peritoneal cavity via milky spots found in the omentum. Carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labelled thymocytes were injected intraperitoneally (i.p.) into zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice, then the omentum was isolated after 24/48 h. (a) Flow cytometric analysis showed that the CFSE⁺ thymocytes entered the omentum (left histogram). Cell surface staining of the CFSE⁺ population for CD4 and CD8 (right dot-plot). (b) Light microscopy whole mount preparation shows the CFSE⁺ cells entering into the omentum at specific sites as small cell aggregates (indicated by arrows). (c,d) Confocal microscopy image of CFSE⁺ donor thymocytes from the omentum of ZAP-70^{-/-} mice. Fibronectin was labelled with red. Representative images show two-dimensional slice (c) and three-dimensional reconstruction (d). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

development have been studied extensively [25]. Here, the re-organization of the medullary region took place after i.p. thymocyte transfer, which was in line with a previous study [10]. In another study, SP cells appeared in the thymus with similar kinetics, i.e. 3 weeks after intrathymic electroporation of ZAP-70 coding plasmids [8]. As ZAP-70-deficient host thymocytes suffer a developmental block at the DP stage, the appearance of SP cells suggests that they originated from the donor ZAP-70^{+/+} thymocyte population. The continuous increase in the ratio of T cells in peripheral blood, following the appearance of SP cells in the thymus with a lag (peak at day 21), suggested that these SP cells populated the peripheral lymphoid organs successfully. By day 21, $\alpha\beta/\gamma\delta$ T cell ratios in peripheral lymphoid organs resembled WT, providing further proof of donor thymocytes being able to repopulate host lymphoid organs in the form of mature $\alpha\beta$ T cells.

Interestingly, the changes observed in the thymus (appearance of SP cells and medullary islets) became more pronounced 4–8 months after i.p. transfer than in the first month, although the composition of thymocytes was still far from WT (data not shown). However, similar percentages of SP thymocytes were reported by others [9].

Overall, the emergence of SP thymocytes and medullary epithelial cells suggested that during the first month following the i.p. thymocyte transfer a wave of T cell development took place, which was followed by long-term thymic recovery which generated T cells for several months.

As these findings implied that the injected thymocytes were capable of entering the thymus, we also analysed which route the thymocytes could have used to leave the peritoneum. Although it was described earlier that the mediastinal and ipsilateral inguinal lymph nodes drain the peritoneal cavity after i.p. transfer of cells [26], in our experiments we have observed no CFSE-labelled donor cells in these localizations (data not shown). Contrary to this, significant CFSE⁺ cell aggregates were present in the omental milky spots, which were already described as gateways for trafficking of B2-B cells [27], dendritic cells [28] and preferential sites for tumour cell adhesion (reviewed in [29]). The morphology of milky spots resembles that of secondary lymphoid organs; however, they are covered by a discontinuous layer of mesothelial cells [30]. These intracellular gaps might also serve as entry sites for i.p. injected cells homing via lymphatic vessels and blood capillaries [31]. We have observed that the majority of CFSE⁺ cells in the omentum were the most immature CD4⁻CD8⁻ DN thymocytes, which might suggest that this population was the main source of donor thymocytes that entered the host thymus and supported the development of mature SP thymocytes.

Based on these results, we propose the following mechanism of the T cell recovery in ZAP-70^{-/-} mice after WT thymocyte transfer. When we injected thymocytes into the peritoneal cavity of recipient mice, we transferred a mixed cell population containing approximately 3–5% DN, 75–80% DP, 10–15% CD4 SP and 5–10% CD8 SP cells [32].

This means that both immature (DN and DP) and mature SP cells entered the recipient. We hypothesize that this mixed cell population repopulated the recipient's lymphoid organs in a complex manner. First, mature SP cells most probably have the capacity to enter peripheral lymphoid organs/tissues, where they could augment the immune response relatively quickly. This peripheral homeostatic expansion could be beneficial, especially in the early stages of the transfer to recapitulate the immune response (at least partially) and promote survival. Conversely, immature cells could have the potential to repopulate primary lymphoid organs and provide a long-term, stable T cell production for several months after the transfer. As DP cells are extremely sensitive to apoptosis [33], in our view they might not play a key role in restoring the T cell development. Instead it is more likely, and also supported by the aggregation in the omentum, that the DN most immature T cells reached the thymus and/or the bone marrow and they colonized these organs. As the recipient's own T cell progenitors do not have the capacity to mature into SP cells [5,6] there is a selective survival advantage of the ZAP-70^{+/+} donor cells. The need for relatively high donor cell numbers could also be a consequence of the following: DN cells represent < 5% of thymocytes, i.e. in the case of 10⁷ donor cells this means $\sim 5 \times 10^5$ cells. Initially, we also tried to transfer 1–2 million donor thymocytes, but the success rate was considerably lower (~ 10 –20%, data not shown), which might be due to the inadequate number of DN cells to repopulate the thymus.

