

PhD TÉZISEK

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



Dr. Ugor Emese

PTE KK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Dr. Simon Diána, egyetemi adjunktus

Programvezető: Prof. Dr. Németh Péter, egyetemi tanár

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

Pécs

2017

1. Bevezetés

A regulatórikus T-sejt egy olyan speciális alcsoportja (populációja) a T-sejteknek, amely kulcsszerepet játszik a saját antigénekkal szembeni toleranciában és az antigén stimuláció által kiváltott túlzott immunreakció gátlásában, így segítve az immunhomeosztázis fenntartását és csökkentve az autoimmun betegségek és allergiák kialakulásának kockázatát. Klinikai relevanciáját tovább növeli a transzplantáció utáni szervkilökődés folyamatában és az anya magzat iránti toleranciájában betöltött szerepe. A Treg sejtek ezidáig legjobban leírt alcsoportja a tímusz eredetű, természetes (tTreg) Treg-sejtek és a periférián kialakuló indukált (iTreg) - újabb nomenklátúra szerint periférás (pTreg) – Treg-sejtek. Mindkét alcsoportra jellemző a Foxp3 (Forkhead borsz protein 3) transzkripciós faktor és a sejtfelszíni CD25 és CD4 expresszió.

A sejtvonal specifikus faktorok fontos szerepet játszanak a sejtek differenciálódásában azáltal, hogy számos olyan gén expresszióját szabályozzák, melyeknek expressziós minázata adott sejttípus funkcionális és fenotípusos tulajdonságait meghatározzák. A Foxp3 a fokhead transzkripciós faktor család tagja, melyet egy általános DNS kötő domén, a forkhead box domén, vagy winged helix domén határoz meg. A Foxp3-at a Treg irányú sejtvonal elköteleződés „fő szabályozójának” tartják. Funkciója még ismeretlen, de a működőképes Foxp3 hiánya IPEX-szindrómához vezet. Egyes adatok szerint felmerült, hogy a Foxp3 expresszió önmagában nem elegendő a Treg-ek stabil szuppressziójának fenntartásához vagy a működőképes Treg-ek megbízható definíciójához. Erre példa az aktivált effektor T-sejtek (Teff) tranziens Foxp3 expresszióra anélkül, hogy szuppresszor aktivitásra tennének szert sőt, az aktiváció hatására proinflammatorikus citokineket termelnek. Mint transzkripciós faktor, a Foxp3 sok más sejttaktivációban, differenciálódásban és TCR stimulációban szerepet játszó transzkripciós faktorkal kerül interakcióba. A másik oldalról viszont a Foxp3 transzkripciós ko-represszorként is viselkedhet, mivel gátolja az NF κ B, CREB, és ROR α aktivitását. Tehát a Foxp3 kölcsönhatásban más transzkripciós faktorokkal transzkripciós aktivátorként és represszorként is működik, illetve a T-sejteket az immuntolerancia irányába programozza, például úgy, hogy represszálja az IL-2-t és szabályozza a Treg-ek szuppresszor funkcióját a NFAT transzkripciós faktorkal való interakciója által. Ezen kívül egyes transzkripciós faktor partnerei kölcsönösen elősegítik a Foxp3 gén expresszióját.

A TGF β a “transforming growth factor beta” szupercsalád egy szabályozó citokinje, amely receptor serin/threonine kináz jelátviteli útok hat, Treg-ek, makrofágok és sok más sejttípus is termeli. Pleiotrop hatású citokin, mely IL-6-al közösen a naív T-sejtek Th17 irányú, IL-6 hiányában pedig a pTreg irányú differenciálódását segíti elő. Az IL-10-et bizonyos körülmények között szintén termelik más sejttípusok is (Th1, Th2, Th17, B-sejtek), jellemzően immunválasz és gyulladás gátló citokin.

