

# **PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A glukokortikoid hormon szerepe a regulatórikus T-sejtek  
differentiálódásában

**PhD értekezés**

Pap Ramóna

**PÉCS, 2022**

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

## A glukokortikoid hormon szerepe a regulatórikus T-sejtek differentiálódásában

*Doktori (PhD) értekezés*

Pap Ramóna



Témavezető:

Prof. Dr. Berki Tímea

**Egyetemi tanár**

Témavezető aláírása

Prof. Dr. Gábrriel Róbert

**Iskolavezető**

Iskolavezető aláírása

**PÉCS, 2022**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK</b>	<b>5</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>8</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>10</b>
2.1. Immunrendszer	10
2.2. Veleszületett immunrendszer	11
2.3. Adaptív immunrendszer	12
2.4. T-sejt fejlődés és differenciálódás	14
2.5. Regulatórikus T-sejtek	19
2.6. Foxp3 transzkripciós faktor	22
2.7. A természetes szabályozó T-limfociták (nTreg sejtek)	23
2.8. A perifériás szabályozó T-limfociták (iTreg sejtek)	23
2.9. Glukokortikoidok	25
2.9.1. Genomikus hatások	26
2.9.2. Nem genomikus hatások	27
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>28</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>29</b>
4.1. Kísérleti állatok	29
4.2. <i>In vivo</i> DX kezelés	29
4.3. Timociták és lépsejtek izolálása	29
4.4. CD4 <sup>+</sup> sejtek izolálása és tisztítása	30
4.5. <i>In vitro</i> Treg sejt expanszió	30
4.6. Antitestek és fluorokrómok	31
4.7. Antitest jelölés és áramlási citometriás mérés	31
4.8. Fluoreszcens jelölt minták vizsgálata konfokális mikroszkóppal	32
4.9. RNS készítés és Real-time PCR	33
4.10. PMA/ionomycin stimuláció	34
4.11. Statisztikai analízis	34
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK</b>	<b>35</b>
5.1. <i>In vivo</i> DX kezelés hatása a tímusz és a lép összetételére	35
5.2. TGFβ és DX hatása a Treg sejtek <i>in vitro</i> expansziójára	40

5.3. A rekombináns TGF $\beta$ és DX upregulálja a Foxp3 expressziót a Treg sejtekben <i>in vitro</i>	44
5.4. <i>In vitro</i> differenciált Treg sejtek immunszuppresszív citokin termelése	44
5.5. Az <i>in vitro</i> Treg sejt expansziója nem okoz Th1, Th2, Th17 irányú citokin termelést	51
5.6. Az <i>in vivo</i> DX előkezelés hatása a Treg sejtek <i>in vitro</i> differenciációjára	52
5.7. DX hatása a GR és Foxp3 expresszióra	58
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>62</b>
<b>7. SUMMARY</b>	<b>66</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>70</b>
<b>PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK</b>	<b>90</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>95</b>

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACTH	Adrenokortikotróp hormon
APC	<i>Allofikocianin</i> , konjugátum
APC	Antigén prezentáló sejt
BCR	B-sejt receptorkomplex
BSA	Borjú szérum albumin
CD	Differenciációs klaszter (cluster of differentiation)
CRF	Kortikotróp releasing faktor hormon
cTEC	Kortikális tímusz epitélsejt
DC	Dendritikus-sejt
DN	Kettős negatív
DP	Kettős pozitív
DX	Dexametazon
FACS	Fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FoxP3	Forkheadbox protein 3
GC	Glukokortikoid hormon
G-CSF	Granulocita kolónia stimuláló faktor
GM-CSF	Granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor
GR	Glukokortikoid receptor
GRE	Glukokortikoid válaszelem
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon gamma

iNKT	Invariáns természetes ölő T-sejt
iTreg	Indukált regulatórikus T-sejtek
LPS	Lipopoliszacharid
MAIT	Mukóza asszociált invariáns T-sejt
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex
mIg	Membrán-kötött immunoglobulin
mRNS	Hírvivő Ribonukleinsav
mTEC	medulláris tímusz epitélsejt
NK-sejt	Természetes-ölősejt
nTreg	Természetesen regulatórikus T-sejtek
PAMP	Kórokozó-asszociált molekuláris mintázatok
PBS	Foszfát-puffer fiziológias sóoldat
PE	Fikoeritrin
PE-Cy5	Fikoeritrin-cianin 5
PE-Cy7	Fikoeritrin-cianin 7
PerCP	Peridinin Klorofill Protein
PMA	Forbol 12-mirisztát 13-acetát
PRR	Mintázatfelismerő receptorok
RPM	Percenkénti fordulatszám
SP	Egyszeresen pozitív
Tc	Citotoxikus T-sejt
TCR	T-sejt receptor
TGFβ	Transzformáló növekedési faktor béta

Th	Helper T-sejt
Treg	Regulatórikus T-sejt

# 1. BEVEZETÉS

Több mint 20 évvel ezelőtti felfedezésük óta a regulatórikus T-sejtek (Treg) nagy érdeklődést váltottak ki mind az alap, mind a klinikai immunológia területén (Shevach, 2018). A Treg sejtek a T-sejtek egy olyan alpopulációját jelentik, amelyek kulcsszerepet játszanak a saját antigénnel szembeni tolerancia fenntartásában és a sejtek szuppressziójában a túlzott immunválaszt kiváltó antigénstimuláció esetén (Sakaguchi és mtsai, 2010; Sharma és Rudra, 2018; Shevach és Thornton, 2014). A Treg sejtek segítenek fenntartani az immunológiai homeosztázist és csökkentik az autoimmun betegségek és allergiák kialakulásának kockázatát (Calzada és mtsai., 2018; Lu és mtsai., 2017; Vila és mtsai., 2009). Klinikailag fontos kérdés a Treg sejtek részvétele a szervkilökődés megelőzésében transzplantáció utáni betegeknél, az anyai-magzati toleranciában, valamint az autoimmun betegségek terápiás alkalmazásában is (Kisielewicz és mtsai., 2010; Spence és mtsai., 2015; Chandran és mtsai., 2017; Sharabi és mtsai., 2018). A Treg sejtek immunszuppresszív és szabályozó funkcióját közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás vagy immunszuppresszív citokinek, pl. Transzformáló növekedési faktor béta (TGF $\beta$ ) (Kretschmer és mtsai., 2005), Interleukin (IL-) 10 vagy IL-35 termelés révén érvényesítik. Számos sejttípus célpontja a Treg sejteknek, beleértve a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejteket, dendritikus sejteket (DC), B-sejteket, makrofágokat, természetes ölősejteket (NK-sejtek) (Saraiva és O'Garra, 2010; Shevach, 2018). A Treg sejtek legjobban jellemzett alcsoportjai a tímusból származó természetes Treg sejtek, valamint a perifériás Treg sejtek, amelyek a periférián lévő CD4<sup>+</sup> T-sejtekből származnak (Kretschmer és mtsai., 2005; Shevach és Thornton, 2014). A Treg-ek expresszálnak CD4 és CD25 sejtfelszíni markereket, és pozitívak a Foxp3 transzkripció faktorra. A Foxp3 a Treg sejtek vonalspecifikus transzkripció faktora, és kulcsszerepet játszik az immunszuppresszív fenotípus és funkció szabályozásában (Kim, 2009; Lu és mtsai., 2017; Schmetterer és mtsai., 2012).

A Treg sejtek *in vitro* indukálhatók naiv T-sejtekből TGF $\beta$  és IL-2 jelenlétében, az ilyen sejteket indukált Treg (iTreg) sejtnak nevezik. Folyamatban vannak a kutatások egy stabil indukált Treg populáció létrehozására klinikai alkalmazásokhoz. Számos csoport elemezte a Foxp3<sup>+</sup> T-sejtek *in vitro* indukálásának optimális körülményeit, mivel ez fontos a jövőbeli Treg terápia szempontjából (Davidson és mtsai., 2007; Hadaschik és Enk, 2015; Kanamori és mtsai., 2016). A magas hozam és az *in vitro* előállított iTreg tisztasága fontos, mivel a szennyezett hagyományos T-sejtek átvitele növelheti a nem kívánt autoimmunitás és gyulladás kockázatát. Egy T-sejt differenciálódási iránya a T-sejt receptorkomplex (TCR) stimuláció során a komplex mikrokörnyezettől függ, beleértve a citokin környezetet, a metabolitokat és a hormonokat,



amelyek meghatározhatják a toleranciát közvetítő iTreg sejtek sorsát. Különböző módszerek javasoltak a Foxp3 expressziójának fokozására és stabilizálására, mint például a progeszteron, a retinsav, a D3-vitamin és a rapamicin (Hoeppli és mtsai., 2015; Lavi Arab és mtsai., 2015; Lee és mtsai., 2012; Schmidt és mtsai., 2016). Ezenkívül hasznosak lehetnek azok a gyógyszerek, amelyek közvetlenül elősegíthetik a naív vagy effektor T-sejtek iTreg sejtekké történő átalakulását *in vivo*. Korábbi vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a tímusz Treg sejtek ellenállnak az ismételt nagy dózisú *in vivo* glukokortikoid (GC) hormonkezelésnek. Kimutattuk azt is, hogy mind a tímusz, mind a lép Treg sejtek fokozott szintű immunszuppresszív citokineket, IL-10-et és TGFβ-t termelnek az *in vivo* Dexametazon (DX) kezelést követően (Ugor és mtsai., 2018). Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelést, hogy a GC-k befolyásolják az immunrendszer szabályozó ágát és jelentőséggel bírhatnak olyan klinikai állapotok esetében, ahol a Treg sejt aktivitás fokozása várhatóan előnyös. Tekintettel a GC hormonok, köztük a DX széles körben elterjedt használatára, valamint az ilyen gyógyszereknek az immunrendszer szabályozására gyakorolt hatására, a DX-kezelés hatásának vizsgálatát tűztük ki célul a Treg sejtek *in vitro* expansziójára és citokinprofiljára egy jövőbeni stabil, magasabb hozamú Treg populáció indukálásához.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Immunrendszer

Életünk során folyamatosan ki vagyunk téve azoknak a mikrobáknak, amelyeket belélegezünk, lenyelünk, vagy a bőrünkön és a nyálkahártyákon élnek. Az, hogy ezek az organizmusok behatolnak-e és betegségeket okoznak-e, függ a szervezet patogenitásától, a virulencia tényezőktől, valamint a gazdaszervezet védelmi mechanizmusainak integritásától. Az immunrendszer a szervezetünk védekező rendszere, egy rendkívül összetett, komplex rendszer, amely megvédi a szervezeten belüli biológiai struktúrákat és folyamatokat egy adott antigén vagy fertőzés hatására kialakuló betegségtől. Elnevezése az „immunis” latin szóból származik, jelentése mentes valamitől. Az immunrendszer alapvető szerepét, a gazda szervezet védelmét a legjobban úgy lehet szemléltetni, amikor az rosszul funkcionál; olyankor vagy alulműködik, amely immunhiány esetén súlyos fertőzéseket és daganatokat okozhat, vagy pedig túlzott aktivitással rendelkezik pl. az allergiás és autoimmun betegségek esetén (Nicholson, 2016; Parkin és Cohen, 2001).

Az immunrendszer egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy felismerő funkciója révén képes megkülönböztetni a szervezet normál, saját, illetve a nem saját, azaz idegen, valamint a módosult saját struktúráit is; felismeri az vírusokat, gombákat, baktériumokat, parazitákat, és effektor funkcióik révén eliminálja azokat. Ez mind a veleszületett, mind a szerzett immunitás alapvető jellegzetessége, amely az egyedi integritást és a szerkezeti állandóságot biztosítja. Az immunrendszer egy interaktív hálózata a limfoid szerveknek, sejteknek, humorális faktoroknak és citokineknek (Parkin és Cohen, 2001; Nicholson, 2016). Az immunrendszer kulcsfontosságú a szervezet belső homeosztázisának fenntartásában, a sérült, transzformált vagy rosszindulatúvá vált szövetek és sejtek eltávolításában. Az immunrendszer felelős az immunológiai memória létrehozásáért és szabályozásáért, emellett megakadályozza az autoimmun betegségek előfordulását az egészséges élőlényekben. E szabályozás különböző károsodásai, az idegen anyagok nem megfelelő felismerése, illetve a fel nem ismert sérülések jelenléte az egészséges rendszerben különböző betegségek kialakulásához vezethet. A gerinces élőlényeknél megkülönböztethetjük a veleszületett és az adaptív immunitást (de Visser és mtsai., 2006; Nguyen és Soulika, 2019; Murphy és mtsai., 2012).

## 2.2. Veszületett immunrendszer

Az emberek naponta millió potenciális kórokozónak vannak kitéve érintkezés, táplálkozás és belégzés útján. Az új kórokozónak való kitettség első kritikus óráiban és napjaiban a veszületett immunrendszerünkre támaszkodunk, hogy az megvédjen minket a fertőzéstől. A veszületett immunitás embrionális korban alakul ki, ennek megfelelően a szervezet patogének elleni védekezésének első vonalában tölt be kulcsfontosságú szerepet. A veszületett immunválasz komponensei megtalálhatók mind a gerincesek és a gerinctelenek élőlények körében, és megőrizték az azokat szabályozó alapvető mechanizmusokat, amelyek nagyon hasonló molekuláris és celluláris funkciók formájában vannak jelen, ezek közé tartoznak egy adott kórokozóra adott nem specifikus mechanizmusok (Hoffmann és mtsai., 1999; Alberts és mtsai., 2002; Nguyen és Soulika, 2019).

A gerinces állatokon a bőr és más hámfelületek, ideértve a tüdő és a bél hámot is, fizikai akadályt képeznek a test belseje és a külvilág között. Az első védelmi vonal a behatoló patogénekkel szemben a hámsejtek felületén létrehozott fizikai barrier, amely különböző módon harcol a mikroorganizmusokkal szemben pl. mukociliáris transzport, enzimek segítségével, valamint létrehoz a szokásos mikrobiológiai flórától eltérő mikrokörnyezetet, pl. egy savas miliót, amelyben az adott kórokozó életképtelen. A szomszédos sejtek szoros kapcsolata megakadályozza a potenciális kórokozók könnyű belépését. A belső hámfelületeket szintén nyálkahártya réteg borítja, amely védi ezeket a felületeket a mikrobiális, mechanikai és kémiai behatásoktól is. A nyálkahártya bevonat elsősorban szekretált mucinból és más glikoproteinekből épül fel és fizikailag segít megelőzni a kórokozók letapadását az epitéliumba (Alberts és mtsai., 2002; Murphy és mtsai., 2012; Riera és mtsai., 2016; Nguyen és Soulika, 2019).

A veszületett immunitás evolúciós szempontból ősi receptorokat, úgynevezett mintázat felismerő receptorokat (PRR) és effektor molekulákat használ. Ezek a receptorok képesek felismerni a patogénekre jellemző molekulák sokaságát anélkül, hogy a saját struktúrákat károsítanák (Li és Wu, 2021). A makrofágoknak fontos szerepük van az immunválasz minden fázisában. A fertőzés vagy a szöveti károsodás nagyon korai szakaszában citokinek szabadulnak fel az aktivált makrofágokból. A makrofágok a veszületett immunrendszer elemeként bekebelezik a PRR-en keresztül felismert kórokozókat, ilyen felismerő receptorcsalád pl. a Toll-like receptorok családja (TLR), amely felismeri a specifikus sejtfelszíni molekulákat; vagy a kórokozó-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP), mint pl.

a lipopoliszacharid (LPS), peptidoglikán, lipoteikóinsav és a sejtfal lipoproteinek felismerése (Gershon és Kondo, 1970; Alberts és mtsai., 2002; Vallés és mtsai., 2014).

A felismerés makrofág aktivációhoz vezet, amely citokinek felszabadulását idézi elő, a citokinek pedig gyulladást okoznak a szövetekben, ez odavonzza a neutrofil granulocitákat és aktiválja a természetes ölősejteket (NK-sejtek), amelyek azonosítják a fertőzött sejteket, és beindítják a programozott T-sejt halál mechanizmusát. Az éretlen dendritikus sejtek (DC) főként a patogének felismerését és felvételét elősegítő receptorokat (FcγR, CR3, CR4, TLR, C-lektin) fejeznek ki nagy számban. A környezetből érkező, veszélyt jelentő szignálok hatására az éretlen DC gyors aktivációnak és érésnek indul, ez a folyamat többszáz gén aktiválódását jelenti, amely a sejtek fenotípusának megváltozását okozza. Az antigén felvételét követően az éretlen DC a közeli nyirokcsomóba vándorolnak, éretté válnak, fagocitózist már nem végeznek, de nagy számban fejeznek ki fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákkal asszociált peptideket és kostimulátor molekulákat. MHC II-peptid komplex és CD40 molekulák jelennek meg nagy számban az érett DC felszínén, majd antigén prezentáló sejtként (APC) bemutatják a naiv T-sejteknek az antigént, ezáltal aktiválódik a T-sejt és megindul az immunválasz. A DC sokoldalú működése révén mind a veleszületett, mind pedig az adaptív immunrendszer fontos része, kapcsolatot teremt a veleszületett és a szerzett immunitás között. A gerincesek veleszületett immunválaszaira szükség van az adaptív immunválaszok aktiválásához (Grawunder és mtsai., 1998; Ye és Graf, 2007; Rosenzweig és Holland, 2011; Pletinckx és mtsai., 2011; Hoffmann és mtsai., 1999).

### 2.3. Adaptív immunrendszer

Az adaptív immunrendszer csak később jelent meg az evolúció során, kevesebb, mint 500 millió évvel ezelőtt alakult ki, létrehozva a gerinces állatok antigén felismerő molekuláinak végtelen készletét (T- és B-sejt receptorok formájában). Ez a repertoár lehetővé teszi az egyedek alkalmazkodását a patogének általi kihívásokhoz, ugyanakkor magában hordozza a saját struktúrák felismerésével járó kockázatot és ezzel együtt az autoimmunitás kialakulásának lehetőségét is. Ennek elkerülésére különféle szelekciós mechanizmusok alakultak ki, melyek az autoreaktív klónok inaktiválásával, és a hasznos klónok kiválasztásával járulnak hozzá a megfelelő immunológiai egyensúly fenntartásához (Flajnik és Kasahara, 2010; Danilova, 2012).

Számos kísérlet bizonyította a két immunrendszer kapcsolatát, azonban a fejlődéstörténeti háttér továbbra is tisztázatlan maradt. Az immunválasz nagyfokú fajlagosságát

és az immunológiai memóriát csak a T-, és B-limfociták képesek biztosítani, mivel kizárólag ezek a sejtek rendelkeznek antigén specifikusan felismerő receptor-struktúrákkal (Mond és mtsai., 1972). A T-, B-, és NK-sejtek a csontvelői progenitor sejtől fejlődnek ki, speciális sejtfelszíni receptorokat expresszálnak, ezek a receptorok a B-sejt receptorkomplex (BCR) és a T-sejteken jelenlévő TCR. Az antigénkötő receptorok nagyfokú diverzitását biztosító genetikai mechanizmus a szomatikus átrendeződés, amely az immunglobulin (Ig), illetve a TCR antigénkötő láncait kódoló gének átrendeződését jelenti, e folyamat kizárólag a limfocitákban zajlik le (Bendelac és mtsai., 2001; Huntington és mtsai., 2007; Flajnik és Kasahara, 2010). Mivel a T-, és B-sejtek megfelelő aktivációjához nélkülözhetetlen kostimulációs molekulák, valamint az APC felszínén történő megjelenéséhez a veleszületett immunrendszer nagyban hozzájárul, ezért a két rendszer szoros együttműködése nem vonható kétségbe. Kostimuláció hiányában az aktivációs jel nem éri el az adaptív immunválasz aktiválódásához szükséges szintet. A szerzett immunválasz során MHC molekulákon keresztül valósul meg az immunológiai felismerés első fázisa és az antigén bemutatása, ami ugyanúgy megtörténik a saját antigének esetében is, mint bármely más (nem saját) antigén esetében, a különbségtétel az immunválasz későbbi végrehajtó, azaz effektor fázisában következik be. Míg a szervezetbe bejutó külső antigénekkal vagy a mutálódott saját struktúrákkal szemben általában támadó jellegű immunválasz alakul ki, addig a normál saját antigéneket az immunrendszer tolerálja. Ez az immunválasz az effektor fázisban csak speciális – általában kóros – esetekben eredményez támadó típusú immunreakciót (Mogensen, 2009; Murphy és mtsai., 2012; Wiczorek és mtsai., 2017).

A B-sejt funkció megszerzése függ a BCR sejtfelszínen történő megjelenésétől, amelyhez a fejlődés és az érés során jut a sejt. A B-sejtek jelentős része már a fejlődése kezdetén elpusztul, mert a csontvelői mikrokörnyezetben nagy affinitással reagál a szervezet saját struktúráival. A többi B-sejt a csontvelőből a másodlagos nyirokszervekbe vándorol. Az érett B-sejtek felületén MHC I és MHC II molekulák egyaránt vannak jelen, ezáltal a periférián a sejtek képesek a BCR révén kötött antigén felismerésére, feldolgozására, majd bemutatásra a T-limfocitáknak. A B-sejtek az antigénnel történő kapcsolódás és a helper T-sejtekből (Th) származó limfokinek hatására ellenanyagtermelő plazmasejttekké alakulnak. A plazmasejtek az ellenanyagtermelésre specializálódott effektor sejtek, a humorális immunválasz alapvető részei. Egy adott B-sejt klónból származó plazmasejtek a membránkötött immunglobulinnal (mIg) azonos antigén specifitású ellenanyagmolekulát termelnek nagy mennyiségben (Miller és Phillips, 1975; Adler és mtsai., 2017). Az antigénnel való találkozás után a B-sejtek kis hányada

memóriasejtté alakul, mely a felszínén az elődsejttel azonos mIg-t hordoz. Ezek a sejtek évekig jelen vannak a keringésben és emlékeznek az aktiválódásukat kiváltó antigénre, és ismételt találkozás után, gyors és hatékony immunválaszt váltanak ki, azáltal, hogy érésük effektor sejtekké rövid időn belül lezajlik, amely nagy affinitású antitestek termelődését eredményezi. Ezt nevezzük immunológiai memóriának (Miller és Phillips, 1975; Parkin és Cohen, 2001; Silver és Cornall, 2003).

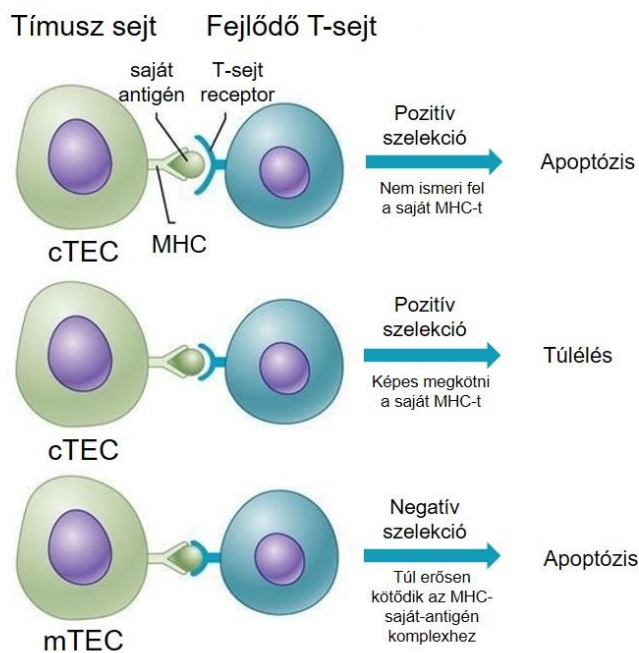
Lényeges különbség a T-sejtek és a B-sejtek antigén felismerése között, hogy a T-limfociták a fehérje természetű antigénekből származó peptidek lineáris szekvenciáit csak az APC membránján megjelenő MHC molekulákhoz kötött formában ismerik fel, míg a B-sejtek az intakt antigének konformációs determinánsaival képesek reagálni. A T-sejtek nem termelnek ellenanyagot (Parkin és Cohen, 2001; Bonilla és Oettgen, 2010, Sanchez-Trincado és mtsai., 2017).

#### 2.4. T-sejt fejlődés és differenciálódás

A fejlődő T-sejteket a timocitáknak nevezzük, amelyek a megfelelő környezeti tényezők hatására a másodlagos nyirokszervben válnak érett immunkompetens T-sejtekké. A T-sejtek érésében a tímusz kitüntetett szerepet játszik. A legéretlenebb timociták nem fejeznek ki sem TCR-t, sem pedig CD4 vagy CD8 koreceptorokat, így kettős negatív (DN) sejtek, amelyek a tímusz külső kéregállományában találhatók meg és főleg IL-7 hatására osztódnak (von Boehmer, 1992; Weinreich és Hogquist, 2008). A sejteken először a TCR  $\alpha\beta$  és  $\gamma\delta$  molekulák fejlődnek ki. A receptor átrendeződés után a sejtek kettős pozitív (DP) CD4 és CD8 koreceptorokat is expresszálnak. A receptoraik alapján két csoportba sorolhatók a T-sejtek, az első az  $\alpha$  és  $\beta$  láncból álló heterodimér, a második a  $\gamma$  és  $\delta$  láncból álló TCR. Az  $\alpha\beta$  T-sejtek CD4<sup>+</sup> MHC II korlátozott vagy CD8<sup>+</sup> MHC I korlátozott sejtekké válnak. Az érés végső fázisában a T-sejtek a medullába vándorolnak, majd onnan kerülnek a perifériába. A T-sejtek érését a tímusz epitélsejtjei, a makrofágok és a DC-k biztosítják. A tímusz kéregállományában a timociták nagymértékben pusztulnak, akár a sejtek 95%-a is elpusztulhat apoptózissal. Ennek egyik oka a rekombináció során kialakuló hibás TCR  $\beta$  lánc, amely következtében a T-sejt nem tud kapcsolódni az MHC molekulához és kiszelektálódik a pozitív szelekció során. A kéregállományba érkező timociták rendkívül érzékenyek a besugárzásra, valamint a glukokortikoid kezelésre, amely hatások szintén sejthalált okozhatnak. Az  $\alpha$  és  $\beta$  TCR-t hordozó sejtek az emberi vér T-sejtjeinek 90-95%-át alkotják, és a sejtfelszíni markereik, valamint működésbeli szempontok szerint alcsoportra bonthatók (Mond és mtsai., 1972;

Sakaguchi és mtsai., 1995; Vacchio és Ashwell, 1997; Bendelac és mtsai., 2001; Talaber és mtsai., 2015).

A T-sejtek előalakjai a magzati májból, később pedig a csontvelői multipotens hematopoetikus őssejtekből származnak. Az előalakok elhagyva a csontvelőt onnan a tímuszba vándorolnak, ezek a fejlődő sejtek a timociták. A tímusz kitüntetett szereppel bír a T-sejtek érésében, mert biztosítja az éréshez elengedhetetlen mikrokörnyezetet. Kísérleti állatokban tímusz hiányában immunhiányos állapotok alakulnak ki. A timociták érése során a sejtek nagyfokú osztódáson esnek át, ezt a proliferációt a csontvelői és később a tímusz által termelt IL-7 citokin magas szintje tartja fenn és indukálja. A timociták az érésük során a tímusz mélyebb kortikális régióiban a dajkasejtekhez kapcsolódnak, amely kortikális epitélsejtekkel történő kötődés hatására az  $\alpha\beta$  TCR-t kifejező  $CD4^+CD8^+$  DP timociták felismerik a saját MHC-peptid komplexet és kis affinitással kötik azokat. Ez a gyenge kötődés a túlélést biztosítja a sejteknek. Azok a timociták, amelyek nem ismerik fel a saját MHC-peptid komplexet és nem képesek kapcsolódni hozzá apoptózissal elpusztulnak, ezáltal biztosítva a későbbiekben az érett T-sejtek korlátozott saját MHC-re történő aktivitását. Ezt a folyamatot pozitív szelekciónak nevezzük, amely következményeként a túlélő sejtek már az egyszerűen pozitív (SP) MHC I-antigén-komplexet kötő CD8 koreceptort expresszáló sejtek vagy pedig az MHC II-antigén-komplexet kötő CD4 koreceptort expresszáló sejtek. Szelekció közben a másik koreceptor kifejeződése elmarad, ezért a sejtek MHC-molekulára korlátozottakká válnak. A negatív szelekció során a fejlődő T-sejtek a medulláris epitélsejtekhez kapcsolódnak, amelyek bemutatják nekik az antigéneket. Ennek következtében, azok a sejtek, amelyek nagy aviditással kötődnek az epitélsejtek MHC-antigén-komplexéhez apoptózissal elpusztulnak, míg a túlélő sejtek a periférián már nem reagálnak a saját antigénnel, így kialakul a centrális tolerancia. A pozitív és a negatív szelekció (1. ábra) eredményeként olyan sejtek kerülnek ki a perifériára, amelyek a saját MHC-peptid-kompleksszel nem kapcsolódnak erősen, de képesek az idegen antigént erősen kötni a saját MHC-molekulával, majd aktiválódni. A tímuszban érett sejtek megfelelő környezeti tényezők hatására a másodlagos nyirokszervben válnak érett immunkompetens T-sejtekké (Mond és mtsai., 1972; Takaba és Takayanagi, 2017).