In summary, we have demonstrated that i.p. injected ZAP-70^{+/+} thymocytes were able to enter the thymus of ZAP-70^{-/-} mice, reorganize its morphology and restore T cell development. Mature, donor-originated $\alpha\beta$ T cells were present in the peripheral blood and lymphoid organs, where they were organized into structured T cell zones. The established chimerism was stable in the long term as the immunodeficiency of ZAP-70^{-/-} mice was resolved, as shown by the long-term survival of mice after thymocyte transfer.

Finally, we believe that our work could have some important practical implications. First, this new and simple transfer technique could provide benefits for those researchers who work with ZAP-70^{-/-} mice. As the transferred mice become immunocompetent and their breeding is possible, they could be extremely useful for researchers who need larger quantities of ZAP-70^{-/-} mice for different *in-vitro* or *in-vivo* experiments (e.g. haemopoietic stem cell or embryonic liver cell isolation for *ex-vivo* genetic manipulation or genetic engineering of ZAP-70^{-/-} embryos). The simplicity and low risk of our transfer approach could be beneficial in such laboratories where the technically more challenging bone marrow transfer is not available. Secondly, although we are still far from the successful restoration of T cell deficiency caused by ZAP-70 deficiency in humans, we hope that our results could also contribute to the development of new therapeutic approaches in future.

Author contributions

R. K., Z. K., L. P. and K. O. performed the experiments, F. B. and P. B. assisted in the experiments, Z. K. and K. O. took part in the breeding of mice, R. K. and F. B. prepared the manuscript, T. B. and P. B. helped in the study design and gave useful advice during manuscript preparation and F. B. conceived the study, finalized the manuscript and was in charge of the project.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian National Research Fund (NKFIH, formerly OTKA) (grant number OTKA K101493 to F. B.); and Research Grant from the Medical Faculty of the University of Pecs (grant number KA-2015-23 to K. O.); the Janos Bolyai Research Scholarship from the Hungarian Academy of Sciences (grant number BO/00086/12/5 to F. B.) and a Post-Doctoral Research Scholarships from the Hungarian Academy of Sciences (grant number 716/180/2014/KIF to K. O.) and the Medical Faculty of the University of Pecs (grant number KA-POSTDOK-12-05 to K. O.). The project has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund: Projects 'Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs' (EFOP-3.6.1.–16–2016-00004) and 'PEPSYS – Complexity of peptide-signalization and its role in systemic diseases' (GINOP 2.3.2.–15-2016-00050).

Disclosure

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

References

- Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**:9166–70.
- Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 1993; **73**: 209–12.
- Palacios EH, Weiss A. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J Exp Med* 2007; **204**:1703–15.
- Elder M, Lin D, Clever J *et al.* Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994; **264**:1596–9.
- Negishi I, Motoyama N, Nakayama K *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995; **376**:435–8.
- Kadlecek TA, van Oers N, Lefrancois S *et al.* Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J Immunol* 1998; **161**:4688–94.
- Adjali O, Marodon G, Steinberg M *et al.* In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer. *J Clin Invest* 2005; **115**:2287–95.