Jelenleg nem ismert pontosan a GC-kezelés hatása a Treg-ek aktivitására vagy előfordulási gyakoriságára, de bizonyított, hogy a GC-k használata elősegíti a Treg indukciót. Ezért a GC-kezelést terápiásan alkalmazzák olyan esetekben, amikor csökkent vagy elveszett a saját antigénekkal szembeni perifériás tolerancia (mint például autoimmun betegségek, allergia), vagy alkalmazzák transzplantáció utáni szervkilökődés megelőzésére is. Mivel a Treg sejtek és a GC hormonok is a citokintermelés és a sejttaktiváció befolyásolásával fejtik ki immunosuppresszív hatásukat, érdekes kérdés volt a szinergisztikus hatásuk vizsgálata. A Treg sejtek GC érzékenységét vizsgáló tanulmányok egérkísérletekben ellentmondásokkal, beszámoltak mind emelkedett, mind csökkent Treg arányokról DX kezelés hatására. Balb/c

egerek tímuszában és lépében emelkedett CD4⁺CD25⁺ Treg sejtarányt, illetve magasabb Bcl-2 és GR szinteket figyeltek meg CD4⁺CD25⁺ sejtekben a CD4⁺CD25⁻ sejtekhez képest. Egy másik vizsgálatban IL-2 és DX adása szintén magasabb Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg sejtarányokat eredményezett a perifériás nyirokszervekben. A másik oldalról viszont a Treg-eket betegségmodellben vizsgáló tanulmányok a kortikoszteroid kezelés Treg kialakulást kolatózó hatását feltételezik, de nem vizsgálták a Treg sejteket specifikus sejtfelszíni, vagy intracelluláris markerrel.

Az SSc-ben észlelt érelváltozások és fibrózis kialakulásának kulcs ingere a T-limfocita aktiváció. Ennek eredményeképpen az aktivált T-limfociták, főként CD4⁺ T-sejtek fedezhetőek fel az SSc-ben szenvedő betegek keringésében és az érintett szervekben is. Ezen felül sok tanulmány az immunrendszer más elemeit – mint például autoantitestek és emelkedett citokin szintek – is összefüggésbe hozza az SSc patológiájával. Mivel a TGFβ részt vesz a fibrózisként megjelenő szervi érintettség kialakulásában valamint a Treg kialakulásban és funkcióban is, esetleg szerepet játszhat az SSc patogenezisében is. Sok közlemény számol be emelkedett Treg arányokról SSc-s betegek perifériás vérének mononukleáris sejt (PBMC) frakciójában, míg néhány tanulmány normál, vagy csökkent Treg szinteket közöl. Mindemellett általános feltételezés, hogy nem csak a Treg-ek megváltozott száma, hanem azok diszfunkciója is felelős az SSc-ben talált abnormális immunszuppressziót mutató Treg sejtekért.

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

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

2. Célkitűzések

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

3. Anyagok és módszerek

3.1 Treg-ek vizsgálata egérmodellen

3.1.1 Kísérleti állatok

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

3.1.2 In vivo glukokortikoid kezelés

A glukokortikoid hatás kiváltására az állatokat 20 mg/kg/nap dexametazonnal (Oradexon, N. V. Organon) oltottuk 1-4 napon át intraperitoneálisan. Ez a koncentráció nagy dózisú szteroid kezelést jelent. Kezeletlen állatok szolgáltak kontrollként. Az állatokat 24

órával az utolsó oltást követően áldoztuk fel. A vizsgált szerveket az eltávolítást követően 0,1% BSA és 0,1% NaN₃ tartalmú PBS-ben mechanikusan homogenizáltuk, majd ezt követően nejlonszűrőn szűrtük.

