

# PhD TÉZISEK

**A ZAP-70 kináz tirozinjainak szerepe a T-sejtek aktivációjában  
és a nem-genomikus glükokortikoid hormon hatások  
kialakításában**

**Dr. Szabó Mariann**



PTE KK  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

**Témavezetők:** Dr. Boldizsár Ferenc, Prof. Dr. Berki Tímea

**Programvezető:** Prof. Dr. Németh Péter

Pécs  
**2012.**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Bevezetés.....</b>	<b>9</b>
2.1 A T-limfociták jellemzése.....	9
2.1.1 A T-sejtek érése.....	9
2.1.2 Az érett T-sejtek differenciációja.....	11
2.1.3 A T-sejt aktiváció jelátviteli folyamatai.....	13
2.1.4 A ZAP-70 kináz .....	15
2.1.5 Az SLP-76.....	16
2.1.6 A LAT .....	17
2.1.7 A Cbl.....	18
2.1.8 Az intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -jel .....	19
2.2 A glükokortikoid hormonok (GC) .....	21
2.2.1 A glükokortikoid hormonok szintézise és élettani hatásaik.....	21
2.2.2 A glükokortikoid hormonok receptorai (GR) .....	23
2.2.3 A glükokortikoidok hatásmechanizmusai .....	25
2.2.3.1 Genomikus glükokortikoid hatások .....	25
2.2.3.2 Nem-genomikus glükokortikoid hatások .....	25
2.2.4 A ZAP-70 kináz szerepe a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában .....	29
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>33</b>
4.1 Vegyszerek és pufferek.....	33
4.2 A humán ZAP-70 klónozása és célzott mutagenezise .....	33
4.3 A ZAP-70 konstrukciók lentivirális transzfekciója ZAP-70 deficiens P116 sejtekbe .....	34
4.4 Sejtvonalak.....	35

4.5 Antitestek .....	36
4.6 Intracelluláris jelölés és áramlási citometria a ZAP-70 expresszió mérésére .....	36
4.7 Immunprecipitáció, Western blot.....	37
4.8 A sejtek kezelése.....	37
4.9 Az intracelluláris kalcium szint mérése áramlási citometriával .....	38
4.10 Foszforiláció változások mérése Foszfo-Flow technikával .....	39
4.11 Statisztika.....	39
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>40</b>
5.1 Tirozin (Y)-fenilalanin (F) pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expressziójának vizsgálata.....	40
5.2 A T-sejt aktiváció vizsgálata a Y-F ZAP-70 pontmutáns sejtekben.....	42
5.2.1 Az anti-CD3 indukálta intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -jel változása ZAP-70 pontmutáns sejtekben .....	42
5.2.2 A ZAP-70 kináz Y aminosav maradékainak pontmutációi megváltoztatják az anti-CD3 indukálta tirozin foszforiláció mintázatot és a ZAP-70 autoregulációját ....	43
5.2.3 Az SLP-76 és a LAT foszforilációját a ZAP-70 specifikus Y aminosav maradékai szabályozzák.....	45
5.3 A nem-genomikus glükokortikoid hatások vizsgálata a Y-F pontmutáns ZAP-70-et expesszáló sejtvonalakban .....	48
5.3.1 A ZAP-70 kináz tirozinjainak pontmutációja megváltoztatja a DX indukálta foszforiláció mintázatot.....	48
5.3.2 A ZAP-70 kináz Y315 és Y492 maradékai vesznek részt a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában .....	49
5.3.3 Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatásai a TcR/CD3 jelátviteli utakra.....	51
5.3.4 A ZAP-70 Y-F pontmutációja a 315 és 492 pozícióban meggátolja a rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés indukálta SLP-76 és Cbl foszforilációt .....	53
<b>6. Az új eredmények összefoglalása .....</b>	<b>55</b>

<b>7. Összefoglalás, megbeszélés.....</b>	<b>56</b>
7.1 A ZAP-70 kináz tirozinjainak funkcionális jellemzése a TcR/CD3 jelátviteli út szabályozásában.....	56
7.2 A nem-genomikus glükokortikoid hatás molekuláris célpontjai Jurkat sejtekben ....	60
7.3 A nem-genomikus glükokortikoid hatások T sejt aktivációra gyakorolt hatásai: cross-talk a TcR/CD3- és a glükokortikoid receptor jelpályák között.....	61
<b>8. Hivatkozások.....</b>	<b>64</b>
<b>9. Ábrák, táblázatok jegyzéke .....</b>	<b>75</b>
<b>10. Publikációk.....</b>	<b>78</b>
10.1 A tézis alapját képező közlemények.....	78
10.2 Egyéb közlemények.....	78
10.3 Idézhető absztraktok .....	89
10.4 Előadások .....	80
10.5 Poszterek.....	81
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>85</b>
<b>12. Melléklet (a PhD tézis alapját képező közlemények) .....</b>	<b>86</b>

# 1. Rövidítések jegyzéke

AA: aminosav

ACTH: adenokortikotrop hormon

ADAP: adhesion and degranulation-promoting adapter protein

AIRE: autoimmune regulatory element, autoimmun regulátor transzkripció faktor

AP-1: activator protein-1

ATPáz: adenzin-5'-trifoszfátáz

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BSA: bovine serum albumine, marha szérum albumin

C: cisztein

CBG: corticosteroid binding globulin, kortikoszteroid kötő globulin

Cbl: casitas B-lineage lymphoma

CCR: kemokin receptor (CC család)

CCL: kemokin ligand (CC család)

CD: cluster of differentiation, differenciálódási antigének

cGR: citoplazmatikus glükokortikoid receptor

cDNS: komplementer DNS

CLL: krónikus limfoid leukémia

Clnk: cytokine-dependent hematopoietic cell linker

cPPT: central polypurine tract

CRAC-csatorna: Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup>-csatorna

CRH: kortikotrop releasing hormon

CrkII: sarcoma virus CT10 oncogene homolog II

CXCL12: kemokin ligand (CXC család 12)

D: diverzitás gének

DAG: diacil-glicerol

DBD: DNA-binding domain, DNS-kötő domén

DC: dendritikus sejt

DMSO: dimetil-szulfoxid

DN: double negative, kettős negatív  
DP: double positive, kettős pozitív  
DX: dexamethasone, dexametazon  
EF1: elongációs faktor-1  
ER: endoplazmatikus retikulum  
Erk: extracelluláris szignál által regulált kináz  
F: fenilalanin  
FCS: fetal calf serum, főtális borjú savó  
FITC: fluoreszcein izotiocianát  
Fluo-3AM: Fluo-3-acetoximetil-észter  
FSC: forward scatter  
GADS: GRB2-related adaptor downstream of Shc  
GC: glükokortikoid hormon  
GR: glükokortikoid receptor  
GRB2: growth factor receptor-bound protein 2  
GRE: glucocorticoid responsive element, glükokortikoid válasz elem  
HPK1: hematopoietic progenitor kinase 1  
HRPO: horseradish peroxidase, tormaperoxidáz  
HSP: heat-shock protein, hősokk fehérje  
Ig: immunglobulin  
I $\kappa$ B: inhibitor of kappa B  
IL: interleukin  
iNOS: inducible nitric oxide synthase, indukált nitrogén monoxid szintáz  
IP: immunprecipitáció  
IP<sub>3</sub>: inozitol-1,4,5-triszfoszfát  
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif  
ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif  
Itk: IL-2 inducible T cell kinase, IL-2-indukált T-sejt kináz  
J: joining gének  
LAT: linker of activated T cells

LBD: ligand binding domain, ligand kötő domén  
Lck: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
LZ: leucin-zipper  
MΦ: makrofág  
MAIT: mucosal-associated invariant T cell, mukóza asszociált invariáns T-sejt  
MAPK: mitogén aktivált protein kináz  
MFI: mean fluorescence intensity  
mGR: membrán glükokortikoid receptor  
MHC: major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex  
MOI: multiplicity of infection or virus/cell ratio  
MR1: MHC-related molecule 1  
mGR: membrane glucocorticoid receptor, membrán glükokortikoid receptor  
Nck: non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1  
NFAT: nuclear factor of activated T cells  
NFDM: non-fatty dry milk, telítő tejpor  
NFκB: nuclear factor κB  
NK: natural killer cell, NK-sejt  
NKT: natural killer T cell, NKT-sejt  
NTD: N-terminális domén  
PAK1: P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1  
PBS: phosphate buffered saline, foszfát-pufferolt sóoldat  
PE: phycoerythrine  
PFA: paraformaldehid  
PIP: phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate  
PKCθ: proteine kináz C theta  
PLCγ: foszfolipáz C gamma  
PRO: proline-rich region, prolinban gazdag régió  
PVDF: polivinilidín-fluorid  
PY: foszfo-tirozin  
Ras: rat sarcoma

RF: RING-finger domain, RING-ujj domén  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute sejtenyésztő médium  
RT: szobahőmérséklet  
SCID: severe combined immunodeficiency, súlyos kombinált immundeficiencia  
SH2: Src homology 2  
SH3: Src homology 3  
Shc: Src homology 2 domain containing transforming protein  
SLE: systemic lupus erythematosus, szisztémás lupusz eritematozus  
SLP-76: SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa  
SP: single positive, egyszeresen pozitív  
Sr: szarkóma  
SSC: side scatter  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription  
STIM1: Stromal interaction molecule 1  
Syk: spleen tyrosine kinase  
TcR: T cell receptor, T-sejt receptor  
Tc: citotoxikus T-sejt  
Tfh: follikuláris, helper T-sejt  
Th: helper T-sejt  
TK: tirozin kináz  
TKB: tyrosine kinase binding domain, tirozin-kináz-kötő domén  
TNF: tumor nekrozis faktor  
Tr/ Treg: regulátoros T-sejt  
V: variábilis gének  
W: triptofán  
WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein  
WB: Western blot  
WT: wild type  
Y: tirozin  
ZAP-70: zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa



## 2. Bevezetés

### 2.1 A T-limfociták jellemzése

A T-limfociták az adaptív immunrendszer sejtjes elemei, egészséges emberben perifériás vérében a limfociták körülbelül 75-80%-át teszik ki. Alapvető szerepet töltenek be a szervezet számára idegen antigének (pl. baktériumok, vírusok, tumor sejtek) felismerésében, ezen antigének ellen irányuló védekező mechanizmusok kialakításában, valamint az immunválasz szabályozásában. Részt vesznek továbbá a saját struktúrák védelmét szolgáló tolerancia mechanizmusok kialakításában is [1].