**1. ábra:** T-sejt szelekció a tímuszban

A pozitív szelekció során azok a kettős pozitív (DP) T-sejtek maradnak életben, amelyek felismerik a tímusz epitélisejteken lévő saját MHC-molekulát, az erre képtelen sejtek pedig elpusztulnak apoptózissal. A negatív szelekció során az MHC-saját-antigén komplexhez túl erősen kötődő sejtek elpusztulnak.

(Rövidítések: cTEC: kortikális tímusz epitélisejt, mTEC: medulláris tímusz epitélisejt, MHC: fő hisztokompatibilitási komplex; az ábra Hiroyuki Takaba, Hiroshi Takayanagi és Reddit nyomán készült: *The mechanism of T cell selection in the thymus, Trends in Immunology, Volume 38, Issue 11, 2017*)

A modern orvostudományban a  $CD4^+$  Th sejteket szabályozó Treg sejtekké és effektor T-sejtekké oszthatjuk (2. ábra). A Treg sejtek megvédik az autoantigénekre és a tolerálandó exogén antigénekre (pl. étel, mikrobióta) adott effektor válaszokat. Az effektor T-sejtek védelmet nyújtanak a kórokozók ellen, és citokin szekréciós profiljuk alapján több típusra bonthatók, beleértve a Th1, Th2 és Th17 sejteket, valamint a Th22 és a Th9 sejteket. Bár a  $CD4^+$  T-sejtek minden egyes részhalmaza különféle citokineket választhat ki, mindegyik alcsoportban jellegzetes citokinek termelődnek. A  $CD4^+$  Th sejtek funkcionálisan feloszthatók az általuk termelt citokinek alapján és azok segítségével képesek az immunválasz irányát celluláris és humorális irányba befolyásolni. Az osztódó Th0 sejtek termelt citokin termeléséhez és a további differenciálódáshoz kostimuláció szükséges. A Th sejtek az MHC II-peptid-komplexet ismerik fel, és e kölcsönhatás, valamint a CD28-B7 kostimuláció következtében, és citokinek hatására aktiválódnak. A stimuláció során a Th0 prekurzor limfociták Th1, Th2 vagy Th17 sejtekké differenciálódnak. Ezen sejtek közötti különbség csak



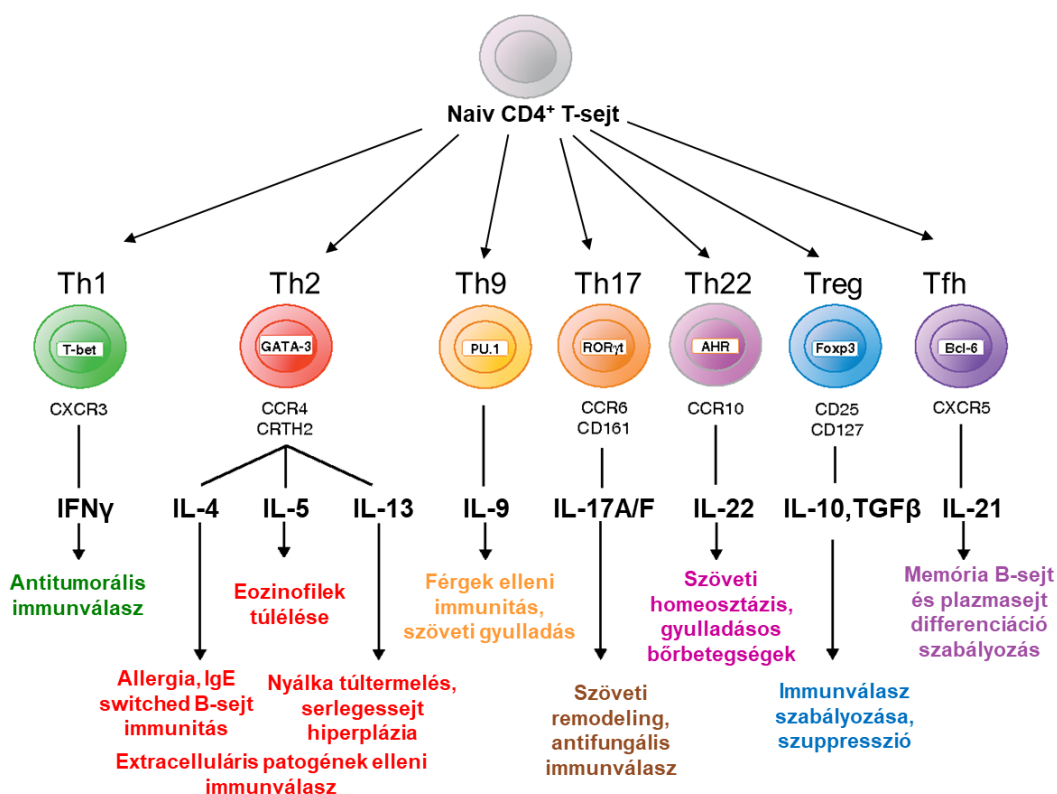
a citokinekben határozható meg; morfológiailag megkülönböztethetetlenek. Az aktivált Th sejtek közvetlenül és az általuk termelt limfokinek által makrofágokat, T-, és B-sejteket aktiválnak. A Th sejtek központi szerepet játszanak az adaptív immunválasz kiváltásában, irányításában és szabályozásában egyaránt (Scott, 1993; Zhu és mtsai., 2010; Soon és Haque, 2018; Jing Ye és mtsai., 2018).

A Th1 sejtek IL-2, Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), TGF $\beta$  citokineket termelnek, melyek stimulálják a T-sejt proliferációt, aktiválják a makrofágokat továbbá a gyulladásos és citotoxikus folyamatokban játszanak szerepet. Az IL-2 serkenti a CD8<sup>+</sup> T-sejtek osztódását és a citotoxicitást, az aktivációs küszöbök csökkentésével. Az IL-12 és az IL-27 elősegíti az IFN $\gamma$  szekretálódását, míg az IL-4 gátolja azt. A Th1 sejtek által termelt fő citokin, az IFN $\gamma$  aktiválja a makrofágokat, hogy elpusztítsák az intracelluláris kórokozókat, mint pl. mikobaktériumok, gombák és protozoák, emellett indukálja az NK-sejteket a citotoxicitásáig, és aktiválja a citotoxikus T-sejteket (Tc) is. Az IFN $\gamma$  pozitív visszacsatolási kört küld a többi Th0 sejtnak, hogy Th1 sejté váljanak és gátolja a Th2 sejtek differenciálódását, ezzel párhuzamosan leáll az IL-4 termelése (Schmitz és mtsai., 1993; Scott, 1993; Zhu és mtsai., 2010; Kak és mtsai., 2018; Ross és Cantrell, 2018).

A CD4<sup>+</sup> Th2 sejtek differenciálódása a Th0 sejtek környezetében alacsony IFN $\gamma$  és magas IL-4 citokin mellett indul el. Ezen sejtek IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 citokineket termelnek, elsősorban a B-limfociták aktiválásában, ellenanyagtermelő sejté történőérésében és így főként az extracelluláris kórokozók, patogének ellen hatékony humorális immunválasz elindításában, valamint allergiában játszanak szerepet. Az IL-4 autokrin módon tovább segíti a sejtek Th2 irányú differenciálódását, míg az IL-12 és az IFN $\gamma$  citokinek gátolják azt (Schmitz, 1993; Dong és Flavell, 2000; Ross és Cantrell, 2018). A Th17 sejtek differenciálódása a Th1 és Th2 sejteket elősegítő citokinek jelenlétében nem indul meg. Képződését egerekben a STAT1/STAT3 útvonal aktiválódásán keresztül IL-6 és TGF $\beta$ , míg emberben az IL-6 és IL-1 $\beta$  citokinek indítják el (Hajimoradi és mtsai., 2022). A sejtosztódást az IL-21 segíti elő, a Th17 sejtek stabilitását pedig az IL-23 biztosítja. A Th1 sejtek IL-17A, IL-17F és IL-22 citokineket termelnek (Ross és Cantrell, 2018; Guo és Zhang, 2021). A Th9 sejtek pleiotróp IL-9 citokint termelnek és a parazita bélférgek elleni immunválaszban játszanak szerepet. Képződésükhöz IL-2 szükséges, valamint IL-4 és TGF $\beta$  (Richard és mtsai., 2015; Li és mtsai., 2019; Zhang és mtsai., 2022). A Th22 sejteket először a bőrben írták le, IL-22 citokint termelnek és a bőr homeosztázisának fenntartásában, a szöveti gyulladásban és a sebgyógyításban játszanak szerepet (Duhon és mtsai., 2009; Wang és mtsai., 2022).

A T-sejtek második csoportja a  $CD8^+$  Tc sejtek az MHC I-peptid-komplextet ismerik fel, a kölcsönhatás, valamint citokinek hatására aktiválódnak és elpusztítják a célsejtet. Az osztódását és aktiválódást az IL-2 és  $IFN\gamma$  citokinek segítik elő (Mond és mtsai., 1972; Bendelac és mtsai., 2001; Gaudino és Kumar, 2019).

A T-limfociták harmadik csoportja a Treg sejtek. A szabályozó Treg sejtek a saját antigénnel történő kölcsönhatás következtében a tímuszban és a perifériás nyirokszervekben képződnek. A Treg sejtek gátolják az autoreaktív, potenciálisan veszélyt jelentő limfociták aktiválódását és funkciót (Sakaguchi és mtsai., 1995).



2. ábra:  $CD4^+$  Th sejt alcsoportok.

A sejtek közepén láthatók a mester regulátor molekulák, alattuk a kifejezett receptorok, a nyilak közepén az általuk termelt legfontosabb citokinek és az immunválaszban betöltött funkciójuk. (Rövidítések:  $IFN\gamma$ : Interferon  $\gamma$ , IL-: Interleukin, TNF $\alpha$ : Tumor nekrozis faktor  $\alpha$ , TGF $\beta$ : Transzformáló növekedési faktor  $\beta$ , GATA3: GATA binding protein 3, ROR $\gamma$ t: Retinoic-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. Az ábra: Wambre és mtsai alapján készült, 2012.)

## 2.5. Regulatórikus T-sejtek

Az immunrendszer érése és működése során sok milliárd limfocita képződik, melyek egyedi antigén felismerő receptorral rendelkeznek. Az érés során jelentkező hibák eredményezhetik a fejlődő limfociták daganatos elfajulását, illetve a szervezet saját antigénjeivel reagáló sejtek létrejöttét. A szervezet számára potenciálisan veszélyt jelentő (saját antigénekkal reagáló és daganatos) limfociták nagy része az érési lépések (pl. pozitív és negatív szelekció a tímuszban) során kisselektálódnak, eliminálódnak. Azonban, mint minden biológiai folyamat ez sem 100%-os pontosságú, így előfordulhatnak a saját antigénekkal reagáló limfociták a perifériás nyirokszövetekben. Ezen autoreaktív limfociták aktiválódását egyéb limfoid sejtek, mint pl. Treg-ek, képesek ellenőrizni és megakadályozni. A Treg sejtek képesek az effektor T-sejtek funkcióinak gátlására, és így alapvető szerepet játszanak a perifériás tolerancia fenntartásában, a kóros autoimmun folyamatok megelőzésében, a gyulladásos folyamatok (aszma, gyulladásos bélbetegségek) korlátozásában, emellett gátolják a fertőző mikroorganizmusok eltávolítását és a tumorelles immunitás hatékonyságát is (Vignali és mtsai., 2008; Sawant és Vignali, 2014).

A sejtek által közvetített szupresszió jelenségéről először Gershon és munkatársai számoltak be az 1970-es évek elején (Gershon és Kondo, 1971). Akkor még nem tudták a magyarázatát, de azt megállapították, hogy valószínűleg immunológiai alapú reakcióról van szó, mivel a keresztreagáló szupresszió folyamata csakis a timociták jelenlétében volt megfigyelhető, tehát a folyamat specifikus. Több hipotézis is született a szupresszió magyarázatára, az egyik ilyen volt Gershon és munkatársai által, amely azt javasolta, hogy a T-sejteknek van egy olyan részhalma, amelyek szupresszív aktivitást fejthet ki, és ez a hipotézis megalapozta a "szupresszor sejtek" kifejezés használatát, melyet 1972-ben írtak le először (Gershon és Kondo, 1970; 1971; Gershon és mtsai., 1972).

A reguláló képességgel rendelkező  $CD4^+CD25^+$  különleges T-sejt populáció a Treg leírása a Sakaguchi munkacsoport nevéhez fűződik. A Treg sejtek létezését 1995-ben sikerült kísérletesen is bebizonyítani. A munkacsoport állatkísérletben kimutatta, hogy az autoimmun betegségek kialakulását a  $CD4^+CD25^+$  T-sejt alpopuláció képes féken tartani. A Treg sejtek a veleszületett és az adaptív immunrendszer működését számos ponton szupresszálják. A TCR-készletük hasonló diverzitású, mint a konvencionális T-sejteké, azonban a konvencionális T-sejteket aktiváló stimulusokra anergiával válaszolnak. Az anergia a megfelelő citokinekkal

áttörhető (pl. IL-2, IL-15), ez megszünteti a sejtek szupresszív hatását is (Sakaguchi és mtsai., 1995).

A Treg sejtek több mint 20 évvel ezelőtti felfedezése óta nagy érdeklődést váltottak ki mind az alap, mind a klinikai immunológiai kutatások irányában. Ahogy a neve is sugallja, a Treg sejtek regulátoros szerepet játszanak az immunrendszer más sejtjeinek szabályozásában vagy azok elnyomásában. A Treg sejtek ellenőrzik a saját és az idegen antigénekkal szembeni immunválaszt és segítenek megelőzni az autoimmun betegségeket. A Treg sejtek tehát a T-sejtek olyan alpopulációja, amelyek kulcsszerepet játszanak a saját antigének toleranciájának fenntartásában és az antigén stimuláció utáni túlzott immunválaszok szupressziójában (Sakaguchi és mtsai., 1995; 2007; 2010; Sharma és Rudra, 2018; Shevach és Thornton, 2014; Vignali és mtsai., 2008; Shevach, 2018).

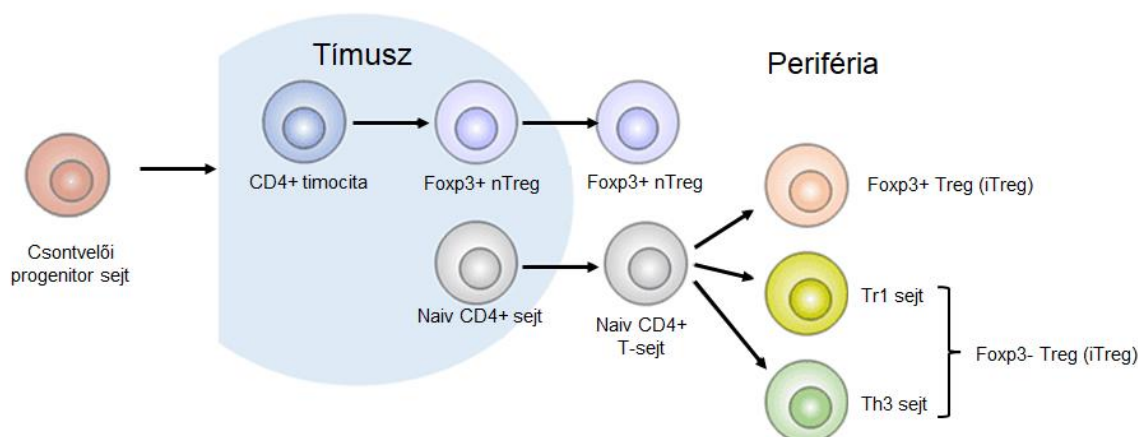
A Treg sejtek fontos szerepet játszanak a szervezet immunológiai toleranciájának fenntartásában és karbantartásában azáltal, hogy aktívan gátolják az autoreaktív limfocitákat, azonban ennek a molekuláris mechanizmusáról és a fejlődéséről még keveset tudunk. Az immunológiai tolerancia kritikusan függ az immunválasz kiváltásától és annak downregulációjától egyaránt. A Treg sejtek fontos szerepet játszanak az immunválasz negatív regulációjában. A  $CD4^+$  Treg sejtek szupresszálják az effektor T-sejteket, gátolják vagy limitálják a reaktivitást a saját antigénekkal, illetve a patogénekkal szemben, tompítják a gyulladást és fenntartják az antigénspecifikus T-sejt homeosztázist (Gershon és Kondo, 1971; Grawunder és mtsai., 1998; Hoffmann és mtsai., 1999; Hori és mtsai., 2003).

A  $CD4^+CD25^+$  Treg sejtek fontos szerepet játszanak az autoimmun betegség megelőzésében és modulálják az immunválasz beállításait, például a transzplantáció utáni szervkilöködés megelőzésében, a magzati-anyai toleranciában és fertőzések esetén. A  $CD4^+CD25^+$  T-sejtek a saját peptid kiválasztásának hatására proliferálnak a periférián, de nem szaporodnak limfopénia esetén a saját fehérje kiválasztásának hatására. Ezek a kutatások a TCR nagyfokú specificitására engednek következtetni, amelyek felismerik közvetlenül a tímikus fehérjéket és a periférián serkentik a  $CD4^+CD25^+$  Treg sejtek proliferációját. A TCR komplexnek kétségtelenül meghatározó szerepe van a  $CD4^+CD25^+$  Treg sejtek sajátosságaiban és a differenciálásukban (Picca és mtsai, 2006; Kisielewicz és mtsai., 2010).

A Treg sejtek funkciójának tulajdoníthatók folyamatosan növekvő számú különböző jelátviteli útvonalak, molekulák és folyamatok. A sejtek a kialakulásuk alapján két fő csoportra oszthatók (3. ábra). Az egyik csoport a tímuszban fejlődő természetes Treg sejtek (nTreg),

melyek nagy mennyiségben expresszálnak CD25 sejtfelszíni markert (IL-2 receptor), valamint intracellulárisan a Foxp3 transzkripciós faktort. Többféle TCR készlettel rendelkeznek és különféle mechanizmusok révén fejtik ki szabályozó funkcióikat. A másik csoport a naiv  $CD4^+$  T-sejtekből a perifériás szövetekben képződő indukált Treg sejtek (iTreg), melyek IL-10 és TGF $\beta$  citokinek révén fejtik ki gátló hatásukat. A Treg sejtek számában és funkciójában bekövetkezett változások számos autoimmun betegségben érintettek, beleértve a Sclerosis Multiplexet, az aktív Rheumatoid Arthritist és az 1-es típusú cukorbetegséget (Tang és Bluestone, 2008; Long és Buckner, 2011; Povoleri és mtsai., 2013).

A  $CD4^+CD25^+$  Treg sejtek expresszálják a CTLA-4 gátló molekulát. A CTLA-4 hiányos egerek fenotípusa hasonlít a Foxp3 mutáns egerekére, jelezve, hogy szoros kapcsolat létezik a CTLA-4 és a  $CD4^+CD25^+$  Treg sejtek között. CTLA-4 szükséges a TGF $\beta$  indukálta Foxp3 expresszióhoz, mert a CTLA-4 hiányos T-sejtek nem képesek indukálni a Foxp3-at TGF $\beta$  jelenlétében (Mond és mtsai., 1972; Scott, 1993; Tivol és mtsai., 1995; Zheng és mtsai., 2007).



**3. ábra:** Treg sejt fejlődés.

A T-sejtek előalakjai a magzati májból, később pedig a csontvelői multipotens hematopoetikus őssejtekből származnak. Az előalakok elhagyva a csontvelőt a tímuszba vándorolnak. Az nTreg a  $CD4^+$  timocitákból képződnek. Az iTreg sejtek a periférián keletkeznek. (Rövidítések: Foxp3: Forkhead box protein 3. *Az ábra:*

*Deng és mtsai., 2022. alapján készült.)*

## 2.6. Foxp3 transzkripciós faktor

A Treg kutatások következő mérföldkövét a Foxp3 transzkripciós faktor leírása jelentette, amely kulcsszerepet játszik a Treg sejtek képződésében és szuppresszív funkcióinak fenntartásában is. A Foxp3 gén kiütése egérben hiperreaktív CD4<sup>+</sup> T-limfociták képződését eredményezi, míg a spontán mutációval kialakult „scurfy” fenotípus több immunszuppresszív mechanizmus kiesésének eredménye. A Foxp3 gén mutációi egérben és emberben is végzetes autoimmun kórkép kialakulásához vezetnek (Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked – IPEX-szindróma). A fiatal férfiak esetében jelentkező kórkép a másodlagos limfoid szövetek megnagyobbodásával, inzulinfüggő cukorbetegséggel, ekcémával, ételallergiával és sorozatos fertőzésekkel jár. A betegség gyógyításának egyetlen terápiás lehetősége jelenleg a csontvelő-átültetés (Bennett és mtsai., 2001; Sakaguchi, 2005; Van Gool és mtsai., 2019).

A Foxp3 a Treg sejtek kulcsfontosságú markere. A Foxp3 gén, egy olyan transzkripciós faktort kódolt, amely genetikailag defektív egy autoimmun és gyulladásos szindrómában az emberekben és egerekben egyaránt, specifikusan fejeződik ki a természetesen keletkező CD4<sup>+</sup> Treg sejtekben. Továbbá, leírták, hogy a Foxp3 retrovirális géntranszfere átalakítja a naiv T-sejteket Treg irányba, amely fenotípusa a természetesen előforduló CD4<sup>+</sup> Treg sejtekre jellemző fenotípushoz hasonló. Így megállapították, hogy a Foxp3 egy kulcsfontosságú szabályozó gén a Treg sejtek fejlődésében (Gershon és mtsai., 1972, Hori és mtsai., 2003, Zhang és Zhao, 2007).

A naív CD4<sup>+</sup> T limfocitákból a perifériás szövetekben képződnek az iTreg sejtek, melyek a Foxp3 negatív reguláló 1 (Tr1) és a T helper 3 (Th3) szabályozó T-limfocitákat foglalják magukban, és IL-10 és TGFβ citokinek révén fejtik ki gátló hatásukat. Az iTreg sejtek különböző fertőzések hatására képződnek és bizonyos antigénekre, sejt- és tumortípusokra specifikusak. A kétféle Treg sejt egérben és emberi szervezetben egyaránt jelen van, de képződésük és fenotípusos sajátásaik bizonyos eltéréseket mutatnak. Az nTreg sejtek a perifériás CD4<sup>+</sup> T-sejt készlet mintegy 5-10%-át alkotják, az iTreg sejtek a perifériás szövetekben a konvencionális T-sejtekből fejlődnek. Így a két sejtípus eltérő szöveti környezetben, különböző feltételek mellett differenciálódik (Hori és mtsai., 2003; Yi és mtsai., 2006; Ugor és mtsai., 2013).

## 2.7. A természetes szabályozó T-limfociták (nTreg sejtek)

A tímuszban képződő nTreg sejtek a pozitív és negatív szelekciós lépéseket követően a tímuszban fejlődnek tovább. Pozitív szelekciójuk feltétele abban különbözik a konvencionális T-limfocitákétól, hogy az nTreg TCR-jeinek kötődési erőssége a konvencionális T-limfociták negatív és pozitív szelekcióját biztosító értékek közé esik. A konvencionális és az nTreg sejtek TCR-jeinek összehasonlító szekvenciaanalízise hasonló variabilitást igazolt, és különleges sajátosságokat nem mutatott ki (Moran és Hogquist, 2012).

A Foxp3 transzkripciós faktor az nTreg sejtek fenotípusának stabilizálásában és fenntartásában is fontos szerepet játszik, míg a TGF $\beta$  citokin a perifériás az nTreg sejtek különböző funkcióit gátolja. Az nTreg sejtek fenntartásában a legfontosabb szerepet a CD28 általi kostimuláció és az IL-2 citokin játssza. A CD28-B7 kapcsolat általi kostimuláció az IL-2-termelés fokozása révén elősegíti az nTreg sejtek túlélését, hozzájárul a sejtfelszíni CD25 fokozott expressziójához, és biztosítja a szabályozó funkciót is. Az nTreg sejtek képződését irányító Foxp3 transzkripciós faktornak számos célgénje ismert, de kifejeződése önmagában nem elegendő a szuppresszív funkció kiváltásához. A tímuszban differenciálódó Foxp3<sup>+</sup> nTreg sejtek gátló funkcióját különböző szinten működő faktorok és folyamatok együttese biztosítja. Az nTreg sejtek hatásukat közvetlen sejtkölcsönhatással vagy közvetve citokinek által fejtik ki. Általuk termelt gátló citokinek az IL-10, TGF $\beta$  és az IL-35. Igazolták, hogy az nTreg sejtek képesek gátolni a DC-k aktivációját és kostimulációs képességét, továbbá módosítják a monociták és makrofágok működését is. Így szuppresszív hatásukat az APC funkciók módosítása révén is kifejezhetik (Chen és mtsai., 1996; Zhang és Zhao, 2007; Mahnke és mtsai., 2007; Wu és mtsai., 2012). Azokban az egerekben, amelyekben a T-sejt-specifikus TGF $\beta$  jelátvitel hiányzik, a nTreg sejteknek differenciálódási hibái vannak jelen, mivel a TGF $\beta$  jelátvitelről kimutatták, hogy elősegíti a nTreg sejt prekursorok túlélését (Liu és mtsai., 2008; Ouyang és mtsai., 2010).

## 2.8. A perifériás indukált szabályozó T-limfociták (iTreg sejtek)

Ellentétben a tímusz eredetű nTreg sejtekkel, az iTreg limfociták *in vivo* a konvencionális perifériás naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtekből képződnek és *in vitro* körülmények között is előállíthatók. Két típusát különböztethetjük meg, az egyik szubpopuláció az IL-10 által indukált iTreg-Tr1 limfociták, a másik alcsoport pedig a TGF $\beta$  hatására képződő iTreg-Th3 limfociták. IL-10 és TGF $\beta$  mellett az IL-4 és IL-13 citokinek is segítik a CD4<sup>+</sup> T-sejtek Foxp3<sup>+</sup> Treg sejtekké differenciálódását. A bél lamina propria rétegében található makrofágok retinsav, IL-

IL-10 és TGF $\beta$  jelenlétében szintén képesek a Foxp3<sup>+</sup> iTreg sejtek képződését kiváltani (Kaminska és mtsai., 2005; Wu és mtsai., 2012; Yang és mtsai., 2017).

Az iTreg-Tr1-sejtek egyedi sejtfelszíni markerrel nem jellemezhetők, képződésüket az IL-10 termelő APC-k (éretlen DC, pDC, tolerogén mieloid DC) váltják ki, IL-2 és IL-15 jelenlétében lassan osztódnak. A Tr1 sejteknek és az általuk termelt IL-10-citokinnek kiemelten fontos szerepe van a gyulladásos bélbetegségek megelőzésében és az allergének elleni immunválasz szabályozásában (Pletinckx és mtsai., 2011; Zhu és mtsai., 2010). Az IL-2 több különböző szinten is biztosít szignálokat a Treg sejtek számára. Egyrészt elengedhetetlen a Treg sejtek tímuszban történő fejlődéséhez, másrészt az IL-2 az egyik fő citokin a felnőtt egerek iTreg sejteinek homeosztázisához. Végül az antigénnel aktivált konvencionális T-sejtek könnyen differenciálódnak iTreg sejtekké IL-2 és TGF $\beta$  stimuláció hatására (Malek és mtsai., 2002; Fontenot és mtsai., 2005; Malek és Castro, 2010; Zheng és mtsai., 2007).

Az iTreg-Th3-sejtek CD4<sup>+</sup> naiv T-sejtekből történő képződését egérben és emberben is a TGF $\beta$  citokin segíti elő. Ez a gátló sejttípus kiemelt szerepet játszik a táplálék- és mikrobiális antigénekben gazdag bélszövet immunológiailag kitüntetett állapotának fenntartásában. TGF $\beta$  vagy TGF $\beta$ RII hiányában a bélben spontán T-sejt-aktiváció és gyulladás alakul ki. A Tr1 és Th3 sejtek az nTreg sejtek hiányában is kialakulnak, ezzel igazolható a különböző Treg sejtek eltérő fejlődési útvonalai. A két sejtpopuláció együttműködését azonban jól alátámasztja, hogy az nTreg sejtek IL-10 és TGF $\beta$  jelenlétében a naiv T-limfociták iTreg irányú differenciálódását is elindítják. Az IL-10 citokin és a TGF $\beta$  is erős immunregulátor, mindketten a természetes immunitásban és a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó citokinek közé tartoznak (Yi és mtsai., 2006; Zhu és mtsai., 2010; Maynard és Weaver, 2008).