3.1.3 Antitestek és fluorochromok

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

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

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

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

3.1.4 Intracelluláris jelölés és áramlási citometria

A kísérleti állatok tímuszát, lépét, mezenteriális és perifériás nyirokcsomóit, valamint Peyer-plakkjait eltávolítottuk. A szerveket mechanikusan homogenizáltuk, majd a kapott szuszpenziót vattán átszűrtük, 5 percig 1000 RPM-en centrifugáltuk, majd 1ml RPMI tápfolyadékba vettük fel. A sejtek életképességét tripánkék festék kizárásos teszttel határoztuk meg, majd mintánként 10⁶ sejttel dolgoztunk tovább. A sejteket kétszer mostuk PBS-ben.

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

Az intracelluláris jelöléshez a BioLegend FoxP3 Fixáló/Permeabilizáló puffer kit-et (Cat: 421403) használtuk: 1 ml FoxP3 Fixáló/Permeabilizáló puffert adtunk a mintákhoz, majd szobahőmérsékleten, sötétben 20 percig inkubáltuk. Centrifugálást követően, a felülúszó eltávolítása után a sejteket egyszer 1 ml jelölő pufferben, egyszer 1 ml FoxP3 Permeabilizáló pufferben mostuk, majd 1 ml FoxP3 Permeabilizáló pufferben vettük fel, ebben 15 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. Centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után került a mintákra az intracelluláris antitest-koktél, szintén megfelelő koncentrációban, 100 µl jelölő pufferben, amivel sötétben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Kétszer 2 ml mosó pufferes mosás után 400 µl FACS-Fix pufferben felvettük a sejteket az áramlási citometriás méréshez.

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

3.1.5 RT-PCR

Treg sejtek izolálása RT-PCR-hoz

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

RNS előkészítés és kvantitatív RT-PCR

Az RNS izolálása 10⁵ CD4⁺CD25^{high+} sejtől NucleoSpin RNA XS kit segítségével, a cDNA előállítását random oligo(dT) primerek (Applied Biosystems) felhasználásával történt. A génextpresszió kvantifikálása a SYBR Green metódussal zajlott Applied Biosystems 7500 RT-PCR rendszerben. A relatív expressziós szintek meghatározása aktinhoz való normalizálást követően történt, az eredményeket pedig a kezeletlen Treg-ek mRNS szintjeinek többszöröseként ábrázoltuk (RQ). A következő primer-szekvenciákat alkalmaztuk: β -ACTIN (Forward) 5'- GGG AGG GTG AGG GAC TTC C -3'; β -ACTIN (Reverse) 5'- TGG GCG CTT TTG ACT CAG GA -3'; IL-10 (Forward) 5'- GTG AAG ACT TTC TTT CAA ACA AAG -3'; IL-10 (Reverse) 5'- CTG CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT -3'; Foxp3 (Forward) 5'- TAC TTC AGA AAC CAC CCC GC -3'; Foxp3 (Reverse) 5'- GTC CAC ACT GCT CCC TTC TC -3'; 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'; egér GR (Forward) 5'- TGG TGT GCT CCG ATG A-3'; egér GR (Reverse) 5'-AGG GTA GGG GTA AGC -3'.

3.1.6 Statisztika

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

3.2 Treg-ek vizsgálata szisztémás szklerózisban

3.2.1 Betegek

A vizsgálatot az Országos Etikai Bizottság engedélyezte (Engedélyszám: 84-256/2008-1018EKU) A vizsgálatban résztvevő személyek előzetes tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot tettek. Beteganyagunkat (n=26) a Pécsi Tudományegyetem Reumatológiai és Immunológiai Klinika által kivizsgált, és gondozott, immunszuppresszív kezelésben még nem részesült (n=18), illetve szteroid és/vagy ciklofoszfamid (CPH) kezelt (n=8) szisztémás szklerózisos betegek alkotják. A kontrollcsoportot (n=10) korban, és nemben illesztett