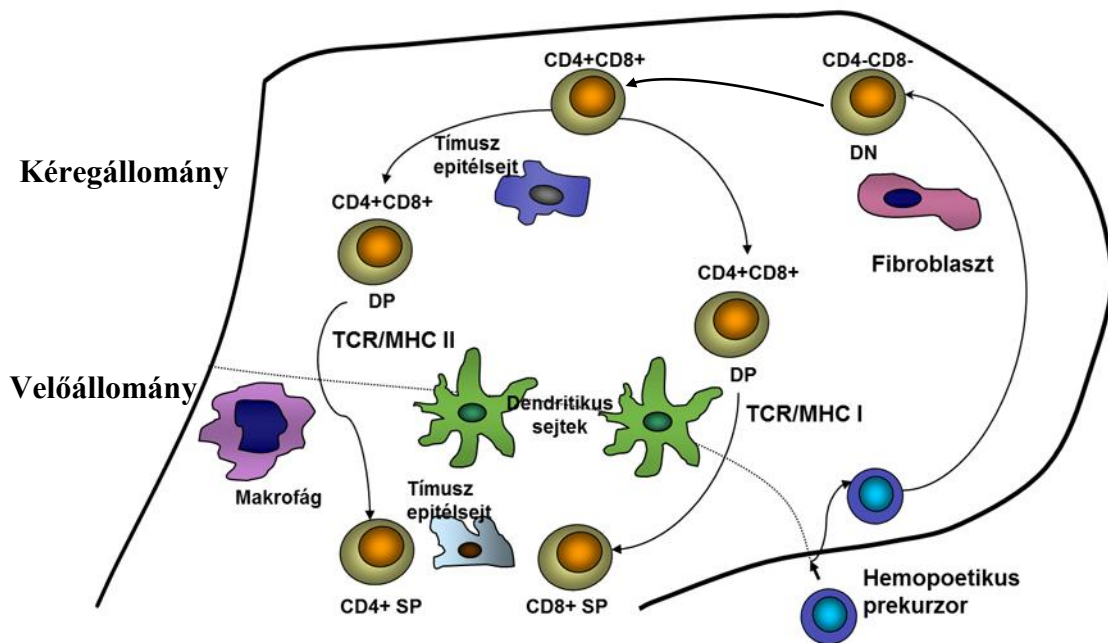
#### 2.1.1 A T-sejtek érése

A T-limfociták fejlődése a csontvelőben kezdődik. A haemopoetikus őssejtekből limfoid irányú elköteleződést követően differenciálódnak a T-sejt előalakok [2]. A T-sejt irányú elköteleződésben a Notch1 jelátviteli útvonal játszik fontos szerepet [3]. Az elköteleződött T-sejt előalakok a csontvelőből a tímuszba vándorolnak. A folyamatot a tímusz által termelt CCL21, CCL25, CXCL12 kemokinek, valamint a T-sejt előalakokon expresszálandó CCR7 receptorok irányítják [4]. A sejtek proliferációjában a stróma sejtek által termelt IL-7 is szerepet játszik [5]. A tímuszba érkező előalakok még nem expresszálnak T-sejt receptort (TcR), illetve a CD4 és CD8 ko-receptorok sem találhatóak a felszínükön [6] [1. ábra]. Ezért ezeket a sejteket kettős negatív (DN) timocitáknak nevezzük. A DN stádiumot követően a timociták kettős pozitív (DP) stádiumba kerülnek. A DP-sejtek már expresszálnak érett TcR-t, valamint CD4 és CD8 molekulát is. A TcR-ok  $\alpha$  és  $\beta$  vagy  $\gamma$  és  $\delta$  láncokból épülnek fel. A  $\beta$  és  $\delta$  láncok esetében variabilitás (V), diverzitás (D) valamint joining (J); az  $\alpha$  és  $\gamma$  láncok esetében V és J génszakaszok rekombinációja révén alakul ki a receptorok variábilis doménje. Az egyes génszakaszok száma, valamint ezek rekombinációs lehetőségei révén jön létre az a TcR repertoár, ami több milliárd antigén felismerését teszi lehetővé [7]. A DP-timociták ezt követően a pozitív és a negatív szelekciós lépéseken mennek keresztül.

A pozitív szelekció során a timociták a tímusz kortikális epitélisejtjeivel kerülnek kapcsolatba. Ezen epitélisejtek különleges proteoszómmákkal rendelkeznek és képesek a sejtfelszínükön MHC-hez kötött peptideket bemutatni a DP-timociták számára [8]. Azok a

T-sejt előalakok, amelyek nem képesek az MHC-peptid komplexhez kötődni és az így bemutatott peptidet felismerni, nem kapnak túlélési szignált (death by neglect) és apoptózis révén elpusztulnak [6]. A pozitívan szelektálódott, saját MHC-t felismerő, életben maradt sejtek ezt követően a negatív szelekción mennek keresztül. A folyamat során a timociták medulláris epitélsejtekkel és dendritikus sejtekkel kerülnek kapcsolatba. Ezen sejtek saját szöveti antigéneket mutatnak be a timociták számára. Az antigének bemutatását az AIRE transzkripciós faktor szabályozza [9]. A negatív szelekció során azon timociták pusztulnak el, amelyek túl erősen kötődnek a saját szöveti antigénekhez. Így a tímusból azon T-sejtek kerülnek ki a perifériára, amelyek az idegen antigéneket felismerik, a szervezet saját antigénjeit viszont tolerálják. A szelekciós folyamatok során a DP-timociták SP-sejtekké fejlődnek. Egészséges egyéneknél a periférián vagy csak CD8 molekulát expresszáló citotoxikus (Tc), vagy csak CD4-et expresszáló helper (Th) T-sejteket találunk [6]. Összefoglalva: a pozitív szelekció felelős az MHC-restrikció kialakításáért, a negatív szelekció pedig a centrális tolerancia egyik fő mechanizmusa.

A tímuszban fejlődnek és differenciálódnak a CD4+ T-sejtek 5-10%-át alkotó természetes regulátoros T-sejtek (nTreg), amik az autoreaktív folyamatok gátlásában játszanak fontos szerepet [10].

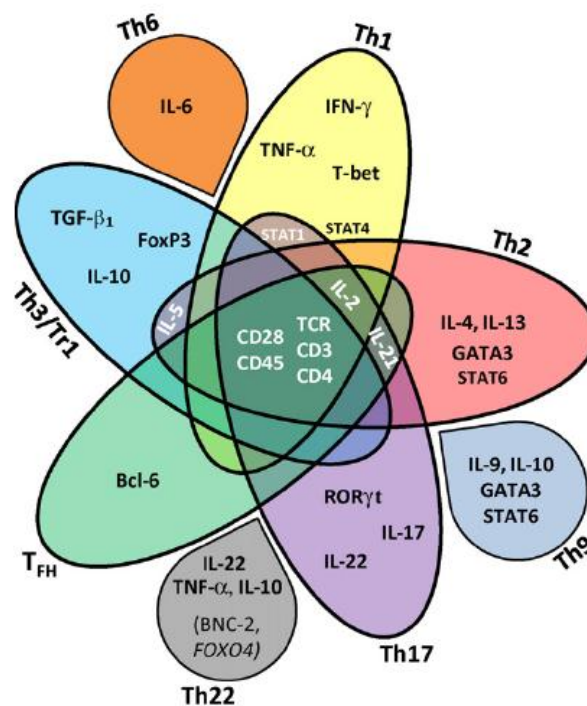


**1. ábra: A T-sejtek fejlődése a tímuszban.** Részletesen lásd a szövegben. Átvéve: Bommhardt U, Beyer M, Hünig T, Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. Cell Mol Life Sci. 2004 Feb;61(3):263-80.[11].

## 2.1.2 Az érett T-sejtek differenciálódása

Az érett, naív (idegen antigénnel még nem találkozott) T-sejtek a perifériás nyirokszervek T-sejt zónáiba jutnak, ahol a számukra bemutatott antigéneket MHC-hez kötve (MHC-restrikció) ismerik fel (részletesen lásd 2.1.3 fejezetben). A sejtek ezt követően aktiválódnak és effektor sejtekké differenciálódnak. A CD8<sup>+</sup> Tc-sejtek citotoxikus hatásai révén vesznek részt az antigének elpusztításában. Az effektor Th-sejteket citokin termelésük alapján tovább csoportosíthatjuk. Korábban két fő alpopulációt: a Th1 és Th2 csoportot különítették el, az előbbieket főleg a celluláris-, az utóbbiak pedig a humorális immunválaszt szabályozzák [12]. Az utóbbi időben az előbbi két csoport mellett elkülönítik még a Th17, Th3/Tr1 (indukált regulátoros T-sejt), Th6, Th9, Th22 és Tfh sejteket is [13] [2. ábra].

Antigén hatására az effektor T-sejtek mellett memória T-sejtek is kialakulnak [11].

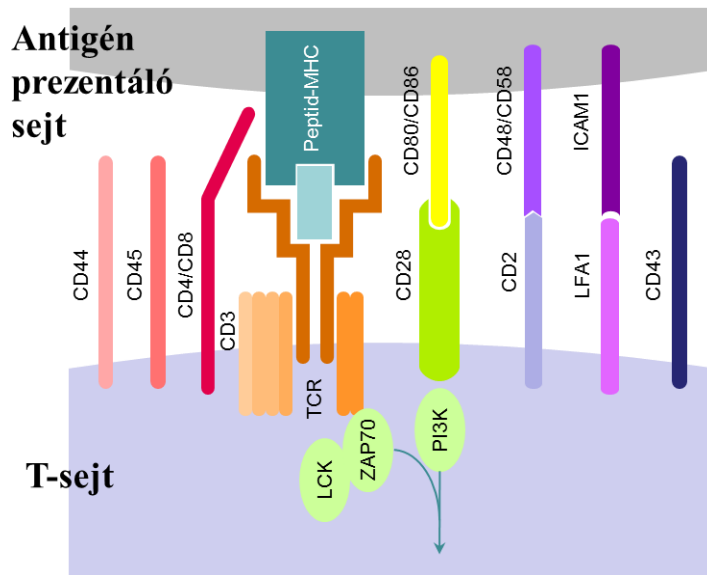


**2. ábra:** A Th-sejtek típusai, a kialakulásukban szerepet játszó faktorok és a sejtek által termelt citokinek emlősökben. Átvéve: Laing KJ, Hansen JD. Fish T cells: Recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol.* 2011 Dec;35(12):1282-95. [13].

A  $\gamma\delta$  T-sejtek érésük folyamán nem mennek át a pozitív és negatív szelekción és a periférián (pl. mukózában) különböző mikrobiális antigéneket (elsősorban lipideket ill. hősokk fehérjéket) ismernek fel nem-klasszikus MHC molekulákhoz kötve [14]. Újabb kutatások szerint léteznek további lipid antigéneket felismerő T-sejt alcsoportok is. A natural killer T (NKT)-sejteknek a CD1d, míg a mukóza asszociált invariáns T (MAIT)-sejteknek feltehetően az MR1 molekulák felszínén történik az antigén bemutatása [15,16]. Ezen folyamatok részleteiről egyelőre még kevés adat áll rendelkezésre.

### 2.1.3 A T-sejt aktiváció jelátviteli folyamatai

A megfelelő antigénnel történő találkozást követően a T-sejtekben számos jelátviteli folyamat megy végbe, ami a T-sejtek aktivációjához és másodlagos differenciálódásához vezet. A TcR csak MHC molekulák által bemutatott peptideket - az antigén proteolitikusan hasított darabjait - képes felismerni. A folyamat szigorúan szabályozott: az intracelluláris peptideket a sejttaggal rendelkező sejtek és a trombociták mutatják be MHCI-en keresztül a CD8<sup>+</sup> Tc-sejteknek, míg az extracelluláris antigéneket a professzionális antigén prezentáló sejtek - B-sejtek, makrofágok, dendritikus sejtek - MHCII segítségével mutatják be a CD4<sup>+</sup> Th-sejteknek. Ezt a jelenséget MHC restrikciónak nevezzük [17,18]. A TcR MHC-peptid komplexhez való kötődése még nem elegendő a T-sejt aktiváció elindításához. Szükséges még, hogy a CD4/8 az MHC molekulák konstans részéhez kapcsolódjon, valamint, hogy a CD28 és CD80/86, a CD40-CD40L és további adhéziós molekulapárok között ko-stimuláció jöjjön létre [19-22] [3. *ábra*]. A TcR láncainak intracelluláris doménjei önmagukban nem képesek arra, hogy aktivációs jelet közvetítsenek a sejt belsejébe, a sejten belüli jel elindításában a TcR-hoz asszociálódó CD3 komplex játszik nélkülözhetetlen szerepet. A CD3 komplex  $\gamma$ ,  $\delta$  és  $\epsilon$  láncokból áll, amikhez egy  $\zeta\zeta$  homodimer vagy  $\zeta\eta$  heterodimer kapcsolódik [23]. A CD3 molekula komplex láncában ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) szekvenciák (YxxLx (6-8)YxxL) találhatóak, melyek tirozinjai a T-sejt aktiváció kezdeti lépései során foszforilálódnak és fontos szerepet töltenek be a jeltovábbításban [24].