- Irla M, Saade M, Kissenpfennig A *et al.* ZAP-70 restoration in mice by in vivo thymic electroporation. *PLoS One* 2008; **3**: e2059.
- Adjali O, Vicente RR, Ferrand C *et al.* Intrathymic administration of hematopoietic progenitor cells enhances T cell reconstitution in ZAP-70 severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:13586–91.
- Vicente R, Adjali O, Jacquet C, Zimmermann VS, Taylor N. Intrathymic transplantation of bone marrow-derived progenitors provides long-term thymopoiesis. *Blood* 2010; **115**:1913–20.
- Tamauchi H, Tamaoki N, Habu S. CD4+CD8+ thymocytes develop into CD4 or CD8 single-positive cells in athymic nude mice. *Eur J Immunol* 1988; **18**:1859–62.
- Lair SV, Lozzio BB. Thymocyte reconstitution of athymic and athymic-splenic mice: graft rejection and antibody synthesis. *Exp Cell Biol* 1980; **48**:439–44.
- Goldschneider I, Komschlies KL, Greiner DL. Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med* 1986; **163**:1–17.
- Kvell K, Czömpöly T, Hiripi L *et al.* Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 2010; **19**:105–12.
- Boldizsar F, Tarjanyi O, Nemeth P, Mikecz K, Glant TT. Th1/Th17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice. *Int Immunol* 2009; **21**:511–22.
- Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem* 2004; **52**:1287–98.
- Martinez-Santibañez G, Cho KW, Lumeng CN. Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. *Methods Enzymol* 2014; **537**:17–30.
- Attaf M, Legut M, Cole DK, Sewell AK. The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system. *Clin Exp Immunol* 2015; **181**:1–18.
- Cuddihy AR, Suterwala BT, Ge S *et al.* Rapid thymic reconstitution following bone marrow transplantation in neonatal mice is VEGF-dependent. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; **18**: 683–9.
- Holland AM, Zakrzewski JL, Goldberg GL, Ghosh A, van den Brink MRM. Adoptive precursor cell therapy to enhance immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation in mouse and man. *Semin Immunopathol* 2008; **30**: 479–87.
- Alpdogan O, Muriglan SJ, Eng JM *et al.* IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2003; **112**:1095–107.
- Wils E-J, Braakman E, Verjans GMGM *et al.* Flt3 ligand expands lymphoid progenitors prior to recovery of thymopoiesis and accelerates T cell reconstitution after bone marrow transplantation. *J Immunol* 2007; **178**:3551–7.
- Kelly KA, O'Brien R, Born W. Reconstitution of SCID mice with haemopoietic precursors: a detailed analysis of gamma delta T-cell reconstitution. *Immunology* 1997; **91**:65–72.
- Dejbakhsh-Jones S, Garcia-Ojeda ME, Chatterjea-Matthes D, Zeng D, Strober S. Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:7455–60.

- 25 Lucas B, McCarthy NI, Baik S *et al.* Control of the thymic medulla and its influence on $\alpha\beta$ T-cell development. *Immunol Rev* 2016; **271**:23–37.
- 26 Kool M, Soullié T, van Nimwegen M *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008; **205**:869–82.
- 27 Berberich S, Dähne S, Schippers A *et al.* Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. *J Immunol* 2008; **180**:2196–203.
- 28 Creusot RJ, Yaghoubi SS, Chang P *et al.* Lymphoid-tissue-specific homing of bone-marrow-derived dendritic cells. *Blood* 2009; **113**:6638–47.
- 29 Chkourko Gusky H, Diedrich J, MacDougald OA, Podgorski I. Omentum and bone marrow: how adipocyte-rich organs create tumour microenvironments conducive for metastatic progression. *Obes Rev* 2016; **17**:1015–29.
- 30 Cao L, Hu X, Zhang J, Huang G, Zhang Y. The role of the CCL22-CCR4 axis in the metastasis of gastric cancer cells into omental milky spots. *J Transl Med* 2014; **12**:267.
- 31 Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Carragher DM *et al.* Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 2009; **30**:731–43.
- 32 Ceredig R, Rolink T. Opinion: a positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**:888–97.
- 33 Pozzesi N, Fierabracci A, Liberati AM *et al.* Role of caspase-8 in thymus function. *Cell Death Differ* 2014; **21**:226–33.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Fig. S1. Comparative immunohistochemistry analysis from the lymphatic organs of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{+/+} and ZAP-70^{-/-} mice. ZAP-70^{+/+} (a) and ZAP-70^{-/-} (e) thymi were stained with anti-CD4-phycoerythrin (PE) (red) and anti-CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC) (green) or anti-epithelial cell adhesion molecule 1 (EpCAM1)-FITC (green) and anti-Ly51-PE (red) (b,f). Note that on panels (a) and (e), yellow areas show the CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocyte-rich cortical areas of the thymi. ZAP-70^{+/+} and ZAP-70^{-/-} lymph nodes (c,g) and spleen (d,h) were stained to distinguish T and B cells with anti-CD3-FITC (green) and anti-B220-AlexaFluor647 (red), respectively.

Fig. S2. Comparative flow cytometric analysis from the lymphatic organs of zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{+/+} and ZAP-70^{-/-} mice. ZAP-70^{+/+} and

ZAP-70^{-/-} blood, lymph nodes and spleen were stained with anti-CD3 and anti-B220 antibodies to distinguish T and B cells. Thymi were stained with anti-CD4 and anti-CD8 to distinguish the four major thymocyte subpopulations. (a) Bars show the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values of the T and B cell percentage in the different peripheral lymphatic organs and the thymocyte subpopulations calculated from the data of four mice. (b) Representative flow cytometric contour plots show the typical T and B cell distribution in the blood, spleen, lymph nodes and thymus of ZAP-70^{+/+} and ZAP-70^{-/-} mice.