egészséges önkéntesek alkotják. A 26 betegből 20 nő, 6 férfi, a betegek átlagéletkora 54,69 év, az átlagos betegség-fennállás 2,54 év. a LeRoy kritériumok alapján 7 az lcSSc alcsoportba, 19 a dcSSc alcsoportba lett sorolva. A betegség diagnózisa az ACR/EULAR által 2013-ban kidolgozott diagnosztikus kritériumrendszer alapján lett felállítva. A betegség fennállás az első nem-Raynaud tünet megjelenésétől lett számítva. A vérminták standard eljárás szerint, heparin tartalmú vákuumcsőbe történő levétel után kerültek feldolgozásra. A tüdő fibrózis kimutatása HRCT-vel és/vagy a forszírozott vitálkapacitás mérésével történt. (FVC <80%). A betegség aktivitás az EScSG betegség aktivitási index alapján lett meghatározva. Aktív betegségnek minősült, ha az aktivitási index értéke nagyobb volt, mint 3.

3.2.2 Autonatitest mérés

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

3.2.3 A Treg alcsoportok áramlási citometriás azonosítása

A többparaméteres áramlási citometriás vizsgálatok Ficoll gradiens centrifugálással izolált PBMC-ken történt. A Treg és alcsoportjainak meghatározására FITC konjugált anti-CD4 (Becton Dickinson, RPA-T4), APC konjugált anti-CD25 (Becton Dickinson, M-A251), PE konjugált anti-Foxp3 (Becton Dickinson, 259D/C7), PacificBlue konjugált anti-CD127 (BioLegend, AO19D5) és APC/Cy7 konjugált anti-CD62L (BioLegend, DREG-5C) antitesteket használtunk. Az intracelluláris jelölés Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) segítségével történt. A jelölt sejtek fluoreszcenciájának mérése FACS Canto II áramlási citométeren (Becton Dickinson, USA) zajlott, a mért adatok analízise FCS Express 4 szoftverrel történt (De Novo Software, USA).

3.2.4 Citokin mérés

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

3.2.5 Metiláció analízis és piro szekvenálás

Genomiális DNS izolálása a B-sejt depletált limfocitákból QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) felhasználásával történt. A *FOXP3* promóter és upstream enhancer cél régióiban lévő CpG metiláció szintjének meghatározásához használt assay a PyroMark Assay Design software

(Qiagen, Hilden, Germany) segítségével lett tervezve. A DNS minták biszulfid konverziója EpiTectFast 96 Bisulfite Kit (Qiagen) segítségével történt. A PCR amplifikációs lépések Vapo-Protect™-en (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany) történtek. Denaturációs lépés 5 perc 95°C, 37 ciklus 30 másodpercig 95°C, primer-specifikus annealing 60°C 30 másodpercig, 72°C 45 másodpercig, és a végső extensio 72°C 7 percig. A reakciós keverék MgCl₂ tartalmú 5 µl 10x PCR puffert, 1 µl 10 mM dNTP mixet, 2.5 µl forward and reverse primert (végső koncentráció 0.5 µM), 0.4 µl (végső koncentráció 1 U) Taq DNA polimerázt (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 36.6 µl nukleázmentes vizet, és 2 µl templát DNS-t (70-200 ng) tartalmazott. A következő primereket használtuk fel: Foxp3 (forward) 5'- Biotin-AGT TTG GTT TGT GGG AAA TTG TT -3'; Foxp3 (reverse) 5'- ACC CTA TTA TCT CAT TAA TAC CTC TCA -3'; Foxp3 (Sequence1) 5'- ATA AAA ACA AAA TTA TTT TTA ATA -3'; Foxp3 (Sequence2) 5'- AAA TTA TTA AAA AAA AAA AAT CTA C -3'; Foxp3 Enhancer (forward) 5'- ATG AAG GGG AGG AGG AAG -3'; Foxp3 Enhancer (reverse) 5'- Biotin-CCT CCA ACT CCA CCA TAA C -3'; Foxp3 Enhancer (Sequence1) 5'- GAG GAA GAG GAG GTT -3'; Foxp3 Enhancer (Sequence2) 5'- GGG TTT TAT TTG GTT TTT ATA TT -3'. A PCR termékek ellenőrzése 1.0% agaróz gélelektroforézissel történt.