**3. ábra: A T-sejt aktiváció elindításához szükséges molekulapárok.** Részleteket lásd a szövegben. Átvéve: Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse *Nat. Rev. Immunol.* 2003 Dec;3(12): 973-983. [21].

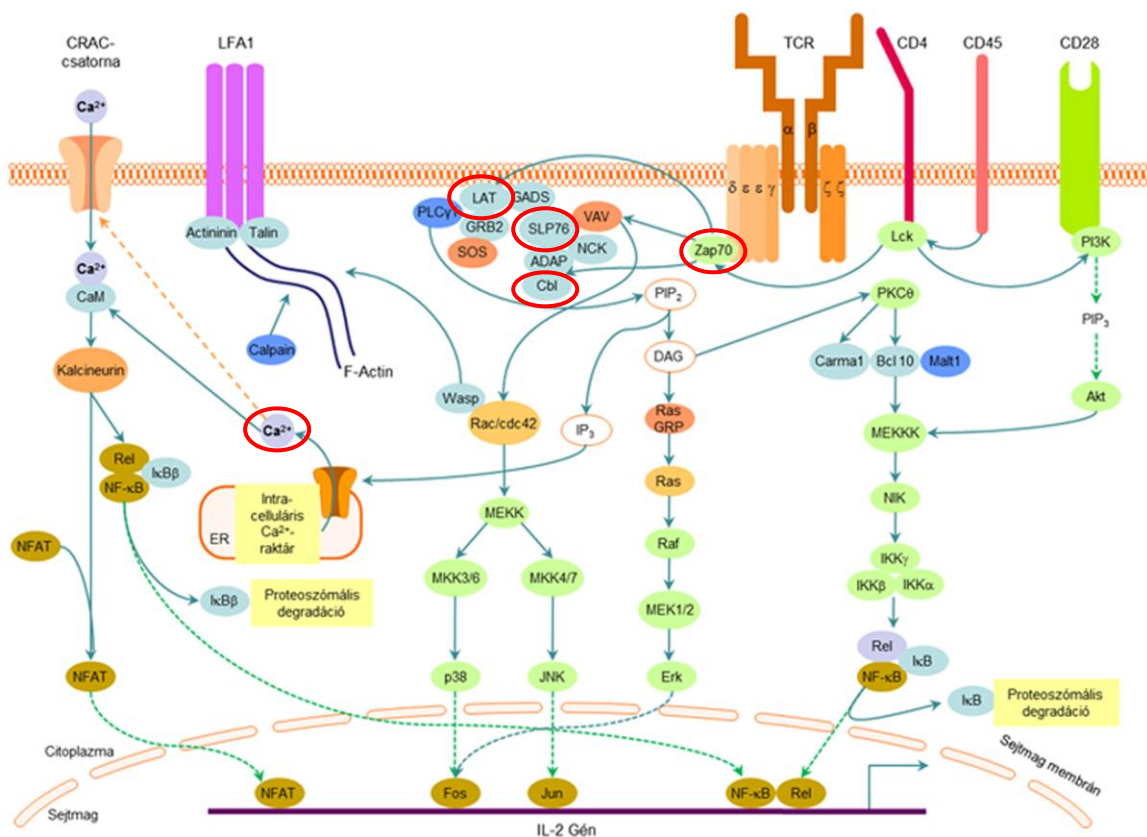
A T-sejt aktiváció kezdeti lépései foszforilációs események sorozatából állnak. Elsőként, a valamennyi leukocitán expresszálandó CD45 molekula - egy foszfortirozin-foszfátáz - defoszforilálja az Lck 505-ös pozícióban található gátló tirozinjét [25] [4. ábra]. Az Lck az Src nem-receptor tirozin kináz család tagja, ami a CD4/8 molekulákkal is asszociálódik. Az Src molekulacsalád másik tagja, a Fyn, szintén szerepet játszik a korai T-sejt aktivációs folyamatokban. Az Lck gátló foszfát csoportjának lehasítását követően, a TcR komplex aktivációjának hatására a 394-es tirozinon foszforilálódik és ezáltal aktiválódik [25]. Az aktivált Lck ezt követően a CD3 komplex ITAM-jainak tirozinjait foszforilálja [26]. A foszforilált CD3ζ lánc dokkoló helyül szolgál a Syk családba tartozó ZAP-70 kináz számára [27]. A ZAP-70 kinázt az Lck foszforilálja, a foszforilált ZAP-70 pedig a T-sejt aktiváció egyik központi molekulája. A kináz két fő célmolekulája a LAT és az SLP-76 adapter fehérjék [28-30]. A ZAP-70 kapcsolódik (asszociál) a negatív regulátor Cbl-lel is, ami a kináz foszforilációját szabályozza [31]. Mivel a ZAP-70, az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulákat kísérleteink során részletesen vizsgáltuk, ezért ezen molekulák szerkezetét és funkcióját a következő fejezetekben részletesen ismertetem.

Az adapter molekulák foszforilációja egy multimolekuláris komplex kialakulásához vezet, melyben a GRB2, Itk, GADS, Nck és Vav molekulák vesznek részt és együttesen aktiválják a PLCγ1-et [32,33]. A PLCγ1 a PIP<sub>2</sub>-t hasítja, a hasítás során két másodlagos hírvívő molekula, az IP<sub>3</sub> és a DAG képződik [34]. A DAG két fő jelátviteli út, a Ras és a PKCθ útvonalak aktivációjához vezet [35]. A Ras a MAP-kináz kaszkád közvetítette

jelátviteli folyamatokat indítja el, ami végül az AP-1 transzkripciós faktor aktivációjához vezet [36]. A PKC $\theta$  az NF $\kappa$ B útvonalat aktiválja, ami szintén transzkripciós folyamatokat szabályoz [37].

Az IP $_3$  az endoplazmatikus retikulumban (ER) raktározódó (intracelluláris Ca $^{2+}$  raktár) Ca $^{2+}$  felszabadulását indukálja, amit a plazma membrán Ca $^{2+}$ -csatornáinak megnyílása követ (kapacitativ influx) [38]. A megnövekedett intracelluláris Ca $^{2+}$  szint a kalcineurint, a kalmodulint, végül az NFAT transzkripciós faktort aktiválja [39].

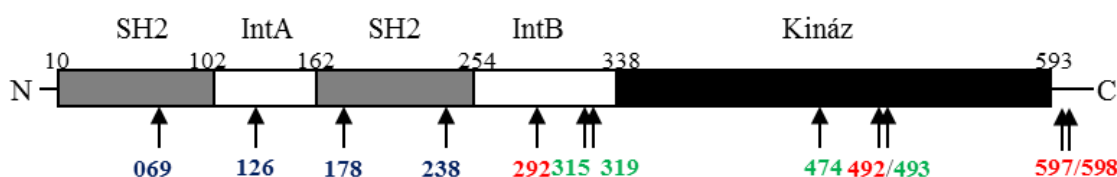
A T-sejt aktiváció jelátviteli útjai végül számos transzkripciós faktort pl. AP-1, NFAT, NF $\kappa$ B aktiválnak, ami komplex génexpressziós változásokhoz vezet a T-sejtekben [40]. Az immunválasz beindításában kiemelkedő fontosságú két géntermék: az IL-2 citokin, valamint az IL-2 receptor  $\alpha$  lánc. Az IL-2 az aktivált T-sejteken megjelenő  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  láncokból felépülő nagy affinitású receptorához kötődik, autokrin mechanizmusok révén szabályozza a T-sejt aktivációt, illetve indukálja a környező T-sejtek növekedését is [41,42].



**4. ábra: A T-sejt aktiváció jelátviteli útvonala.** Részleteket lásd a szövegben. Átvéve: <http://www.cellsignal.com/pathways/lymphocyte.jsp>- Cell Signaling Technology. Pirossal bekarikázva azok a molekulák illetve a Ca $^{2+}$ , amikkel kísérleteink során részletesen foglalkoztunk.

## 2.1.4 A ZAP-70 kináz

A ZAP-70 kináz a Syk nem-receptor tirozin kináz család tagja, T-sejtekben, NK-sejtekben és bazofil granulocitákban expresszálódik [27,43]. A molekula két N-terminális SH2 doménből és egy C-terminális kináz doménből épül fel, melyeket az interdomén A és B választanak el egymástól [5. ábra] [44]. A kinázt az Lck foszforilálja, de a molekulában autofoszforiláció is végbemegy. A ZAP-70 31 tirozin (Y) maradéka közül tömegspektrometriás mérések eredményei alapján 11-nek tulajdonítanak szerepet a T-sejt aktivációban. Ezek között található olyanok, melyek ismert aktivációs, vagy gátló helyek, illetve olyanok is, amelyek funkciója még ismeretlen [45]. Keveset tudunk az SH2 doménben és az interdomén A-ban található Y069, Y126, Y178 és Y238-ról, bár a Y126 feltehetően szerepet játszik a kináz autofoszforilációjában [45]. Az interdomén B-ben 3 tirozin található a 292, 315 és 319-es pozícióban. A Y292 gátló szerepet tölt be a T-sejt aktivációban és dokkoló helyként szolgál a Cbl számára [46-48]. A Y315-höz a Vav és a CrkII kötődik, ez a tirozin maradék pozitív és negatív szabályozó szerepet is betölt a T-sejt aktivációban [49,50]. A Y319 egy pozitív szabályozó tirozin és fontos szerepet játszik a PLC- $\gamma$ 1 és a Ras közvetítette jelátviteli utakban, valamint asszociálódik az Lck-val [51,52]. Az interdomén B-ben található tirozinok a tímuszban zajló pozitív és negatív szelekciót is befolyásolják [53-55]. A kináz doménben 3 tirozin maradéknak tulajdonítanak szerepet a T-sejt aktivációban. A Y474-hez az Shc kötődik [56]. A Y492 gátló, míg a Y493 aktivációs szerepet tölt be a T-sejt jelátviteli folyamatokban [57,58]. A Y597 és a Y598 negatív szabályozó helyek [59].



**5. ábra: A ZAP-70 kináz szerkezete és a T-sejt aktivációban részt vevő tirozin maradékai.** Pirossal a gátló, zölddel az aktivációs, kékkkel a még ismeretlen funkciójú tirozinokat jelöltük. In: Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87. [60].

A ZAP-70 kináz fontos szerepét bizonyítja az, hogy a molekula hiányában, emberben súlyos kombinált immundeficiencia, SCID alakul ki. A betegek Tc-sejtjei csaknem teljesen hiányoznak, míg a Th-sejtek száma normális, vagy emelkedett, de a jelátvitel bennük is zavart szenved. A ZAP-70 deficiens P116 sejtekben aktiváció hatására nem alakul ki az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel és számos foszforilációs folyamat gátlódik. A ZAP-70 KO egerekben a T-sejtérés és a T-sejt aktiváció is zavart szenved [44,61-63].

A ZAP-70-et kódoló gén missense mutációja figyelhető meg az SKG egérben. A mutáció egy W163C csere a C-terminális SH2 doménben. Ezekben az egerekben spontán alakul ki autoimmun artritisz. A mutáció következtében a ZAP-70 kináz nem tud a TcR $\zeta$  láncához kötődni, csökken az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel, a LAT és a PLC $\gamma$  foszforilációja. Ez az egérmodell felhívja a figyelmet arra, hogy a ZAP-70 kináz mutációja autoimmun betegségek kialakulásában is szerepet játszhat [44,64].

