

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A glukokortikoid hormon szerepe a regulatórikus T-sejtek differenciálódásában

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Pap Ramóna



Témavezető:

Prof. Dr. Berki Tímea

Egyetemi tanár

PÉCS, 2022

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 antigénekkal szembeni tolerancia fenntartásában és a sejtek szupressziójában a túlzott immunválaszt kiváltó antigénstimuláció esetén (Sakaguchi és mtsai, 2010). A Treg sejtek segítenek fenntartani az immunológiai homeosztázist és csökkentik az autoimmun betegségek és allergiák kialakulásának kockázatát (Calzada és mtsai., 2018). Klinikailag fontos kérdés a Treg sejtek részvétele a szervkilökődés megelőzésében transzplantáció utáni betegeknel, az anyai-magzati toleranciában, valamint az autoimmun betegségek terápiás alkalmazásában is (Chandran és mtsai., 2017; Sharabi és mtsai., 2018). A Treg sejtek immunszupresszív és szabályozó funkcióját közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás vagy immunszupresszív citokinek, pl. Transzformáló növekedési faktor béta (TGF β), Interleukin (IL-) 10 vagy IL-35 termelés révén érvényesítik. Számos sejttípus célpontja a Treg sejteknek, beleértve a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteket, dendritikus sejteket (DC), B-sejteket, makrofágokat, természetes ölősejteket (NK-sejtek) (Shevach, 2018). A Treg sejtek legjobban jellemzett alcsoportjai a tímusból származó természetes Treg sejtek, valamint a perifériás Treg sejtek, amelyek a periférián lévő CD4⁺ T-sejtekből származnak (Shevach és Thornton, 2014). A Treg-ek expresszálnak CD4 és CD25 sejtfelszíni markereket, és pozitívak a Foxp3 transzkripciós faktorra. A Foxp3 a Treg sejtek vonalspecifikus transzkripciós faktora, és kulcsszerepet játszik az immunszupresszív fenotípus és funkció szabályozásában (Lu és mtsai., 2017).

A Treg sejtek *in vitro* indukálhatók naiv T-sejtekből TGF β és IL-2 jelenlétében, az ilyen sejteket indukált Treg (iTreg) sejteknek nevezik. Folyamatban vannak a kutatások egy stabil indukált Treg populáció létrehozására klinikai alkalmazásokhoz. Számos csoport elemezte a Foxp3⁺ T-sejtek *in vitro* indukálásának optimális körülményeit, mivel ez fontos a jövőbeli Treg terápia szempontjából (Hadaschik és Enk, 2015). 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 mikrokoznyezettől függ, beleértve a citokin környezetet, a metabolitokat és a hormonokat, amelyek meghatározhatják a toleranciát közvetítő iTreg sejtek sorsát. Különböféle módszerek javasoltak a Foxp3 expressziójának fokozására és stabilizálására, mint például a progeszteron, a retinsav, a D3-vitamin és a rapamicin (Hoepli és mtsai., 2015; Schmidt és mtsai., 2016). Ezenkívül hasznosak lehetnek azok a gyógyszerek, amelyek közvetlenül elősegíthetik a naiv 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 immunszupresszív citokineket, IL-10-et és TGF β -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* expanziójára és citokinprofiljára egy jövőbeni stabil, magasabb hozamú Treg populáció indukálásához.

2. 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⁺ 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).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

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.

In vivo DX kezelés

Kísérleti állatainkat 2-4 napig intraperitoneálisan oltottuk magas dózisu (20 mg/testtömeg kg) Dexametazonnal PBS-el hígítva. Az utolsó oltást követően 24 óra elteltével eltávolítottuk az egerek lépét és tímuszát és RPMI-1640 (RPMI) médiumba helyeztük.

Timociták és lépsejtek izolálása

Az egerek feláldozását követően eltávolítottuk tímuszukat és lépüket. A szerveket mechanikusan homogenizáltuk RPMI médiumban, majd a szuszpenziót átszűrtük vattán, hogy

a szöveti törmeléktől megszabaduljunk. A sejteket megmostuk 1X PBS-ben, 5 percig centrifugáltuk 5000 rpm sebességgel, majd 1 mL RPMI tápfolyadékba vettük fel. A sejtek életképességének meghatározásához és a sejtszámoláshoz tripánkék festékkizárásos technikát alkalmaztunk. 1×10^6 timocitát és lépsejtet kezeltünk nagy dózisu 10^{-6} M DX-nal (10^{-2} M törzsoldat dimetil-szulfoxidban feloldva (DMSO) szérumentes 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 jég hideg PBS- NaN_3 (1X Foszfát pufferes sóoldat, 0,1% Na-azid tartalommal) hozzáadásával állítottuk le.