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

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

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

3.2.7 Statisztika

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

4. Eredmények

4.1 Treg-ek vizsgálata egérmodellen

4.1.1 DX-kezelés hatása Treg sejtekre

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

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

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

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

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

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

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a GC kezelés a Treg sejtarányokra kifejtett hatása mellett a Treg funkcióra is hatással van-e, ezért a tTreg-ek és pTreg-ek IL-10 és TGF β produkciójának és Foxp3 expressziójának változását követtük. A tímuszban az IL-10 pozitív és TGF β pozitív Treg-ek aránya hasonló volt ($11.0 \pm 2.3\%$ és $13.5 \pm 3.1\%$), és a DX kezelés mindkét citokin esetében szignifikáns aránynövekedést okozott ($17.6 \pm 1.4\%$ és $21.0 \pm 4.9\%$). A kontroll

állatok lépében a TGF β pozitív Treg-ek aránya (13.7 \pm 2.0%) szignifikánsan magasabb volt az IL-10 pozitív Treg-ekhez (3.6 \pm 0.5%) viszonyítva, és bár a 48 órás DX kezelés hatására az IL-10 emelkedés jóval markánsabb, de mindkét citokin aránya szignifikánsan emelkedett.

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

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

4.1.3 DX-kezelés hatása a GR expresszióra

Egy adott sejt típus GC érzékenységét nagyban meghatározza annak GR expressziós szintje, ezért vizsgáltuk a lehetséges összefüggést a tTreg-eknél tapasztalt GC rezisztencia és a Treg-ek GR expressziója között. Ennek érdekében áramlási citometriával mértük az intracelluláris GR szinteket és qRT-PCR-t végeztünk a GR mRNS szintek meghatározásához CD4⁺CD25^{high+} tisztított tímusz és lép eredetű Treg sejtekben.

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

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

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

4.2 Treg-ek vizsgálata szisztémás szkerózisban

4.2.1 Treg-ek azonosítása humán mintákban

A Treg sejtek azonosítására három különböző, korábbi Treg sejt vizsgálatokon alapuló markerkombinációt alkalmaztunk. Összehasonlítottuk a „konvencionális” CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg jelölést, egy „kiterjesztett” (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) sejt felszíni és a

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

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

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

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

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

4.2.3 Emelkedett CD62L+Treg arány és csökkent TGF β termelés SSc-ben

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

A következőkben a CD62L+ Treg citokinjeit vizsgáltuk. Az egészséges kontroll csoport mintáiban lényegesen magasabb volt az IL-10 pozitív és a TGF β pozitív CD62L+ Treg arány (IL-10: $4.3 \pm 0.6\%$; TGF β : $49.1 \pm 9.6\%$), mint a teljes Treg populációban mért citokin pozitivitás (IL-10: $1.3 \pm 0.2\%$; TGF β : $1.4 \pm 0.2\%$). Az lcSSc és a dcSSc alcsoportban is

szignifikánsan alacsonyabb TGF β pozitív CD62L+ Treg arányt találtunk az egészséges csoporthoz viszonyítva. Az autoantitest pozitivitás alapján történő felosztás esetében mindhárom csoportban (autoantitest negatív, ACA pozitív, Scl-70 és RNA-Pol-III pozitív) szintén szignifikánsan alacsonyabb TGF β pozitív CD62L+ Treg arányt találtunk ($p < 0,05$). Az IL-10 pozitív CD62L+Treg arányokban nem tapasztaltunk különbségeket egyik alcsoport esetében sem. A citokin pozitív CD62L+ Treg-ek ilyen csökkenése és emellett arányuk növekedése, a Treg-ek funkcionális kimerülésére utalhat.