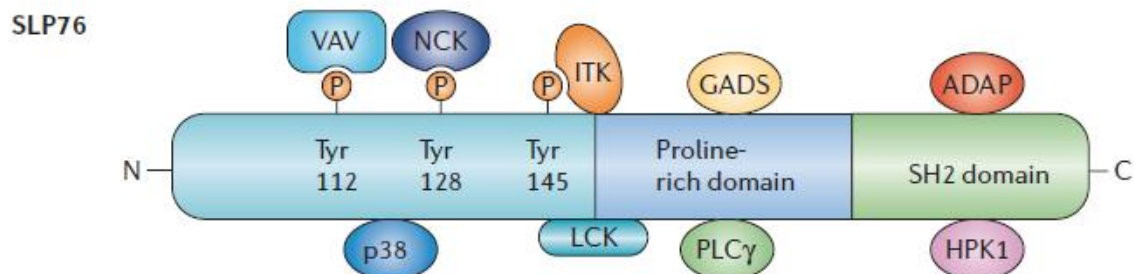
A ZAP-70 megjelenik B-sejtes leukémiában is (normál B-sejtek a Syk molekulát expresszálják). A B-CLL-t a CD19+, CD5+, CD23+ B-sejtek klonális felszaporodása jellemzi. A betegség lefolyása heterogén, ezért számos kísérletsorozatot végeznek olyan faktorok felkutatására, amik a betegség lefolyását előre jelezhetik. A CD38 expresszió és az Ig nehéz lánc variábilis régiójának mutációs állapota mellett a sejtek ZAP-70 pozitivitása is a betegség rossz prognózisára utalhat [44,65].

### **2.1.5 Az SLP-76**

Az SLP-76 családba 3 adapter fehérje tartozik, az SLP-76, az SLP-65 és a Clnk. A T-sejt aktivációban az SLP-76 vesz részt. Az SLP-76 egy N-terminális doménből, egy centrális prolinban gazdag régióból és egy C-terminális SH2 doménből áll [6.ábra]. Fontos szerepet játszik az IL-2 szintézisében, az NFAT és AP-1 transzkripciós faktorok aktivációjában, valamint az Erk kináz aktivitásának szabályozásában [30,66]. A T-sejt aktiváció során az adapter foszforilálódik és számos jelátviteli fehérjével lép kapcsolatba. Az SLP-76 112 és 128-as tirozinjait a ZAP-70 foszforilálja, ezen a tirozin maradékokhoz kötődik a Vav1 és az Nck [67,68]. A szintén az N-terminális doménben található Y145-öt a ZAP-70 Lck függő módon foszforilálja; az SLP-76 ezen tirozin maradékát tartják a legfontosabbnak a T-sejt aktiváció szempontjából [69]. A foszforilálódott Y145-höz az Ikk



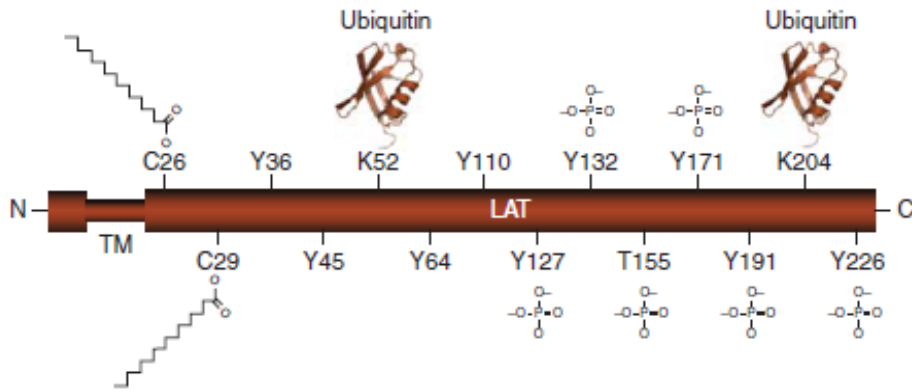
asszociálódik. A prolinban gazdag régióhoz a GADS és a PLC $\gamma$  kötődik. A két domén határán található az Lck kötőhelye. Az SH2 doménhez a foszforilálódott ADAP és a szerin-treonin kináz HPK1 kötődik [30,66].



**6. ábra:** Az SLP-76 molekula szerkezete, foszforilált tirozinjai és az adapterhez asszociáló molekulák. Átvéve: Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jan;6(1):67-78. [30].

## 2.1.6 A LAT

A LAT egy transzmembrán adapter fehérje, amit T-, NK- és hízósejtek, trombociták és pre-B-sejtek expresszálnak. A molekulának fontos szerepe van a T-sejtek érésében, hiányában a T-sejt fejlődés a kettős negatív stádiumban megakad [70,71]. A LAT extracelluláris része 4 aminosavból áll, amit egy 20 aminosavból felépülő, hidrofób, transzmembrán szakasz követ. A hosszú intracelluláris rész nem rendelkezik intrinszik enzim aktivitással, sem fehérje-fehérje interakciós doménnel [70] [7. ábra]. A molekulában 9 tirozin található, ezek közül a T-sejt aktiváció során a Y127, Y132, Y171, Y191 és a Y226 foszforilálódik, valamennyit a ZAP-70 foszforilálja [72]. A molekula 155-ös treoninját az Erk foszforilálja. A foszforilálódott tirozinokhoz számos jelátviteli molekula kötődik. A pY132-höz a PLC $\gamma$ ; a pY171 és pY191-hez a GADS; a pY171, pY191 és pY226-hoz a GRB2; a pY226 és pY191-hez a Vav asszociálódik [70,72]. Az SLP-76 a GADS-on keresztül lép kapcsolatba a molekulával, míg a Cbl feltehetően a LAT ubiquitinációjában is részt vesz [70].

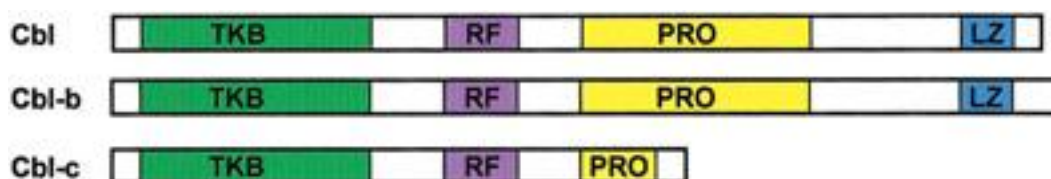


**7. ábra: A LAT szerkezete; foszforilációban, ubiquitinációban és palmitilációban részt vevő aminosav maradékai.** Átvéve: Balagopalan L, Coussens NP, Sherman E, Samelson LE, Sommers CL. *The LAT Story: A Tale of Cooperativity, Coordination, and Choreography* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2:a005512. [70].

## 2.1.7 A Cbl

A Cbl molekulacsaládnak 3 tagja van a Cbl: a Cbl-b és a Cbl-c. A Cbl és a Cbl-b 84%-ban homológ szerkezetű, széles körben expresszáldó fehérjék, legnagyobb koncentrációban a tímuszban és a herében expresszáldnak. A Cbl-c szerkezetileg különböző, hematopoetikus sejtekben kevésbé, epitelt nagy mennyiségben tartalmazó szervekben viszont nagy mértékben expresszálddik. A Cbl és Cbl-b egy N-terminális tirozin-kináz-kötő doménből (TKB), egy Zn-koordinálta RING-ujj doménből (RF), egy prolinban gazdag régióból (PRO) és egy C-terminális leucin-zipper-szerű régióból (LZ) áll [8. ábra]. A Cbl-c-nek rövidebb a prolinban gazdag régiója és hiányzik a leucin-zipper-szerű régiója. A tirozin-kináz-kötő domén foszforilált tirozin kinázok, a prolinban gazdag régió SH3 domének megkötésére képes. A molekula többi része ubiquitinációban vesz részt [31]. A Cbl a T-sejt aktiváció negatív szabályozója, nem rendelkezik intrinszik enzimatis aktivitással, de számos jelátviteli molekulával asszociálddik. TKB doménjéhez kötődnek a Syk molekulacsalád tagjai, így a ZAP-70 is, a prolinban gazdag régiójához pedig az Src családba tartozó Lck és Fyn, valamint az Nck és a GRB2 adapterek kapcsolóldnak. A molekula C-terminális tirozinjai aktivációtól függően asszociáldnak a Vav (Y700), a PI3-kináz (Y731) és a Crk (Y774) adapter fehérjékkel [73]. A Cbl a ZAP-70-et a

Y292-n keresztül negatívan szabályozza, befolyásolja a LAT és az SLP-76 foszforilációját, valamint asszociálódik a PLC $\gamma$ -val is [31,74].



**8. ábra: A Cbl molekulacsalád tagjainak szerkezete.** Átvéve: Rao N, Dodge I, Band H. *The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system* *Journal of Leukocyte Biol.* 2002May;71(5)753-63.[31].

### 2.1.8 Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-jel

A Ca<sup>2+</sup> univerzális másodlagos messenger, ami szerepet játszik a sejtek aktivációjában, proliferációjában és apoptózisában. A nyugvó limfociták citoplazmájában a Ca<sup>2+</sup> koncentráció alacsony (50-150nM) [75]. Antigén kötés hatására számos jelátviteli folyamat indul el, ami megváltoztatja a limfociták intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintjét. Aktiválódik a PLC $\gamma$ , ami az IP<sub>3</sub>-at PIP<sub>2</sub>-re és DAG-ra bontja. Az IP<sub>3</sub> az endoplazmatikus retikulumban (ER) található receptorához kötődik, ami egy Ca<sup>2+</sup>-permeábilis ion csatorna. Az ER Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának csökkenése kalcium-indukálta kalcium felszabaduláshoz vezet. A koncentráció változását a STIM1 molekula érzékeli, ami aktiválja a plazma membrán kalcium-raktárak által vezérelt csatornáit, a CRAC-csatornákat. A csatornákon beáramló Ca<sup>2+</sup> hatására megnő az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció és kalcium-függő enzimek, pl. a calcineurin aktiválódnak, ami a T-sejt aktiváció során leírt (ld. 2.1.3. fejezet) transzkripció folyamatokhoz vezet [76,77] [**1. táblázat**].