A TGF $\beta$  egy multifunkcionális citokin, amely egy több, mint 30 tagból álló polipeptid család tagja. Hatásai közé tartozik a sejtproliferáció gátlása, immunszuppresszió és az extracelluláris mátrix szintézisének szabályozása. A növekedésgátló hatásának nagy figyelmet szentelnek a legkülönbözőbb vizsgálatokban, számos tanulmány igazolta a TGF $\beta$  tumorszupresszor funkcióit daganatkeletkezésben. Sok betegség hátterében ismert a TGF $\beta$  funkciójának kiesése, a TGF $\beta$  patológiás szerepe; TGF $\beta$  rezisztenciát figyeltek meg számos daganatsejt esetében. A TGF $\beta$ -gén hiánya a perifériás nTreg sejtek számának és funkciójának csökkenéséhez vezet, igazolva a TGF $\beta$  szükségességét a perifériás az nTreg-egyensúly fenntartásában (Chen és mtsai., 1996; Kaminska és mtsai., 2005; Zhu és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2012). Azokban az egerekben, amelyekben a TGF $\beta$  jelátvitel károsodott vagy teljesen

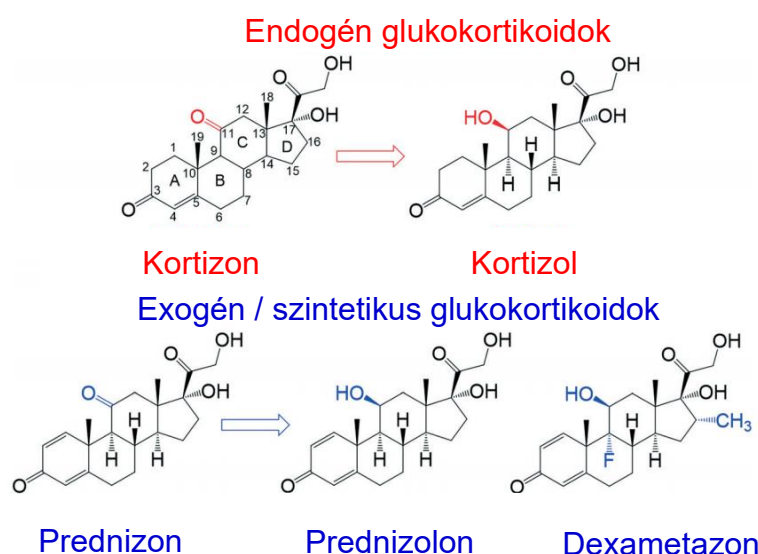


elveszett a T-sejtekben, multifokális autoimmunitás alakul ki, amely hasonló a globális TGF $\beta$ 1 g $\acute{e}$ nhiányos egereknél megfigyelt betegséghez (Kulkarni és mtsai., 1993; Shull és mtsai., 1992).

## 2.9. Glukokortikoidok

A természetes GC-eket a mellékvesekéreg zóna fascikuláta sejtjei termelik, prekursora a koleszterin. Szintézisük és felszabadulásuk a hipofízis elülső lebenyének adrenokortikotrop hormonja (ACTH) által stimulált, míg elválasztását a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely szabályozza. Az ACTH-szekréciót a vérben lévő GC szintje és a hipotalamikus kortikotróp releasing faktor hormon (CRF) szabályozza. A fő GC hormon *in vivo* az emberben a kortizol, rágcsálókban pedig a kortikoszteron (Herman és mtsai., 2016).

A glukokortikoidok fontos tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. A homeosztázis fenntartása érdekében számos fiziológiai folyamatot szabályoznak, mint a szénhidrátok, fehérjék és lipidek anyagcseréje, a víz- és sóháztartás szabályozása, továbbá hatása van a fejlődési folyamatokra. Emellett befolyásolják az immunrendszer működését, erős gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatással bírnak, ma a világ egyik legelterjedtebb gyógyszerei (4. ábra). A klinikumban igen széleskörűen alkalmaznak különböző betegségek kezelésében GC-analógokat (pl. Dexametazon-t (DX, Dexamethasone) allergiás állapotok, autoimmun betegségek, transzplantált betegek, kezelésére), amelyek világszerte az egyik leggyakrabban felírt gyógyszerek, a gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív aktivitásuk, limfocita apoptózist indukáló képességük miatt, mégis keveset tudunk a Treg sejtekre gyakorolt hatásaikról. Irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a klinikumban szisztémásan adott GC-k segítik a Treg-ek működését, ezáltal új megvilágításba helyezve a GC-mediált immunszuppressziót.



**4. ábra:** Endogén (felső) és szintetikus (alsó) glukokortikoidok.

*(Pflug és mtsai., 2017., munkája alapján készült az ábra.)*

A GC hormonok immunszuppresszív hatásukat a citokin termelés és a sejt aktiváció befolyásolásával érik el. Biológiai hatásukat intracelluláris glukokortikoid receptorokhoz (GR) kötődve közvetítik, amelyek képesek genomikus és nem genomiális mechanizmusokon keresztül hatni (Sary és mtsai., 2011; Oakley és Cidlowski 2013, 2016, Ramamoorthy és Cidlowski, 2016).

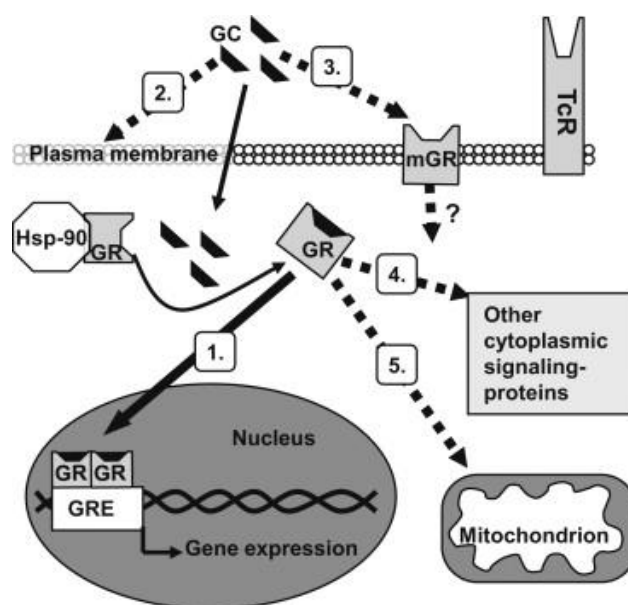
#### 2.9.1. Genomikus hatások

A GC-ok a sejtbe lépve először a specifikus receptorukhoz kapcsolódnak. A GR-ok a citoplazmában találhatók inaktív formában hő sokkfehérje-komplexhez kapcsolva. A ligand kapcsolódása után a konformációváltozás következtében lehasad a GR, a DNS-kötő domén felszabadul, a komplex dimerizálódik és a sejtmagba transzlokálódik, ahol a glukokortikoid válasz elemhez (GRE) kötődik és befolyásolja a génexpressziós folyamatokat (5. ábra). A genomikus hatások órák alatt következnek be. Képes bizonyos gének átírását serkenteni, mint pl. IL-10, míg másokét gátolni pl. IL-1 $\beta$ , IL-2, valamint közvetett módon más gének expresszióját is befolyásolhatja transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva pl. NF- $\kappa$ B. A GC-ok leválása a DNS-ről szigorúan szabályozott folyamat, a szintetikus analógok, mint pl. DX esetében ez módosul a természetesnél erősebb receptor affinitás miatt, amely a transzkripciós folyamatot is megváltoztathatja (Pálinkás és mtsai., 2008; Boldizsar és mtsai., 2010; Oakley és

Cidlowski, 2013; Busillo és Cidlowski, 2013; Ramamoorthy és Cidlowski, 2016; Kiraz és mtsai., 2016; Liu és mtsai., 2022).

## 2.9.2. Nem genomikus hatások

A GC-ok néhány gyorsan végbemenő, főként nagy koncentrációban történő alkalmazásakor bekövetkező hatása nem magyarázható a genomikus folyamatokkal. Munkacsoportunk korábban publikálta, hogy a nagy dózisú GC kezelés elősegíti az éretlen, fejlődő  $CD4^+CD8^+$  DP timociták apoptózisát a nem genomális GC hormon hatás révén. Mivel az nTreg sejtek a tímuszban DP timocitákból fejlődnek ki, kérdéses volt, hogy az nTreg hogyan reagál a nagy dózisú GC kezelésre. Az elérhető irodalom ellenmondásos a GC kezelésnek Treg sejtekre kifejtett hatásáról, ugyanakkor bizonyított, hogy a GC felhasználása elősegítheti a Treg sejtek aktivációját (Boldizsar és mtsai., 2010; Mathian és mtsai., 2015; Prenek és mtsai., 2017).



**5. ábra:** A glukokortikoid jelátvitel a T-sejtekben:

1. génexpresszió változás, genomikus hatás, 2. direkt membrán hatások, 3. membránhoz kapcsolt GR, 4. GR interakciója citoplazmatikus fehérjékkal, 5. mitokondriumba való transzlokáció

(Boldizsar és mtsai., 2010., munkája alapján készült az ábra.)

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkánk célja a GC hormon szerepének vizsgálata Treg sejtek differenciálódásában és működésében.
2. Vizsgálni kívántuk a Treg sejtek GC érzékenységét a Treg arány és abszolút T-sejtszám nyomon követésével kezeletlen és kezelt BALB/c egerek tímuszában és lépében.
3. A GC kezelés hatására a Treg sejtek funkciójában bekövetkező változásokat a sejtek szupresszor citokin termelésével, valamint a citokinek és Foxp3 transzkripciós faktor relatív mRNS expressziójának mérésével kívántuk meghatározni.
4. További célunk volt, a GR és Foxp3 transzkripciós faktor lehetséges kolokalizációjának vizsgálata Treg sejtekben DX nélkül és *in vitro* DX kezelés után.
5. Célunk volt megvizsgálni a GC hatását a Treg sejtek *in vitro* differenciálódására, valamint a tímusz és lép eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejtekre különböző körülmények között. Új módszereket alkalmazni stabil és funkcionálisan szupresszív Treg-ek előállítására, adoptív transzfer kísérletekben történő jövőbeni felhasználáshoz.
6. Az *in vitro* differenciáltatott Treg sejtek funkcionális sajátosságait a sejtek citokin termelésével, a citokinek, valamint a Foxp3 transzkripciós faktor relatív mRNS expressziójának mérésével kívántuk meghatározni.

Elegendő számú funkcionálisan hatékony és stabil Treg sejt megszerzése elsődleges fontosságú a Treg sejtek *in vitro* manipulálása során az adaptív sejterápiában olyan betegségekben, ahol az immunszupresszió kívánt kimenetel (Milward és mtsai., 2017).

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez 3-4 hetes BALB/c nőstény egereket használtunk. Az állatokat konvencionális körülmények között tartottuk, kereskedelmi forgalomban kapható egértápot és vizet ad libitum kaptak. A kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság előírásainak megfelelően hajtottuk végre (#BA 02/2000-16/2015). Az egereket a The Jackson Laboratory laboratóriumtól (Bar Harbor, ME, USA) szereztük be.

### 4.2. *In vivo* DX kezelés

Kísérleti állatainkat 2-4 napig intraperitoneálisan oltottuk magas dózisú (20 mg/testtömeg kg) Dexametazonnal (DEXA-ratiopharm 4 mg/mL oldatos injekció, TEVA, OGYI-T-6071/03) PBS-el hígítva. Az utolsó oltást követően 24 óra elteltével eltávolítottuk az egerek lépét és tímuszát és RPMI-1640 (RPMI) médiumba (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) helyeztük.

### 4.3. Timociták és lépsejtek izolálása

Az egerek feláldozását követően eltávolítottuk tímuszukat és lépüket. A szerveket mechanikusan homogenizáltuk RPMI médiumban (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), majd a szuszpenziót átszűrtük vattán, hogy a szöveti törmeléktől megszabaduljunk. A sejteket megmostuk 1X PBS-ben, 5 percig centrifugáltuk 5000 rpm sebességgel Eppendorf 5804R centrifugán, majd 1 mL RPMI tápfolyadékba vettük fel. A sejtek életképességének meghatározásához és a sejtszámoláshoz tripánkéék festékkizárásos technikát alkalmaztunk.  $1 \times 10^6$  timocitát és lépsejtet kezeltünk nagy dózisú  $10^{-6}$ M DX-nal ( $10^{-2}$ M törzsoldat dimetil-szulfoxidban feloldva (DMSO, Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország)) szérummentes RPMI médiumban és 37 °C-on inkubáltuk 30 percig konfokális mikroszkópiához és koimmunprecipitációhoz, valamint egy éjszakán át az áramlási citometriás mérésekhez. A kontroll mintákat azonos körülmények között tartottuk és azonos ideig inkubáltuk az oldószer jelenlétében. A GC analóg kezelést jéghideg PBS- $\text{NaN}_3$  (1X Foszfát pufferes sóoldat, Phosphate Buffered Saline, Molar Chemicals, Budapest, Magyarország), 0,1% Na-azid tartalommal (Sigma-Aldrich Kft.) hozzáadásával állítottuk le.

#### 4.4. CD4<sup>+</sup> sejtek izolálása és tisztítása

A CD4<sup>+</sup> T-sejteket a frissen izolált lép és tímusz sejtekből negatív szelekcióval nyertük az EasySep Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kits (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada, #19752, #19772) szelekciós kitet használva. A szelekciót a gyártó által javasolt leírás alapján végeztük EasySep Magnet (Stemcell Technologies) gyári lila mágneset használva. A szelekciót lamináris fülkében végeztük. A kiindulási sejtszám 1-1.5 x 10<sup>8</sup> sejt/mL timocita vagy lép sejt a szelekciós pufferbe felvéve (PBS, 2% FBS, 1 mM EDTA) 5 mL-es steril polisztirol csőben. Első lépésként 50 µL CD4<sup>+</sup> T Cell Pre-Enrichment koktélt adtunk a sejtszuspenzióhoz és 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően 150 µL Biotin szelekciós koktélt adtunk a mintához, összekeverés után 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. 150 µL EasySep D mágneses partikulumot összekeverve 10 percig inkubáltuk a mintákat, majd 2.5 mL végtérfogatra kiegészítettük az ajánlott médiummal és 5 percre a mágnesbe helyeztük. A mágneses szelekció után a felülúszó tartalmazza a negatívan szelektált T-sejteket. A szelekció végén kinyert CD4<sup>+</sup> T-sejt populáció tisztaságának ellenőrzéséhez sejtfelszíni anti-CD4-Pacific Blue, CD8-PE jelölést végeztük áramlási citometriás méréshez és RNS-t izoláltunk. A szelektált T-sejtek CD4<sup>+</sup> tisztasága >96% volt. A sejtek RPMI-ben történő mosását követően az élő sejtszámot Bürker kamrában, tripánkék festékkizárásos teszt segítségével határoztuk meg.

#### 4.5. *In vitro* Treg sejt expanszió

A CD4<sup>+</sup> T-sejteket *in vitro* RPMI + 10% FCS + 100 U/mL penicillin/streptomycin + 2 mM L-glükóz tartalmú médiumban tenyésztettük *in vitro* 2-14 napig Dynabeads CD3/CD28 T-sejt aktiváló mikrogöngyök (2:1, göngy:sejt arányban) (Gibco; #11452D) segítségével, 30 U/mL rekombináns IL-2 (eBioscience; #34-8021-82) ± 40 pg/mL rekombináns TGF beta 1 (eBioscience; #34-8342-82) ± 10<sup>-6</sup> mol/L DX (Sigma-Aldrich; #D4902) jelenlétében 24-lyukú lemezen (1000 µL/lyuk) 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalommal.

Az *in vitro* tenyésztést követően a sejteket összegyűjtöttük és a mikrogöngyöket eltávolítottuk az EasySep Magnet (Stemcell Technologies; #18000) mágnes segítségével. A sejteket megmostuk 1X PBS-ben és meghatároztuk az élő splenocita és timocita számot Bürker kamrában tripánkék festékkizárásos teszt segítségével. A sejtekből RNS-t izoláltunk NucleoSpin RNA XS (MACHEREY-NAGEL; #740902.50) kit segítségével, valamint a fluoreszcens jelölést követően áramlási citometriás méréseket végeztünk.

#### 4.6. Antitestek és fluorokrómok

Az áramlási citometriás méréseknél a Treg sejtek azonosítására anti-CD4-FITC (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet; YTS 191), anti-CD8-PE (BD Pharmingen; 53-6.7) és anti-CD25-PE-Cy5 (eBioscience; RM4-5) vagy anti-CD25-PE-Cy7 (eBioscience; PC61) sejtfelszíni antitesteket, illetve anti-Foxp3-PE (eBioscience, Exbio; 3G3), anti-IL-10-APC (BioLegend; JES5-16E3) és anti-TGF $\beta$ -PerCP (BioLegend, TW7-16B4) intracelluláris antitesteket használtunk.

Az *in vitro* differenciált T-sejtek és Treg sejtek további vizsgálataihoz anti-IL-17A-PerCP-Cyanine5.5 (eBioscience; eBio17B7), anti-IFN $\gamma$ -APC (eBioscience; XMG1.2) és anti-IL-4-FITC (eBioscience; BVD6-24G2) monoklonális ellenanyagokat használtunk.

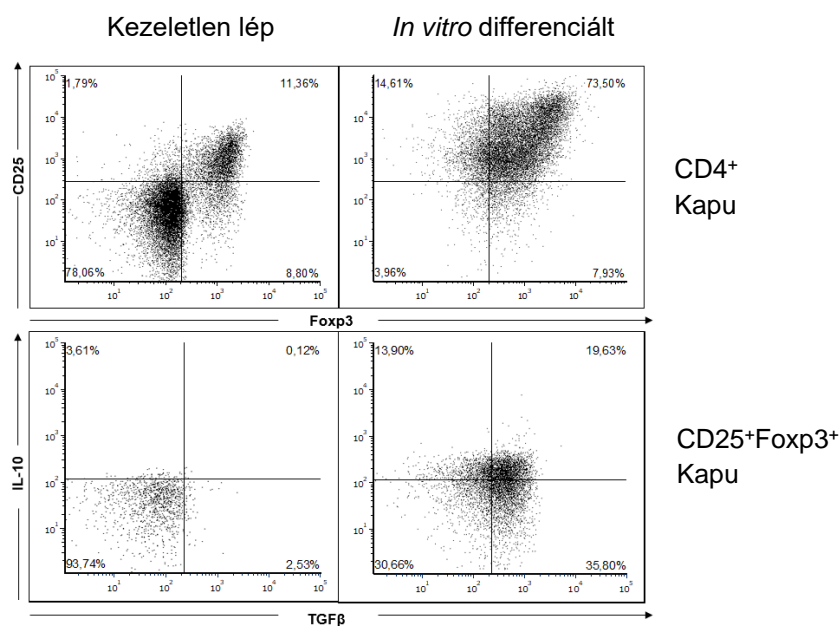
A Treg sejtek FACS szeparálásához anti-CD4-PE (ImmunoTools; YTS 191.1.2), és anti-CD25-PE-Cy5 (eBioscience; PC61.5) antitesteket használtunk.

A konfokális mikroszkópos metszetek jelöléséhez anti-CD4-Pacific Blue (BD Pharmingen; RM4-5), anti-CD8-PE (BD Pharmingen; 53-6.7), anti-CD25-PE-Cy5 (BD Pharmingen; PC61), anti-Foxp3-Alexa Fluor 647 (BD Bioscience; 150D), anti-GR-FITC (PTE KK, Immunológia és Biotechnológia Intézet; 5E4-B1) antitesteket használtunk.

#### 4.7. Antitest jelölés és áramlási citometriás mérés

A sejtfelszíni jelöléshez az adott antitestnek megfelelő koncentrációkkal antitest koktétl készítettünk 100  $\mu$ L PBS/0,1% BSA/0,1% NaN<sub>3</sub> jelölő pufferben. Mintánként 10<sup>6</sup> élő sejtet jelöltünk fluoreszcens monoklonális antitesttel. A sejteket 30 percen keresztül inkubáltuk sötétben, ezt követően a mintákat kétszer mostuk 2 mL PBS/NaN<sub>3</sub> mosó pufferben. Az intracelluláris jelöléshez az eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, Egyesült Államok, #00-5523-00) kitet használtuk. A sejteket 30 percig fixáltuk és permeabilizáltuk sötétben, jégen 1 mL fixáló/permeabilizáló pufferrel (Fixation/Permeabilization Concentrate 4x; Fixation/Permeabilization Diluent). A fixálást követően 2 x 2 mL előzőleg meghígított permeabilizáló pufferrel mostuk a sejteket (Permeabilization Buffer (10X)). Az intracelluláris jelöléshez a korábban felsorolt fluoreszcens monoklonális antitesteket használtuk, a 30 perces inkubáció végén kétszer mostuk a sejteket permeabilizáló pufferben. A jelölés végén 500  $\mu$ L fixáló pufferben (15  $\mu$ L 35%-os formaldehid + 485  $\mu$ L PBS) vettük fel a sejteket és a mérés kivitelezéséig abban tároltuk azokat. A jelölést a kitben meghatározott leírás alapján végeztük. A mintákat FACSCanto II áramlási citométeren

(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) mértük, az eredményeket az FCS Express 4 Flow Research program segítségével analizáltuk. A spektrális átfedések korrekciójára kompenzációt végeztünk jelöletlen mintákkal, egyszeresen jelölt mintákkal és teljes jelölt mintákkal élő sejteken. Mintánként 100000 eseményt mértünk a limfocita kapuból. A nagyság és granularitás (FSC/SSC) paraméterek alapján azonosítottuk a limfocitákat, majd azokon belül csak a  $CD4^+$  sejteket vizsgáltuk tovább. A  $CD4^+$  T-sejt populáción belül  $CD25^{high}Foxp3^+$  alpopulációt tekintettük Treg sejteknek. A citokinek arányát a  $CD4^+$  T-sejt és a Treg populáción belül is meghatároztuk (5. ábra).



**6. ábra:** Kapuzási stratégia a Treg sejtek meghatározásához a  $CD4^+$  sejtpopuláción belül.

#### 4.8. Fluoreszcens jelölt minták vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A fluoreszcens konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz a sejtpreparátumokat sejtfelszíni és intracelluláris antitestekkel történő jelölést követően a metszetekre mért sejteket laboratóriumi citocentrifuga segítségével 5 percig pörgettünk 1000 rpm sebességen (Cytospin III, Shandon). A Shandon Cytospin 3 centrifuga egyrétegű sejteket hoz létre egy egyértelműen meghatározott területen, a behelyezés megdöntött helyzetben történik a sejtvesztés megakadályozása érdekében. Működés közben függőleges helyzetbe kerülnek a lemezek, miközben a sejtek letapadnak a tárgylemezre. A Cytospin 3 centrifuga elősegíti a sejtek integritásának megőrzését, amely a további vizsgálatok céljából fontos.



Az elkészült citopreparátumokat szobahőmérsékleten szárítottuk 10 percig. A metszetek fedése PromoFluor Antifade Reagent (BioLegend; #:PK-PF-AFR1) segítségével történt, amely minimalizálja a fluorokrómok kifakítását (photobleaching) azáltal, hogy stabilizálja a fluorokrómozókat fixált-sejtekben, szövetekben és sejtmentes preparátumokban. Az elkészült metszeteket 4 °C-on tároltuk, sötétben.

Olympus FluoView FV-1000 konfokális lézerpasztázó mikroszkóp és fluoreszcencia korrelációs spektroszkóp segítségével, Olympus Fluoview FV-1000S-IX81 képgyűjtő szoftver rendszerrel készültek a fluoreszcens felvételek a metszetekről. A mikroszkóp 3 lézere 456, 470, 488, 514, 543 és 633 nm-es gerjesztési hullámhosszakot biztosít. A mintából egyidejűleg 3 fluoreszcencia, ebből 2 spektrális feloldású és egy áteső fényű (DIC kontrasztosítású) jel detektálható. Pásztázással 0,5 µm optikai szelet vastagságú képek készíthetők. A kolokalizáció elemzése ImageJ szoftver segítségével történt.

#### 4.9. RNS készítés és Real-time PCR

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

Az RNS minták izolálása NucleoSpin RNA XS (MACHEREY-NAGEL; #740902.50) kit segítségével történt 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup> sejtől, a komplementer DNS szintetizálása random oligo(dT) primerek (Applied Biosystems) felhasználásával történt. A génexpresszió kvantifikálása a SYBR Green módszerrel történt Applied Biosystems 7500 RT-PCR rendszerben. A relatív génexpressziós szintek meghatározásához β-aktinra normalizáltunk, az eredményeket pedig a kezeletlen Treg sejtek mRNS szintjeinek többszöröseként ábrázoltuk (RQ érték). Az alkalmazott primer-szekvenciák a következők voltak: β-ACTIN (Forward) 5'-GGG AGG GTG AGG GAC TTC C -3'; β-ACTIN (Reverse) 5'-TGG GCG CTT TTG ACT CAG GA -3'; IL-10 (Forward) 5'-GTG AAG ACT TTC TTT CAA ACA AAG -3'; IL-10 (Reverse) 5'-CTG CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT -3'; Foxp3 (Forward) 5'-TAC TTC AGA AAC CAC CCC GC -3'; Foxp3 (Reverse) 5'-GTC CAC ACT GCT CCC TTC TC -3'; TGFβ1 (Forward) 5'-GAC TCT CCA CCT GCA AGA CC 3'; TGFβ1 (Reverse) 5'-GGA

CTG GCG AGC CTT AGT TT-3'; egér GR (Forward) 5'- TGG TGT GCT CCG ATG A-3';  
egér GR (Reverse) 5'-AGG GTA GGG GTA AGC -3'.

#### 4.10. PMA/ionomycin stimuláció

A  $CD4^+$  T-sejtek aktivációjához *in vitro* Forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA)/ionomycin stimulációt végeztünk a kezeletlen lépből és tímuszból izolált, valamint az *in vivo* DX kezelt állatokból szelektált  $CD4^+$  T-sejteken is. A stimuláció 25 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich Kft.) és 1  $\mu$ g/mL Ionomycin (Sigma-Aldrich Kft.) jelenlétében történt RPMI médiumban, 24 órán keresztül, 37 °C-on, 5%  $CO_2$  koncentráció mellett. Az inkubációs idő leteltével a sejteket összegyűjtöttük és fluoreszcens antitesttel történő jelölést követően áramlási citometriás méréseket végeztünk a Treg sejt arányok meghatározására.

#### 4.11. Statisztikai analízis

A statisztikai kiértékelést SPSS V.22.0 statistics package (IBM, USA) statisztikai programmal végeztük. Munkánk során, a diagramokon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk. Normalitás vizsgálatot (Kolmogorov-Smirnov) követően a különböző csoportok eredményeinek összehasonlítására egyutas vagy többutas ANOVA tesztet alkalmaztunk LSD post hoc tesztel, és a  $p < 0,05$  eltérést fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. Jelölések: \* kontrollhoz képes, # kezelések közötti különbség

Az ábrákon az  $n$  elemszám megjelölés csoportonként értendő, a különböző kezelési csoportokban felhasznált kísérleti állatok számát jelöli. A kísérletek legalább 3 független kísérletet jelentenek kezelési csoportonként legalább 3 kísérleti állattal.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 5.1. *In vivo* DX kezelés hatása a tímusz és a lép összetételére

A regulatórikus T-sejtek kulcsfontosságú tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Korábbi tanulmányunkban bebizonyítottuk, hogy a tímusz Treg sejtek rezisztensek az ismételt nagy dózisú *in vivo* GC hormonkezeléssel szemben (Ugor és mtsai., 2018). Azt is kimutattuk, hogy mind a tímusz, mind a lép Treg sejtek emelkedett immunszuppresszív IL-10 és TGF $\beta$  citokin szinteket termelnek a DX kezelés után, amelyet megnövekedett Foxp3 mRNS expresszió kísér, amely a DX kezelés eredményeként erőteljesebben tükrözheti a sejtek Treg vonal irányú elkötelezettségét. Ezek az eredmények alátámasztották azt az elképzelést, hogy a GC-k befolyásolják az immunrendszer szabályozási ágát és relevánsak lehetnek azokban a klinikai állapotokban, amelyekben a Treg sejtek aktivitásának fokozása várhatóan előnyös lesz.

A 20 mg/kg naponta beadott GC koncentráció megfelel a klinikumban széles körben immunszuppresszánsként és gyulladáscsökkentőként használatos dózisnak. Munkánk során először a nagy dózisú DX kezelés hatását vizsgáltuk a timociták és perifériás nyirokszerv lép T-sejt alcsoportjainak arányára és abszolút sejtszámára. Ismételt nagy dózisú *in vivo* DX kezelést követően megváltozott a tímusz és lép sejtekből izolált abszolút sejtszám, mindkét szervben csökkent a sejtes állomány (1. táblázat).