4.2.4 CD4+CD25-Foxp3+ T-sejt gyakoriság

Korábban leírtak egy CD4+CD25-, de Foxp3+ sejtcsoportot, mely megfelelő hatásokra CD25+, Treg fenotípusú konvertálható. Ezen CD4+CD25-Foxp3+, Treg rezerv sejtpopuláció érintettségét is vizsgáltuk SSc-ben. Egészséges kontrolokhoz hasonlítva egy nem szignifikáns, de tendenciózusan alacsonyabb CD4+CD25-Foxp3+ T-sejt arányt találtunk SSc-ben. A tüdő fibrózisával nem érintett SSc betegcsoportban ezen sejtcsoport aránya viszont szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a tüdő fibrózisával érintett csoporthoz képest ($p < 0,05$). Ebből arra következtetünk, hogy a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek olyan nagy arányban alakulnak át Treg sejtekké, hogy ez a CD4+CD25-Foxp3+ sejtek relatív hiányát okozza.

4.2.5 Emelkedett FOXP3 génexpresszió aktív SSc-ben

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

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

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

5. Összefoglalás és következtetések

5.1 Treg sejtek összetételének és glukokortikoid hormon érzékenységének vizsgálata egérmodellen

Az allo- és autoantigénekkal szembeni immunválasz gátlásával a regulatórikus T-sejtek (Treg) és glukokortikoid hormonok (GC) fontos tényezői az immunválasz szabályozásának és

a perifériás tolerancia fenntartásának. Gyulladásos betegségek, autoimmun és transzplantált betegek kezelésének egyik legfontosabb eszközei a GC analógok, mégis keveset tudunk a Treg sejtekre kifejtett hatásairól.

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

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

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

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

Egy adott sejt GC érzékenysége a GC expressziójának szintjétől és különböző jelátviteli utakkal való összekapcsolódásától függ. Intézetünkben végzett korábbi kísérletek alapján ismert, hogy az éretlen DP timociták expresszálják a legalacsonyabb szinten a GR-t, ennek ellenére a legérzékenyebb sejtpopuláció a GC-indukálta apoptózisra. A GC kezelést túlélő, SP sejtje differenciálódó timocitákban ugyanakkor a GR upregulációja figyelhető meg. Az érett, perifériás limfocitákban ugyancsak magasabb a GR szint, sokkal rezisztensebbek a GC-analóg kezelésekkel szemben, és bennük a GR szignifikáns downregulációja figyelhető meg GC kezelést követően. Jelenlegi adataink azt mutatják, hogy a kezeletlen kontroll állatok tímuszában található Treg-ek GR expressziója alacsonyabb, mint a lép Treg sejtjeiben, ami a lokális mikrokörnyezeti hatások következménye lehet (mint például a lokális GR termelés). GC kezelés hatására a tímuszban a Treg sejtek GR expressziója emelkedett, míg a lép Treg sejtjeiben downreguláció volt megfigyelhető, ami szintén a tímusz eredetű és perifériás Treg-ek különböző GC szenzitivitására utalhat. A GC hatására aktivált jelátviteli utak a Treg sejtekben azonban további vizsgálatokat igényelnek.

In vivo ismételt DX kezelés hatására megemelkedett IL-10 és TGF β pozitív Treg arányokat találtunk. Mindkét említett citokin immunoszuppresszív aktivitással rendelkezik, a TGF β -t a „purveyor of immune privilege” (immunválaszt kiváltó)-nek is nevezik. Az IL-10 és a TGF β a Treg sejtek gátló hatásának fő mediátorai az effektor T-sejteken és az immunrendszer más sejtjeitípusain. Adataink azt mutatják, hogy a DX kezelés az IL-10 és TGF β pozitív Treg arányok emelkedését okozza mind a tímuszban, mind a lépben. Ezen citokinek relatív expressziója mRNA szinten is emelkedést mutatott, kivéve az IL-10 esetében a lépben. Azonos mértékű Foxp3 mRNA szinteket találtunk a tímusz eredetű és lépben izolált Treg sejtekben, de