**1. táblázat: A  $Ca^{2+}$  szerepe az immunrendszer különböző sejtjeiben.**

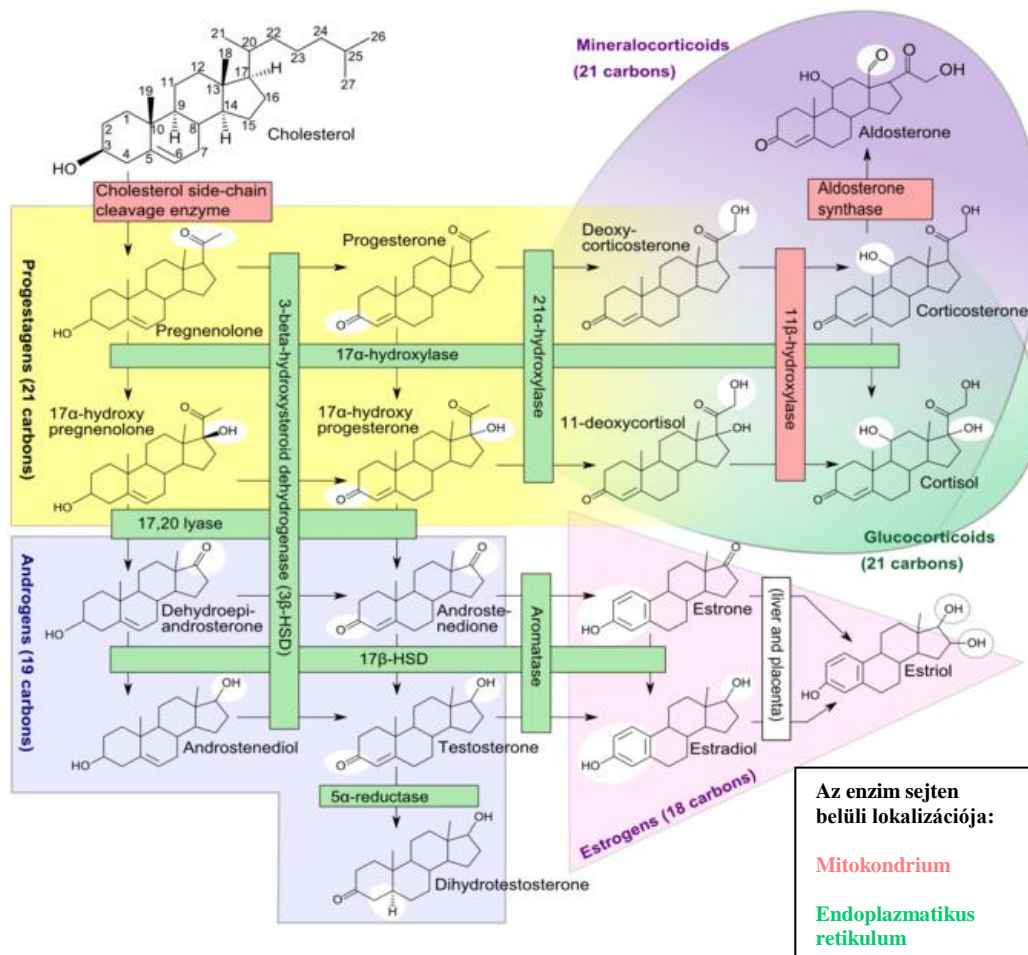
<b>Sejttípus</b>	<b>Funkció</b>
<b>T-, Treg- és NKT-sejt</b>	T-sejt aktiváció, anergia, génexpresszió, motilitás, immunológiai szinapszis kialakítása, citotoxicitás, fejlődés és differenciáció
<b>B-sejtek</b>	B-sejt aktiváció és érés
<b>Hízósejtek</b>	Degranuláció, hisztamin felszabadulás
<b>NK-sejtek</b>	Célsejt felismerését követően citolitikus aktivitás
<b>Dendritikus sejtek</b>	Dendritikus sejtek differenciációja mieloid progenitorokból, MHCII és ko-stimulációs molekulák expressziója, éretlen dendritikus sejtek migrációja a másodlagos nyirokszervekbe
<b>Makrofágok</b>	Pro-inflammatórikus citokin gének expressziója, iNOS és TNF expresszió, fagocitózis (?)
<b>Neutrofil granulociták</b>	Fagocitózis

*Átvéve: Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease Nat Rev Immunol. 2007 Sep;7(9):690-702. [77].*

## 2.2 A glükokortikoid hormonok (GC)

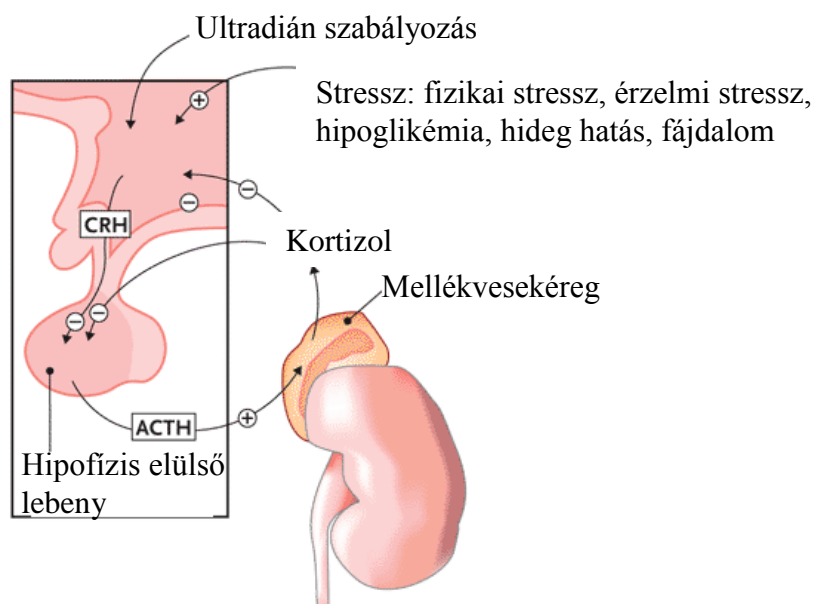
### 2.2.1 A glükokortikoid hormonok szintézise és élettani hatásaik

A GC-ok a mellékvese szteroid hormonjai, a mellékvesekéreg zona fasciculátájában koleszterinből szintetizálódnak. A szintézisben részt vevő enzimek közül a 3- $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz az aldoszteron és a GC szintézis közös enzimje. A 17- $\alpha$ -hidroxiláz és a 11- $\beta$ -hidroxiláz csak a kortizol és a kortikoszteron szintézisében vesznek részt [78] [9. ábra].



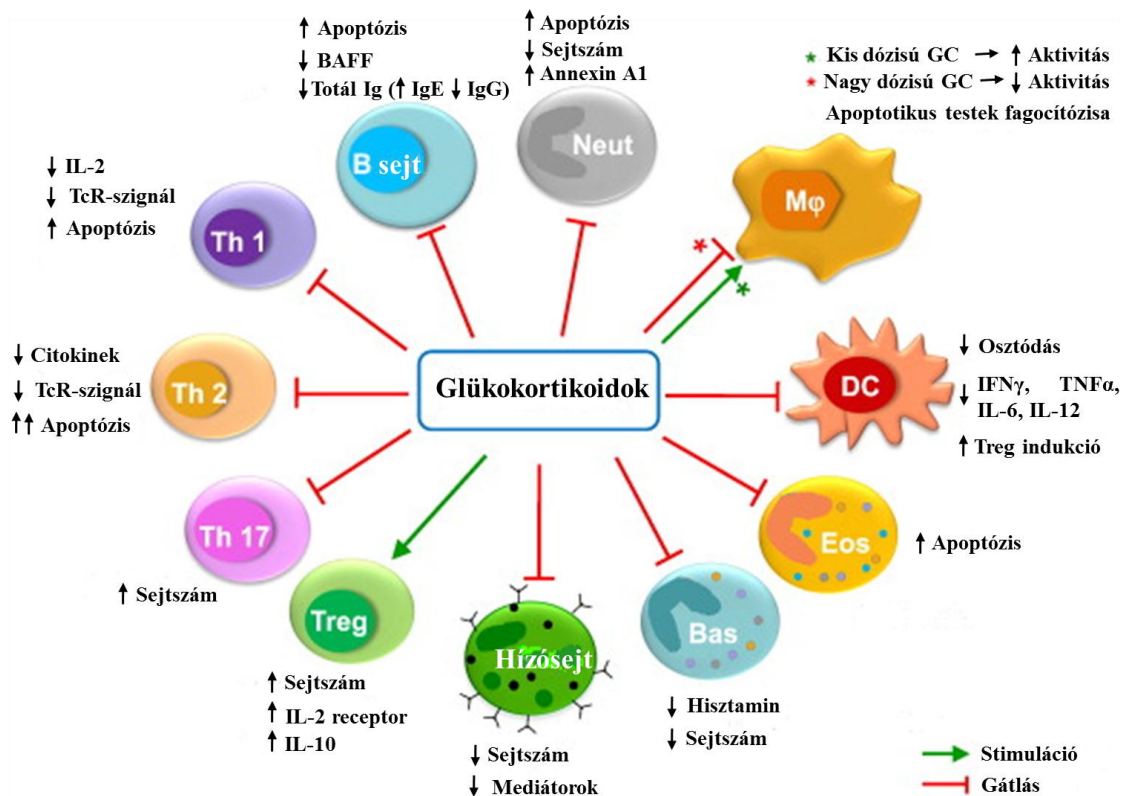
9. ábra: A szteroid hormonok szintézise. Átvéve: Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach, (2003) page 1300, Elsevier/Saunders. [78].

A GC-ok szintézisét a hipotalamo-hipofizeális-mellékvesekéreg tengely szabályozza. A CRH felszabadulása a hipotalamuszból ultradián ritmussal mutat, ébredés után és délután éri el a legmagasabb szintet. A stressz és a vér kortizol szintje szintén befolyásolja a CRH felszabadulását. A CRH a portális ereken keresztül jut a hipofízis elülső lebenyébe, ahol a kortikotróp sejtek ACTH felszabadulását indukálják. Az ACTH a véráram útján jut a mellékvesekéreghez, hatására a koleszterinből GC hormonok szintetizálódnak. A keringésbe kerülő glükokortikoidokat a CBG-ok szállítják a célsejtekhez. A GC-ok számos metabolikus folyamatot befolyásolnak, növelik a vércukor szintet, stimulálják a májban a glükoneogenezist, elősegítik az aminosavak és a zsírsavak metabolizmusát, valamint negatív „feedback” révén gátolják a CRH és az ACTH kibocsátását [79-81] [10. ábra].



**10. ábra:** A hipotalamo-hipofizeális-mellékvesekéreg tengely. Átvéve: Kronenberg HM, Meme S, Polonsky KS, Larsen RP. *Williams Textbook of Endocrinology: The Adrenal Cortex* Page: 451.[80].

A GC-ok nemcsak metabolikus folyamatokat szabályoznak, hanem befolyásolják az immunrendszer működését is. Csökkentik a bazofil és neutrofil granulociták, valamint a hízósejtek számát, apoptózist indukálnak a Th1-, Th2- és B-sejtekben, a neutrofil és az eozinofil granulocitákban. A T-sejt jelátvitel gátlása révén csökkentik a citokinek, különösen az IL-2 szintézisét. Növelik viszont a regulátoros T-sejtek és a Th17-sejtek számát [82] [11. ábra].



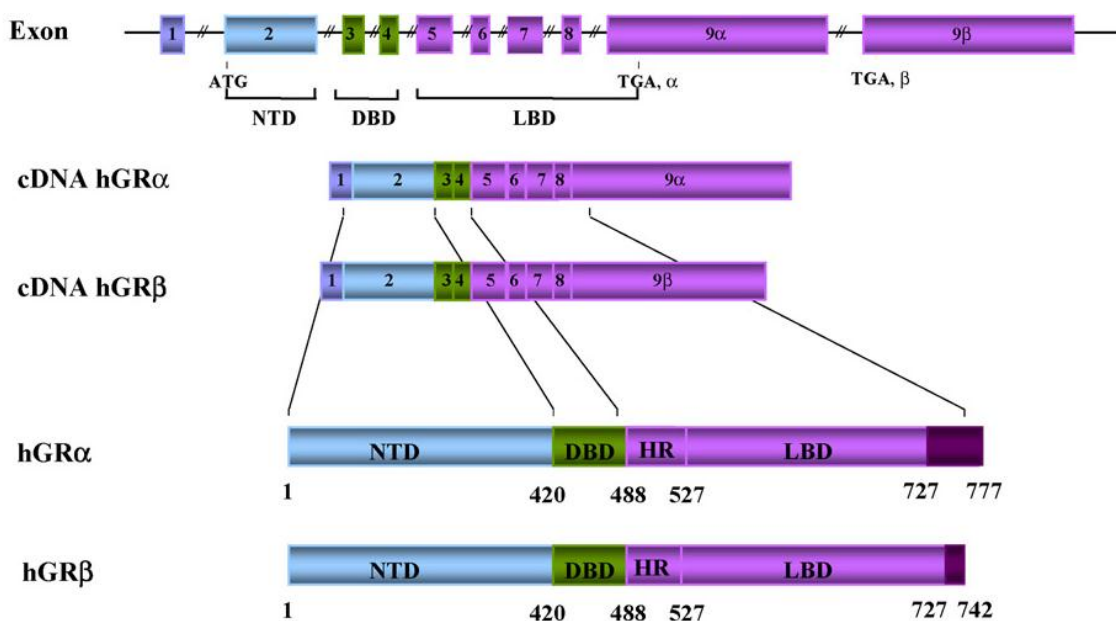
**11. ábra: A glükokortikoid hormonok hatásai az immunrendszer sejtjeire.** Átvéve: Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A. *The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system.* *Autoimmun Rev.* 2011Apr;10:305-10. [82].