CD4⁺ sejtek izolálása és tisztítása

A CD4⁺ T-sejteket a frissen izolált lép és tímusz sejtekből negatív szelekcióval nyertük az EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Enrichment Kits szelekciós kitet használva. A szelekciót a gyártó által javasolt leírás alapján végeztük EasySep Magnet gyári lila mágnes használva. A szelekciót lamináris fülkében végeztük. A kiindulási sejtszám $1-1.5 \times 10^8$ sejt/mL timocita vagy lép sejt a szelekciós pufferbe felvéve (PBS, 2% FBS, 1 mM EDTA) 5 mL-es steril polisztirol csőben. A szelekció a gyártói protokollnak megfelelően történt. A mágneses szelekció után a felülúszó tartalmazza a negatívan szelektált T-sejteket. A szelekció végén kinyert CD4⁺ 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⁺ tisztasága $>96\%$ volt. A sejtek RPMI-ben történő mosását követően az élő sejtszámot Bürker kamrában, tripánkék festékkizárásos teszt segítségével határoztuk meg.

***In vitro* Treg sejt expanszió**

A CD4⁺ 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 mikrogyöngyök (2:1, gyöngy:sejt arányban) segítségével, 30 U/mL rekombináns IL-2 \pm 40 pg/mL rekombináns TGF β 1 \pm 10^{-6} mol/L DX jelenlétében 24-lyukú lemezen (1000 μL /lyuk) 37°C -on 5% CO_2 tartalommal. Az *in vitro* tenyésztést követően a sejteket összegyűjtöttük és a mikrogyöngyöket eltávolítottuk az EasySep Magnet 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 kit segítségével, valamint a fluoreszcens jelölést követően áramlási citometriás méréseket végeztünk.

Antitestek és fluorokrómok

Az áramlási citometriás méréseknél a Treg sejtek azonosítására anti-CD4-FITC (YTS 191), anti-CD8-PE (53-6.7) és anti-CD25-PE-Cy5 (RM4-5) vagy anti-CD25-PE-Cy7 (PC61) sejtfelszíni antitesteket, illetve anti-Foxp3-PE (3G3), anti-IL-10-APC (JES5-16E3) és anti-TGF β -PerCP (TW7-16B4) intracelluláris antitesteket használtunk. Az *in vitro* differenciált T-sejtek és Treg sejtek további vizsgálataikhoz anti-IL-17A-PerCP-Cyanine5.5 (17B7), anti-IFN γ -APC (XMG1.2) és anti-IL-4-FITC (BVD6-24G2) monoklonális ellenanyagokat használtunk.

A Treg sejtek FACS szeparálásához anti-CD4-PE (YTS 191.1.2) és anti-CD25-PE-Cy5 (PC61.5) antitesteket használtunk. A konfokális mikroszkópos metszetek jelöléséhez anti-CD4-Pacific Blue (RM4-5), anti-CD8-PE (53-6.7), anti-CD25-PE-Cy5 (PC61), anti-Foxp3-Alexa Fluor 647 150D), anti-GR-FITC (5E4-B1) antitesteket használtunk.

Antitest jelölés és áramlási citometriás mérés

A sejt felszíni jelöléshez az adott antitestnek megfelelő koncentrációkkal antitest koktélt készítettünk 100 μ L PBS/0,1% BSA/0,1% NaN_3 jelölő pufferben. Mintánként 10^6 élő sejtet jelöltünk fluoreszcens monoklonális antitesttel. A sejteket 30 percen keresztül inkubáltuk sötétben, ezt követően a mintákat kétszer mostuk 2 mL PBS/ NaN_3 mosó pufferben. Az intracelluláris jelöléshez az eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set kitet használtuk. A sejteket 30 percig fixáltuk és permeabilizáltuk sötétben, jégen 1 mL fixáló/permeabilizáló pufferrel. A fixálást követően 2 x 2 mL előzőleg meghigított permeabilizáló pufferrel mostuk a sejteket. 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 μ L fixáló pufferben (15 μ L 35%-os formaldehid + 485 μ 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 mértük, az eredményeket az FCS Express 4 Flow Research program segítségével analizáltuk. Mintánként 100000 eseményt mértünk a limfocita kapuból. A nagyság és granularitás (FSC/SSC) paraméterek alapján azonosítottuk a limfocitákat, majd azokon belül a CD4^+ sejteket vizsgáltuk tovább. A CD4^+ T-sejt populáción belül $\text{CD25}^{\text{high+}}\text{Foxp3}^+$ alpopulációt tekintettük Treg sejteknek. A citokinek arányát a CD4^+ T-sejt és a Treg populáción belül is meghatároztuk.