Fig. S3. Long-term effect of the intraperitoneal (i.p.) thymocyte transfer. Zeta chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70)^{-/-} mice was evaluated 12 months after a single i.p. transfer with 10⁷ thymocytes isolated from ZAP-70^{+/+} mice. (a) Bars show the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) values of the T (black bars) and B cell (open bars) percentage in the peripheral lymphatic organs calculated from the data of four transferred mice. (b) Representative flow cytometric density plots show the typical T and B cell distribution in the lymph nodes and spleen of transferred ZAP-70^{-/-} mice. (c) T cell receptor (TCR) type was determined using antibodies against the $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ forms of the TCR by flow cytometric analysis. Bar diagram shows the percentages of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the lymph nodes and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer. Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four mice. (d) Representative flow cytometric dot plots show the typical distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the lymph nodes and spleen of ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer 12 months before killing. (e) Composition of thymocytes was determined using anti-CD4/CD8 staining by flow cytometry [also see (f)]. Bar diagram shows the percentages of the four major thymocyte subpopulations (DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4 SP = CD4⁺ single-positive; CD8 SP = CD8⁺ single-positive) in those ZAP-70^{-/-} mice, which received i.p. thymocyte transfer 12 months before killing. Mean \pm s.e.m. values were calculated from the results of four mice. (f) Representative flow cytometric density plot shows the distribution of thymocytes isolated from ZAP-70^{-/-} mouse, which received i.p. thymocyte transfer 12 months before killing based on their CD4 and CD8 staining.

A glukokortikoid hormon nem genomikus hatásai a T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára

PRENEK LILLA, UGOR EMESE, PAPP RAMÓNA, BOLDIZSÁR FERENC, BERKI TÍMEA

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

A klinikai gyakorlatban a glukokortikoid hormon analógok (GC) autoimmun betegségek, malignus hematológiai kórképek, allergiás folyamatok kezelésében széles körben alkalmazott szerek. Klasszikus, genomikus hatásai mellett, melyek a ligandkötött glukokortikoid-receptor (GR), mint transzkripció faktor által elindított génaktiváció és -gátlás következtében kialakuló folyamatok, az utóbbi évtizedben felismerésre kerültek a gyors GC-hatásokat eredményező ún. nem genomikus jelátviteli útvonalak. Ezek egyrészt direkt membránhatások, másrészt bizonyos sejteken membrán-GR jelenlétével, vagy más receptorok jelátviteli útvonalával történő interakciókkal, ill. a GR mitokondriális transzlokációjával magyarázhatók. Jelen közleményben intézetünkben az elmúlt években a nem genomikus GC jelátviteli folyamatok területén végzett kísérleteink eredményeit foglaljuk össze, különös tekintettel a T-sejt receptor (TcR) és glukokortikoid-receptor (GR) jelátvitel közötti kapcsolatra, illetve a GC-nek a thymocyták apoptózisában betöltött szerepére, a mitokondriális GR transzlokáció jelentőségét kiemelve.

Kulcsszavak: glukokortikoid-receptor, glukokortikoid hormon, T lymphocytá, thymus, nem genomikus GC-hatások, mitokondrium, apoptózis

NON-GENOMIC EFFECTS OF GLUCOCORTICOID HORMONES ON SIGNAL TRANSDUCTION AND APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES

Glucocorticoids (GC) are widely used drugs in the treatment of autoimmune diseases, haematological malignancies and allergic reactions. Besides their classic genomic effects new GC signalling pathways were also observed in the last decade, referred to as non-genomic signalling pathways, which, importantly, appear more rapidly than the genomic effects. In our present work we summarise our results in the field of non-genomic GC signalling mechanisms. We discuss the interplay between T cell receptor (TcR) and glucocorticoid receptor (GR) signalling pathways, and the role of GC in the apoptosis of thymocytes, paying special attention to the importance of mitochondrial translocation of the GR.

Keywords: glucocorticoid receptor, glucocorticoid hormone, T lymphocyte, thymus, non-genomic mechanism, mitochondria, apoptosis