Összsejtszám x 10 <sup>7</sup> (átlag $\pm$ SEM)	Tímusz	Lép
Kontroll	9,5 $\pm$ 0,75	7,73 $\pm$ 1,33
<i>in vivo</i> 2 nap DX	3,6 $\pm$ 1,47*	3,12 $\pm$ 0,1**
<i>in vivo</i> 4 nap DX	1,12 $\pm$ 1,35*	2,65 $\pm$ 1,45*

**1. táblázat:** Abszolút sejtszámok *in vivo* 2 és 4 napos DX kezelés hatására tímuszban és lépben.

Az ismételt *in vivo* nagy dózisú (20 mg/kg) DX kezelés hatására a tímuszban és a lépben szignifikánsan csökkent az abszolút sejtszám. A táblázatban az áramlási citometriás elemzéssel kiszámolt adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=36). \* azt jelzi, hogy p <0,05; \*\* azt jelzi, hogy p <0,01 a kezeletlen kontroll és az *in vivo* DX kezelések között.

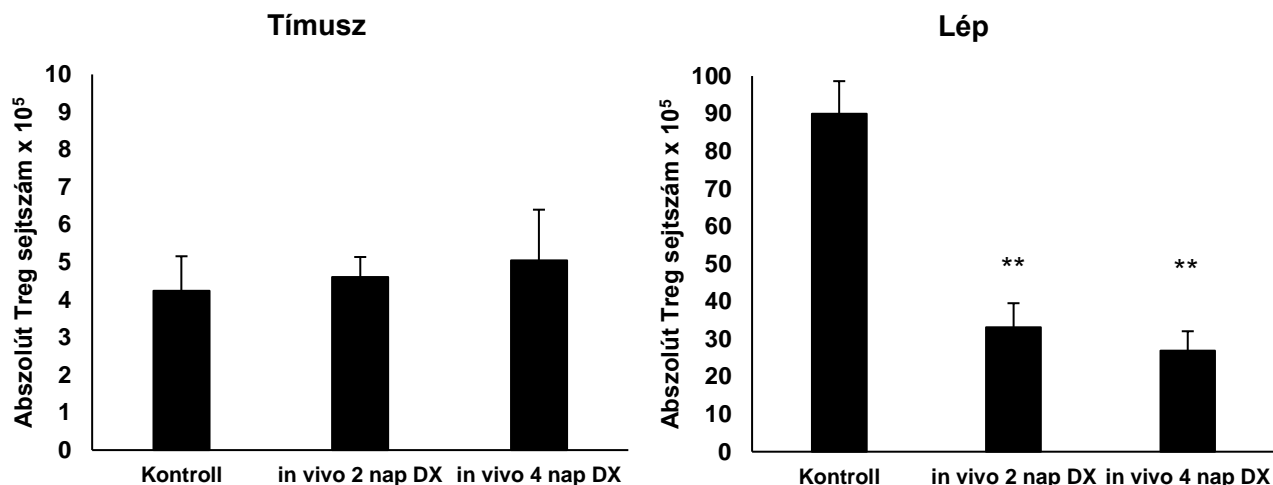
Megvizsgáltuk a tímusz és lép T-sejtek összetételének változásait DX kezelést követően. Ismételt (4 napos) nagy dózisú *in vivo* DX kezelés hatására a tímuszban a DP timociták szinte eltűntek, arányuk 1% alá csökkent (2. táblázat), míg a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek aránya emelkedett a kontroll sejtekhez képest. A lépben az ismételt *in vivo* DX kezelés hatására emelkedett a CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> és kis mértékben DP T-sejtek aránya a kontrollhoz képest (2. táblázat).

		<b>CD4<sup>+</sup></b>	<b>CD8<sup>+</sup></b>	<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>
<b>Tímusz</b>	Kontroll	14,68 ± 0,32	5,79 ± 3,34	77,13 ± 0,49
	<i>in vivo</i> 2 nap DX	59,73 ± 1,73	28,16 ± 3,06	7,55 ± 1,6
	<i>in vivo</i> 4 nap DX	57,3 ± 3	32,29 ± 4,31	0,71 ± 0,12
<b>Lép</b>	Kontroll	21,74 ± 0,44	10,12 ± 1	0,09 ± 0,01
	<i>in vivo</i> 2 nap DX	30,6 ± 1,2	15,06 ± 1,16	0,12 ± 0,03
	<i>in vivo</i> 4 nap DX	30,1 ± 2,1	16,28 ± 1,3	0,26 ± 0,02

**2. táblázat:** *in vivo* 2 és 4 napos DX (20 mg/kg) kezelés hatása a tímusz és lép T-sejt összetételére.

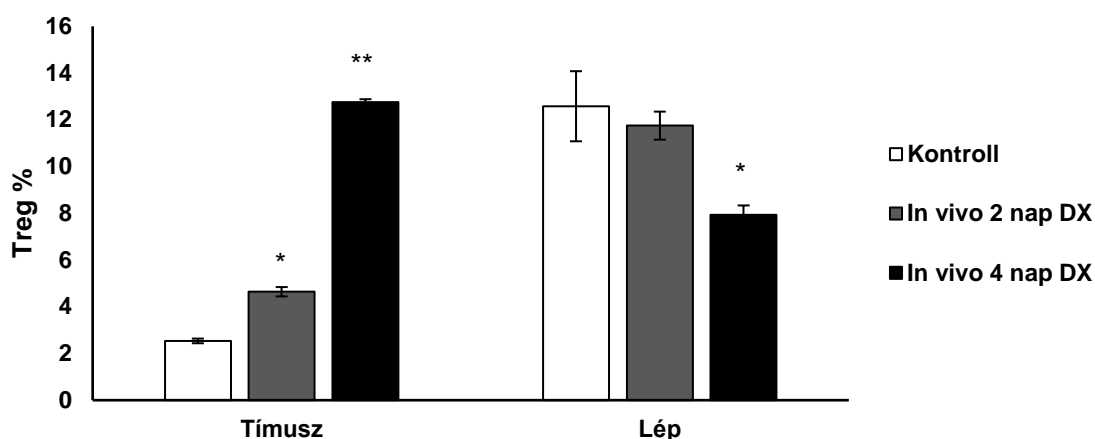
A táblázat az *in vivo* ismételt DX kezelés hatására bekövetkező a CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> és a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-sejtek arányában bekövetkező változásokat szemlélteti. Az ismételt *in vivo* DX kezelés T-sejtek aránya a kettős pozitív timociták aránya lecsökkent, míg a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek aránya emelkedett a kezeletlen állatokhoz képest. A lépben a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek aránya emelkedett az ismételt *in vivo* DX kezelés hatására, míg a kettős pozitív sejtek aránya nem változott. A táblázatban az áramlási citometriás elemzéssel kiszámolt százalékos adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (± SEM) mutatjuk be (n=18).

Az ismételt *in vivo* DX kezelés hatására megváltozott a tímusz és lép Treg sejtek aránya. A tímusz sejtek állománya közel a tizedére csökkent a kezelést követően, miközben a Treg sejtszám változatlan maradt (7. ábra), a lépben az *in vivo* DX kezelés következtében lecsökkent az abszolút Treg sejtszám (7. ábra).



**7. ábra:** Abszolút Treg sejtszámok a tímuszban és lépben és *in vivo* 2 és 4 napos DX kezelést követően.

Az ismételt *in vivo* nagy dózisú (20 mg/kg) DX kezelés hatására a lépben szignifikánsan csökkent az abszolút Treg összsejtszám, míg a tímuszban inkább enyhe, Treg sejtszám emelkedés volt megfigyelhető. Az ábra az áramlási citometriás elemzéssel kapott adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatja be (n=18). \*\* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  a kezeletlen kontroll és az *in vivo* DX kezelések között.

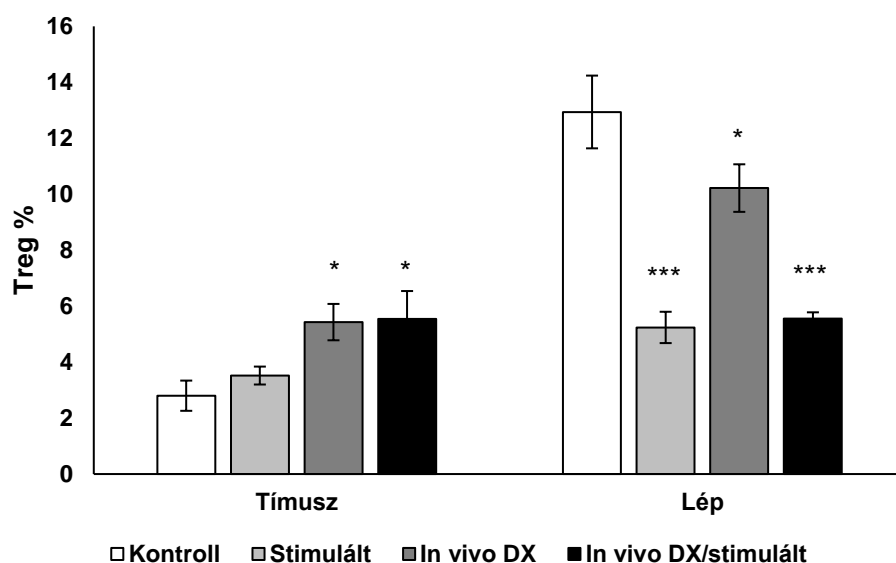


**8. ábra:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg sejt arányok a tímuszban és lépben ismételt *in vivo* 2 és 4 napos DX kezelést követően.

Az ismételt *in vivo* DX kezelés hatására a tímuszban emelkedett a Treg sejtek százalékos aránya, míg a lépben csökkenés volt megfigyelhető. A diagram az áramlási citometriás elemzéssel kiszámolt adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatja be (n=18). \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$ ; \*\* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  a kezeletlen kontroll és az *in vivo* DX kezelések között.

A tímuszban a nagy dózisú DX (20 mg/kg) kezelés hosszával párhuzamosan tovább növekszik a Treg sejtek aránya, miközben az összsejtszám tovább csökken, így a tapasztalt arány növekedése a Treg sejtek túléléséből adódik.

Az ionomycin és PMA együttesen használatos a T-sejtek aktivációjára. A PMA aktiválja a protein-kináz C-t, míg az ionomycin egy kalcium-ionofor, és az ezekkel a vegyületekkel végzett stimuláció megkerüli a T-sejtmembrán-receptor komplexet, és számos intracelluláris jelátviteli útvonal aktiválásához vezet, ami a T-sejtek aktiválódását és számos citokin termelését eredményezi (Ai és mtsai., 2013). A továbbiakban megvizsgáltuk a lép és tímusz sejtekben a Treg arányok változásait PMA/ionomycin stimuláció hatására, valamint az ismételt *in vivo* DX kezelést követő PMA/ionomycin stimulációt követően (9. ábra).



**9. ábra:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg sejt arányok a tímuszban és lépben *in vitro* PMA/ionomycin stimuláció hatására, ismételt nagy dózisu *in vivo* 2 napos DX kezelést követően.

PMA/ionomycin *in vitro* stimuláció hatására a tímuszban emelkedett a Treg sejtek százalékos aránya, míg a lépben csökkenés volt megfigyelhető. Az ismételt *in vivo* DX kezelés és PMA/ionomycin együttes hatására a lépben közel felére csökkent a Treg sejtek százalékos aránya. Az ábra az áramlási citometriás elemzéssel kiszámolt adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatja be (n=18). \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a tímusz és lép kezeletlen kontroll és az *in vivo* DX kezelések, valamint a tímusz *in vivo* DX és PMA/ionomycin stimuláció között. \*\*\* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$  a lép kezeletlen kontroll és a PMA/ionomycin stimuláció között; valamint a lép kontroll és az *in vivo* DX és PMA/ionomycin stimuláció között. Ábra magyarázat: stimulált = PMA/ionomycinnal *in vitro* stimulált.

Megvizsgáltuk az *in vivo* DX kezelt tímusz és lép Treg sejtek IL-10 és TGF $\beta$  citokin arányainak változásait *in vitro* PMA/ionomycin stimuláció hatására (3. táblázat).

	Tímusz		Lép	
	IL-10	TGF $\beta$	IL-10	TGF $\beta$
Kontroll	0,19 $\pm$ 0	2,7 $\pm$ 0,1	3,34 $\pm$ 0,1	2,51 $\pm$ 0,2
Stimulált	0,39 $\pm$ 0	3,01 $\pm$ 0,1	1,41 $\pm$ 0,1	4,64 $\pm$ 0,2
In vivo DX	2,22 $\pm$ 0,1	4,86 $\pm$ 0,1	1,82 $\pm$ 0,1	5,27 $\pm$ 0,2
In vivo DX/stimulált	2,26 $\pm$ 0,1	1,69 $\pm$ 0,1	2,05 $\pm$ 0,1	2,79 $\pm$ 0,1

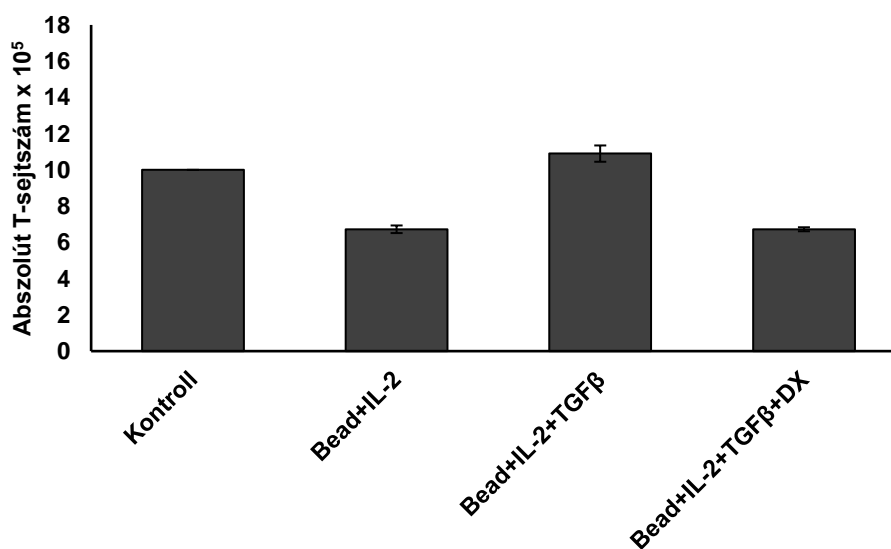
**3. táblázat:** *in vivo* 2 napos DX kezelés hatása a tímusz és lép Treg sejtek IL-10 és TGF $\beta$  citokin arányaira.

A táblázat a tímusz és lép Treg sejtekben *in vivo* ismételt DX kezelés és PMA/ionomycin *in vitro* stimuláció hatására bekövetkező IL-10 és TGF $\beta$  citokin arányában bekövetkező változásokat szemlélteti. A táblázatban az áramlási citometriás elemzéssel kiszámolt százalék adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=18). Táblázat magyarázat: stimulált = PMA/ionomycinnal *in vitro* stimulált.

Tekintettel a glukokortikoid (GC) hormonok, köztük a DX, széles körű alkalmazására és az ilyen gyógyszereknek az immunrendszer szabályozására gyakorolt hatására, a továbbiakban megvizsgáltuk a DX kezelés hatását a regulatórikus T-sejtek *in vitro* expansziójára, valamint azok citokin profiljára.

**5.2. TGF $\beta$  és DX hatása a Treg sejtek *in vitro* expansziójára**

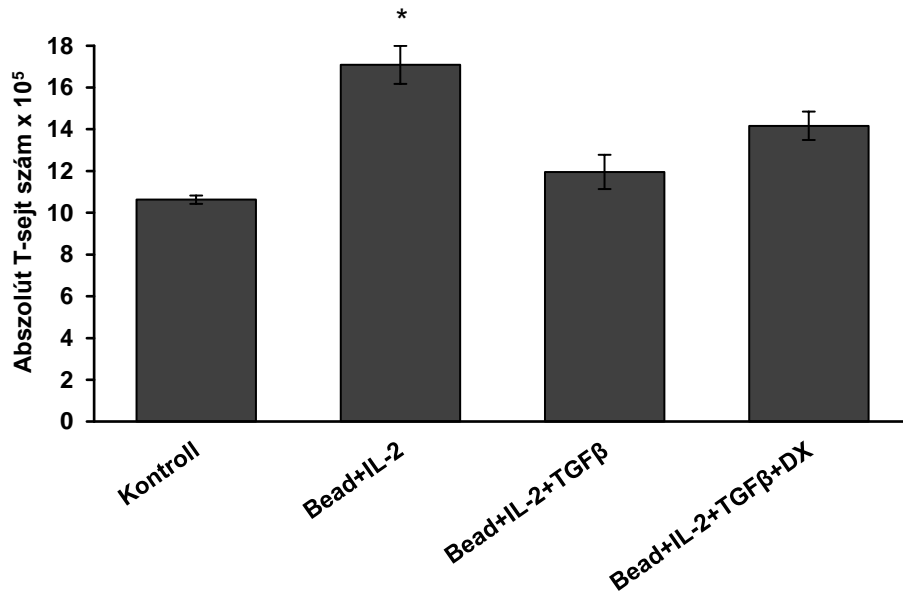
A CD4<sup>+</sup> T-sejteket 3 napig stimuláltuk T-sejt aktivátor CD3/CD28 mikrogyöngyökkel rekombináns IL-2 (rIL-2) jelenlétében, hozzáadott rekombinás TGF $\beta$  (rTGF $\beta$ ), valamint plusz DX jelenlétében is. A stimulációt követően a tímusz eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejtek esetében nem volt vagy csekély mértékű emelkedést mértünk az abszolút sejtszámokban, míg a lépből származó CD4<sup>+</sup> T-sejtek esetében proliferációt tapasztaltunk mindegyik stimulációt követően. A legmagasabb szignifikáns emelkedést az abszolút sejtszámban az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 jelenlétében figyeltünk meg (10. A. és B. ábra).



**10. A. ábra:** Abszolút tímusz sejtszámok a 3 napos *in vitro* expansziót követően.



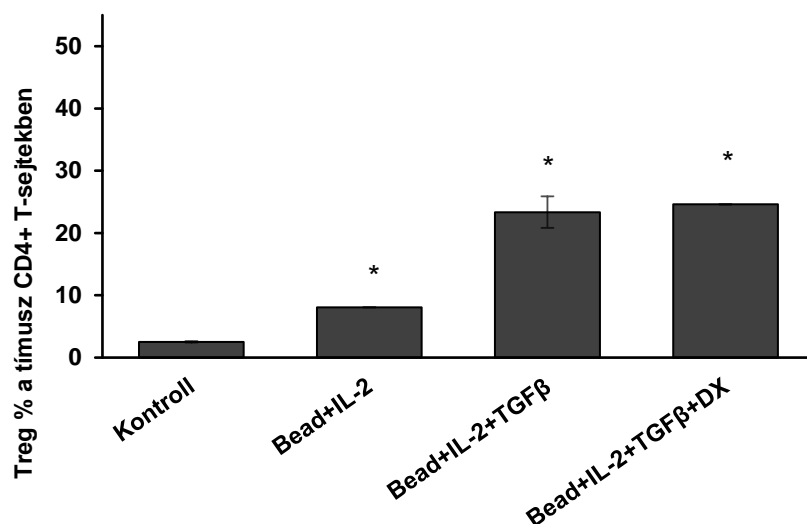
A tímusz abszolút T-sejt számok nem változtak szignifikánsan a 3 napos *in vitro* differenciációt követően anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 and + rTGF $\beta$  + DX jelenlétében. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=12).



**10. B. ábra:** Abszolút lép sejtszámok a 3 napos *in vitro* expansziót követően.

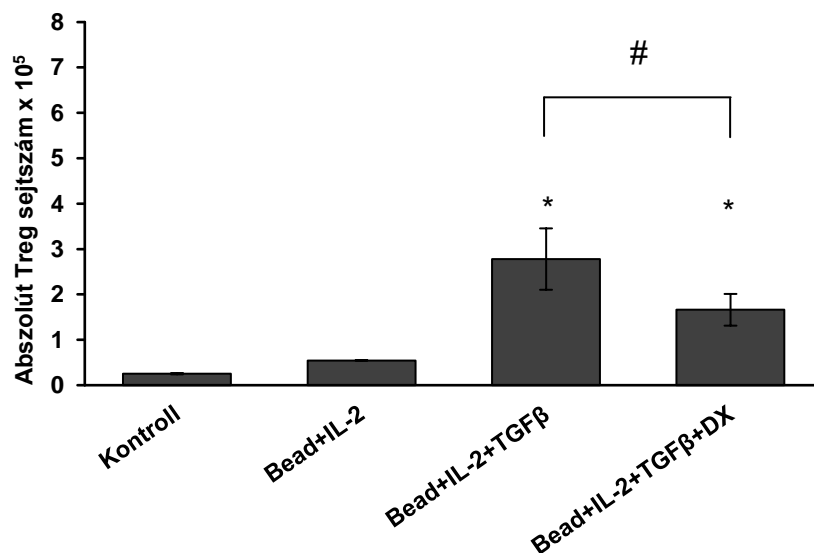
A lép abszolút T-sejt számok szignifikánsan emelkedtek a 3 napos *in vitro* differenciációt követően anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 jelenlétében. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGF $\beta$   $\pm$  DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=12).

Ezt követően fenotípusos vizsgálatokat végeztünk az *in vitro* stimulált CD4<sup>+</sup> T-sejteken áramlási citometriás mérés segítségével. A tímusz eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejtek esetében a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg sejt arány szignifikánsan emelkedett ( $23,4 \pm 1,9\%$ -ra) anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGF $\beta$  jelenlétében. Az indukált Treg sejt arány nem változott szignifikánsan a sejt kultúrák médiumhoz hozzáadott DX jelenlétében ( $24,6 \pm 0,8\%$ ) (11. A. ábra). A tímusból expandált Treg sejtek száma a legnagyobb emelkedést az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2, rTGF $\beta$  jelenlétében mutatta, DX hozzáadása nélkül (11. B. ábra).



**11. A. ábra:** A Treg sejtek expanziója tímusz CD4<sup>+</sup> T-sejtekből 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

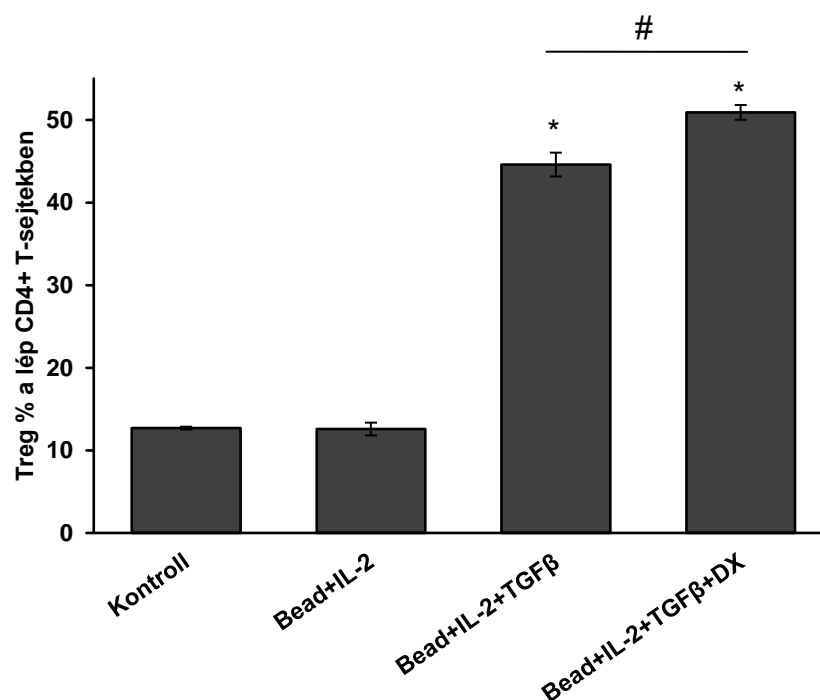
A tímusz CD4<sup>+</sup> T-sejtekből származó Treg arányok 3 napos *in vitro* expanzió után emelkedtek az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök ± rIL-2 ± rTGFβ ± DX jelenlétében. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$  a kontroll (0. nap) és kezelt minták között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=12).



**11. B. ábra:** Abszolút Treg sejtszámok a tímusz CD4<sup>+</sup> T-sejtekből 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

A tímusból származó abszolút Treg sejtszámok szignifikánsan növekedett 3 napos *in vitro* differenciálás után anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGF $\beta$   $\pm$  DX jelenlétében. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$  a kontroll (0. nap) és az eltérően kezelt minták között, # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGF $\beta$  között DX kezeléssel és hozzáadott DX nélkül. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=12).

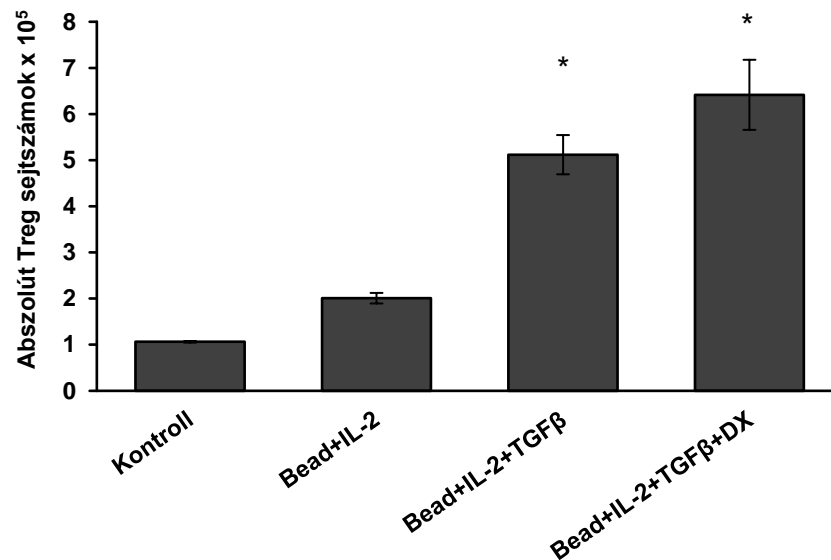
A lép CD4<sup>+</sup> T-sejtek *in vitro* expanszója során a leghatékonyabb stimulációt az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGF $\beta$  jelenlétében kaptuk. Az indukált Treg sejtek aránya  $44,6 \pm 2,9\%$ -ra emelkedett, amely további emelkedést mutatott a sejt kultúrához hozzáadott *in vitro* DX jelenlétében  $50,9 \pm 1,0\%$ . Önmagában az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök és rIL-2 jelenlétében nem detektáltunk szignifikáns *in vitro* Treg sejt expansziót (12. A. ábra). A lépéből származó indukált Treg sejtek abszolút sejtszáma szignifikánsan emelkedett az *in vitro* expanszió során anti-CD3/CD28 mikrogyöngy stimuláció és rIL-2, rTGF $\beta$  jelenlétében, amely abszolút sejtszám további emelkedést mutatott, ha DX-t is adtunk a sejt kultúrák médiumhoz (12. B. ábra).



**12. A. ábra:** A Treg sejtek expansziója lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekből 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

A lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekben a Treg sejtek aránya emelkedett 3 napos *in vitro* stimulációt követően anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead), rIL-2 és rTGF $\beta$   $\pm$  DX jelenlétében. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  a

kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 ± rTGFβ ± DX kezelések között, # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kezelések között DX jelenlétében és hiányában. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=12).



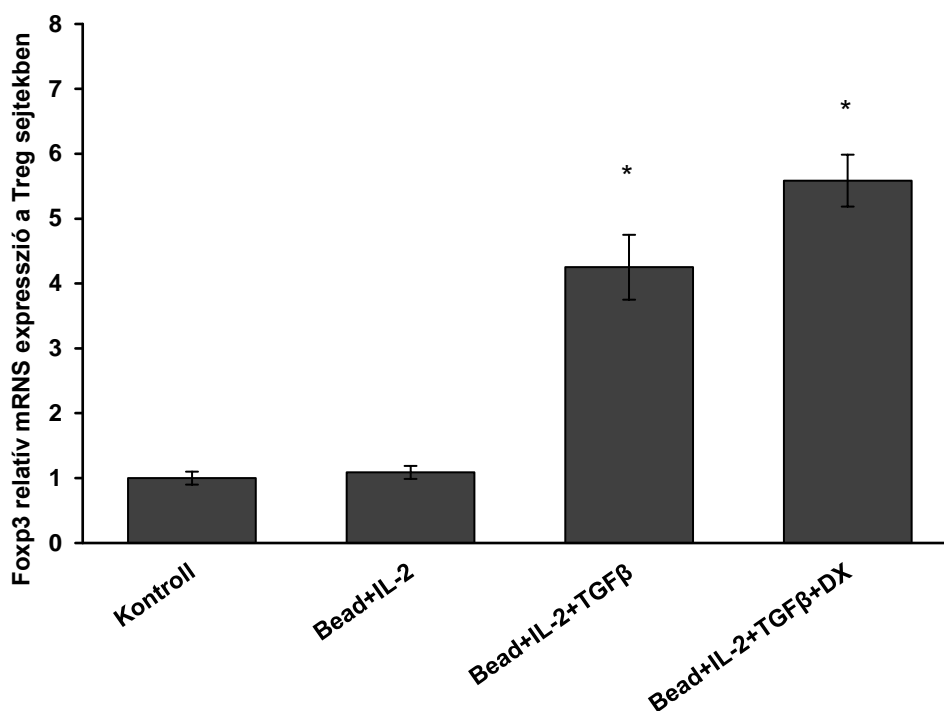
**12. B. ábra:** Abszolút Treg sejtszámok a lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekből 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

A lépből indukált Treg abszolút sejtszámok szignifikánsan emelkedett a 3 napos *in vitro* stimulációt követően anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 ± rTGFβ ± DX jelenlétében. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 ± rTGFβ ± DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=12).