Ezen immunszuppresszív hatásai miatt a GC analógokat széles körben használják allergia, asztma és autoimmun betegségek kezelésére, valamint graft rejekció megelőzésére is [83-85].

### 2.2.2 A glükokortikoid hormonok receptorai (GR)

A GR-ok a sejtmagi receptorok családjába tartoznak. Ilyen receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat a szteroid valamint tiroid hormonok, a retinolsav és a D-vitamin. A sejtmagi receptorok N-terminális doménje (NTD) variábilis. Ezt egy DNS-kötő régió (DBD) követi, ami cink-ujj szakaszokat tartalmaz és nagy mértékben konzervált. A DNS-kötő régiót egy variábilis hosszúságú henge régió választja el a ligand kötő doméntől (LBD). A legtöbb receptor tartalmaz egy szintén változó hosszúságú C-terminális domént [86].

A humán GR a 9-es kromoszóma rövid karján kódolódik és 9 exont tartalmaz. A DNS-ről 2 mRNS íródik át és 2 GR izoforma, a GR $\alpha$  és a GR $\beta$  szintetizálódik. A GR $\alpha$  777, a GR $\beta$  742 aminosavból áll. A 2 izoforma aminosav sorrendje a 727. aminosavig megegyezik, ezt követően egyedi C-terminális aminosav szekvenciákból épülnek fel. A 2 izoforma tehát a ligand kötő doménjében tér el egymástól [12. ábra]. A GR $\alpha$  ubiquiter módon expresszálódik. Ligand hiányában a molekula a citoplazmában található hőssokk fehérjékhez és egyéb jelátviteli fehérjéhez asszociálódik. Ez a receptor felelős a GC közvetítette hatások kialakításáért. A GR $\beta$  állandóan a sejtmagban található és nem képes GC analógok megkötésére [87-89]. Szerepe nem tisztázott, bár újabb kísérleti eredmények szerint rendelkezik intrinszik, a GR $\alpha$ -tól független transzkripciós aktivitással [90]. A GR ligand kötés hatására N-terminális szerin maradékokon foszforilálódhat. A foszforiláció szerepet játszhat a GR sejten belüli mozgásában, promóter specificitásában, ko-faktorokkal való összekapcsolódásában, a receptor által kiváltott jelek erősségének és időtartamának szabályozásában, a receptor stabilitásában vagy a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában [91].



**12. ábra:** A humán glükokortikoid receptor gén és glükokortikoid receptor izoformák. Átvéve: Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010 Jan;75(1):1-12. [87].



## 2.2.3 A glükokortikoidok (GC) hatásmechanizmusai

### 2.2.3.1 Genomikus glükokortikoid hatások

A GC-ok miután átdiffundálnak a sejtmembránon, citoplazmatikus receptorukhoz kötődnek. A klasszikus, genomikus hatásmechanizmus során, ligand kötést követően a GR konformációváltozáson megy keresztül, disszociál a hőszokk fehérjéről és dimerizálódik. A ligand kötött, dimerizálódott GR a sejtmagba transzlokálódik, ahol glükokortikoid válasz elemekhez (GRE) kötődik [87-89]. A negatív GRE-hez való kötődés gátolja a transzkripciót (transzrepresszió), így a gyulladáshoz gúenek (pl. IL-1 $\beta$ ) átíródásának gátlása révén immunszuppresszióhoz vezet. Transzaktivációt eredményez a ligand kötött GR pozitív GRE-hez való kötődése, így az immunszuppresszióban fontos szerepet játszó gúenek, pl. I $\kappa$ B, annexin-1, IL-10, MAPK foszfatáz-1, lipokortin-1 átíródása fokozódik. A GR közvetlenül is képes pro-inflammatórikus transzkripciós faktorokat gátolni pl. AP-1, NFAT, NF- $\kappa$ B, STAT, ami szintén immunszuppresszióhoz vezet [92]. Ezen folyamatok kialakulásához órákra, napokra van szükség.

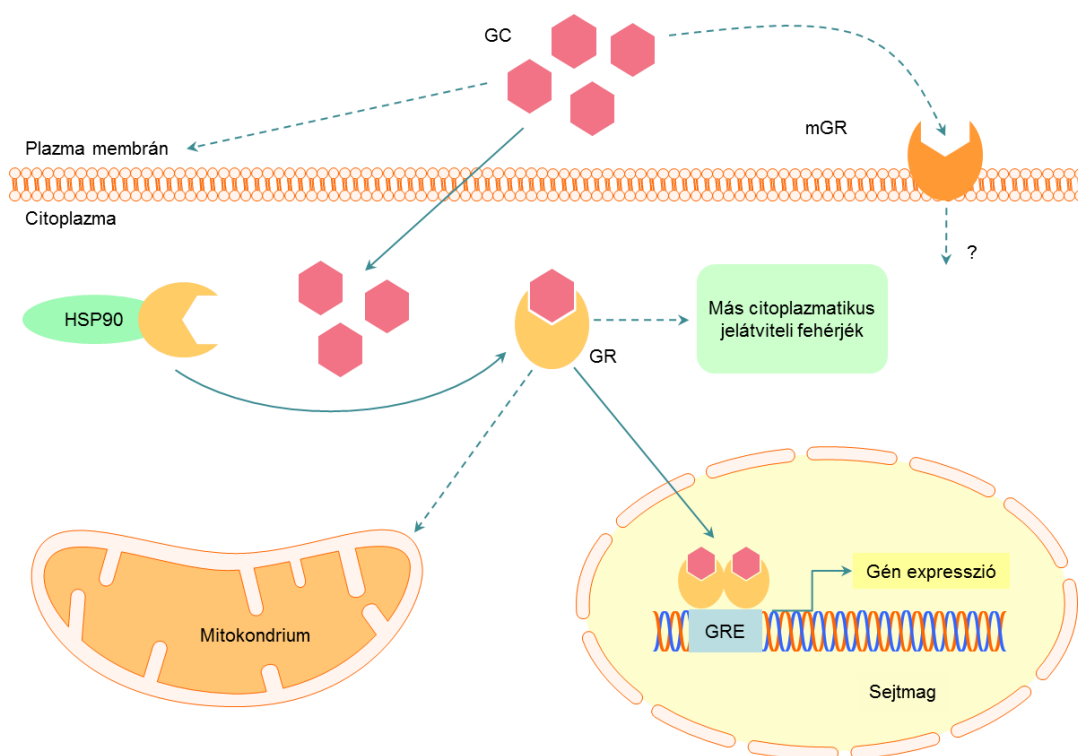
A GC-ok nem minden hatása magyarázható a genomikus folyamatokkal. Ezért az utóbbi időben intenzív kutatások tárgyát képezik a glükokortikoidok nem-genomikus hatásmechanizmusai [13. ábra].

### 2.2.3.2 Nem-genomikus glükokortikoid hatások

A GC-ok nem-genomikus hatásai rövid időn belül (percek alatt), nagy dózisú (30 mg–1g/nap) GC kezelés hatására alakulnak ki [93,94]. Ezt a dózist alkalmazzák asztmás roham és anafilaxiás reakciók kezelése során, transzplantációkor lökésterápiában, valamint autoimmun betegségek fellángolása esetén.

A nem-genomikus GC hatások a következők lehetnek:

- i) membrán GR közvetítette hatások;
- ii) direkt hatások a plazmamembránon keresztül;
- iii) mitokondriális hatások;
- iv) a GR kölcsönhatása citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel [87,95] [13. ábra].



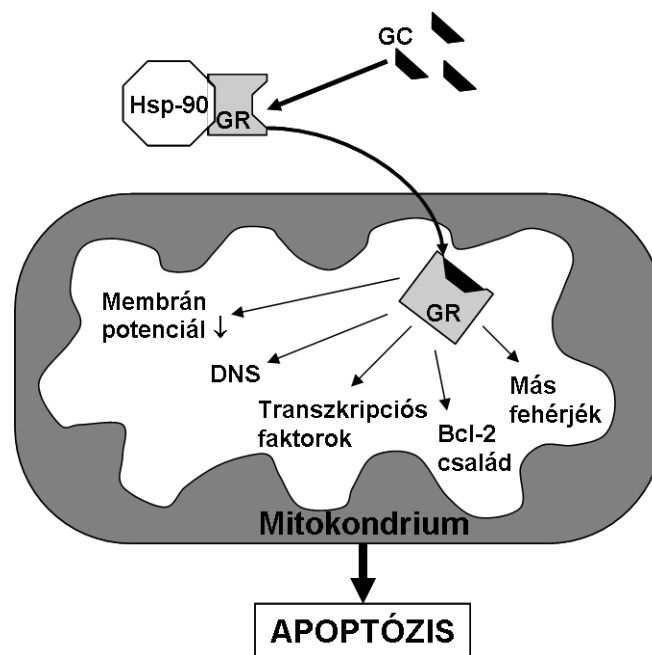
**13. ábra: A GC genomikus (folytonos vonal) és nem-genomikus (szaggatott vonal) hatásmechanizmusai. Átvéve: Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. Immunobiology 2010 Jul; 215:521-6. [97].**

A membrán GR-t kimutatták már kételtűek agyában, valamint emlős és humán tumor sejtvonalakon, pl. S-49 egér T limfóma sejteken és CCRF-CEM humán T-sejtes limfoblaszt szerű sejtvonalakon, valamint humán monocitákon és limfocitákon. Összefüggést mutattak ki monociták mGR expressziója és autoimmun betegségek, pl. reumatoid arthritisz, SLE és spondilitisz ankilopoetika súlyossága között. Korrelációt találtak a mGR expresszió és a sejtciklus függő apoptózis érzékenység között humán leukémia sejtvonalakban. Újabb kutatások szerint mind a mGR, mind a cGR ugyanarról a génről íródik át és a mGR a p38 MAPK foszforilációját indukálja [96-102].

A GC analógok plazma membránra gyakorolt hatásai már régóta ismertek vörösvértetekben. Nagy dózisú szteroid kezelés befolyásolja a membrán lipid mobilitását emlős tumor sejtvonalakban. A GC kezelés patkány leukocitákon zavart plazma membrán pszeudopódium retrakcióhoz vezet, míg hörcsög vese sejtvonalban direkt hatása van a tight

junkciók képződésére. Aktivált emlős timocitákban a GC-ok gátolják a  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ , a  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPáz}$  és a  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  -kicserélő csatornák aktivációját [103-108].