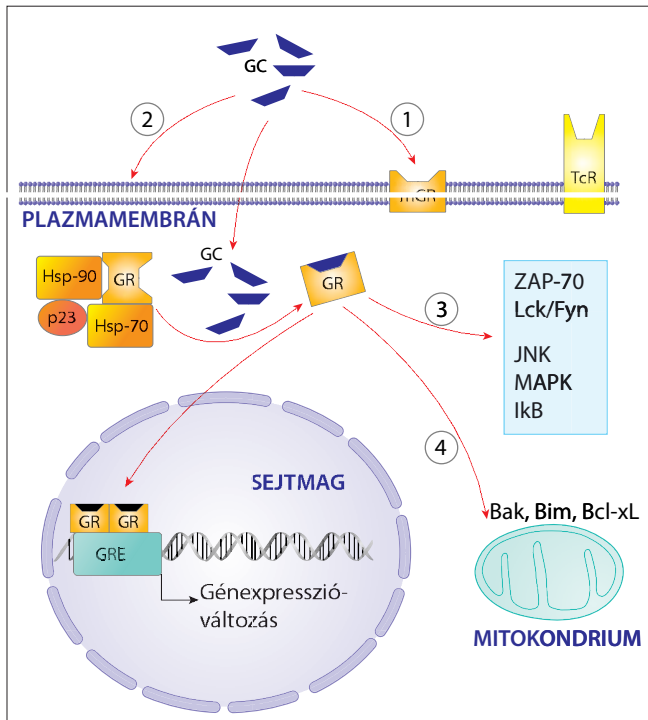
Bevezetés

A glukokortikoid hormon (GC) hatására elinduló jelátviteli útvonalak legrégebb óta ismert formája a ligandkötött glukokortikoid-receptor (GR) sejtmagba való transzlokációja, ahol a DNS glukokortikoid válaszlemeihez (GRE) kötődve transzkripció faktoroként génexpressziós változásokat eredményez [1, 2]. A GR a szteroidreceptor szupercsalád tagja. Három fő doménja van: (1) a hormonkötő, (2) a DNS-kötő és (3) az N-terminális domén [3]. Nyugalmi állapotban a GR a citoplazmában hőszokkfehérjékhez kötődve található [4]. A ligandkötődést követően a GR felveszi aktív konformációját, és dimerizálódik. Ez a homodimer transzlokálódik a sejtmagba [1], ahol sejtípustól függően 10–100 gén működését sza-

bályozza [5]. Genomikus hatásaiból következik a glukokortikoid-analógok széles körű alkalmazása a mindennapi orvosi gyakorlatban, amely főleg gyulladáscsökkentő és immun-suppresszív folyamatokban nyilvánul meg [6].

A nem genomikus hatások (1. ábra) főleg nagy dózisú GC-kezelés során létrejövő gyors, génexpressziótól független mechanizmusok [7]. Négy ilyen, alternatív GC jelátviteli útvonalat írtak le eddig: (1) membránhoz kapcsolt GR által közvetített útvonal, (2) GC direkt membránra kifejtett hatása, (3) interakció más citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel [8] és (4) a GR mitokondriumba való transzlokációja [9–13].

A membránkötött GR-t többek között humán lymphoid sejtvonalakban figyelték meg [14–16], melynek fokozott expresszióját rheumatoid arthritisben, SLE-ben és spondylitis



1. ábra

A glukokortikoid hormon (GC) lehetséges hatásmechanizmusai T-lymphocytákon [7]. A lipofil GC bejut a citoplazmába, és kapcsolódik a glukokortikoid-receptorhoz (GR), amely konformációváltozást követően leválik a citoplazmatikus Hsp komplexről, dimerizálódik, és bevándorol a sejtmagba, ahol az ún. genomikus hatásmechanizmus révén génexpresszió-változásokat okoz. Nagy dózisu GC-kezelés hatására létrejövő gyors, nem genomikus hatások: a membránhoz kapcsolt GR (mGR) által közvetített útvonala (1), a GC direkt membránstabilizáló hatása (2), a GR kapcsolódásamás citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel (3) és a GRmitokondriumba való transzlokációja, amely az intrinszik apoptotikus út vonal aktivációját váltja ki (4)

ankylopoeticában is megtalálták, ami felveti szerepét a betegségek kialakulásában [17–19]. Másrészt, a GC direkt (nem receptorfüggő) membránhatását mutatja, hogy nagy dózisu GC-kezelést követően emlős tumorsejtekben megváltozik a membránlipid-mobilitás [20].

A harmadik nem genomikus hatás a ligandkötött GR-nek más jelátviteli molekulákkal való kapcsolódása, melyet például a GR és T-sejt receptor (TcR) jelátviteli fehérjéi között figyeltek meg [21]. Az eddigi kutatási eredmények szerint a ligandkötött GR asszociálódik az Lck-, Fyn-molekulákkal a TcR-aktivációt követően, és gátolja a TcR-aktiváció által indukált Lck/Fyn foszforilációt [22, 23]. Végül, Sionov és munkatársai in vitro tenyésztett folyamatos sejtvonalakon és thymocytákban írták le a GC-GR komplex mitokondriumba való transzlokációját, ami összefüggésbe hozható az adott sejttípus GC-indukált apoptóziskészségével [9–13].