### 5.3. A rekombináns TGFβ és DX upregulálja a Foxp3 expressziót a Treg sejtekben *in vitro*

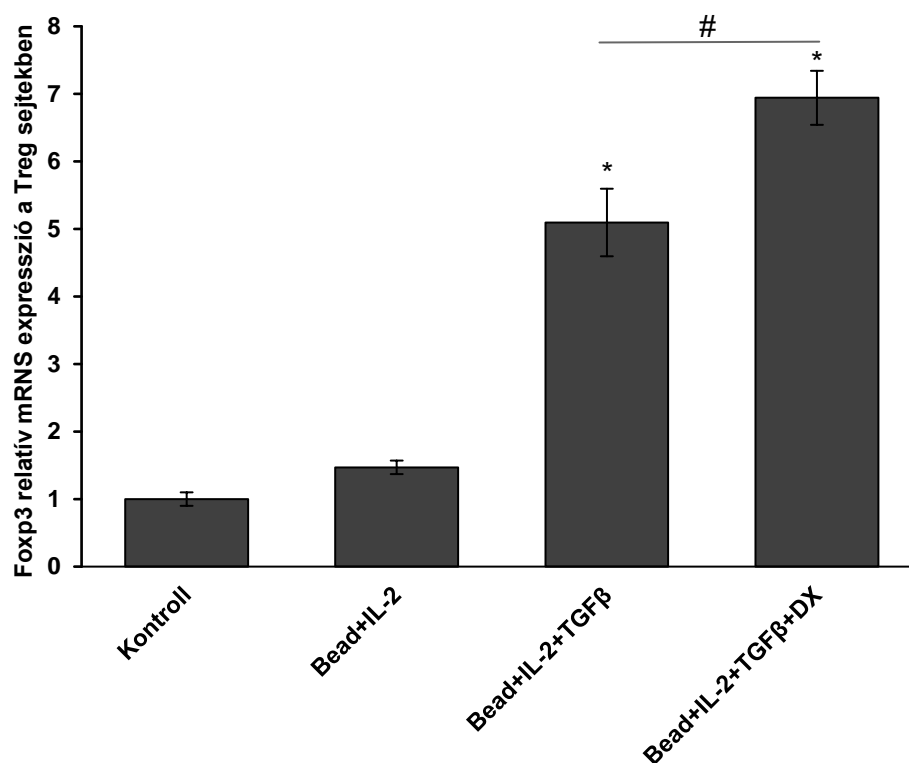
Az áramlási citometriával történt Treg expanziós mérések követően, meg akartuk vizsgálni a DX hatását a Foxp3 mRNS expresszióra az *in vitro* differenciált Treg sejtekben kvantitatív RT-PCR analízis segítségével. A tímusból *in vitro* expandált Treg sejtek esetében a Foxp3 relatív mRNS expresszió szignifikáns emelkedést mutatott az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGFβ jelenlétében. DX hozzáadása tovább emelte a Treg sejtek Foxp3 mRNS expresszióját (13. A. ábra). A lépből származó, *in vitro* generált Treg sejtekben azonos kezelési körülmények között a Foxp3 mRNS expressziójának szignifikáns emelkedését detektáltuk TGFβ jelenlétében, hasonlóan a tímusz eredetű Treg sejtekben megfigyelt

eredményekhez. Az *in vitro* DX kezelés tovább fokozta a Foxp3 mRNS expresszióját (13. B. ábra).



**13. A. ábra:** Foxp3 relatív mRNS expressziója a tímusz Treg sejtekben *in vitro* 3 napos differenciáltatást követően.

A tímusz Treg sejtekben emelkedett a Foxp3 relatív mRNS expressziója anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGFβ jelenlétében és tovább emelkedett hozzáadott DX hatására. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 ± rTGFβ ± DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be ( $n=3$ ).



**13. B. ábra:** Foxp3 relatív mRNS expressziója lép Treg sejtekben *in vitro* 3 napos differenciálást követően.

A lép Treg sejtekben emelkedett a Foxp3 relatív mRNS expressziója anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGFβ jelenlétében és tovább emelkedett hozzáadott DX hatására. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 ± rTGFβ ± DX kezelések között, # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ ± DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be ( $n=3$ ).

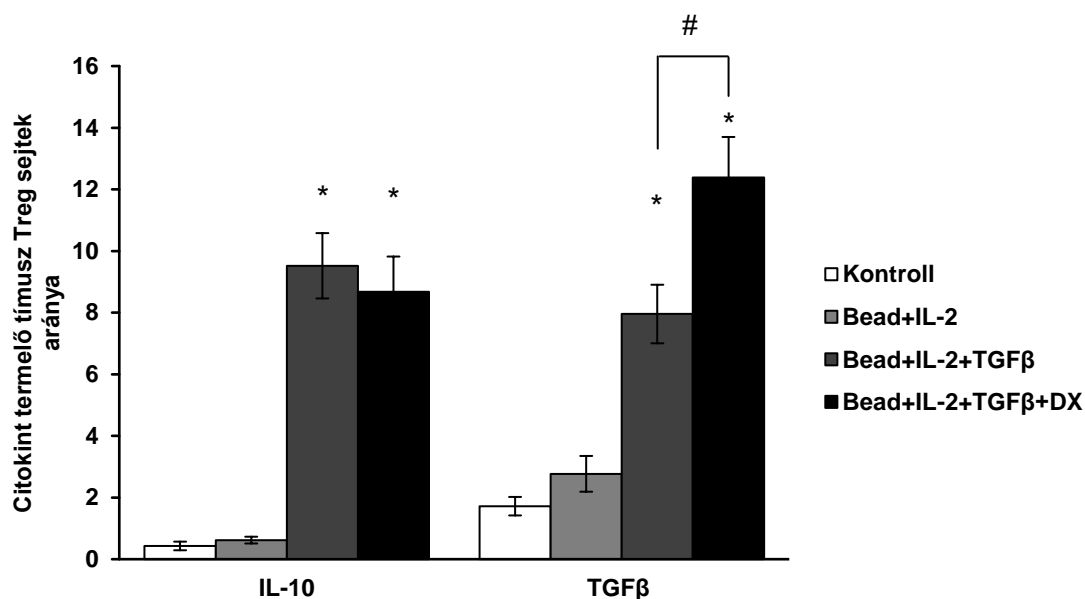
#### 5.4. *In vitro* differenciált Treg sejtek immunszuppresszív citokin termelése

Annak érdekében, hogy felmérjük a különböző kezelési körülmények Treg sejtek működésére gyakorolt hatását, először az *in vitro* indukált Treg-ek által termelt immunszuppresszív IL-10 és TGFβ citokineket mértük intracelluláris detektálással áramlási citométer segítségével. A frissen izolált kezeletlen kontroll sejtekhez képest (IL-10:  $0,4 \pm 0,1\%$ ; TGFβ:  $1,4 \pm 0,3\%$ ) szignifikánsan magasabb IL-10 ( $9,5 \pm 1,6\%$ ) és TGFβ ( $7,9 \pm 1,2\%$ ) citokin termelő Treg sejt arányt figyeltünk meg az anti-CD3/CD28 gyönggyel aktivált és differenciált tímikus Treg sejtekben. További emelkedést detektáltunk a TGFβ citokin termelő Treg-ek arányában ( $12,4 \pm 1,5\%$ ), amikor DX is jelen volt a sejt kultúrában (14. A. ábra).

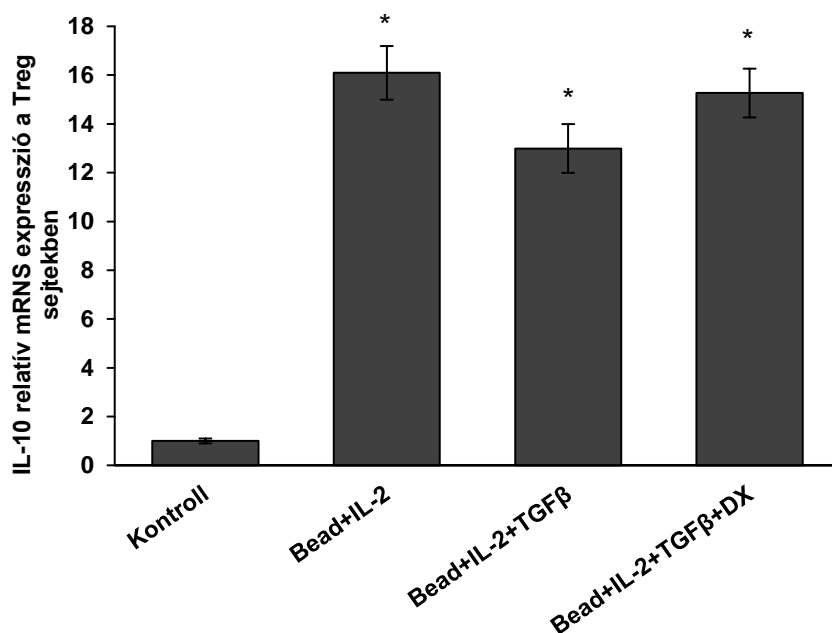
Megvizsgáltuk az IL-10 és TGFβ citokinek relatív mRNS expresszióját is a tímusból és lépéből származó CD4<sup>+</sup> T-sejtekből indukált Treg sejtekben a 3 napos *in vitro* stimulációt

követően. Megnövekedett IL-10 relatív mRNS expressziót figyelünk meg a tímusz eredetű Treg-ekben, anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök és rIL-2 jelenlétében (14. B. ábra). Rekombináns TGF $\beta$  és DX hozzáadása a sejt kultúrás médiumhoz nem okozott további emelkedést az IL-10 mRNS szintekben. A TGF $\beta$  relatív mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett, amikor DX is jelen volt a sejt kultúrás médiumban a CD3/CD28 aktivátor mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGF $\beta$  mellett (14. C. ábra).

**14. ábra:** Tímusz Treg sejtek citokin expressziója 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

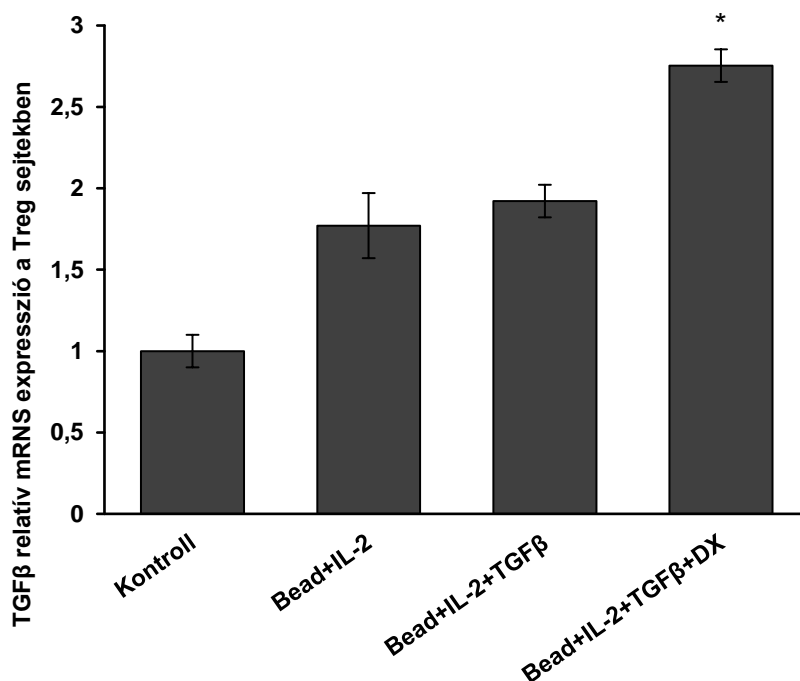


**14. A. ábra:** Tímusz Treg sejtek citokin expressziója 3 napos *in vitro* stimulációt követően. A Treg sejtekben az IL-10 és TGF $\beta$  citokinek aránya szignifikáns emelkedést mutatott anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGF $\beta$   $\pm$  DX jelenlétében. A DX hozzáadása tovább emelte a TGF $\beta$  expresszióját. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGF $\beta$   $\pm$  DX kezelések között, # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a DX kezelt és kezeletlen sejt kultúrák között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be ( $n=8$ ).



**14. B. ábra:** Tímusz Treg sejtek IL-10 relatív mRNS expressziója 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

A tímusz Treg sejtekben az IL-10 relatív mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett a 3 napos *in vitro* stimulációt követően mindegyik kezelési kondíció hatására a kontrollhoz (0. nap) képest. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és különböző kezeléseket között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be ( $n=4$ ).



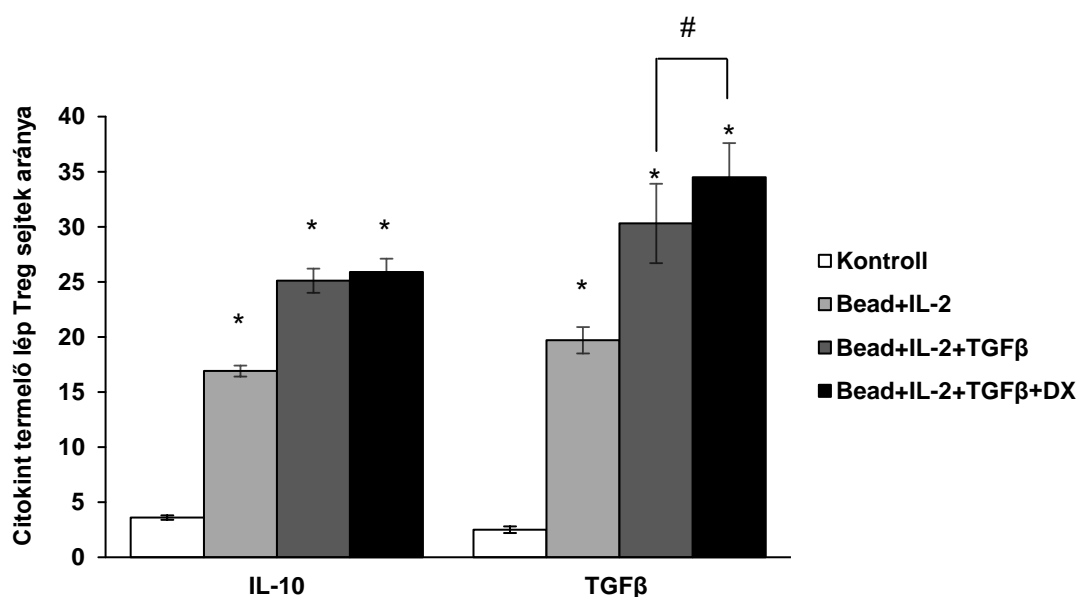
**14. C. ábra:** Tímusz Treg sejtek TGFβ relatív mRNS expressziója 3 napos *in vitro* stimulációt követően.



A TGF $\beta$  relatív mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX jelenlétében 3 napos *in vitro* stimulációt követően a kontrollhoz (0. nap) képest a tímusz Treg sejtekben. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és anti-CD3/CD28 gyöngyök + rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=4).

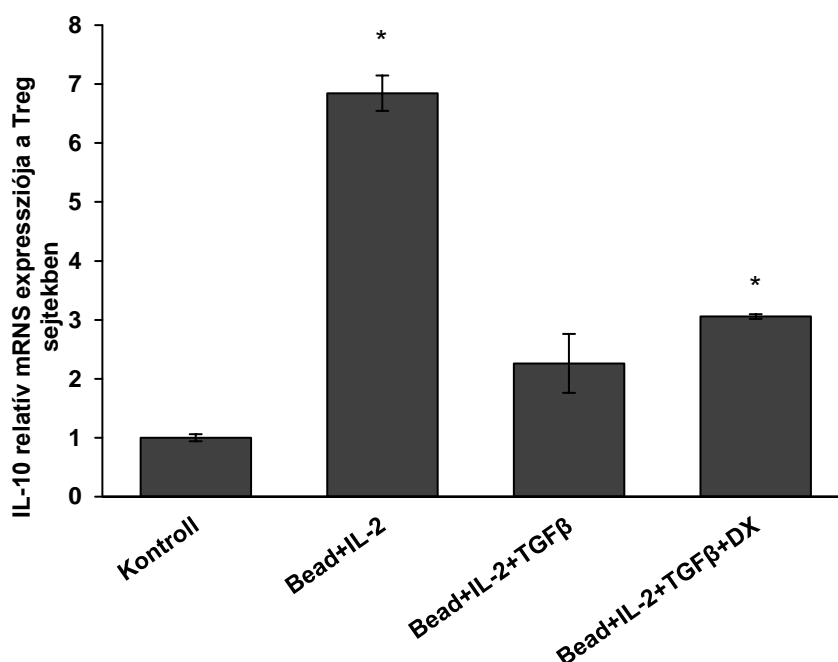
Meghatároztuk a kezeletlen és a különböző körülményekben történő differenciálás hatására bekövetkező citokinek arányát a lép eredetű Treg sejtekben áramlási citometriás méréssel. A frissen lépből izolált kontroll CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg sejtekben az IL-10 termelő sejtek aránya  $3,6 \pm 0,2\%$ , míg a TGF $\beta$  aránya  $2,5 \pm 0,3\%$  volt. 3 napos *in vitro* expansziót követően a lép eredetű Treg sejtek immunszuppresszív citokin termelő aránya emelkedett anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök és rIL-2 jelenlétében (IL-10:  $16,9 \pm 0,5\%$  TGF $\beta$ :  $19,7 \pm 1,2\%$ ), amely további emelkedést mutatott rTGF $\beta$  hozzáadása esetén (IL-10:  $25,1 \pm 1,1\%$  TGF $\beta$ :  $30,3 \pm 3,6\%$ ). DX jelenlétében enyhe további emelkedés volt mérhető a TGF $\beta$  arányában (IL-10:  $25,9 \pm 1,2\%$ , TGF $\beta$ :  $34,5 \pm 3,1\%$ ) (15. A. ábra). Megvizsgáltuk a citokinek relatív mRNS expresszióját. A lépből származó Treg sejtekben szignifikáns IL-10 emelkedést figyeltünk meg mindegyik kezelési kombináció esetében, amely legmagasabb az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök és rIL-2 jelenlétében volt (15. B. ábra). Egyik sejt kultúrás kezelés sem indukált szignifikáns változásokat a TGF $\beta$  relatív mRNS expressziójában a lépből expandált Treg sejtekben (15. C. ábra).

**15. ábra:** Lép Treg sejtek citokin expressziója a 3 napos *in vitro* stimulációt követően.



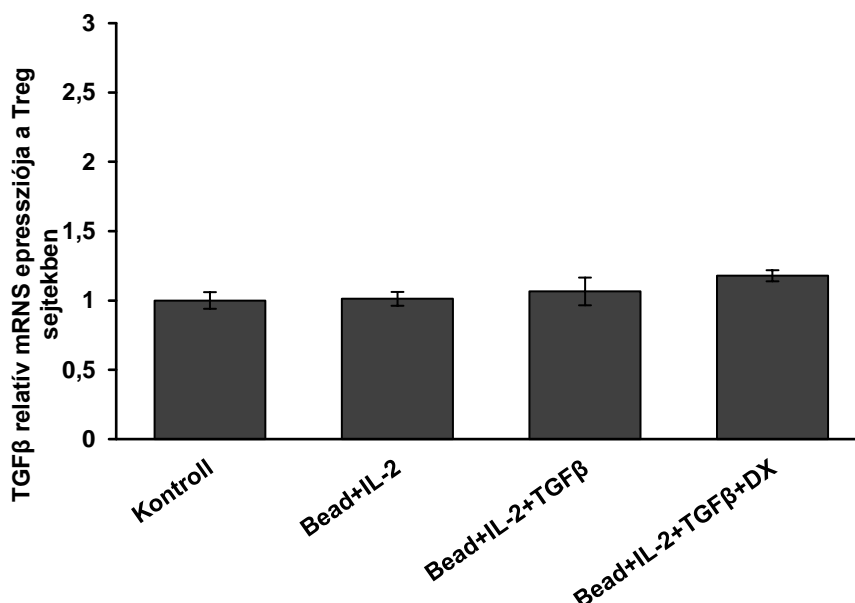
**15. A. ábra:** IL-10 és TGF $\beta$  citokin termelő lép CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg arányok.

A Treg sejtekben az IL-10 és TGF $\beta$  citokinek aránya szignifikáns emelkedést mutatott minden kezelési körülmény hatására a kontroll (0. nap) sejtekhez viszonyítva. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogöngyök (Bead)  $\pm$  rIL-2  $\pm$  rTGF $\beta$  kezelések között, # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  az anti-CD3/CD28 göngyök + rIL-2 és a hozzáadott + rTGF $\beta$   $\pm$  DX kezelt sejt kultúrák között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be ( $n=8$ ).



**15. B. ábra:** Lép Treg sejtek IL-10 relatív mRNS expressziója 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

A lép Treg sejtekben az IL-10 relatív mRNS expressziója emelkedett a 3 napos *in vitro* stimulációt követően mindegyik kezelési kondíció hatására a kontrollhoz (0. nap) képest. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 göngyök + rIL-2 és + rTGF $\beta$  + DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be ( $n=4$ ).



**15. C. ábra:** Lép Treg sejtek TGFβ relatív mRNS expressziója 3 napos *in vitro* stimulációt követően.

A TGFβ relatív mRNS expressziója nem változott szignifikánsan a 3 napos *in vitro* expenziót követően a kontrollhoz (0. nap) képest. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) mutatjuk be (n=4).

#### 5.5. Az *in vitro* Treg sejt expenziója nem okoz Th1, Th2, Th17 irányú citokin termelést

Az immunszuppresszív IL-10 és TGFβ citokinek mellett a következőkben megvizsgáltuk a különböző T-sejt alcsoportokhoz tartozó Th1-típusú IFN $\gamma$ , Th2-típusú IL-4 és Th17-típusú IL-17 citokineket az *in vitro* differenciált CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> lép Treg sejtekben anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök és rIL-2  $\pm$  rTGFβ  $\pm$  DX jelenlétében. Az IFN $\gamma$  expresszáló Treg-ek aránya 1,02% volt a kontroll mintákban, az *in vitro* differenciációt és expenziót követően egyik kezelési kombinációban sem volt detektálható a citokin. Az IL-17 termelő Treg sejtek aránya 0,72% a kiindulási CD4<sup>+</sup> T-sejtekben, amely az *in vitro* expenziót követően lecsökkent a CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2  $\pm$  rTGFβ  $\pm$  DX jelenlétében egyaránt. Az IL-4 termelő Treg-ek aránya 0,04% a kontroll sejtekben, amely emelkedett 0,4%-ra az *in vitro* anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ stimuláció hatására, azonban nem volt detektálható, amikor DX is jelen volt a sejt kultúrás médiumban (5. táblázat).

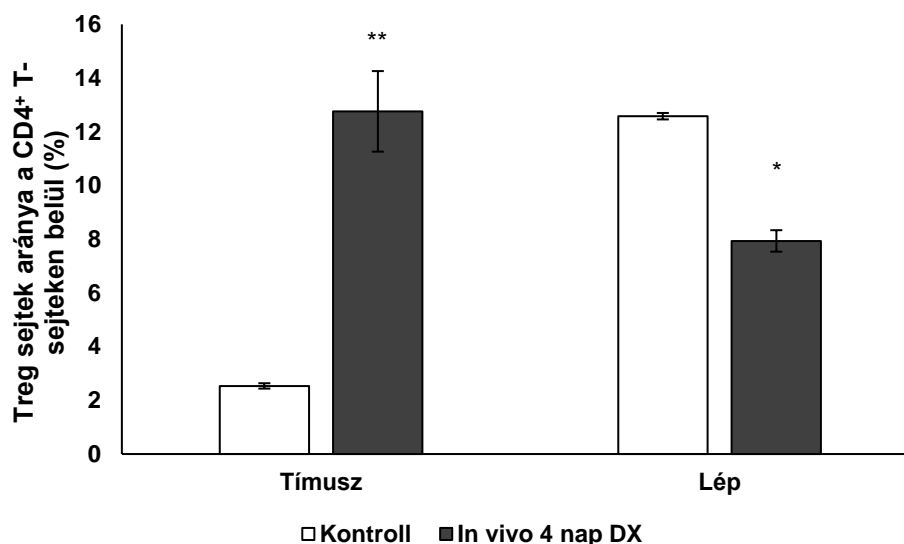
Lép	IL-10	TGFβ	IFNγ	IL-4	IL-17
Kontroll	3,64 ± 0,1	2,52 ± 0,2	1,02 ± 0,1	0,04 ± 0,01	0,72 ± 0,02
CD3/CD28 + rIL-2	16,9 ± 0,1	19,72 ± 0,1	0	0,3 ± 0,04	0,26 ± 0,04
CD3/CD28 + rIL-2 + rTGFβ	25,1 ± 0,1	30,37 ± 1,9	0	0,4 ± 0,07	0,04 ± 0,01
CD3/CD28 + rIL-2 + rTGFβ + DX	25,93 ± 0,4	34,52 ± 0,9	0	0	0,11 ± 0,02

**5. táblázat:** Citokin termelő lép Treg sejtek aránya 3 napos *in vitro* differenciációt követően.

A mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (± SEM) ábrázoltuk (n=4).

#### 5.6. Az *in vivo* DX előkezelés hatása a Treg sejtek *in vitro* differenciációjára

Az intézetünkben végzett korábbi kutatásban megvizsgáltuk a nagy dózisos terápia GC hormon analógok hatását a tímusz Treg és lép Treg sejtekre, amelyek kulcsszerepet játszanak a fizioiógias immunszupresszióban. Igazoltuk, hogy a perifériás Treg sejtek érzékenyek a nagy dózisos (20 mg/kg) DX kezelésre, ezzel elletében a tímikus Treg sejtek rezisztensnek bizonyultak. Mindkét perifériás és tímusz túlélő Treg-ek esetében emelkedett IL-10 és TGFβ citokin expresszió volt megfigyelhető (Ugor és mtsai., 2018). A korábbi eredményekre alapozva, kíváncsiak voltunk, hogy a kísérleti állatok *in vivo* DX előkezelése hogyan befolyásolja az *in vitro* Treg differenciációt a CD4<sup>+</sup> T-sejtekből. Először összehasonlítottuk a tímusz és lép CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg arányokat a kontroll állatok és a DX előkezelt állatok között. Az *in vivo* 4 napos ismételt nagy dózisos DX kezelés szignifikánsan emelkedett tímusz Treg százalékos arányt váltott ki, miközben a lépben ellentétes hatást figyeltünk meg (16. ábra).

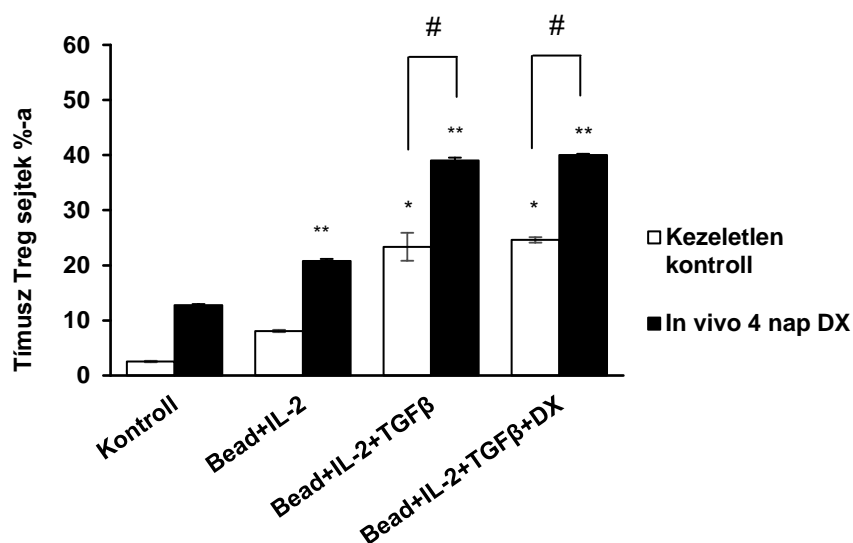


**16. ábra:** *In vivo* DX hatása a CD4<sup>+</sup> tímusz és lép T-sejtekben a Treg arányokra.

A tímikus Treg sejtek aránya szignifikánsan emelkedett 4 napos ismételt nagy dózisú (20 mg/kg) *in vivo* DX kezelés hatására, ezzel szemben a lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekben szignifikánsan csökkent a Treg sejtek aránya. \*\* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$ , \* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  a kezeletlen kontroll és az *in vivo* DX kezelt állatok között. A mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk ( $n=4$ ).