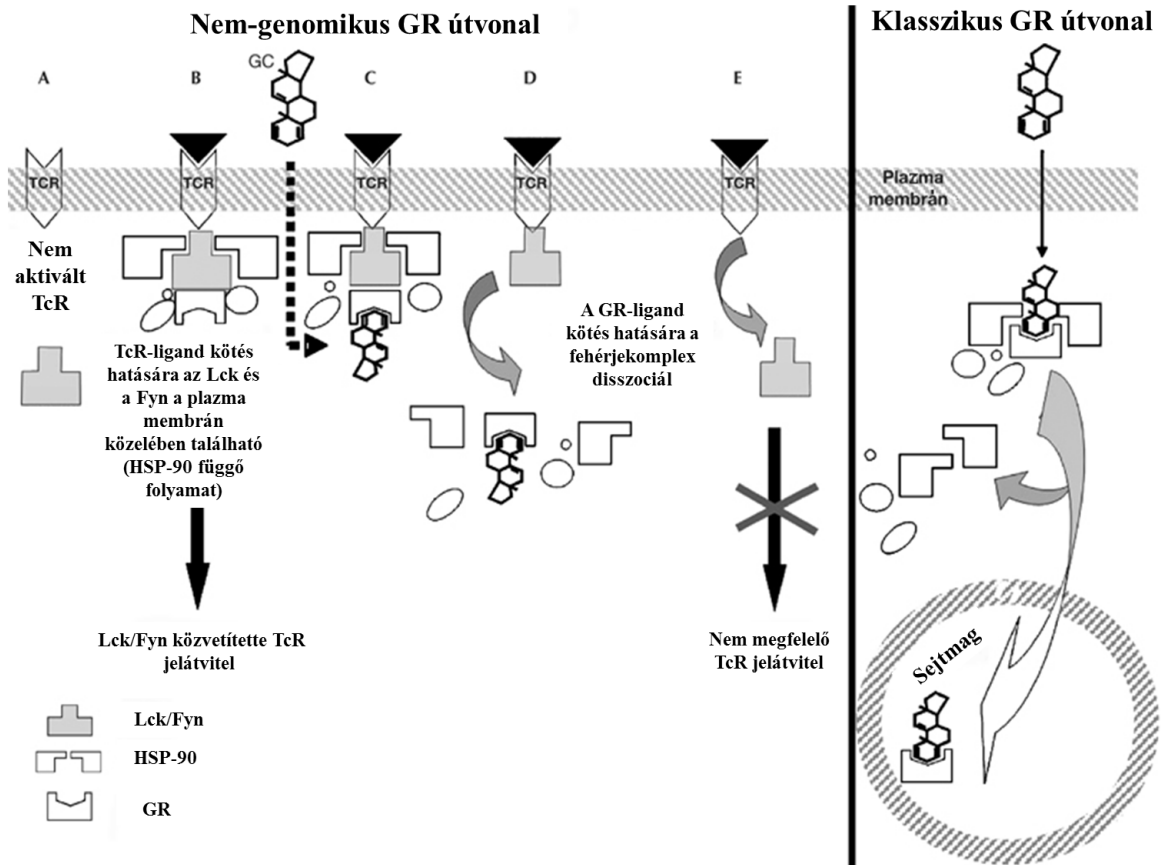
A GR mitokondriális transzlokációját kimutatták nem-limfoid és limfoid sejtekben, köztük DP timocitákban is. A ligand indukálta mitokondriális GR transzlokáció számos sejtvonalban korrelációt mutat a GC-indukálta apoptózis érzékenységgel. A mitokondriumban a GR asszociálódhat HSP fehérjékkel, vagy a Bcl-2 család tagjaival. Rövid idejű GC kezelés hatására csökken a mitokondriális membrán potenciál is [97, 109-112] [14. ábra].



**14. ábra: A ligand kötött GR feltételezett hatásai timociták mitokondriumában.** Átvéve: Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology*. 2010Jul; 215:521-6.[97].

A ligand kötését követően a GR a T-sejt aktiváció jelátviteli molekuláival is kölcsönhatásba kerül. A GC-ok immunszuppresszív hatásainak megértése szempontjából különösen fontos, hogy a GR mely T-sejt jelátviteli molekulákkal lép kapcsolatba. Aktivált humán  $\text{CD4}^+$  T-sejtekben a rövid idejű, nagy dózisú GC kezelés a TcR/CD3 útvonal számos fehérjéjének foszforilációját gátolja. Ezek között megtalálhatóak a T-sejt aktiváció

kezdeti lépéseiben nélkülözhetetlen Lck és Fyn kinázok, valamint downstream molekulák, pl. a PKB, a PKC és a MAPK kaszkád elemei [113]. Az aktiváció indukálta TcR-Lck-Fyn komplex, ami a HSP-90-et és a GR-t is tartalmazza, GC kezelés hatására disszociál [114] [15. ábra].

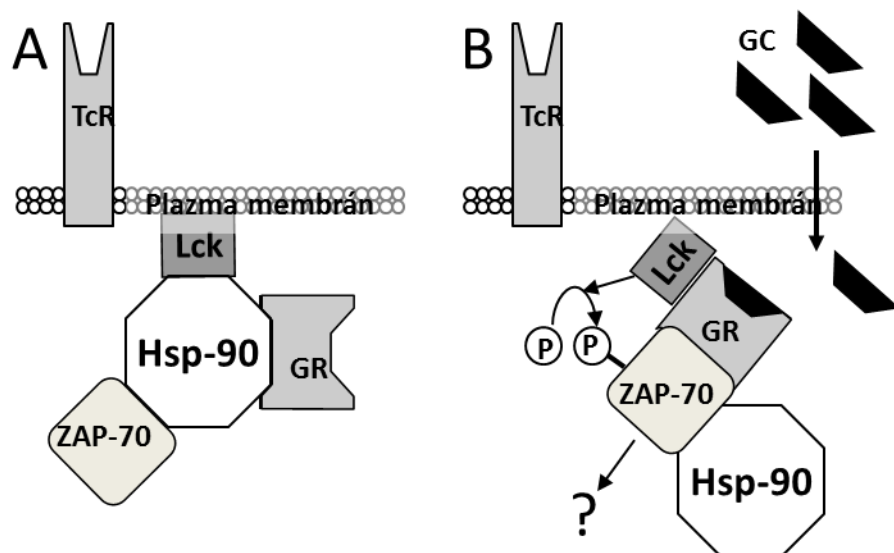


**15. ábra: Nem-genomikus glükokortikoid hatások aktivált humán CD4+ T-sejtekben.** Antigen kötés hatására az Lck és Fyn kinázok a TcR-hez asszociálódnak, ami aktivációhoz és downstream jelátviteli utak elindításához vezet. A folyamatban HSP fehérjék is részt vesznek (A, B). A glükokortikoid hormon a HSP-90-hez kötődik. A kötődés hatására az aktiváció indukálta TcR-Lck-Fyn-HSP komplex disszociál és a T-sejt aktiváció gátlódik (C, D, E). Az ábra jobb oldalán a genomikus glükokortikoid hatások láthatóak. Átvéve: Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgereit F, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ, Hommes DW. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* 2006Oct; 7:1023-9. [114].

## 2.2.4 A ZAP-70 kináz szerepe a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában

A nem-genomikus GC hatások nem csak a foszforiláció gátlását eredményezik. Intézetünkben végzett korábbi kísérletekben Jurkat T-sejtes leukémia sejtekben vizsgáltuk a GC-ok nem-genomikus hatásait. Rövid idejű, nagy dózisú dexamethasone (DX-glükokortikoid analóg) kezelés önmagában foszforiláció növekedéshez vezetett Jurkat sejtek lizátumában, a DX előkezelés pedig gátolja az anti-CD3 indukálta foszforiláció növekedést.

Kísérleteink során részletesen vizsgáltuk a ZAP-70 kinázt, a T-sejt aktiváció egyik központi molekuláját. Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés a ZAP-70 foszforiláció növekedéséhez vezetett, ami anti-CD3 és DX kombinált kezelés hatására még további foszforilációt indukált. Tovább vizsgálva a ZAP-70 szerepét a nem-genomikus GC hatásokban, az alábbi modellt állítottuk fel. Ligand hiányában a GR, az Lck és a ZAP-70 multimolekuláris komplexet alkot a HSP-90-el a sejtmembrán közeli régióban. Néhány perces GC kezelést követően a GR disszociál a HSP-90-ről és asszociál az Lck által foszforilált ZAP-70 kinázzal [97,115,116][16. ábra].



**16. ábra:** A ZAP-70, GR, Lck és HSP-90 molekulák interakciójának modellje Jurkat sejtekben. Az A. ábra ligand hiányában, míg a B. ábra ligand kötést követően mutatja a jelátviteli molekulák egymáshoz való viszonyát. Átvéve: Boldizsar F, Talaber G, Szabo M,

*Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. Immunobiology. 2010Jul; 215:521-6.[97].*

Ezek az eredmények némileg ellentmondásban állnak a Löwenberg és munkatársai által végzett kísérletekkel. A különbségek adódhatnak abból, hogy Löwenberg és munkatársai a GC hatásokat aktivált primer CD4+ T-sejtekben vizsgálták, míg munkacsoportunk nyugvó sejtvonalakban csak GC analóg kezelést követően írta le a fenti modellt [97, 114, 115,116].

A ZAP-70 kináz mind anti-CD3, mind DX kezelés hatására foszforilálódik. Mivel a ZAP-70 aktivációs és gátló tirozin maradékokat is tartalmaz, így felmerül, hogy a különböző kezelések során más-más funkciójú tirozinok foszforilálódnak és közvetítenek eltérő jeleket a downstream molekuláknak.

### 3. Célkitűzések

Kísérleteink célja az volt, hogy a ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak szerepét vizsgáljuk a T-sejtek aktivációjában és a GC-ok nem-genomikus hatásainak kialakításában.

1. Olyan rendszert kívántunk létrehozni, amiben a ZAP-70 tirozinjait külön-külön vizsgálhatjuk. Ehhez P116 sejteket (ZAP-70 deficiens Jurkat sejt vonal) transzfektáltunk lentivirális vektorral, mely vad típusú (kontroll) vagy pontmutáns ZAP-70-et kódol. A mutáns sejt vonalakban a 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492, 493 pozícióban található tirozinokat fenilalaninra cseréltük.

2. Ebben a rendszerben először jellemezni kívántuk a ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak szerepét a T-sejt aktivációban, különös tekintettel a még ismeretlen funkciójú Y069, Y126, Y178 és Y238 maradékokra.

- Vizsgálni kívántuk a ZAP-70 tirozinjainak szerepét az aktiváció indukálta intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában.

- Tisztázni szerettük volna, hogy mi a funkciója a ZAP-70 egyes tirozinjainak a kináz autoregulációjában.

- Az SLP-76 és a LAT a ZAP-70 kináz szubsztrátjai és fontos szerepet játszanak az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában. Ezért tanulmányozni kívántuk, hogy a ZAP-70 tirozinjainak pontmutációi hogyan befolyásolják az anti-CD3 indukálta SLP-76 és LAT foszforilációt.

3. Intézetünkben végzett korábbi kísérletek szerint a ZAP-70 kináz szerepet játszhat a nem-genomikus GC hormon hatások kialakításában. Rövid idejű, nagy dózisu GC analóg kezelés a ZAP-70 foszforiláció növekedését és a ZAP-70-GR asszociációját indukálta. A ZAP-70 aktiváció indukálta foszforiláció növekedését a GC kezelés tovább fokozta [97, 115,116].

- Jelen kísérleteinkben jellemezni kívántuk, hogy a ZAP-70 kináz mely tirozinjai vesznek részt a GC-ok nem-genomikus hatásmechanizmusainak kialakításában, valamint hogy a Y-F aminosav csere megváltoztatja-e a ZAP-70-GR asszociációt.

- Elemezni szeretnénk volna a ZAP-70 szubsztrátjainak, az SLP-76, a LAT és a Cbl molekuláknak a szerepét a nem-genomikus GC hatások kialakításában.

- Tanulmányozni kívántuk, hogy ZAP-70 azon tirozin maradékai, amelyek a nem-genomikus GC hatásokat közvetítik, befolyásolják-e a ZAP-70 szubsztrátjainak - SLP-76, LAT, Cbl - GC indukálta foszforiláció változását.

- Vizsgáltuk, hogy GC előkezelés hogyan befolyásolja az anti-CD3 indukálta T-sejt aktiváció jelátviteli útvonalait: az SLP-76, LAT és Cbl molekulák foszforilációját, valamint az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását.



## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 Vegyszerek és pufferek

A kísérletekhez a vegyszereket a Sigma Aldrich Kft-től rendeltük. A máshonnan rendelt termékeket jelezzük.

### 4.2 A humán ZAP-70 klónozása és célzott mutagenezise

A teljes hosszúságú humán ZAP-70 kódoló szekvencia (WT ZAP-70) amplifikálásához P1 (forw) és P2 (rev) primereket használtunk (olvadási hőmérséklet: 57°C; termék hossza: 1881bp), amelyek BamH1 és SalI restriktációs helyeket tartalmaztak [2. táblázat]. A klónozás során a PCR-hoz templátként humán perifériás T-sejtekből izolált totál RNS transzkripcióját követően létrehozott cDNS könyvtárt használtunk. A PCR termékeket tisztítottuk és TA vektorba klónoztuk, amihez az InsTAclone PCR klónozó kitet (Fermentas) használtuk a gyártó útmutatásának megfelelően, majd a plazmidot az inzerttel együtt szekvenáltuk.