A GC-k nem genomikus hatásainak támadáspontjai

A T-lymphocyt-aktiváció gátlása

A GC-k T-sejt jelátvitelre gyakorolt hatását humán T-sejt-leukémia sejtvonalon (Jurkat) vizsgáltuk 2-5 perces, nagy dózisu dexamethason- (DX-) kezelést követően. Megfigyeltük, hogy a GC-kezelés önmagában is, a TcR jelátviteli út egyik kulcsmolekuláján, a ZAP-70-en tirozinfoszforilációt okoz (1. táblázat) [24]. Ez a változás a GR-antagonista RU486-tal gátolható volt [24]. Ezt követően megvizsgáltuk a kapcsolatot a ZAP-70, GR és Hsp-90 között DX-kezelt Jurkat-sejtek citoplazmájában. A nagy dózisu DX-kezelés hatására a GR koprecipitálódott, ill. kolokalizálódott a ZAP-70-molekulával [25], mely magyarázhatja a korábban tapasztalt gyors GC-indukált ZAP-70-foszforilációt (1. táblázat). Ugyanakkor a ZAP-70 Hsp-90-nel való kapcsolódása is megfigyelhető volt, függetlenül a GR-agonista jelenlététől, de a kapcsolódást meg lehetett gátolni Hsp-antagonista geldanamycinnel (GA) (1. táblázat) [25]. Eredményeinkkel az elsők között világítottunk rá a DX-nek a ZAP-70-molekulára kifejtett direkt hatására az aktivált GR-en keresztül [25]. A GC-indukált ZAP-70 tirozinfoszforiláció alapján feltételezhető, hogy a GC-k ezen a ponton lehetséges gátlói a T-sejt-funkcióknak. A ZAP-70-nek négy aktiváló (Y315, Y319, Y474, Y493) és négy gátló (Y292, 492, 597, 598) foszforilációs helyét írták le korábban [26]. Intézetünkben ZAP-70 pontmutáns Jurkat-sejtvonalakkal végzett kísérleteink során azt találtuk, hogy rövid idejű DX-kezelés hatására csökkent a ZAP-70 foszforilációja az F315- és F492-ZAP-70-molekulát expresszáló sejtekben [27]. Ezt követően ugyanezen mutáns ZAP-70-molekulák szubsztrátjait vizsgáltuk, és megfigyeltük, hogy DX hatására a mutáns sejtekben nem foszforilálódott az SLP-76 és a Cbl, de egyik mutáció

1. táblázat. Rövid idejű, nagy dózisu glukokortikoid hormon hatására létrejövő változások a T-sejt jelátviteli út vonal fehérjéiben ([23] és [26] alapján)

Célmolekula:	GC hatás
ZAP-70	Y-foszforiláció ↑, GR- és Hsp-90-asszociáció
LAT	Y-foszforiláció ↑
Cbl	Y-foszforiláció ↑*
SLP-76	Y-foszforiláció ↑*
	TcR-aktiváció + GC hatás
LAT	Y-foszforiláció ↑
Cbl	Y-foszforiláció –
SLP-76	Y-foszforiláció ↑
Ca ²⁺ -jel	↓

* ZAP-70 Y315- és Y492-függő változás

sem befolyásolta a LAT foszforilációját (1. táblázat) [27]. Ez arra enged következtetni, hogy a ZAP-70-kinázon keresztül végbemenő nem genomiális GC-hatást inkább az SLP-76 és a Cbl közvetíti, és nem a LAT (1. táblázat) [26]. Megvizsgáltuk azt is, hogyan befolyásolja a DX a T-sejt-aktivációt, és fejt ki immunosuppresszív hatását. A LAT és SLP-76 megnövekedett, míg a Cbl csökkent foszforilációját sikerült detektálnunk, továbbá a DX csökkentette az anti-CD3 által indukált Ca^{2+} -jelet is (1. táblázat) [27]. Ez az eredmény korrelál azzal a korábbi megfigyelésünkkel, mely szerint a Jurkat-sejtekben a Ca^{2+} -jelet az SLP-76 szabályozza [28].