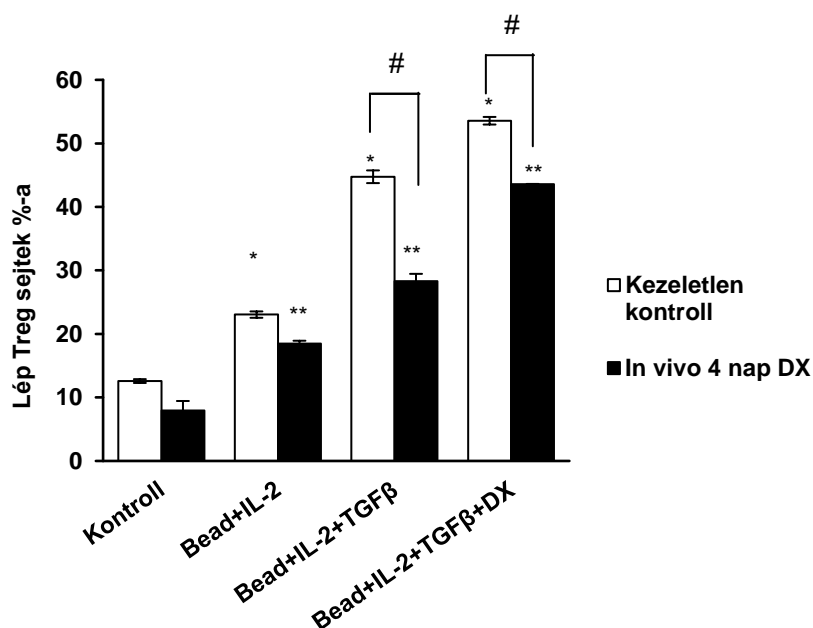
Az *in vivo* DX előkezelte T-sejtek funkcionális változásainak meghatározásához, megmértük a CD4<sup>+</sup> T-sejtek *in vitro* differenciálódási potenciálját, abból a célból, hogy nagyobb számú Treg sejtet generálhassunk. A vizsgálathoz a korábbi az *in vitro* sejt kultúrás rendszer (anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2  $\pm$  rTGF $\beta$   $\pm$  DX) segítségével a 4 napig *in vivo* DX előkezelte állatok tímuszából és lépéből izolált CD4<sup>+</sup> T-sejteket stimuláltuk *in vitro*. A tímusz eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejtekben az *in vivo* nagy dózisú DX előkezelés emelkedett Treg sejt expansziót indukált anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök  $\pm$  rIL-2  $\pm$  rTGF $\beta$   $\pm$  DX jelenétében a kezeletlen állatokból izolált CD4<sup>+</sup> T-sejtekhez viszonyítva (17. A. ábra). A tímusz eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejtekhez képest a lép eredetű CD4<sup>+</sup> T-sejtek *in vitro* differenciálódása kevésbé kifejezett emelkedést okozott a kezeletlen állatokból izolált kontroll sejtekhez viszonyítva, mindegyik kezelési kondícióban (17. B. ábra).

**17. ábra:** Az egerek *in vivo* 4 napos DX kezelésének hatása az *in vitro* expandált tímusz és lép Treg sejtekre.



**17. A. ábra:** *In vivo* DX hatása a tímusz Treg arányokra.

A tímusz eredetű sejtekben, a 4 napos *in vivo* DX kezelését követően az *in vitro* 3 napos stimuláció hatására emelkedett az indukált Treg sejtek aránya anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 ± rTGFβ ± DX jelenlétében a kontrollhoz (0. nap) viszonyítva. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ ± DX kezelések között, \*\* az jelzi, hogy  $p < 0,01$  az *in vivo* 4 napos DX kezelt minták kontroll minták (0. nap) és az anti-CD3/CD28 gyöngyökkel + rIL-2 ± rTGFβ ± DX- kezelés között, # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kezeletlen és az *in vivo* DX kezelt állatok között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk ( $n=4$ ).



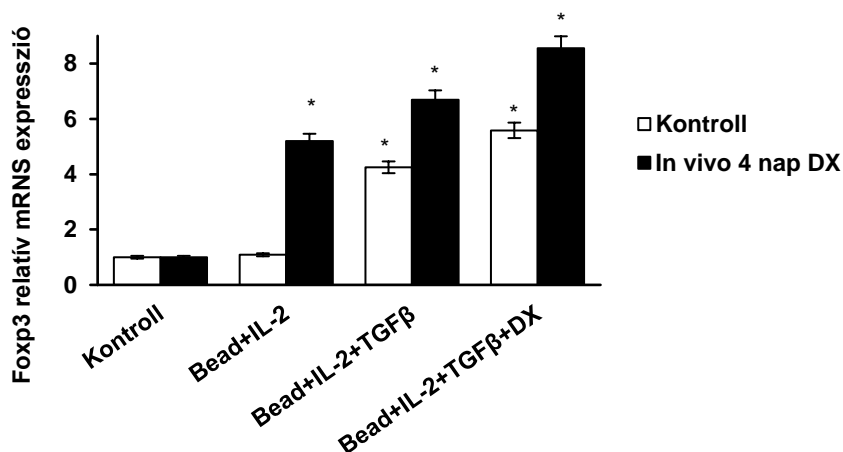
**17. B. ábra:** *In vivo* DX hatása a lép Treg arányokra.

*In vivo* 4 napos DX kezelés hatása a lép CD4<sup>+</sup> T-sejtek *in vitro* differenciációjára. A Treg arányok 3 napos *in vitro* expanziót követően emelkedtek anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 ± rTGFβ ± DX jelenlétében. Az *in vivo* 4 napos DX előkezelés alacsonyabb Treg arányt eredményezett a lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekből származtatva anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 ± rTGFβ ± DX jelenlétében. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,001$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 ± rTGFβ ± DX kezelések között; \*\* az jelzi, hogy  $p < 0,01$  az *in vivo* 4 napos DX-nal kezelt minták és az *in vivo* DX kezelt anti-CD3/CD28 mikrogyöngyökkel (Bead) + rIL-2 ± rTGFβ ± DX stimuláció között; # azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  az *in vivo* DX kezelt és a kezeletlen kontroll állatok között, amikor a T-sejteket anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ ± DX jelenlétében expandáltattuk. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk ( $n=4$ ).

Mivel a tímusz emelkedett Treg sejt arányt mutatott a magas dózisú DX előkezelést követően, megvizsgáltunk a DX hatását a Foxp3, IL-10 és TGFβ relatív mRNS expressziójára a tímuszból származó indukált Treg sejtekben. Az *in vivo* DX előkezelt állatokból izolált CD4<sup>+</sup> T-sejtekből *in vitro* expandált Treg sejtekben mindegyik kezelési kondíció hatására emelkedett a Foxp3 mRNS relatív expressziója (18. A. ábra). Ezen Treg sejtek funkcionális aktivitásának vizsgálata azt mutatta, hogy az *in vivo* DX előkezelés csökkent expressziót okozott az immunszuppresszív citokinek relatív mRNS expressziójában. A változás a legszembetűnőbb az IL-10 mRNS expressziója esetén volt (18. B. ábra), miközben a TGFβ mRNS expressziója csekély mértékben csökkent vagy nem változott (18. C. ábra). A kontroll sejtekhez képest a

TGF $\beta$  relatív mRNS expressziójának szignifikáns csökkenését csak azokban az *in vitro* expandált Treg sejtek esetében tapasztaltunk, ahol *in vivo* és *in vitro* DX is jelen volt a sejt kultúrában.

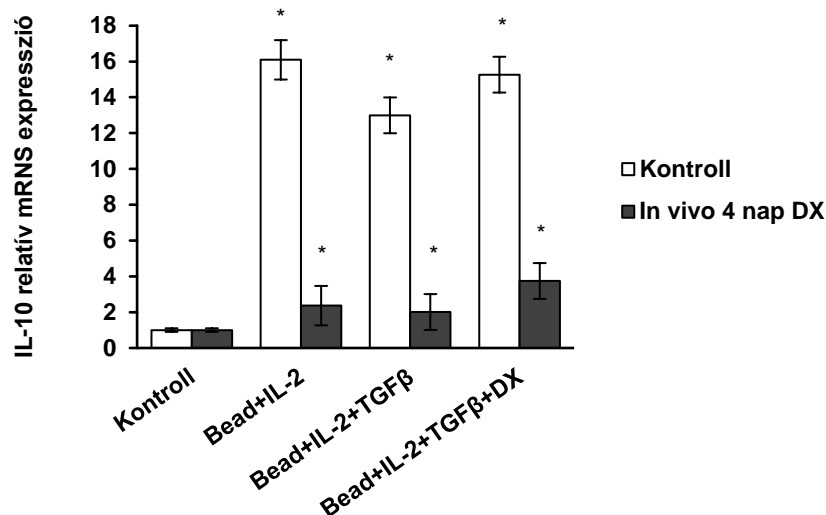
**18. ábra:** Foxp3, IL-10 és TGF $\beta$  relatív mRNS expressziók a kontroll és az *in vivo* 4 napos DX kezelt tímusz Treg sejtekben 3 napos *in vitro* differenciációt követően.



**18. A. ábra:** *In vivo* DX hatása a tímusz Treg arányokra.

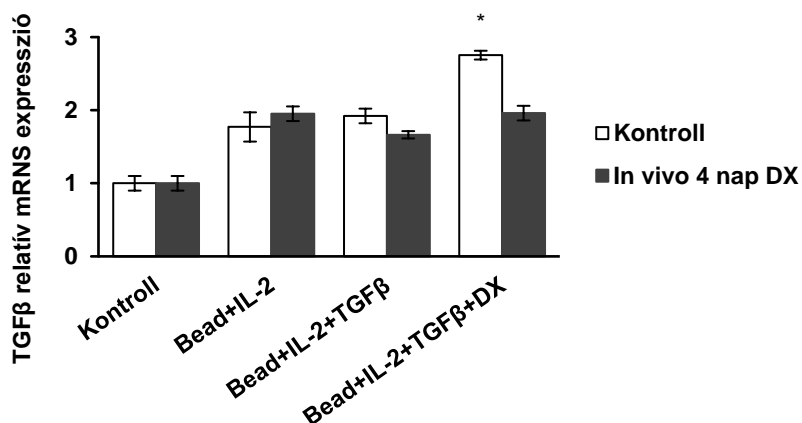
A Foxp3 relatív mRNS expressziók a tímusz Treg sejtekben emelkedtek a kezeletlen állatokból 3 napos *in vitro* expanziót követően anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2  $\pm$  rTGF $\beta$   $\pm$  DX jelenlétében és további emelkedést mutattak a DX előkezelt CD4<sup>+</sup> T-sejtekből differenciáltatva. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2  $\pm$  rTGF $\beta$   $\pm$  DX kezelések között a DX előkezelt és kezeletlen kontroll mintákból. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk (n=4).





**18. B. ábra:** IL-10 relatív mRNS expressziója tímusz Treg sejtekben.

Az IL-10 mRNS relatív expressziója egyaránt emelkedett a kezeletlen és az *in vivo* 4 nap DX kezelt tímusz Treg sejtekben a 3 napos *in vitro* expansziót követően anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGFβ ± DX jelenlétében a kiindulási kontrollokhoz (0. nap) viszonyítva. Az *in vivo* DX elkezelés lényeges csökkenést okozott az IL-10 relatív mRNS expressziókban minden további *in vitro* kezelési kondíció esetén. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ ± DX kezelések között, valamint az *in vivo* DX kezelt és az anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ ± DX kezelt minták között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábráztuk ( $n=4$ ).



**18. C. ábra:** TGFβ relatív mRNS expressziója tímusz Treg sejtekben.

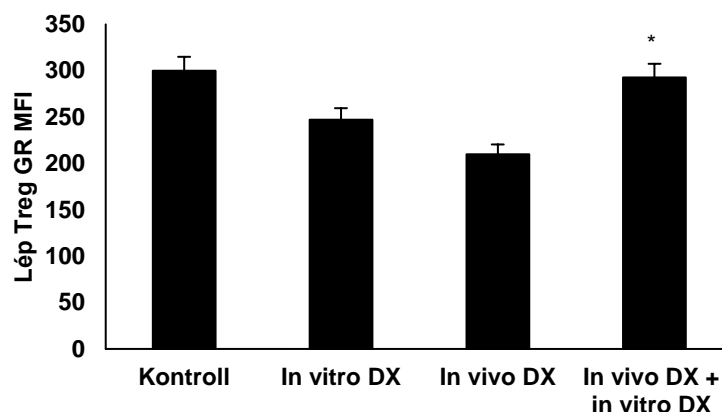
A TGFβ relatív mRNS expressziója a tímusz Treg sejtekben nem változott a 3 napos *in vitro* expansziót követően, kivéve a kezeletlen állatból CD3/CD28 mikrogyöngyök + rIL-2 + rTGFβ + DX jelenlétében

differentiáltatott sejtek esetében. A 4 napos *in vivo* DX előkezelése az állatoknak nem befolyásolta a TGF $\beta$  relatív mRNS expresszióját az *in vitro* expanszió során. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  a kontroll (0. nap) és az anti-CD3/CD28 mikrogöngyök (Bead) + rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX kezelés között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk ( $n=4$ ).

## 5.7. DX hatása a GR és Foxp3 expresszióra

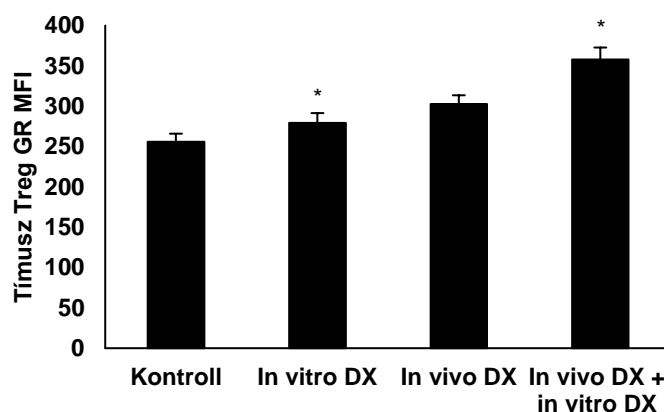
Az endogén glukokortikoidok (GC) számos fiziológiai folyamatot szabályoznak. A glukokortikoid receptorok (GR) az egész testben expresszálódnak, de a GC érzékenység és az indukált biológiai válaszok jelentős heterogenitást mutatnak a szövetekben, a különböző sejteken expresszáló GR szintje meghatározza a sejtek GC érzékenységét (Cain és Cidlowski, 2015; Ramamoorthy és Cidlowski, 2013). A GC kezelés által indukált GR expresszió emelkedését Intézetünk korábban leírta DP tímusz sejtekben és a GR expresszió csökkenését érett és SP T-sejtekben humán és eger mintákban egyaránt (Berki és mtsai., 2002, Boldizsar és mtsai., 2006.) A GC hormonra érzékeny DP timocitákban a DX kezelés hatására a sejtmagból a GR mitokondriális transzlokációja következik be, amely arra utalhat, hogy a receptor expressziós színjének változása mellett a GR elhelyezkedése is befolyásolja a sejtek túlélését. Munkacsoportunk korábbi kísérleteiből kiderült, hogy az ismételt nagy dózisú *in vivo* DX kezelés hatására a tímusz eredetű Treg sejtekben emelkedik a GR fluoreszcencia intenzitása (MFI), míg a kontroll állatok lép Treg sejteiben a mért magasabb GR MFI az *in vivo* 2 napos ismételt DX kezelés következtében csökken (Ugor és mtsai., 2018).

A lépből és a tímuszból származó CD4<sup>+</sup> T-sejtekben a 3 napos *in vitro* Treg sejt expansziók során a sejt kultúrák médiumában jelenlévő *in vitro* DX fokozta a Foxp3<sup>+</sup> Treg sejtek arányát mindkét szervből származó T-sejtekben. Ennek okán kíváncsiak voltunk az *in vitro* DX hatására a kezeletlen kontroll és az *in vivo* ismételt DX kezelt lép és tímusz Treg sejtekben a GR-ra. Az *in vitro* DX kezelés hatására emelkedett az *in vivo* DX kezelt lép Treg sejtekben a GR MFI (19. ábra). A tímusz Treg sejtek esetében a korábbi mérésekhez hasonlóan csökkent az *in vivo* DX ismételt kezelés hatására a GR MFI, azonban az *in vitro* DX kezelés hatására emelkedő tendencia figyelhető meg mind a kontroll, mind pedig az *in vivo* ismételt DX kezelt tímusz Treg sejtek GR átlag fluoreszcencia intenzitásában (20. ábra).



**19. ábra:** Lép eredetű Treg sejtek GR expressziója

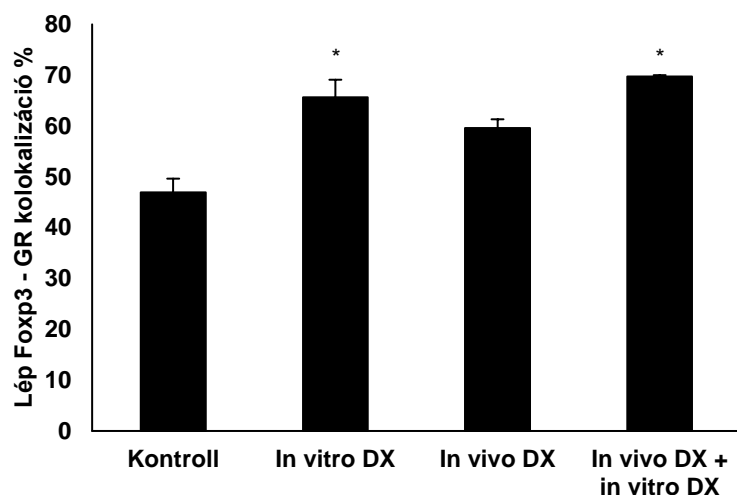
Az ismételt *in vivo* DX kezelt lép Treg sejtek GR átlag fluoreszcencia intenzitása emelkedett *in vitro* DX kezelés hatására. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,01$  az *in vivo* DX kezeléshez képest. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk (n=8).



**20. ábra:** Tímusz eredetű Treg sejtek GR expressziója

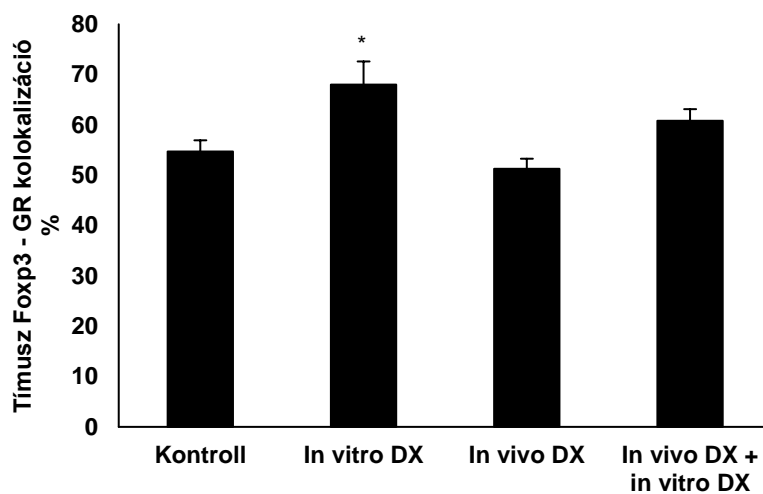
Az *in vitro* DX kezelés hatására emelkedik a kontroll és az *in vivo* DX kezelt tímuszból származó Treg sejtek GR átlag fluoreszcencia intenzitása. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll és *in vitro* DX, valamint az *in vivo* DX és az *in vivo* + *in vitro* DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk (n=8).

A továbbiakban konfokális mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk a Foxp3 és GR kolokalizációját a kezeletlen kontroll és az *in vivo* DX kezelt Treg sejtekben hozzáadott *in vitro* DX jelenlétében (21-23. ábra).



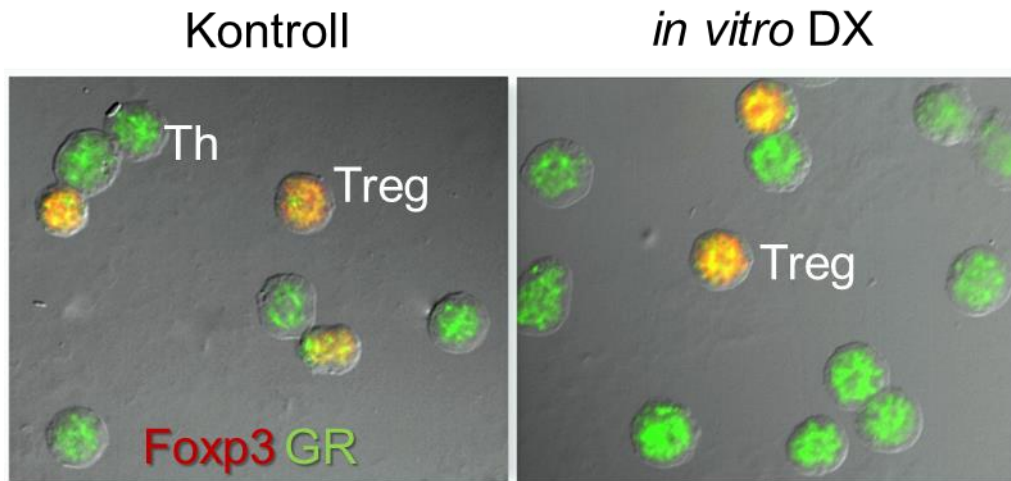
**21. ábra:** Foxp3 GR kolokalizáció lép Treg sejtekben.

Az *in vitro* DX kezelés hatására emelkedik a kontroll és az *in vivo* DX kezelt lépből származó Treg sejtekben a Foxp3 kolokalizációja a GR-hoz. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll és *in vitro* DX, valamint az *in vivo* DX és az *in vivo* + *in vitro* DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk (n=8).



**22. ábra:** Foxp3 – GR kolokalizáció tímusz Treg sejtekben.

Az *in vitro* DX kezelés hatására emelkedik a kontroll és az *in vivo* DX kezelt tímuszból származó Treg sejtekben a Foxp3 kolokalizációja a GR-hoz. \* azt jelzi, hogy  $p < 0,05$  a kontroll és az *in vitro* DX kezelések között. A diagramon a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk (n=8).



**23. ábra:** Foxp3 – GR kolokalizáció tímusz  $CD4^+$  T-sejtekben.

Reprezentatív kép a konfokális mikroszkópos felvételekből a Foxp3 – GR kolokalizációról  $CD4^+$  pozitív T-sejt populációban.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunk során optimalizálni szeretnénk volna a megfelelő feltételeket a Treg sejtek *in vitro* differenciálódásához és expanziójához tímusz és lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekből. A Treg sejtek az immunszabályozás és az immunológiai tolerancia fenntartásának elengedhetetlen közvetítői, és mint ilyenek, számos betegség szempontjából kulcsfontosságú terápiás célpontok (Danikowski és mtsai., 2017; Kawai és mtsai., 2018; Li és mtsai., 2018; Romano és mtsai., 2017; Sakaguchi és mtsai., 2008). A Treg sejtek adoptív transzfer terápiája egy feltörekvő terület, amelynek célja a nem kívánt, a túlzott vagy a patológiás immunreakciók megfékezése. Ahhoz, hogy az adoptív Treg sejt terápiák sikeresek legyenek, magas hatékonyságú, tisztaságú és hozamú, jól jellemzett Treg sejtekre van szükség (Safinia és mtsai., 2015; Vaikunthanathan és mtsai., 2018). Kísérleteink során fontos szempont volt az a tény, hogy a Treg sejtek az immunológiai kutatás élvonalában vannak, valamint, hogy a glukokortikoid (GC) hormon analógok a legfontosabb gyógyszerek között vannak a gyulladásos és autoimmun betegségek, allergiák, valamint a szervátültetések és rosszindulatú daganatokban szenvedők kezelésében (Cain and Cidlowski, 2017). A glukokortikoidok immunszabályozó tulajdonságait a klinikán gyulladásos és autoimmun betegségek, valamint bizonyos rosszindulatú hematológiai daganatok kezelésére használják ki, de a káros mellékhatások nehezítik a hosszan tartó használatot. A glukokortikoid kezelés élettani hatásait meghatározó molekuláris események teljes megértése betekintést nyújt az optimális glukokortikoid kezelésekre, a betegek glukokortikoid érzékenységeinek megbízható felmérésébe, és előmozdíthatja az új GR agonisták kifejlesztését, amelyek immunszuppresszív hatást fejtenek ki, miközben elkerülik a káros mellékhatásokat. Annak ellenére, hogy mindkét irányban van érdeklődés, a GC analógoknak a Treg sejtekre gyakorolt hatására vonatkozó információk *in vivo* és *ex vivo* (*in vitro*) körülmények között viszonylag ritkák. Csak maroknyi tanulmány jelent meg, amelyek mindkét témával átfogóan foglalkoznak, köztük néhány látszólag ellentmondásos eredményekkel (Chen és mtsai., 2003; 2016; Olsen és mtsai., 2015; Zhang és mtsai., 2018; Jørgensen és mtsai., 2019; Bruscoli és mtsai., 2021).

A munkánk elsődleges célja az volt, hogy meghatározzuk azokat a feltételeket, amelyek között a Treg sejtek robusztusan gyarapíthatók. Feltártuk az anti-CD3/CD28 stimulációnak, rekombináns IL-2-vel és rTGFβ-val történő stimulációnak, valamint a hozzáadott DX vagy nélküle történő hatását a CD4<sup>+</sup> T-sejtek differenciálódására, a Treg-vonal elkötelezettségére (Foxp3 expresszió) és az immunszuppresszív citokinek termelésére, amelyek fontos tényezők a Treg sejtek funkcionális meghatározásához.

Összehasonlítottuk a frissen izolált lép és tímusz CD4<sup>+</sup> T-sejteket, differenciáltatást alkalmaztunk különböző kondíciók segítségével. A sejtek legjobb expansziója a lépből származó T-sejtek esetében volt megfigyelhető anti-CD3/CD28 és rIL-2 jelenlétében, körülbelül 70%-os relatív emelkedés a sejtszámban. Amikor a Treg sejtek relatív arányát és abszolút sejtszámát megvizsgáltuk a CD4<sup>+</sup> T-sejtpopulációban a stimulációs rend függvényében, szignifikáns növekedést tapasztaltunk a Treg sejtek százalékában és az abszolút sejtszámban mind a tímusz, mind a lép eredetű Treg sejtekben, az *in vitro* anti-CD3/CD28 stimulálás hatására rIL-2 + rTGFβ és rIL-2 + rTGFβ + DX jelenlétében (Pap és mtsai., 2019). Ezzel összefüggésben Hippen és munkatársai beszámoltak egy nagy *ex vivo* humán természetes Treg sejt expanszióról perifériás vérből izolált sejtekből (Hippen és mtsai., 2011). A DX modellbe történő beépítése releváns lehet a GC hormonok immunrendszerben játszott komplex szerepének további megismerésében (Bereshchenko és mtsai., 2018; Cain és Cidlowski, 2017; Quatrini és mtsai., 2021; Li és mtsai., 2023).

A Foxp3 relatív mRNS szintek növekedtek a rIL-2 + rTGFβ kezeléssel és további növekedést mutattak, amikor DX-t adtunk a sejt kultúrákhoz. Ezek az adatok arra utalhatnak, hogy a tímikus és lép CD4<sup>+</sup> T-sejtek differenciálódása a Treg fenotípus felé elősegíthető IL-2 + TGFβ + DX kezeléssel *in vitro* körülmények között (Pap és mtsai., 2019). Az IL-2 + TGFβ hatása a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejteknek a Treg-fenotípus irányába történő polarizációjára ismert (Apert és mtsai., 2018; Safinia és mtsai., 2015; Sanjabi és mtsai., 2017). Az IL-2 citokint használják klinikai körülmények között különféle autoimmun betegségek és transzplantáción átesett betegek kezelésére, ahol kimutatták, hogy a Treg sejtek *in vivo* expansziójához vezet (Koreth és mtsai., 2011; Saadoun és mtsai., 2011; Ye és mtsai., 2018). A TGFβ immunrendszerre gyakorolt fiziológiai és patológiai körülményekre gyakorolt hatásáról szóló jelentős ismeretek ellenére a TGFβ közvetlen klinikai alkalmazását kevésbé kutatott; néhány folyamatban lévő klinikai vizsgálatról számoltak be reumatoid artritisszel és oszteoartritisszel kapcsolatban (van der Kraan, 2018). Milyen mechanizmus közvetítheti a Treg sejtek DX által indukált képességét? A GC hormon és a TGFβ jelátvitel közötti átszabályozás releváns lehet. Bereshchenko és munkacsoportja beszámolt arról, hogy a GC-indukálta leucin cipzár (GILZ), a GC-k által indukált protein, elősegítette a Treg sejtek termelődését (Bereshchenko és mtsai., 2014). Az eredményeink a TGFβ és DX együttes hatásáról a megnövekedett Treg sejt termelésre és a Foxp3 expresszióra vonatkozó adatok összhangban állnak ezzel a modellel. Vizsgálatunkban figyelemre méltó a Foxp3 fokozott expressziója a TGFβ és DX kezelés eredményeként, mivel a Foxp3 gén expresszió predikciója a stabil transzkripció

elkötelezettségnek a Treg sejt fenotípus iránt. A Foxp3 széles körben elismert Treg sejt epigenom alakítónak válik azáltal, hogy asszociálódik azokkal a molekulákkal, amelyek közvetítik az epigenetikus módosításokat, amelyek befolyásolják a több Foxp3 célgén aktiválását vagy elnémítását (Bereshchenko és mtsai., 2014; Lu és mtsai., 2017).