Fluoreszcens jelölt minták vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A fluoreszcens konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz a sejtpreparátumokat sejt felszíni 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 segítségével történt, amely minimalizálja a fluorokrómok kifakítását (photobleaching) azáltal, hogy stabilizálja a fluorokrómokot 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 hullámhosszakat 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.

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. A limfocita kapun belül a CD4⁺ és magas CD25⁺ pozitivitást mutató sejtek kerültek kiválogatásra. Az RNS minták izolálása NucleoSpin RNA XS kit segítségével történt 10⁵ CD4⁺CD25^{high+} sejtől, a komplementer DNS szintetizálása random oligo(dT) primerek 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'; TGF β 1 (Forward) 5'- GAC TCT CCA CCT GCA AGA CC 3'; TGF β 1 (Reverse) 5'- GGA CTG GCG AGC CTT AGT TT-3'; GR (Forward) 5'- TGG TGT GCT CCG ATG A-3'; GR (Reverse) 5'-AGG GTA GGG GTA AGC -3'.

PMA/ionomycin stimuláció

A CD4⁺ T-sejtek aktivációjához *in vitro* Forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA)/ionomycin stimulációt végeztünk a kezeletlen lépéből és tímusból izolált, valamint az *in vivo* DX kezelt állatokból szelektált CD4⁺ T-sejteken is. A stimuláció 25 ng/mL PMA és 1 $\mu\text{g/mL}$ Ionomycin jelenlétében történt RPMI médiumban, 24 órán keresztül, 37 °C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett. Az inkubációs idő leteltével a sejteket összegyűjtöttük és fluoreszcens antitesttel történő jelölést követően áramlási citometriás méréseket végeztünk a Treg sejt arányok meghatározására.

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.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Kutatásunk során optimalizálni szeretnénk volna a megfelelő feltételeket a Treg sejtek *in vitro* differenciálódásához és expanziójához tímusz és lép CD4⁺ T-sejtekből. A Treg sejtek az immunszabályozás és az immunológiai tolerancia fenntartásának elengedhetetlen közvetítői, és mint ilyenek, számos betegség szempontjából kulcsfontosságú terápiás célpontok (Li és mtsai., 2018; 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 (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 érzékenységének 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 (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⁺ 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⁺ T-sejteket, differenciáltatást alkalmaztunk különböző kondíciók segítségével. A sejtek legjobb expanziója 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⁺ 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). A DX modellbe történő beépítése releváns lehet a GC hormonok immunrendszerben játszott komplex szerepének további megismerésében (Bereshchenko és mtsai., 2018; Quatrini és mtsai., 2021).

A Foxp3 relatív mRNS szintek növekedtek a rIL-2 + rTGF β kezeléssel és további növekedést mutattak, amikor DX-t adtunk a sejt kultúrákhoz. Ezek az adatok arra utalhatnak, hogy a tímikus és lép CD4⁺ T-sejtek differenciálódása a Treg fenotípus felé elősegíthető IL-2 + TGF β + DX kezeléssel *in vitro* körülmények között (Pap és mtsai., 2019). Az IL-2 + TGF β hatása a naiv CD4⁺ T-sejteknek a Treg-fenotípus irányába történő polarizációjára ismert (Apert és mtsai., 2018). Az IL-2 citokint használják klinikai körülmények között különféle autoimmun betegségek és transzplantáción átesett betegek kezelésére, ahol kimutatták, hogy a Treg sejtek *in vivo* expanziójához vezet (Ye és mtsai., 2018). A TGF β immunrendszerre gyakorolt fiziológiai és patológiás körülményekre gyakorolt hatásáról szóló jelentős ismeretek ellenére a TGF β 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 TGF β 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 TGF β 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 TGF β és DX kezelés eredményeként, mivel a Foxp3 gén expresszió predikciója a stabil transzkripciós 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 β) termelését a Treg sejtekben. A Treg sejtekben megnövekedett arányban detektáltunk IL-10-et és a TGF β citokint expresszáló sejteket amikor IL-2, TGF β és DX kombinációval kezeltük azokat. Az IL-10 mRNS relatív szintje növekedést mutatott, összehasonlítva a kontroll sejtenyészetekkel (anti-CD3/CD28), kivéve a lépből származó sejteket, ha IL-2 + TGF β -val tenyésztettük. A TGF β mRNS relatív szintje tímusz eredetű Treg-ekben csak abban az esetben emelkedett szignifikánsan, amikor anti-CD3/CD28 mikrogyöngyökkel + rIL-2 + rTGF β + DX-nal kezeltünk (Pap és mtsai., 2019).