Kettős pozitív thymocyták GC-indukált mitokondriális apoptózis útvonala

A GC-k nemcsak az érett, de a differenciálódó, éretlen T-sejtekre is hatnak. Régóta ismert, hogy a thymus elsovad magas GC hormon szintek esetén, míg ezen hormonok hiánya a thymus megnagyobbodását okozza [29]. Intézetünkben végzett korábbi vizsgálatok szerint a kettős pozitív (DP) thymocyták a legérzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra [30–32], ugyanakkor ezekben a sejtekben a legalacsonyabb a GR-expresszió mind fehérje, mind RNS szinten [30–33]. Ez a látszólagos ellentmondás felvetette a GC-k-nek a thymocyták differenciálódásában betöltött, nem hagyományos jelátviteli útvonalon keresztül megvalósuló szerepére. Ezt a feltevést erősítette, hogy *in vivo* sem a DP sejt depletáló hatását, sem pedig a nagy dózisu szteroid korai proapoptotikus hatást nem tudtuk gátolni GC-antagonista RU486-tal [31, 33]. Az RU486 hatása ugyanis abban nyilvánul meg, hogy megakadályozza a GR ligandkötődést követő transzlokációját a sejtmagba [34]. Ezek alapján a GC-k proapoptotikus hatása a DP sejtekben függetlennek tűnik az aktivált GR nukleuszba való transzlokációjától, amely felveti a lehetőségét a nem genomikus jelátviteli folyamatoknak ezekben a sejtekben.

Ebből kiindulva sikerült igazolnunk, hogy a DP thymocy-

tákban rövid idejű GC-kezelést követően a GR inkább a mitokondriumba vándorol, mint a sejtmagba [13]. A mitokondriális transzlokáció ezen sejtekben arányban volt a sejtek GC által indukált apoptózisérzékenységgel [13]. A pontos folyamat, amely révén a transzlokálódott, aktivált GR apoptotikus kaszkádot indít el, még nem teljesen ismert. Ezért vizsgáltuk a GC-k hatását egér thymocytá apoptózis útvonalainak aktiválódására és a GR Bcl-2 fehérjecsald tagjaival való interakcióját (2. táblázat; eddig nem publikált eredmény). Azt találtuk, hogy rövid idejű DX-kezelés hatására a thymocytákban aktiválódott az intrinszik apoptotikus útvonal, amit a citokróm C, az aktivált kaszpáz-3, -9 koncentrációjának emelkedése jelzett (2. táblázat). Megfigyeltük továbbá, hogy a GR asszociálódott a Bim- és a Bcl-xL-fehérjékkel, valamint ezen fehérjék mennyisége megnövekedett a mitokondriumban a DX-kezelést követően. A GR Bax-fehérjével nem kapcsolódott, azonban ez a fehérje is felhalmozódott a mitokondriumban DX hatására (2. táblázat). Így valószínűleg az aktivált GR a Bcl-2-fehérjékkel való asszociációja révén befolyásolhatja a thymocyták apoptózisát oly módon, hogy úgy változtatja meg ezen fehérjék között az egyensúlyt, hogy az proapoptotikus irányába tolódjon el.

Megbeszélés

A nem genomiális GC jelátviteli útvonalak felismerése új, érdekes és izgalmas irányt nyitott a kutatásban. A lymphoid sejtek nagy dózisu GC hormon kezelésre adott gyors válaszreakciói nem magyarázhatók a viszonylag lassan bekövetkező géntranszkripció mechanizmusokkal. A T-lymphocytá-aktiváció gátlása a TcR jelátviteli útvonal fehérjéivel való közvetlen GR asszociáció útján, míg a DP thymocyták GC-indukált gyors apoptózisa a GR mitokondriális pro- és antiapoptotikus fehérjékkel való kapcsolódással, azok egyensúlyának módosítása révén zajlik. A thymusban található sejtek közel 80%-a DP thymocytá, melyek lokális GC-termelő sejtek környe-

2. táblázat. Rövid idejű glukokortikoid-kezelés hatására bekövetkező thymocytáapoptózis útvonal fehérjéinek aktivációja és lokalizációjának változása

Célmolekula	Citoplazma	Mitokondrium	GR-rel való asszociáció
Citokróm C	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-3	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-8	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-9	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-12	nem változott	nincs adat	nincs adat
Bak	nincs adat	nincs adat	+
Bax	↓	↑	-
Bim	↓	↑	+
Bcl-xL	↓	↑	+



zetében differenciálódnak. Feltételezhető, hogy ez az oka, hogy a többi thymocytá sejtcsoporthoz képest bennük a legalacsonyabb a GR-expresszió, mégis ebben a differenciálódási stádiumban érzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra [31]. Ezt erősíti azon megfigyelésünk is, hogy ebben a sejtcsoportban magas a Dig2 (DX-indukált gén) és alacsony a Bcl-2 expressziója [33], valamint *in vivo* alkalmazott szintetikus GC hatására is a DP sejtek számának jelentős csökkenését és a mitokondriális membránpotenciál redukálódását figyeltük meg, a Bcl-2-expresszió párhuzamos mérséklődésével [32]. Irodalmi adatokkal összhangban, a GC-k fokozni tudták a thymocyták pozitív szelekcióját, amikor egyidejűleg TcR-aktiváció is történt [31, 35], amit a CD69-expresszió megnövekedése jelez a DP és CD4⁺ egyszeresen pozitív sejteken (SP), amit nagyobb mértékű érett CD4⁺ sejt kibocsátás kísért [31, 35].