Megvizsgáltuk a kulcsfontosságú immunszuppresszív citokinek (IL-10, TGF $\beta$ ) termelését a Treg sejtekben. A Treg sejtekben megnövekedett arányban detektáltunk IL-10-et és a TGF $\beta$  citokint expresszáló sejteket amikor IL-2, TGF $\beta$  és DX kombinációval kezeltük azokat. Az IL-10 mRNS relatív szintje növekedést mutatott, összehasonlítva a kontroll sejttenyészetekkel (anti-CD3/CD28), kivéve a lépéből származó sejteket, ha IL-2 + TGF $\beta$ -val tenyésztettük. A TGF $\beta$  mRNS relatív szintje tímusz eredetű Treg-ekben csak abban az esetben emelkedett szignifikánsan, amikor anti-CD3/CD28 mikroyöngyökkel + rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX-nal kezeltünk (Pap és mtsai., 2019).

Korábban leírtuk, hogy az *in vivo* DX kezelés az egerekben emelkedett IL-10 és TGF $\beta$  termelő Treg sejt arányokat eredményezett a tímuszban és a lépben is (Ugor és mtsai., 2018). Ez megegyezik az *in vitro* eredményeinkkel, azonban megjegyzendő, hogy *in vitro* modellünkben a DX-t exogén módon hozzáadott anti-CD3/CD28 + rIL-2 + rTGF $\beta$ -val kombinálva használtuk (Pap és mtsai., 2019). Az *in vivo* DX kezelés során a GC hormon exogén eredetű (az endokrin rendszer által termelt endogén GC hormonok kivételével), de az IL-2 és a TGF $\beta$  a citokinek endogén készletének részeként vannak jelen. Feltételezzük, hogy a Treg sejtek fokozott IL-10 és TGF $\beta$  termelése, akár *in vivo*, akár *in vitro* DX-nal kezelve (utóbbi esetben a recipiensbe történő átültetés után), segítheti az ilyen Treg sejteket a gyulladásgátló környezet kialakításában az immunszuppresszív citokinek, valamint a DC-k modulálása révén. Ezek az események elősegíthetik a további Treg sejtek képződését a prekursor sejtekből, és irányított előrecsatolással erősíthetik a Treg hálózatot (Kendal és Waldmann, 2010; Milward és mtsai., 2017; Kim és mtsai., 2020).

Az egerek nagy dózisu DX-nal történő előkezelésével végzett kísérleteink azt mutatták, hogy a CD4<sup>+</sup> T-sejtekben a Treg sejtek aránya növekedett a tímuszban, de csökkent a lépben. Ez arra utal, hogy a tímikus Treg sejtek nagyobb ellenállást mutatnak a DX-indukált sejthalállal szemben, mint a lépéből származó Treg sejtek, ami összhangban áll korábbi adatainkkal (Ugor és mtsai., 2018). A GC-hormonokról ismert, hogy lokálisan a tímuszban képződnek (Talaber és mtsai., 2015), így a tímusz T-sejtek hosszabb ideig *in vivo* ki vannak téve a glukokortikoidoknak; ennél fogva feltételezhető, hogy a tímusz Treg sejtek relatív ellenállása a



DX-ra részben a magasabb GC szinteknek tulajdonítható, amelyek a tímusz Treg sejtek szelekcióját okozhatják a GC-rezisztens fenotípus felé. Megfigyeltük továbbá a tímikus T-sejtek fokozott differenciálódását *in vitro* Treg sejt irányába azokból az egerekből, amelyeket DX-nal 4 napig előkezeltünk, összehasonlítva a kontroll egerekkel, míg a lépből származtatott sejtek esetében ellenkező hatást figyeltünk meg (Pap és mtsai., 2019). Ez azt sugallja, hogy a tímusz T-sejtek populációja Treg fenotípus felé mutathat, amint azt a Foxp3 expressziójuk is tükrözi (lehetséges, hogy a GC-k helyi termelése miatt a tímuszban), amelyek *in vivo* DX előkezelésnél erőteljesebben elköteleződhetnek a Treg leszármazás felé.

A Foxp3, IL-10 és TGFβ mRNS expressziója tekintetében a tímusz eredetű Treg sejtekben összetettebb kép alakult ki; az egerek *in vivo* DX kezelésének eredményeként megfigyeltük a Foxp3 és az IL-10 mRNS szintek növekedését és csökkenését is (Pap és mtsai., 2019). A TGFβ mRNS tekintetében az egerek *in vivo* DX kezelése nem okozott szignifikáns változást az azt következő *in vitro* kezelési körülmények között, kivéve az anti-CD3/CD28 + rIL-2 + rTGFβ + DX kezeléssel végzett *in vitro* kísérletekben, ahol csökkentett TGFβ mRNS szintet tapasztaltunk *in vivo* DX-nal kezelt egerek tímikus Treg sejtjeiben a kezeletlen egerekhez viszonyítva. Ezek az eredmények tükrözhetik a Treg-vonal heterogenitását és plaszticitását (Sawant és Vignali, 2014).

Megvizsgáltuk az *in vitro* DX hatását a Treg sejtek GR expressziójára, emelkedett GR fluoreszcencia intenzitást kaptunk a lép és tímusz Treg sejtek GR expressziójában a kezelés hatására, továbbá emelkedett Foxp3 transzkripciós faktor és GR kolokalizációt tapasztaltunk a tímusz és a lép CD4<sup>+</sup> T-sejtekben az *in vitro* DX kezelést követően. A GR – Foxp3 transzkripciós faktor kolokalizáció magyarázatot adhat a GC Treg sejtekre gyakorolt hatásának mechanizmusára.

Összegezve az eredményeinket, az adataink további betekintést nyújtanak a GC hormonok immunrendszer szabályozására gyakorolt hatására. A GC analóg DX elősegíti a tímikus és lép Treg sejtek expanszióját, elősegíti a Foxp3<sup>+</sup> expresszióját és az IL-10 és TGFβ immunszuppresszív citokinek termelését *in vitro*. Az egerek DX-nal történő előkezelése eltérő módon befolyásolja a Treg sejtek későbbi *in vitro* gyarapítását (emelkedett a tímusz Treg sejtek expansziója és csökkent a lép eredetű Treg sejtéké). Ez arra utal, hogy a GC terápiában részesülő betegek esetében külön figyelmet kell fordítani a Treg sejtek *in vitro* expansziójára. Végül, a GC-k fontos gyógyszerré válhatnak a terápiás Treg sejtek optimalizálásában.

## 7. SUMMARY

In our research, we wanted to optimize the appropriate conditions for the *in vitro* differentiation and expansion of Treg cells from thymus and spleen CD4<sup>+</sup> T cells. Treg cells are essential mediators of immune regulation and maintenance of immunological tolerance and, as such, are key therapeutic targets for many diseases (Danikowski et al., 2017; Kawai et al., 2018; Li et al., 2018; Romano et al. 2017; Sakaguchi et al., 2008). Adoptive transfer therapy for Treg cells is an emerging area aimed at curbing unwanted, excessive, or pathological immune responses. For adoptive Treg cell therapies to be successful, well-characterized Treg cells with high efficiency, purity, and yield are required (Safinia et al., 2015; Vaikunthanathan et al., 2018). An important consideration in our experiments was the fact that Treg cells are at the forefront of immunological research and that glucocorticoid (GC) hormone analogs are among the most important drugs in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, allergies, and organ transplants and malignancies (Cain and Cidlowski, 2017). The immunoregulatory properties of glucocorticoids are used in the clinic to treat inflammatory and autoimmune diseases, as well as certain hematological malignancies, but long-term use is hampered by adverse side effects. A full understanding of the molecular events that determine the physiological effects of glucocorticoid therapy provides insight into optimal glucocorticoid therapies, a reliable assessment of patients' glucocorticoid susceptibility, and may promote the development of new GR agonists that exert immunosuppressive effects while avoiding adverse side effects. Although there is interest in both directions, information on the effect of GC analogs on Treg cells *in vivo* and *ex vivo* (*in vitro*) is relatively rare. Only a handful of studies have been published that deal comprehensively with both topics, including some seemingly contradictory results; for example (Chen et al., 2003; 2016; Olsen et al., 2015; Zhang et al., 2018; Jørgensen et al., 2019; Bruscoli et al., 2021).

The primary goal of our work was to determine the conditions under which Treg cells can be robustly proliferated. We investigated the effect of anti-CD3/CD28 stimulation, stimulation with recombinant IL-2 and rTGFβ, and the presence or absence of added DX on CD4<sup>+</sup> T cell differentiation, Treg line binding (Foxp3 expression), and immunosuppressive cytokines. important factors that are important for the functional determination of Treg cells.

Freshly isolated spleen and thymus CD4<sup>+</sup> T cells were compared and differentiated using different conditions. The best cell expansion was observed in spleen-derived T cells in the presence of anti-CD3/CD28 and rIL-2, with a relative increase in cell number of

approximately 70%. When the relative proportions and absolute cell numbers of Treg cells in the CD4 + T cell population as a function of the stimulation order were examined, there was a significant increase in the percentage of Treg cells and the absolute number of cells in both thymic and spleen-derived Treg cells, *in vitro* anti-CD3 / CD28 upon stimulation in the presence of rIL-2 + rTGF $\beta$  and rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX (Pap et al., 2019). In this context, Hippen et al. reported a large *ex vivo* expansion of human natural Treg cells from cells isolated from peripheral blood (Hippen et al., 2011). The incorporation of DX into the model may be relevant for further understanding of the complex role of GC hormones in the immune system (Bereshchenko et al., 2018; Cain and Cidlowski, 2017; Quatrini et al., 2021; Li et al., 2023).

Foxp3 relative mRNA levels increased with rIL-2 + rTGF $\beta$  treatment and showed a further increase when DX was added to cell cultures. These data may suggest that differentiation of thymic and splenic CD4<sup>+</sup> T cells toward the Treg phenotype may be facilitated by *in vitro* treatment with IL-2 + TGF $\beta$  + DX (Pap et al., 2019). The effect of IL-2 + TGF $\beta$  on the polarization of naive CD4<sup>+</sup> T cells toward the Treg phenotype is known (Apert et al., 2018; Safinia et al., 2015; Sanjabi et al., 2017). The cytokine IL-2 is used in clinical settings to treat a variety of autoimmune diseases and transplant patients where it has been shown to lead to *in vivo* expansion of Treg cells (Koreth et al., 2011; Saadoun et al., 2011; Ye et al., 2018). Despite significant knowledge of the effect of TGF $\beta$  on the physiological and pathological conditions of the immune system, the direct clinical use of TGF $\beta$  has been less studied; some ongoing clinical trials have been reported for rheumatoid arthritis and osteoarthritis (van der Kraan, 2018). What mechanism can mediate the DX-induced generation of Treg cells? The upregulation between GC hormone and TGF $\beta$  signaling may be relevant. Bereshchenko and colleagues reported that GC-induced leucine zipper (GILZ), a GC-induced protein, promoted the production of Treg cells (Bereshchenko et al., 2014). Our results on the combined effect of TGF $\beta$  and DX on increased Treg cell production and Foxp3 expression are consistent with this model. In our study, the overexpression of Foxp3 as a result of TGF $\beta$  and DX treatment is remarkable, as Foxp3 gene expression is a precedent for stable transcriptional commitment to the Treg cell phenotype. Foxp3 becomes a widely recognized Treg cell epigenoma modifier by associating with molecules that mediate epigenetic modifications that affect the activation or silencing of multiple Foxp3 target genes (Bereshchenko et al., 2014; Lu et al., 2017).

We examined the production of key immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF $\beta$ ) in Treg cells. Both thymus and spleen-derived Treg cells showed an increased proportion of IL-10 and TGF $\beta$  cytokine-producing cells when treated with a combination of IL-2, TGF $\beta$ , and

DX (except for thymus-derived Tregs when IL-10 alone was used). The relative level of IL-10 mRNA showed an increase compared to control cell cultures (anti-CD3/CD28 treatment), except for spleen-derived cells when cultured with IL-2 + TGF $\beta$ . The relative level of TGF $\beta$  mRNA in thymic Tregs was only significantly increased when treated with anti-CD3/CD28 microbeads + rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX (Pap et al., 2019).

In our previous research, we described that *in vivo* DX treatment in mice resulted in increased IL-10 and TGF $\beta$ -producing Treg cell ratios in both the thymus and spleen (Ugor et al., 2018). This is consistent with our *in vitro* results, however, it should be noted that in our *in vitro* model, DX was used in combination with exogenously added anti-CD3/CD28 + rIL-2 + rTGF $\beta$  (Pap et al., 2019). During *in vivo* DX treatment, GC hormone is of exogenous origin (except for endogenous GC hormones produced by the endocrine system), but IL-2 and TGF $\beta$  are present as part of an endogenous pool of cytokines. It is hypothesized that increased production of IL-10 and TGF $\beta$  by Treg cells, either *in vivo* or *in vitro* treated with DX (in the latter case after transplantation into the recipient), may help such Treg cells to develop an antiinflammatory environment for immunosuppressive cytokines and by modulating DCs. These events may promote the formation of additional Treg cells from the precursor cells and may strengthen the Treg network through directed feeding (Kendal and Waldmann, 2010; Milward et al., 2017; Kim et al., 2020).

Our experiments with pretreatment of mice with high-dose DX showed that the proportion of Treg cells in CD4<sup>+</sup> T cells increased in the thymus but decreased in the spleen. This suggests that thymic Treg cells show greater resistance to DX-induced cell death than spleen-derived Treg cells, consistent with our previous data (Ugor et al., 2018). GC hormones are known to be formed locally in the thymus (Talaber et al., 2015), so that thymic T cells are exposed to glucocorticoids for a longer period of time *in vivo*; therefore, it can be hypothesized that the relative resistance of thymic Treg cells to DX is due in part to higher GC levels that may induce selection of thymic Treg cells for the GC-resistant phenotype. Increased differentiation of thymic T cells into Treg cells was also observed *in vitro* under all *in vitro* stimulation conditions from mice pretreated with DX for 4 days compared to untreated (control) mice, whereas the opposite effect was observed in spleen-derived cells observed. This suggests that the population of thymic T cells may point to the Treg phenotype, as reflected by their Foxp3 expression (possibly due to local production of GCs in the thymus), which may be more strongly bound to Treg lineage than *in vivo* DX pretreatment.

Regarding to the expression of Foxp3, IL-10 and TGF $\beta$  mRNA, a more complex picture emerged in thymic Treg cells; an increase and decrease in Foxp3 and IL-10 mRNA levels were also observed as a result of *in vivo* DX treatment of mice. In case of TGF $\beta$  mRNA, *in vivo* DX treatment of mice did not cause a significant change under subsequent *in vitro* treatment conditions, except in the *in vitro* experiments with anti-CD3/CD28 + rIL-2 + rTGF $\beta$  + DX treatment, where reduced TGF $\beta$  mRNA levels were observed. In the thymic Treg cells of mice treated with *in vivo* DX compared to untreated mice. These results may reflect the heterogeneity and plasticity of the Treg line (Sawant and Vignali, 2014).

We examined the effect of *in vitro* DX on GR expression in Treg cells, increased GR fluorescence intensity in GR expression of spleen and thymus upon treatment, and increased Foxp3 transcription factor and GR colocalization in thymus and spleen CD4<sup>+</sup> T cells after *in vitro* DX treatment. GR-Foxp3 transcription factor colocalization may explain the mechanism of the effect of GC on Treg cells.

Summarizing our results, our data provide further insight into the effect of GC hormones on the regulation of the immune system. The GC analog DX promotes the expansion of thymic and splenic Treg cells, promotes Foxp3<sup>+</sup> expression, and the production of IL-10 and TGF $\beta$  immunosuppressive cytokines *in vitro*. Pretreatment of mice with DX has a different effect on subsequent *in vitro* proliferation of Treg cells (increased thymic Treg cell expansion and decreased splenic Treg cells). This suggests that special attention should be paid to the *in vitro* expansion of Treg cells in patients receiving GC therapy. Finally, GCs may become an important drug in the optimization of therapeutic Treg cells.

# IRODALOMJEGYZÉK

Adler, L. N., Jiang, W., Bhamidipati, K., Millican, M., Macaubas, C., Hung, S. C., & Mellins, E. D. (2017). The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. *Frontiers in immunology*, 8, 319. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00319> [136]

Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., & Chen, H. (2013). Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 3834–3842. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834> [155]

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Innate Immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/> [44]

Apert, C., Romagnoli, P., & van Meerwijk, J. (2018). IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein & cell*, 9(4), 322–332. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0425-3> [46]

Apostolou, I., & von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine*, 199(10), 1401–1408. <https://doi.org/10.1084/jem.20040249> [47]

Bendelac, A., Bonneville, M., & Kearney, J. F. (2001). Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 1(3), 177–186. <https://doi.org/10.1038/35105052> [16]

Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*, 27(1), 20–21. <https://doi.org/10.1038/83713> [19]

Bereshchenko, O., Bruscoli, S., & Riccardi, C. (2018). Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Frontiers in immunology*, 9, 1332. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01332> [48]

Bereshchenko, O., Coppo, M., Bruscoli, S., Biagioli, M., Cimino, M., Frammartino, T., Sorcini, D., Venanzi, A., Di Sante, M., & Riccardi, C. (2014). GILZ promotes production of peripherally

induced Treg cells and mediates the crosstalk between glucocorticoids and TGF- $\beta$  signaling. *Cell reports*, 7(2), 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.004> [49]

Berki, T., Tavakoli, A., Nagy, K. K., Nagy, G., & Németh, P. (2002). Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 15(2-3), 132–138. <https://doi.org/10.1007/s00147-002-0397-x> [120]

Boldizsár, F., Pálinkás, 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(10), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.06.005> [121]

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. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.10.003> [43]

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017> [117]

Bruscoli, S., Febo, M., Riccardi, C., & Migliorati, G. (2021). Glucocorticoid Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Clinical Practice. *Frontiers in immunology*, 12, 691480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691480> [157]

Cabarrocas, J., Cassan, C., Magnusson, F., Piaggio, E., Mars, L., Derbinski, J., Kyewski, B., Gross, D. A., Salomon, B. L., Khazaie, K., Saoudi, A., & Liblau, R. S. (2006). Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), 8453–8458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603086103> [28]

Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2015). Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 29(4), 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.007> [162]

Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nature reviews. Immunology*, 17(4), 233–247. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.1> [50]

- Calzada, D., Baos, S., Cremades-Jimeno, L., & Cárđaba, B. (2018). Immunological Mechanisms in Allergic Diseases and Allergen Tolerance: The Role of Treg Cells. *Journal of immunology research*, 2018, 6012053. <https://doi.org/10.1155/2018/6012053> [51]
- Cari, L., De Rosa, F., Nocentini, G., & Riccardi, C. (2019). Context-Dependent Effect of Glucocorticoids on the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Regulatory T Cells: A Review of the Empirical Evidence and Clinical Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1142. <https://doi.org/10.3390/ijms20051142> [161]
- Cerundolo, V., Barral, P., & Batista, F. D. (2010). Synthetic iNKT cell-agonists as vaccine adjuvants--finding the balance. *Current opinion in immunology*, 22(3), 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.003> [30]
- Chandran, S., Tang, Q., Sarwal, M., Laszik, Z. G., Putnam, A. L., Lee, K., Leung, J., Nguyen, V., Sigdel, T., Tavares, E. C., Yang, J., Hellerstein, M., Fitch, M., Bluestone, J. A., & Vincenti, F. (2017). Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 17(11), 2945–2954. <https://doi.org/10.1111/ajt.14415> [52]
- Chen, W., & Ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGF $\beta$  superfamily. *Nature reviews. Immunology*, 16(12), 723–740. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.112> [53]
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*, 198(12), 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152> [22]
- Chen, Y., Lebrun, J. J., & Vale, W. (1996). Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 12992–12997. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.12992> [25]
- Danikowski, K.M., Jayaraman, S. & Prabhakar, B.S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation* 14, 117 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0892-8> [54]



Danilova N. (2012). The evolution of adaptive immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 738, 218–235. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1680-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1680-7_13) [132]

Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J., & Shevach, E. M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 178(7), 4022–4026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4022> [14]

Deng, B., Zhang, W., Zhu, Y., Li, Y., Li, D., & Li, B. (2022). FOXP3+ regulatory T cells and age-related diseases. *The FEBS journal*, 289(2), 319–335. <https://doi.org/10.1111/febs.15743> [172]

de Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 6(1), 24–37. <https://doi.org/10.1038/nrc1782> [1]

Dong, C., Flavell, R.A. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res Ther* 2, 179 (2000). <https://doi.org/10.1186/ar85> [144]

Dons, E. M., Raimondi, G., Cooper, D. K., & Thomson, A. W. (2012). Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential. *Human immunology*, 73(4), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.12.011> [56]

Du, J., Wang, Q., Ziegler, S. F., & Zhou, B. (2018). FOXP3 interacts with hnRNPF to modulate pre-mRNA alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, 293(26), 10235–10244. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001349> [57]

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*, 10(8), 857–863. <https://doi.org/10.1038/ni.1767> [147]

Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrg2703> [131]

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology*, 6(11), 1142–1151. <https://doi.org/10.1038/ni1263> [13]

- Gaudino, S. J., & Kumar, P. (2019). Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Frontiers in immunology*, 10, 360. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00360> [148]
- Gergely, J., & Erdei, A. (2006). *Immunbiológia. Medicina, Budapest* [10]
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), 723–737. [3]
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21(6), 903–914. [36]
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R., & Liebhaver, S. A. (1972). Suppressor T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 108(3), 586–590. [4]
- Goswami R. (2017). Th9 Cells: New Member of T Helper Cell Family. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1585, 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0_1) [81]
- Grawunder, U., West, R. B., & Lieber, M. R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology*, 10(2), 172–180. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80246-x](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80246-x) [32]
- Guo, K., & Zhang, X. (2021). Cytokines that Modulate the Differentiation of Th17 Cells in Autoimmune Uveitis. *Journal of immunology research*, 2021, 6693542. <https://doi.org/10.1155/2021/6693542> [146]
- Hadaschik, E. N., & Enk, A. H. (2015). TGF- $\beta$ 1-induced regulatory T cells. *Human immunology*, 76(8), 561–564. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.06.015> [58]
- Hajimoradi, M., Rezaiofi, A., Esmailnejad-Ahranjani, P., Mohammad Hassan, Z., & Ebrahimi, M. (2022). STAT3 inactivation suppresses stemness properties in gastric cancer stem cells and promotes Th17 in Treg/Th17 balance. *International immunopharmacology*, 111, 109048. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109048> [166]
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015> [154]

- Hippen, K. L., Merkel, S. C., Schirm, D. K., Sieben, C. M., Sumstad, D., Kadidlo, D. M., McKenna, D. H., Bromberg, J. S., Levine, B. L., Riley, J. L., June, C. H., Scheinberg, P., Douek, D. C., Miller, J. S., Wagner, J. E., & Blazar, B. R. (2011). Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. *Science translational medicine*, 3(83), 83ra41. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001809> [59]
- Hoeppli, R. E., Wu, D., Cook, L., & Levings, M. K. (2015). The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Frontiers in immunology*, 6, 61. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00061> [60]
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1313–1318. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313> [33]
- Hori, S., & Sakaguchi, S. (2004). Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and infection*, 6(8), 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.02.020> [61]
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490> [5]
- Huntington, N., Voshchenrich, C. & Di Santo, J. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7, 703–714 (2007). <https://doi.org/10.1038/nri2154> [133]
- Jørgensen, N., Persson, G., & Hviid, T. (2019). The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer. *Frontiers in immunology*, 10, 911. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00911> [156]
- Kak, G., Raza, M. & Tiwari, B. K. (2018) Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, vol. 9, no. 1, 2018, pp. 64-79. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007> [142]
- Kaminska, B., Wesolowska, A., & Danilkiewicz, M. (2005). TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta biochimica Polonica*, 52(2), 329–337. [20]

Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in immunology*, 37(11), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012> [63]

Katoh, H., Zheng, P., & Liu, Y. (2013). FOXP3: genetic and epigenetic implications for autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 41, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.12.004> [64]

Kawai, K., Uchiyama, M., Hester, J., Wood, K., & Issa, F. (2018). Regulatory T cells for tolerance. *Human immunology*, 79(5), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.12.013> [65]

Kendal, A. R., & Waldmann, H. (2010). Infectious tolerance: therapeutic potential. *Current opinion in immunology*, 22(5), 560–565. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.002> [66]

Kim C. H. (2009). FOXP3 and its role in the immune system. *Advances in experimental medicine and biology*, 665, 17–29. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_2) [67]

Kim, D., Nguyen, Q. T., Lee, J., Lee, S. H., Janocha, A., Kim, S., Le, H. T., Dvorina, N., Weiss, K., Cameron, M. J., Asosingh, K., Erzurum, S. C., Baldwin, W. M., 3rd, Lee, J. S., & Min, B. (2020). Anti-inflammatory Roles of Glucocorticoids Are Mediated by Foxp3+ Regulatory T Cells via a miR-342-Dependent Mechanism. *Immunity*, 53(3), 581–596.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.002> [158]

Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(7), 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9> [126]

Kisielewicz, A., Schaier, M., Schmitt, E., Hug, F., Haensch, G. M., Meuer, S., Zeier, M., Sohn, C., & Steinborn, A. (2010). A distinct subset of HLA-DR+-regulatory T cells is involved in the induction of preterm labor during pregnancy and in the induction of organ rejection after transplantation. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 137(2), 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.07.008> [29]

Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H. T., McDonough, S. M., Bindra, B., Alyea, E. P., 3rd, Armand, P., Cutler, C., Ho, V. T., Treister, N. S., Bienfang, D. C., Prasad, S., Tzachanis, D., Joyce, R. M., Avigan, D. E., Antin, J. H., Ritz, J., & Soiffer, R. J. (2011). Interleukin-2 and regulatory T

cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine*, 365(22), 2055–2066. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108188> [70]

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. *Nature immunology*, 6(12), 1219–1227. <https://doi.org/10.1038/ni1265> [71]

Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., & Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 770–774. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.770> [72]

Lavi Arab, F., Rastin, M., Faraji, F., Zamani Taghizadeh Rabe, S., Tabasi, N., Khazaei, M., Haghmorad, D., & Mahmoudi, M. (2015). Assessment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects on Treg cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 37(1), 12–18. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.968255> [73]

Lee, J. H., Lydon, J. P., & Kim, C. H. (2012). Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. *European journal of immunology*, 42(10), 2683–2696. <https://doi.org/10.1002/eji.201142317> [74]

Li, D., & Wu, M. (2021) Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 291. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0> [130]

Li, J. C., Wang, S., Wang, H. C., Zhang, Q., Wang, Q., Guo, M. H., Zhang, H., Li, T. F., Guo, Q., Li, Y. B., & Wei, G. S. (2023). Dexamethasone affects the chemotaxis and phagocytic activity of neutrophils for boar spermatozoa and the quality of liquid preserved boar semen in vitro. *Theriogenology*, 195, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.012> [170]

Li, J., Chen, S., Xiao, X., Zhao, Y., Ding, W., & Li, X. C. (2017). IL-9 and Th9 cells in health and diseases-From tolerance to immunopathology. *Cytokine & growth factor reviews*, 37, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.07.004> [146]

Li, J., Tan, J., Martino, M. M., & Lui, K. O. (2018). Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Frontiers in immunology*, 9, 585. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00585> [75]

- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology*, 24, 99–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737> [76]
- Libert, C., & Dejager, L. (2014). How steroids steer T cells. *Cell reports*, 7(4), 938–939. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.041> [62]
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., & Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nature immunology*, 9(6), 632–640. <https://doi.org/10.1038/ni.1607> [77]
- Liu, Z., Hu, X., Liang, Y., Yu, J., Li, H., Shokhirev, M. N., & Zheng, Y. (2022). Glucocorticoid signaling and regulatory T cells cooperate to maintain the hair-follicle stem-cell niche. *Nature immunology*, 23(7), 1086–1097. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01244-9> [171]
- Long, S. A., & Buckner, J. H. (2011). CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 187(5), 2061–2066. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003224> [150]
- Lu, L., Barbi, J., & Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nature reviews. Immunology*, 17(11), 703–717. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.75> [78]
- Mahnke, K., Johnson, T. S., Ring, S., & Enk, A. H. (2007). Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *Journal of dermatological science*, 46(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.03.002> [8]
- Malek, T. R., & Castro, I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, 33(2), 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.004> [11]
- Malek, T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., & Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 17(2), 167–178. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00367-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00367-9) [12]
- Marie, J. C., Liggitt, D., & Rudensky, A. Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity*, 25(3), 441–454. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.012> [79]