a DX kezelés hatására csak a lépben tapasztaltuk szignifikáns emelkedést. Ez összecseng a lép eredű TGF β pozitív Treg arányok emelkedésével, és magyarázhatja ezen sejtek TGF β mRNS-ének upregulációját is. Az IL-10 fehérje és mRNS közötti korreláció hiánya a lépben adódhat abból a tényből, hogy a kezeletlen állatok CD4⁺CD25⁺ FACS szeparált sejtjei között aktivált, IL-10 termelő helper T-sejtek is megtalálhatóak, de ezek a sejtek a DX kezelés hatására eltűnnek, így a DX hatására bekövetkező IL-10 változások mRNS szinten nem detektálhatóak. Ezen felül sokféle fehérje és azoknak megfelelő mRNS között találtak hasonló eltéréseket különböző sejtípusokban és szervezetekben.

Adataink alátámasztják, hogy a GC kezelés a tímuszban és lépben is a Treg sejtek immunszuppresszív tulajdonságait fokozza. Tehát a DX (és esetlegesen más GC-k) a glukokortikoidok számos hatásmehanismusa mellett befolyásolhatnak fő immunszabályozó utakat és mechanizmusokat azáltal, hogy elősegítik a Treg sejtek szelektív túlélését és ezen sejtek immunszuppresszív citokinjeinek termelődését növelik.

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

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

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

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

5.2 Treg sejtek összetételének és funkcióinak vizsgálata szisztémás szkerózisban

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

Korábbi vizsgálatok emelkedett Treg arányokat találtak SSc-ben, míg mások csökkent szintjeiről számoltak be. Egyik alapvető eredményünk a korai stádiumú SSc-s miták emelkedett CD127-Treg aránya az egészséges kontroll minták Treg arányához képest. A statisztikailag szignifikánsan magasabb Treg arányok még kifejezettebbek voltak a betegség súlyosabb formáiban, úgy mint a dcSSc, Scl-70 és RNA-Pol-III autoantitest pozitív és tüdőfibrozis esetében. Bár ellentmondásosak az eredmények a Treg alpopulációk változásait illetően SSc-ben, adataink az SSc-s betegek perifériás vérében emelkedett Treg arányokat mutató vizsgálatokat támasztják alá, melynek hátterében a CD62L+Treg-ek arányának jelentős növekedése áll. A CD62L+Treg-ek a természetes, vagy tímusz eredetű Treg sejtpopulációt és centrális memória Treg sejteket képviselnek, melyek egy a nyirokszervekbe történő recirkulációs mintázatot mutatnak, így szuppresszálva a naív CD4+ T-sejtek aktivációját. Egérkísérletek során kimutatták, hogy a CD62L+Treg-ek szignifikánsan magasabb gátló aktivitással rendelkeznek, mint CD62L negatív társaik. Egy másik tanulmányban cöliákiában szenvedő betegek CD62L+Treg sejteit mint a Treg-ek limfoid szövet homing csoportját írták le, míg a CD62L negatív Treg-ek a mukózális homing csoport, melyek a szöveti immunhomeosztázisért felelősek.