Korábban leírtuk, hogy az *in vivo* DX kezelés az egerekben emelkedett IL-10 és TGF β 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 β -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 β a citokinek endogén készletének részeként vannak jelen. Feltételezzük, hogy a Treg sejtek fokozott IL-10 és TGF β 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 előreccatolással erősíthetik a Treg hálózatot (Kim és mtsai., 2020).

Az egerek nagy dózisu DX-nal történő előkezelésével végzett kísérleteink azt mutatták, hogy a CD4⁺ 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 lépből 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 szelektív elpusztítását 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 előkezelünk, 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 követő *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⁺ T-sejtekben az *in vitro* DX kezelést követően. A GR – Foxp3 transzkripciós faktor kolokalizáció magyarázatot adhat a GC Treg sejtekre gyakorolt hatásának mechanizmusára.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

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 expanzióját, elősegíti a Foxp3⁺ 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 expanziója és csökkent a lép eredetű Treg sejteké). 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 Treg sejtek terápiás optimalizálásában.

1. Sikerült *in vitro* Treg sejtet expandálni tímuszból és lépéből izolált CD4⁺ T-sejtekből CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGFβ segítségével.
2. A tímuszból *in vitro* expandált Treg sejtek abszolút száma a legnagyobb emelkedést CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGFβ jelenlétében mutatta. A lépéből *in vitro* expandált Treg sejtek abszolút sejt száma szignifikánsan emelkedett CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGFβ jelenlétében, és tovább emelkedett DX hozzáadására.
3. A tímuszból és lépéből *in vitro* expandált Treg sejtekben emelkedett a Foxp3 transzkripciós faktor relatív mRNS expressziója CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 és rTGFβ jelenlétében, amely a lépéből indukált Treg sejtek esetében további szignifikáns emelkedést mutatott DX hozzáadására.
4. Az *in vitro* tímuszból és lépéből differenciált Treg sejtek IL-10 és TGFβ citokineket termelnek. A tímuszból differenciált Treg sejtek CD3/CD28, rIL-2, rTGFβ hatására emelkedett IL-10 és TGFβ termelést mutattak, DX hozzáadására a TGFβ tovább emelkedett. A lépéből *in vitro* differenciált sejtek emelkedett IL-10 és TGFβ szekréciót mutattak már a CD3/CD28 mikrogyöngyök, rIL-2 hatására is, a TGFβ tovább emelkedett DX jelenlétében.
5. A Treg sejtek *in vitro* expansziója nem okoz Th1, Th2, Th17 irányú citokin termelést.
6. Az *in vivo* DX előkezelés javítja a tímuszból indukált Treg sejtek *in vitro* expanszióját, míg a lépéből nem.
7. Az *in vitro* DX kezelés következtében emelkedik a tímuszból és lépéből indukált Treg sejtek GR expressziója, továbbá emelkedik a Foxp3 transzkripciós faktor és a GR kolokalizációja.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

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>

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>

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-β signaling. *Cell reports*, 7(2), 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.004>

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>

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>

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>

- 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>
- Hadaschik, E. N., & Enk, A. H. (2015). TGF- β 1-induced regulatory T cells. *Human immunology*, 76(8), 561–564. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.06.015>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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., 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>

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>

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>

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>

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>

7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A dolgozat alapját képző bírált folyóiratban megjelent publikációk:

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

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 előadás és poszter konferencia közlemények:

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Tudományos adatok:

Kumulatív impakt faktor: 69,505 (a dolgozat alapját képező: 5,586)

Idézetek összesen: 170 (ebből független: 144)

h-index: 7

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítségével nélkül 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, nagyra értékelem a tudományos diákköri, majd PhD hallgatói éveim során nyújtott sok-sok támogatását, útmutatását és gyakorlati tanácsait.

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, folyamatosan 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 (NKFI), K105962 számú támogatás, a GINOP-232-15-2016-00050 és EFOP361-16-2016-00004 támogatások segítségével valósult meg.