- Maynard, C. L., & Weaver, C. T. (2008). Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunological reviews*, 226, 219–233. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x> [153]
- Miller, R. G., & Phillips, R. A. (1975). Development of B lymphocytes-1,2. *Federation proceedings*, 34(2), 145–150. [39]
- Milward, K. F., Wood, K. J., & Hester, J. (2017). Enhancing human regulatory T cells in vitro for cell therapy applications. *Immunology letters*, 190, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.012> [80]
- Mogensen T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08> [134]
- Mond, J. J., Takahashi, T., & Thorbecke, G. J. (1972). Surface antigens of immunocompetent cells. 3. In vitro studies of the role of B and T cells in immunological memory. *The Journal of experimental medicine*, 136(4), 663–675. <https://doi.org/10.1084/jem.136.4.663> [17]
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2012) *Janeway's Immunobiology*. Garland Science 8th edition, ISBN: 0815342438 [2]
- Nguyen, A. V., & Soulika, A. M. (2019). The Dynamics of the Skin's Immune System. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1811. <https://doi.org/10.3390/ijms20081811> [129]
- Nicholson L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017> [128]
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007> [124]
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., & Li, M. O. (2010). Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity*, 32(5), 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.012> [83]

Pacholczyk, R., Kraj, P., & Ignatowicz, L. (2002). Peptide specificity of thymic selection of CD4+CD25+ T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 168(2), 613–620. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.613> [27]

Pálinkás, L., Talabér, G., Boldizsár, F., Bartis, D., Németh, P., & Berki, T. (2008). Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*, 213(1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.06.004> [122]

**Pap, R.**, Ugor, E., Litvai, T., Prenek, L., Najbauer, J., Németh, P., & Berki, T. (2019). Glucocorticoid hormone differentially modulates the in vitro expansion and cytokine profile of thymic and splenic Treg cells. *Immunobiology*, 224(2), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.12.002> [55]

Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet* (London, England), 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7) [45]

Pflug, N. C., Hankard, M. K., Berg, S. M., O'Connor, M., Gloer, J. B., Kolodziej, E. P., Cwiertny, D. M., & Wammer, K. H. (2017). Environmental photochemistry of dienogest: phototransformation to estrogenic products and increased environmental persistence via reversible photohydration. *Environmental science. Processes & impacts*, 19(11), 1414–1426. <https://doi.org/10.1039/c7em00346c> [167]

Picca, C. C., Larkin, J., 3rd, Boesteanu, A., Lerman, M. A., Rankin, A. L., & Caton, A. J. (2006). Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunological reviews*, 212, 74–85. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00416.x> [9]

Pletinckx, K., Döhler, A., Pavlovic, V., & Lutz, M. B. (2011). Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Frontiers in immunology*, 2, 39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00039> [26]

Povoleri, G. A., Scottà, C., Nova-Lamperti, E. A., John, S., Lombardi, G., & Afzali, B. (2013). Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators?. *Frontiers in immunology*, 4, 169. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00169> [149]

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 : an international*



journal on programmed cell death, 22(2), 239–253. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1320-8> [155]

Quatrini, L., Ricci, B., Ciancaglini, C., Tumino, N., & Moretta, L. (2021). Regulation of the Immune System Development by Glucocorticoids and Sex Hormones. *Frontiers in immunology*, 12, 672853. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672853> [163]

Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2013). Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocrine development*, 24, 41–56. <https://doi.org/10.1159/000342502> [164]

Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 42(1), 15–vii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002> [123]

Richard, A. C., Tan, C., Hawley, E. T., Gomez-Rodriguez, J., Goswami, R., Yang, X. P., Cruz, A. C., Penumetcha, P., Hayes, E. T., Pelletier, M., Gabay, O., Walsh, M., Ferdinand, J. R., Keane-Myers, A., Choi, Y., O'Shea, J. J., Al-Shamkhani, A., Kaplan, M. H., Gery, I., Siegel, R. M., ... Meylan, F. (2015). Correction: The TNF-Family Ligand TL1A and Its Receptor DR3 Promote T Cell-Mediated Allergic Immunopathology by Enhancing Differentiation and Pathogenicity of IL-9-Producing T Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(12), 5839–5840. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502026> [145]

Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597> [118]

Romano, M., Tung, S. L., Smyth, L. A., & Lombardi, G. (2017). Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 30(8), 745–753. <https://doi.org/10.1111/tri.12909> [84]

Rosenzweig, S. D., & Holland, S. M. (2011). Recent insights into the pathobiology of innate immune deficiencies. *Current allergy and asthma reports*, 11(5), 369–377. <https://doi.org/10.1007/s11882-011-0212-9> [127]

Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual review of immunology*, 36, 411–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053352> [143]

- 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. *Nature immunology*, 13(10), 1010–1019. <https://doi.org/10.1038/ni.2402> [85]
- Saadoun, D., Rosenzwajg, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., & Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *The New England journal of medicine*, 365(22), 2067–2077. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105143> [86]
- 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., Goodall, G. J., Zola, H., Shannon, M. F., & Barry, S. C. (2010). Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(2), 1071–1081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000082> [87]
- Safinia, N., Scotta, C., Vaikunthanathan, T., Lechler, R. I., & Lombardi, G. (2015). Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation. *Frontiers in immunology*, 6, 438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00438> [88]
- Sakaguchi S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6(4), 345–352. <https://doi.org/10.1038/ni1178> [37]
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785> [89]
- 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(3), 1151–1164. [35]
- Sakaguchi, S., Wing, K., & Yamaguchi, T. (2009). Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European journal of immunology*, 39(9), 2331–2336. <https://doi.org/10.1002/eji.200939688> [90]

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009> [91]

Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of immunology research*, 2017, 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160> [137]

Sanjabi, S., Oh, S. A., & Li, M. O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- $\beta$ : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(6), a022236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236> [92]

Saraiva, M., & O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711> [93]

Sawant, D. V., & Vignali, D. A. (2014). Once a Treg, always a Treg?. *Immunological reviews*, 259(1), 173–191. <https://doi.org/10.1111/imr.12173> [94]

Schlossberger, V., Schober, L., Rehnitz, J., Schaier, M., Zeier, M., Meuer, S., Schmitt, E., Toth, B., Strowitzki, T., & Steinborn, A. (2013). The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(11), 3062–3073. <https://doi.org/10.1093/humrep/det316> [68]

Schmetterer, K. G., Neunkirchner, A., & Pickl, W. F. (2012). Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(6), 2253–2276. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193672> [95]

Schmidt, A., Eriksson, M., Shang, M. M., Weyd, H., & Tegnér, J. (2016). Comparative Analysis of Protocols to Induce Human CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells by Combinations of IL-2, TGF-beta, Retinoic Acid, Rapamycin and Butyrate. *PloS one*, 11(2), e0148474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148474> [96]

Schmitz, J., Assenmacher, M., & Radbruch, A. (1993). Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *European journal of immunology*, 23(1), 191–199. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230130> [38]

Scott P. (1993). Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets. *Current opinion in immunology*, 5(3), 391–397. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90058-z](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90058-z) [140]

Selvaraj R. K. (2013). Avian CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Developmental and comparative immunology*, 41(3), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.018> [97]

Selvaraj, R. K., & Geiger, T. L. (2007). A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(2), 11–1390. [41]

Sharabi, A., Tsokos, M. G., Ding, Y., Malek, T. R., Klatzmann, D., & Tsokos, G. C. (2018). Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(11), 823–844. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.148> [98]

Sharma, A., & Rudra, D. (2018). Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Frontiers in immunology*, 9, 883. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00883> [99]

Shevach E. M. (2018). Foxp3+ T Regulatory Cells: Still Many Unanswered Questions-A Perspective After 20 Years of Study. *Frontiers in immunology*, 9, 1048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01048> [100]

Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological reviews*, 259(1), 88–102. <https://doi.org/10.1111/imr.12160> [101]

Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., & Calvin, D. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359(6397), 693–699. <https://doi.org/10.1038/359693a0> [102]

Silver, K., & Cornall, R. J. (2003). Isotype control of B cell signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2003(184), pe21. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.184.pe21> [116]

Soon, M., & Haque, A. (2018). Recent Insights into CD4+ Th Cell Differentiation in Malaria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(6), 1965–1975. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701316> [125]

- Spence, A., Klementowicz, J. E., Bluestone, J. A., & Tang, Q. (2015). Targeting Treg signaling for the treatment of autoimmune diseases. *Current opinion in immunology*, 37, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.09.002> [103]
- Strydom, 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- $\beta$  and expand regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(1), 103–112. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002485> [6]
- Takaba, H., & Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in immunology*, 38(11), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010> [152]
- Talaber, G., Jondal, M., & Okret, S. (2015). Local glucocorticoid production in the thymus. *Steroids*, 103, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.010> [104]
- Tang, Q., & Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology*, 9(3), 239–244. <https://doi.org/10.1038/ni1572> [34]
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5), 541–547. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90125-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6) [40]
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M. L., Greene, M. I., & Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology*, 9(2), 194–202. <https://doi.org/10.1038/ni1549> [105]
- Tuovinen, H., Salminen, J. T., & Arstila, T. P. (2006). Most human thymic and peripheral-blood CD4+ CD25+ regulatory T cells express 2 T-cell receptors. *Blood*, 108(13), 4063–4070. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016105> [21]
- Ugor, E., Prenek, L., **Pap, R.**, Berta, G., Ernszt, D., Najbauer, J., Németh, P., Boldizsár, F., & Berki, T. (2018). Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression. *Immunobiology*, 223(4-5), 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.010> [106]

Ugor, E., Simon, D., **Pap, R.**, Kraljik, N., Németh, P., Boldizsár, F., & Berki, T. (2013). Regulátorikus T sejtek glukokortikoid hormon érzékenysége vizsgálat, Immunológiai Szemle, V. évfolyam 4. szám [23]

Vacchio, M. S., & Ashwell, J. D. (1997). Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *The Journal of experimental medicine*, 185(11), 2033–2038. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.2033> [139]

Vaikunthanathan, T., Safinia, N., & Lombardi, G. (2018). Optimizing regulatory T cells for therapeutic application in human organ transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 23(5), 516–523. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000561> [82]

Vaikunthanathan, T., Safinia, N., Boardman, D., Lechler, R. I., & Lombardi, G. (2017). Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation. *Clinical and experimental immunology*, 189(2), 197–210. <https://doi.org/10.1111/cei.12978> [107]

Vallés, P. G., Lorenzo, A. G., Bocanegra, V., & Vallés, R. (2014). Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play?. *International journal of nephrology and renovascular disease*, 7, 241–251. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S37891> [42]

van de Geer, A., Cuadrado, E., Slot, M. C., van Bruggen, R., Amsen, D., & Kuijpers, T. W. (2019). Regulatory T cell features in chronic granulomatous disease. *Clinical and experimental immunology*, 197(2), 222–229. <https://doi.org/10.1111/cei.13300> [119]

van der Kraan P. M. (2018). Differential Role of Transforming Growth Factor-beta in an Osteoarthritic or a Healthy Joint. *Journal of bone metabolism*, 25(2), 65–72. <https://doi.org/10.11005/jbm.2018.25.2.65> [160]

Van Gool, F., Nguyen, M., Mumbach, M. R., Satpathy, A. T., Rosenthal, W. L., Giacometti, S., Le, D. T., Liu, W., Brusko, T. M., Anderson, M. S., Rudensky, A. Y., Marson, A., Chang, H. Y., & Bluestone, J. A. (2019). A Mutation in the Transcription Factor Foxp3 Drives T Helper 2 Effector Function in Regulatory T Cells. *Immunity*, 50(2), 362–377.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.016> [151]

Veiga-Parga, T., Sehrawat, S., & Rouse, B. T. (2013). Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunological reviews*, 255(1), 182–196. <https://doi.org/10.1111/imr.12085> [108]

Vignali, D. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343> [109]

Vila, J., Isaacs, J. D., & Anderson, A. E. (2009). Regulatory T cells and autoimmunity. *Current opinion in hematology*, 16(4), 274–279. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832a9a01> [110]

von Boehmer H. (1992). T cell development and selection in the thymus. *Bone marrow transplantation*, 9 Suppl 1, 46–48. [69]

Wambre, E., James, E. A., & Kwok, W. W. (2012). Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Current opinion in immunology*, 24(6), 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.07.009> [173]

Wang, Y. M., Ghali, J., Zhang, G. Y., Hu, M., Wang, Y., Sawyer, A., Zhou, J. J., Hapudeniya, D. A., Wang, Y., Cao, Q., Zheng, G., Harris, D. C., & Alexander, S. I. (2016). Development and function of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 21(2), 81–85. <https://doi.org/10.1111/nep.12652> [111]

Wang, Y., Yu, H., Li, J., Liu, W., Yu, S., Lv, P., Zhao, L., Wang, X., Zuo, Z., & Liu, X. (2022). Th22 cells induce Müller cell activation via the Act1/TRAF6 pathway in diabetic retinopathy. *Cell and tissue research*, 390(3), 367–383. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03689-8> [168]

Weinreich, M. A., & Hogquist, K. A. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(4), 2265–2270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2265> [138]

Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*, 8, 292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292> [135]

Wu, H., Li, P., Shao, N., Ma, J., Ji, M., Sun, X., Ma, D., & Ji, C. (2012). Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- $\beta$  in acute myeloid leukemia. *Oncology letters*, 3(5), 1119–1123. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.614> [24]

Yang, W. C., Hwang, Y. S., Chen, Y. Y., Liu, C. L., Shen, C. N., Hong, W. H., Lo, S. M., & Shen, C. R. (2017). Interleukin-4 Supports the Suppressive Immune Responses Elicited by

Regulatory T Cells. *Frontiers in immunology*, 8, 1508. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01508> [161]

Ye, C., Brand, D., & Zheng, S. G. (2018). Targeting IL-2: an unexpected effect in treating immunological diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 3, 2. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0002-5> [112]

Ye, M., & Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Current opinion in immunology*, 19(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.007> [31]

Yi, H., Zhen, Y., Jiang, L., Zheng, J., & Zhao, Y. (2006). The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Cellular & molecular immunology*, 3(3), 189–195. [7]

Zhang, H., Xia, Y., Ye, Q., Yu, F., Zhu, W., Li, P., Wei, Z., Yang, Y., Shi, Y., Thomson, A. W., Chen, J., & Hu, X. (2018). In Vivo Expansion of Regulatory T Cells with IL-2/IL-2 Antibody Complex Protects against Transient Ischemic Stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 38(47), 10168–10179. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3411-17.2018> [165]

Zhang, L., & Zhao, Y. (2007). The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells: multiple pathways 88nt he road. *Journal of cellular physiology*, 211(3), 590–597. <https://doi.org/10.1002/jcp.21001> [18]

Zhang, X., Ma, Y., He, Y., Gu, W., Yan, Y., Ji, W., Huang, L., Wang, Y., Hao, C., Li, G., & Chen, Z. (2022). Foxp2 inhibits Th9 cell differentiation and attenuates allergic airway inflammation in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *International immunopharmacology*, 111, 109060. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109060> [169]

Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., & Horwitz, D. A. (2002). Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> precursors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(8), 4183–4189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4183> [113]

Zheng, S. G., Wang, J. H., Gray, J. D., Soucier, H., & Horwitz, D. A. (2004). Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(9), 5213–5221. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5213> [115]



Zheng, S. G., Wang, J., Wang, P., Gray, J. D., & Horwitz, D. A. (2007). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(4), 2018–2027. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2018> [15]

Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology*, 28, 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212> [141]

## PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

### A dolgozat alapját képző bírált folyóiratban megjelent publikációk:

1. **Pap, R.**, Ugor, E., Litvai, T., Prenek, L., Najbauer, J., Németh, P., & Berki, T. (2019). Glucocorticoid hormone differentially modulates the in vitro expansion and cytokine profile of thymic and splenic Treg cells. *Immunobiology*, 224(2), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.12.002> **Q2 IF 2.788**
2. Ugor, E., Prenek, L., **Pap, R.**, Berta, G., Ernszt, D., Najbauer, J., Németh, P., Boldizsár, F., & Berki, T. (2018). Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression. *Immunobiology*, 223(4-5), 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.010> **Q2 IF 2.798**

### A dolgozat alapját képző konferencia közlemények:

1. T, Litvai; **R, Pap**; T, Berki. Optimization of in vitro condition for regulatory T cell differentiation and expansion (2019) 2019. 02. 14-15. Pécs, XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference, Közlemény:31008004
2. Tímea, Litvai; **Ramóna, Pap**; Tímea, Berki. Optimalization of in vitro regulatory T cell differentiation and expansion. In: XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition – Abstracts. Pécs, Magyarország: János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs (2019) p. 271 Közlemény:30899720
3. **Pap Ramóna**, Ugor Emese, Simon Diána, Boldizsár Ferenc, Németh Péter, Berki Tímea. 2014: Regulatórikus T sejtek citokin termelése és Foxp3 expressziója glukokortikoszteroid kezelés és PMA/Ionomycin aktiváció hatására. Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 44. Membrántranszport Konferencia Sümeg 2014.
4. **Pap Ramóna**, Prenek Lilla, Ugor Emese, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea. Centrális és perifériás T-sejtek in vitro expanziója és funkcionális vizsgálata. Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 46. Membrántranszport Konferencia Sümeg 2016.
5. **R. Pap**, E. Ugor, L. Prenek, D. Simon, T. Berki. 2015: In vitro development of functional thymic and splenic regulatory T cells. Department of Immunology and

Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 4th European Congress of Immunology, ECI Vienna 2015.

#### Előadások

6. **Ramóna Pap**, Tímea Berki. In vitro development of functional thymic and splenic regulatory T cells, 12th Spring School on Immunology, February 28th - March 4th, 2016, Ettal.
7. **Ramóna Pap**, Emese Ugor, Gergely Berta, Dávid Ernst, Tímea Berki. Alteration of cytokine production and FoxP3 – GR colocalization in dexamethasone treated regulatory T cells. Department of Immunology and Biotechnology, Department of Medical Biology, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 43. MIT Velence 2014.
8. Tímea Berki, **Ramóna Pap**, Emese Ugor, Diána Simon, Ferenc Boldizsár. Glukokortikoid kezelés megváltoztatja a regulatorikus T sejtek citokin termelését, Magyar Reumatológusok Egyesülete, MRE Kongresszus Pécs 2014.

#### A dolgozat témakörén kívül megjelent publikációk:

1. **Pap, R.**, Pandur, E., Jánosa, G., Sipos, K., Nagy, T., Agócs, A., & Deli, J. (2022). Lutein Decreases Inflammation and Oxidative Stress and Prevents Iron Accumulation and Lipid Peroxidation at Glutamate-Induced Neurotoxicity. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(11), 2269. <https://doi.org/10.3390/antiox11112269> **Q1 7.675**
2. Pandur, E., Szabó, I., Hormay, E., **Pap, R.**, Almási, A., Sipos, K., Farkas, V., & Karádi, Z. (2022). Alterations of the expression levels of glucose, inflammation, and iron metabolism related miRNAs and their target genes in the hypothalamus of STZ-induced rat diabetes model. *Diabetology & metabolic syndrome*, 14(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s13098-022-00919-5> **Q1 5.395**
3. Pandur, E.; Tamási, K.; **Pap, R.**; Jánosa, G., & Sipos, K. (2022). Modulatory Effects of Fractalkine on Inflammatory Response and Iron Metabolism of Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid-Activated THP-1 Macrophages. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 2629. <https://doi.org/10.3390/ijms23052629> **Q1 IF 6.208**
4. Pandur, E., Tamási, K., **Pap, R.**, Jánosa, G., & Sipos, K. (2021). Distinct Effects of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cell Wall Component-Induced Inflammation on the Iron Metabolism of THP-1 Cells.

International journal of molecular sciences, 22(3), 1497.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22031497> **Q1 IF 6.208**

5. **Pap, R.**, Pandur, E., Jánosa, G., Sipos, K., Agócs, A., & Deli, J. (2021). Lutein Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Influences Iron Utilization of BV-2 Microglia. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(3), 363.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10030363> **Q1 IF 7.675**
6. Pandur, E., **Pap, R.**, Montskó, G., Jánosa, G., Sipos, K., & Kovács, G. L. (2021). Fractalkine enhances endometrial receptivity and activates iron transport towards trophoblast cells in an in vitro co-culture system of HEC-1A and JEG-3 cells. *Experimental cell research*, 403(1), 112583.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112583> **Q2 IF 4.145**
7. Varga, E., **Pap, R.**, Jánosa, G., Sipos, K., & Pandur, E. (2021). IL-6 Regulates Hepcidin Expression Via the BMP/SMAD Pathway by Altering BMP6, TMPRSS6 and Tfr2 Expressions at Normal and Inflammatory Conditions in BV2 Microglia. *Neurochemical research*, 46(5), 1224–1238. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03322-0> **Q1 IF 4.414**
8. **Pap, R.**, Montskó, G., Jánosa, G., Sipos, K., Kovács, G. L., & Pandur, E. (2020). Fractalkine Regulates HEC-1A/JEG-3 Interaction by Influencing the Expression of Implantation-Related Genes in an In Vitro Co-Culture Model. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3175. <https://doi.org/10.3390/ijms21093175> **Q1 IF 5.924**
9. Pandur, E., **Pap, R.**, Varga, E., Jánosa, G., Komoly, S., Fórizs, J., & Sipos, K. (2019). Relationship of Iron Metabolism and Short-Term Cuprizone Treatment of C57BL/6 Mice. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2257.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20092257> **Q1 IF 4.556**
10. Pandur, E., Tamási, K., **Pap, R.**, Varga, E., Miseta, A., & Sipos, K. (2019). Fractalkine Induces Hepcidin Expression of BV-2 Microglia and Causes Iron Accumulation in SH-SY5Y Cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(7), 985–1001.  
<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00694-4> **Q1 IF 3.606**
11. Pandur, E., Varga, E., Tamási, K., **Pap, R.**, Nagy, J., & Sipos, K. (2018). Effect of Inflammatory Mediators Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid on Iron Metabolism of Differentiated SH-SY5Y Cells Alters in the Presence of BV-2 Microglia. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 17.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20010017> **Q1 IF 4.556**
12. Ugor, E., Simon, D., Almanzar, G., **Pap, R.**, Najbauer, J., Németh, P., Balogh, P., Prelog, M., Czirják, L., & Berki, T. (2017). Increased proportions of functionally

impaired regulatory T cell subsets in systemic sclerosis. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 184, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.05.013> **Q1 IF 3.557**

13. Ugor, E., Simon D., **Pap, R.**, Kraljik, N., Németh, P., Boldizsár, F., & Berki, T. (2014). Investigation of glucocorticoid hormone sensitivity of regulatory T cells, Immunology Quarterly Volume VI. Issue 1-2., 2014. IF -
14. Prenek, L., Ugor, E., **Pap, R.**, Boldizsár, F., & Berki, T. (2014). Non-genomic effects of glucocorticoid hormones on signal transduction and apoptosis of T lymphocytes, Immunology Quarterly Volume VI. Issue 3-4., 2014. IF -

#### **A dolgozat témakörén kívüli konferenciaközlemények:**

1. **Ramóna Pap**, Edina Pandur, Gergely Jánosa, Adrienn Horváth, Viktória Farkas, József Deli, Katalin Sipos. The effect of lutein in glutamate-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022 (2022) p. 92. ISBN: 9786155270734
2. Edina Pandur, **Ramóna Pap**, Gergely Jánosa, Adrienn Horváth, Viktória Farkas, Katalin Sipos. Effect of fractalkine on the receptivity of iron deficient HEC-1A endometrium cells. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022. (2022) p. 51. ISBN: 9786155270734
3. Gergely Jánosa, Edina Pandur, **Ramóna Pap**, Adrienn Horváth, Katalin Sipos. Effect of vitamin D on the thapsigargin caused dysregulation of iron homeostasis in neuroblastoma cells. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022. (2022) p. 55. ISBN: 9786155270734
4. Adrienn Horváth, Edina Pandur, Gergely Jánosa, **Ramóna Pap**, Katalin Sipos. Interaction of dithiothreitol-induced unfolded protein response and vitamin D in a neuronal cell model. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022. (2022) p. 67. ISBN: 9786155270734
5. **Pap, Ramóna**; Pandur, Edina; Jánosa, Gergely; Deli, József; Sipos, Katalin. A LUTEIN OXIDATÍV STRESSZ ELLENI VÉDŐ SZEREPE BV-2 SEJTEKBEN. 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17 (2019) p. 47
6. Pandur, Edina; **Pap, Ramóna**; Jánosa, Gergely; Kovács, L. Gábor; Sipos, Katalin. A FRAKTALKIN HATÁSA AZ IMPLANTÁCIÓBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA ENDOMETRIUM ÉS TROPHOBLAST SEJTVONALAKON. 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17 (2019) p. 46

7. Jánosa, Gergely; Pandur, Edina; **Pap, Ramóna**; Sipos, Katalin. Rövid idejű cuprizone kezelés hatása a vasanyagcserére sclerosis multiplex egérmodellben. 49. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17 (2019) p. 29
8. Garai Kitti, Frezik Mónika, Almási Attila, Pandur Edina, **Pap Ramóna**, Horváth Györgyi, Bencsik Tímea, Póor Miklós, Pohóczky Krisztina, Pál Szilárd, Horváth Barbara, Perjési Pál, Kvell Krisztián. The diabetic drug metabolism drug landscape. Gyógyszer Innováció 2018 Konferencia Velence, 2018. ápr. 9-11.
9. **Pap Ramóna**, Pandur Edina, Tamási Kitti, Varga Edit, Sipos Katalin. A bakteriális membránkomponens LPS és LTA kezelés hatása a humán perifériás monociták/makrofágok vasanyagcseréjére. Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Biológiai Tanszék, 47. Membrántranszport Konferencia Sümeg 2017.
10. E. Ugor, K. Bodnár, D. Simon, T. Minier, **R. Pap**, V. Lóránd, L. Czirják, T. Berki, Regulatórikus T-sejtek vizsgálata szisztémás szklerózisban. Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 45. Membrántranszport Konferencia Sümeg 2015.
11. E. Ugor <sup>1</sup>, D. Simon <sup>1</sup>, **R. Pap** <sup>1</sup>, P. Németh <sup>1</sup>, T. Minier <sup>2</sup>, L. Czirják <sup>2</sup>, T. Berki <sup>1</sup>. Investigation of regulatory T cells in systemic sclerosis. <sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, <sup>2</sup>Department of Rheumatology and Immunology, University of Pécs, EULAR15-6234, The 16th Annual European Congress of Rheumatology EULAR, Rome 2015.

#### Előadások

12. K Sipos, E Pandur, **R Pap**, E Varga, G Jánosa: Hepcidin: regulation, role in diagnosis and therapy. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2018 56: 9. 59th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. Pécs, Hungary, August 30; September 1, 2018, **IF: 3.556** (2017)

#### Tudományos adatok:

Kumulatív impakt faktor: 69.505 (a dolgozat alapját képző: 5.586)

Idézetek összesen: 170 (ebből független: 144)

*h*-index: 7

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítségével PhD munkám nem valósulhatott volna meg.

Hálás köszönettel tartozom elsősorban a témavezetőmnek Prof. Dr. Berki Tímeának, aki lehetővé tette a kutatómunkába való bekapcsolódásomat az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben, hálás vagyok a tudományos diákköri, majd PhD hallgatói éveim során nyújtott sok-sok támogatásáért, útmutatásáért és gyakorlati tanácsaiért.

Köszönöm a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden munkatársának, akik segítettek a munkám során és a laboratóriumi technikák elsajátításában.

Köszönöm Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkópos felvételek készítésében nyújtott segítségét az Orvosi Biológiai Intézetben.

Nagyon köszönöm főnökömnek, Dr. Sipos Katalinnak és a munkatársaimnak a PTE GYTK Gyógyszerészi Biológiai Tanszéken, különösen Dr. Pandur Edina és Jánosa Gergelynek, hogy mindenben támogattak a hétköznapiakban, meghallgattak, inspiráltak és építő kritikával illettek.

Végtelenül köszönöm férjemnek, szüleimnek, testvéreimnek és a barátaimnak, akik türelmesen támogattak, bíztattak a munkám során, mindvégig mellettem álltak tanulmányaim alatt, és akik nélkül nem sikerült volna megvalósítani az álmaimat.

A munkám a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, OTKA K105962 számú támogatás, a GINOP-232-15-2016-00050 és EFOP361-16-2016-00004 támogatások segítségével valósult meg.