SSc-ben nem csak a CD62L pozitív és negatív Treg-ek közötti egyensúly eltolódását találtuk, hanem a Treg-ek funkciójának zavarát is, úgy mint csökkent IL-10 termelés a teljes Treg populációban, és csökkent TGF β termelés a CD62L+Treg alcsoportban. Mivel a Treg eredetű anti-inflammatórikus citokinek központi szerepet játszanak az immunválasz gátlásában és a gyulladással és autoimmun folyamatok patológiájában, az IL-10 pozitív Treg-ek ilyen csökkenése és emellett a Treg arányának növekedése a Treg-ek funkcionális kimerülésének következménye lehet, más T-sejt populációkhoz hasonlóan. Kísérleteinkben nem találtuk

csökkentnek a CD62L+Treg-ek IL-10 pozitivitását, ami arra utalhat, hogy a CD62L-Treg alcsoportok (Tr1, vagy CD62L- effektor memória Treg) IL-10 termelése elégtelen. Kimutatták, hogy ezek a sejtek felelősek a szöveti homeosztázis egyensúlyáért és a gyulladásozó válaszok gátlásáért a bőrben és a mukózában. A vizsgálataink során talált emelkedett *FOXP3* génexpresszió az SSc aktív formájában és ennek inverz korrelációja a CD62L+IL-10+ Treg-ekkel szintén alátámasztják az effektor memória Treg sejtek funkcionális károsodását SSc-ben. A másik fontos citokin a Treg funkcióban a TGF β , melynek szintje csökkent a CD62L+Treg populáción belül, de a teljes Treg csoporton belül nem. Ezen adatok a CD62L+ tTreg-ek és centrális memória Treg-ek funkciójának károsodását, és emellett a Th3 alcsoport – mely TGF β -t termel – funkciójának érintetlenségét támasztják alá. Az IL-10 és TGF β expresszáló Treg-ek funkcionális változásainak hátterében álló mechanizmusok nem ismertek pontosan, bár vannak újabb kutatási eredmények, melyek szerint epigenetikai mechanizmusok, mint DNS metilációs státusz, hiszton modifikáció és nem-kódozó RNS-ek szerepet játszhatnak az SSc patogenezisében. A Foxp3 pozitív Treg fenotípus stabilizálásában szerepet játszhat a *FOXP3* génlókus proximalis promóterének és upstream enhanszerének metilációs státusza. A *FOXP3* gén metilálatlan promóter és enhanszer régiói stabil, hosszútávú Foxp3 expressziót biztosítanak, amely mintázat a tímusz eredetű tTreg-ekre jellemző, míg a hipometilált enhanszer régió a perifériásTreg-ek esetében típusos, a konvencionális T-sejtekben pedig teljesen metilált. A *FOXP3* gén általunk végzett metilációs analízise az enhanszer régió minden CpG helyén hipometilációt mutatott az SSc-betegek mintáiban szignifikánsan csökkent metilációval 2 specifikus CpG helyen. Ez a megfigyelés egy emelkedett, stabil Foxp3 expresszáló sejtpopuláció jelenlétére utal SSc-s betegekben, ami összecseng az áramlási citometriás méréseink során tapasztalt emelkedett CD62L+Foxp3+ Treg arányokkal, melyet más kutatások is igazolnak.

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

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

6. Publikációs lista

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. Ugor Emese, Simon Diána, Pap Ramóna, Nikola Kraljik, Németh Péter, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea
Regulatórikus T-sejtek glukokortikoidhormon-érzékenységének vizsgálata
IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 6:(1-2) pp. 17-24. (2014)
2. Emese Ugor, Diána Simon, Giovanni Almanza, Ramóna Pap, József Najbauer, Péter Németh, Péter Balogh, Martina Prelog, László Czirják, Tímea Berki
Increased proportions of functionally impaired regulatory T cell subsets in systemic sclerosis
CLINICAL IMMUNOLOGY (2017); 184:54-62. **IF: 3,990**
3. Emese Ugor, Lilla Prenek, Ramóna Pap, Gergely Berta, Dávid Ernszt, József Najbauer, Péter Németh, Ferenc Boldizsár, Tímea Berki
Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression
IMMUNOBIOLOGY (2017) DOI: [10.1016/j.imbio.2017.10.010](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.010) **IF: 2,720 (ebből 1,904 IF-t használtam a tézishoz)**

Egyéb publikáció

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

Összes IF: 9,727

7. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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