Az ezen a területen végzett vizsgálatok eredményei tovább bővítik ismereteinket a GC-k hatásairól, hozzájárulnak új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.

IRODALOM

- [1] Drouin J, Sun YL, Tremblay S, et al: Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1299-1309.
- [2] Berg JM: DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; 57: 1065-1068.
- [3] Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
- [4] Smith DF, Toft DO: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 4-11.
- [5] Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM: Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* 2004; 500: 51-62.
- [6] Buttgereit F, Burmester GR, Lipworth BJ: Optimised glucocorticoid therapy: The sharpening of an old spear. *Lancet* 2005; 365: 801-803.
- [7] Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, et al.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (gc) signalling in t cells. *Immunobiology* 2010; 215: 521-526.
- [8] Buttgereit F, Scheffold A: Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002; 67: 529-534.
- [9] Sionov RV, Cohen O, Kfir S, et al.: Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 2006; 203: 189-201.
- [10] Sionov RV, Kfir S, Zafir E, et al.: Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: A novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 2006; 5: 1017-1026.
- [11] Du J, Wang Y, Hunter R, et al.: Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3543-3548.
- [12] Psarra AM, Solakidi S, Trougakos IP, et al.: Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma hepg2 and saos-2 osteosarcoma cells: Presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2544-2558.
- [13] Talaber G, Boldizsar 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: 1269-1276.
- [14] Gametchu B: Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: Correlation to cell lysis. *Science* 1987; 236: 456-461.
- [15] Gametchu B, Chen F, Sackey F, et al.: Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 1999; 64: 107-119.
- [16] Evans SJ, Murray TF, Moore FL: Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2000; 72: 209-221.
- [17] Bartholome B, Spies CM, Gaber T, et al.: Membrane glucocorticoid receptors (mgcr) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18: 70-80.
- [18] Spies CM, Schaumann DH, Berki T, et al.: Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65: 1139-1146.
- [19] Tryc AB, Spies CM, Schneider U, et al.: Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33: 2249-2253.
- [20] Van Bommel T, Marsen T, Bojar H: Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in cama-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res* 1987; 7: 1217-1223.
- [21] Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW: Glucocorticoid signaling: A nongenomic mechanism for t-cell immunosuppression. *Trends in Molecular Medicine* 2007; 13: 158-163.
- [22] Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, et al.: Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through lck and fyn. *Blood* 2005; 106: 1703-1710.
- [23] Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, et al.: Glucocorticoids cause rapid dissociation of a t-cell-receptor-associated protein complex containing lck and fyn. *EMBO Rep* 2006; 7: 1023-1029.
- [24] Bartis D, Boldizsar F, Szabo M, et al.: Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of zap-70 in jurkat cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 98: 147-154.
- [25] Bartis D, Boldizsar F, Kvell K, et al.: Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, zap-70 kinase, and hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 253-258.
- [26] Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A: The structure, regulation, and function of zap-70. *Immunol Rev*, 2009 vol. 228, no. 1, pp. 41-57.
- [27] Boldizsar F, Szabo M, Kvell K, et al.: Zap-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (gc) effects in t cells. *Molecular Immunology* 2013; 53: 111-117.
- [28] Szabo M, Czompoly T, Kvell K, et al.: Fine-tuning of proximal tcr signaling by zap-70 tyrosine residues in jurkat cells. *Int Immunol* 2012; 24: 79-87.
- [29] Selye H: Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 234-248.
- [30] Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, et al.: Cd4(+)cd8(+)tcr(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors



while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 2001; 31: 2293-2301.

- [31] Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P: Glucocorticoid (gc) sensitivity and gc receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 2002; 14: 463-469.
- [32] Palinkas L, Talaber G, Boldizsar F, et al.: Developmental shift in tcr-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*, 2008; 213: 39-50.
- [33] Boldizsar F, Palinkas L, Czompoly T, et al.: 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: 785-796.

- [34] Distelhorst CW, Howard KJ: Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone ru486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry* 1990; 36: 25-31.

- [35] Boldizsar F, Palinkas L, Bartis D, et al.: Antigen and glucocorticoid hormone (gc) induce positive selection of dp thymocytes in a tcr transgenic mouse model. *Immunology Letters* 2003; 90: 97-102.

(Dr. Berki Tímea, PTE, KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12. Tel: 72-536-291, fax:72-536-289, e-mail: berki.timea@pte.hu)