A humán ZAP-70 célzott mutagenezisét 2 lépésben végeztük és ehhez a TA klónozott WT szekvenciát használtuk templátként. Először a PCR reakciókhoz olyan primereket használtunk, amik a Y-F pontmutációkat tartalmazták a különböző aminosav pozíciókban [2. táblázat]. Az alábbi forward és reverse primer kombinációkat használtuk: P1-P069, P1-P126, P1-P178, P1-P238, P1-292, P315-P2, P492-P2, P493-P2 [2. táblázat]. A PCR termékeket tisztítást követően megaprimerként használtuk a második PCR-hoz P1-el vagy P2-vel párban, hogy a végül Y-F pontmutációt tartalmazó teljes hosszú ZAP-70 konstrukciót létrehozzuk. Az így kapott termékeket TA klónoztuk és a mutációk ellenőrzésére szekvenáltuk. Valamennyi PCR reakcióhoz a Proof Start DNA Polymerase (Qiagen) kitet használtuk a gyártó útmutatása szerint.

## 2. táblázat: A kísérletekben használt primerek összefoglalása.

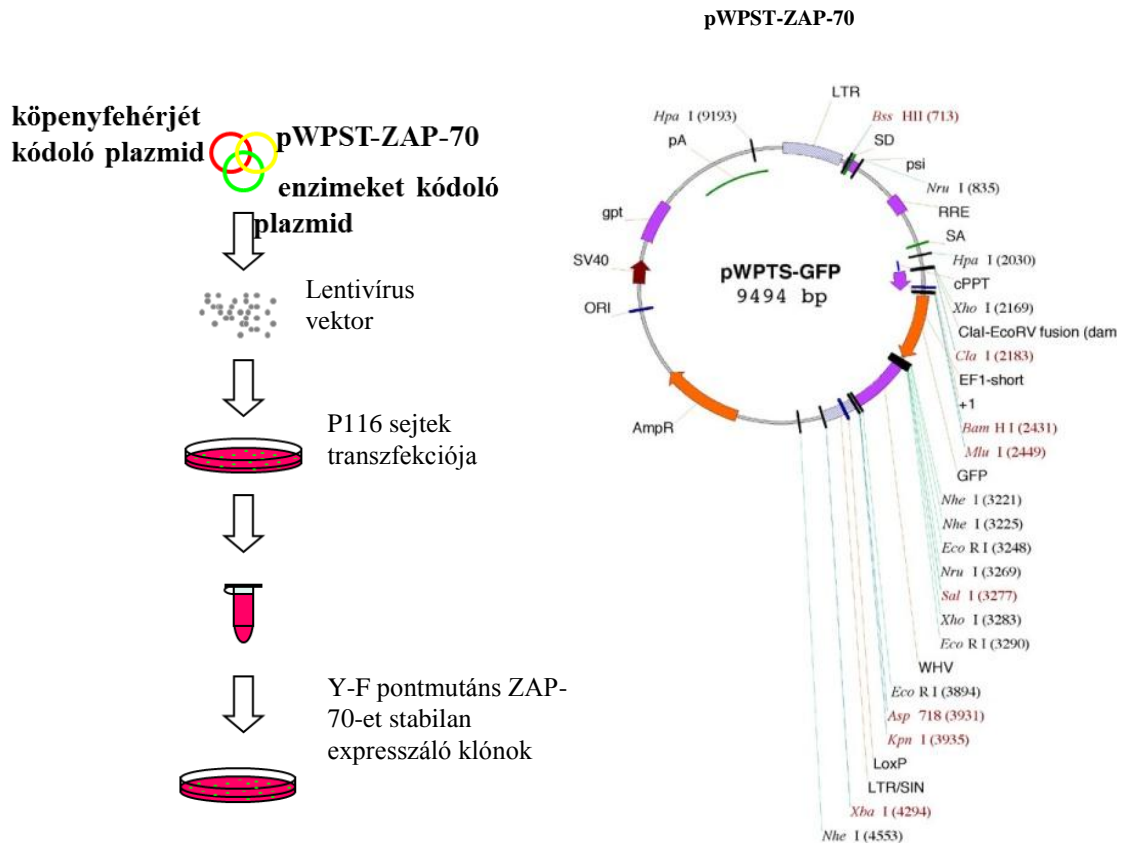
Név	Szekvencia (5' > 3')	Funkció/rendeltetés
P1	cgggatcccggccATGccagaccccggcgccacc	ZAP-70 klónozás, Forw, Start
P2	agcacacagaaggctgaggctgcctgtgccTGAgcgtcgacgtc	ZAP-70 klónozás, Rev, Stop
P069	cggcaatggc <b>aa</b> aggtgccg	F069 mutáció
P126	ctggcgcac <b>aa</b> agtcacgca	F126 mutáció
P178	gtctgcgccccag <b>aaaa</b> agtttgc	F178 mutáció
P238	cagcttcag <b>aa</b> actccaccag	F238 mutáció
P292	ctcaggggt <b>aa</b> atccatctgag	F292 mutáció
P315	cga gcggt <b>ttt</b> ga gagccccctac	F315 mutáció
P492	gac gacagct <b>ttt</b> acaactgcccc	F492 mutáció
P493	gac gacagctact <b>ttt</b> actgcccc	F493 mutáció
S1	ccggcagagctctgcgagtt	szekvenálás 1 (421-439)
S2	ctgcctgaaggaggcctgcc	szekvenálás 2 (927-946)
S3	cgtgacctggcggccccgcaac	szekvenálás 3 (1561-1581)

A ZAP-70 klónozására használt P1 és P2 primerek BamHI és Sall restriktions helyeket tartalmaznak (aláhúzva), a start és a stop kodonok nagy betűvel vannak jelölve. A számok azt az aminosav pozíciót jelölik, ahol a pontmutáció történt. Zárójelben megadtuk a szekvenáló primerek pontos cDNS kötőhelyét. In: Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87. [60].

### 4.3 A ZAP-70 konstrukciók lentivirális transzfekciója ZAP-70 deficiens P116 sejtekbe

A P116 sejteket transzfektáltuk lentivirális vektorral, ami pontmutáns vagy teljes hosszúságú, vad típusú (WT) ZAP-70-et kódoló cDNS-t tartalmazott. A pontmutáns vagy WT ZAP-70 cDNS-t inzertáltunk a pWPST lentivirális transzfer plazmidba, az EF1 promóter mögé. Ez a második generációs lentivirális konstrukció cPPT és WPRE elemeket tartalmaz, melyek a transzgén integrációját és expresszióját növelik [117,118]. A lentivírus termeléshez egy envelope konstrukciót (pMD.G), egy csomagoló plazmidot (R8.91) és a transzfer plazmidot (pWPTS-EF1-ZAP-70) ko-transzfektáltunk kalcium-foszfát módszert használva kloroquinnal (1mM végső koncentráció) előkezelt 293T sejtekbe. 24 órás inkubációt követően a vírustermelő sejtek felülcszóját összegyűjtöttük, lecentrifugáltuk (2000 rpm, 10 min, 4°C) és átszűrtük (0.45µm pórusméretű PVDF filter),

hogy a sejtmaradványoktól megszabaduljunk [119]. A P116 sejteket spinokulációval transzfektáltuk, MOI=10 arányban (MOI: transzfektáló vírus/sejt arány) [120] [17. ábra].



17. ábra: A lentivirális transzfekció folyamata és a pWPST lentivirális transzfer plazmid.

Átvéve: <http://www.immbio.hu/hu/lentilink20070405.htm>.

#### 4.4 Sejtvonalak

A Jurkat, a P116 (ZAP-70 deficiens Jurkat szubklón (Prof. Monostori Éva (SZBK) bocsátotta rendelkezésünkre) és a WT vagy pontmutáns ZAP-70-el transzfektált P116 sejteket szokásos körülmények között (37°C, megfelelő páratartalom, 5% CO<sub>2</sub>) tenyésztettük. A tenyésztéshez 10% FCS (Gibco) tartalmú médiumot használtunk, amit nátrium-piruváttal (1mM), glükózzal (4,5g/l), penicillinnel és sztreptomicinnel egészítettünk ki.

## 4.5 Antitestek

A Western blotok előhívását az alábbi antitestekkel végeztük: egér monoklonális anti-foszfotirozin (klón PY20, 1:5000, BD Pharmingen); anti-ZAP-70 (klón 29 / ZAP-70 kináz, 1:5000, BD Pharmingen); egér monoklonális anti- $\beta$ -aktin (klón AC-74, 1:50000, Sigma); nyúl poliklonális anti-SLP76 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti-LAT (1:500, Santa Cruz Biotechnology); anti-Cbl (1:500, Santa Cruz Biotechnology) és egér monoklonális anti-GR (klón 5E4, Intézetünkben készített hibridómából) [121]. Másodlagos antitestként HRPO konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000, Hunnavix) vagy anti-nyúl IgG (1:1000, Pierce) antitesteket használtunk.

Az immunprecipitációkat egér monoklonális anti-SLP76 (klón F-7, 2  $\mu$ g / minta, Santa Cruz Biotechnology); anti-LAT (klón 11B.12, 2  $\mu$ g / minta, Santa Cruz Biotechnology); anti-Cbl (klón A-9, 2  $\mu$ g / minta, Santa Cruz Biotechnology) és nyúl poliklonális anti-ZAP-70 (Prof. Monostori Éva (SZBK) bocsátotta rendelkezésünkre) antitestekkel végeztük.

Az áramlási citometriás méréseknél alkalmazott anti-ZAP-70 antitestek a kináz 2 különböző epitópját ismerik fel: az egér anti-ZAP-70-FITC (klón 2F3.2, Upstate Biotechnology) az 1-254 AA közötti epitóphoz, míg az egér anti-ZAP-70-PE (klón 1E7.2, eBioscience) a 282-307AA közötti epitóphoz kötődik.

A Fosfo-Flow módszerrel végzett mérésekhez foszfospecifikus PE-konjugált egér anti-SLP-76 pY128 (klón J141-668.36.58, BD Biosciences) és egér anti-LAT pY171 (klón I58-1169, BD Biosciences) antitesteket használtunk.

## 4.6 Intracelluláris jelölés és áramlási citometria a ZAP-70 expresszió mérésére

Mintánként  $10^6$  sejtet fixáltunk és szaponin pufferben permeabilizáltunk (PBS/0,1%  $\text{NaN}_3$ /0,1% BSA/0,1% szaponin). A sejteket permeabilizáló pufferben vettük fel és a különböző anti-ZAP-70 antitestekkel 45 percen keresztül inkubáltuk jégen. Ezt követően a mintákat kétszer mostuk szaponin pufferben és egyszer PBS/0,1% BSA/0,1%  $\text{NaN}_3$ -ban. Az áramlási citometriás mérést és analízist a FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük. A sejteket az FSC/SSC paramétereik alapján azonosítottuk és mintánként 10000 eseményt mértünk. Az átlag fluoreszcencia intenzitás értékeket (MFI) a hisztogramok alapján kalkuláltuk. Jelöletlen,

valamint a megfelelő izotípus kontroll antitesttel inkubált mintákat használtunk negatív kontrollként.

#### **4.7 A sejtek kezelése**

Kezelés előtt a sejteket RPMI médiumban vettük fel. A TcR/CD3 útvonal vizsgálatára a sejteket anti-humán-CD3 (klón OKT-3; ATCC CRL-8001, 1 mg/ml törzsoldat) antitesttel inkubáltuk  $5\mu\text{l}/10^6$  sejt koncentrációban 2 percig. A nem-genomikus glükokortikoid hatások kiváltására a sejteket  $10^{-5}\text{M}$  dexametazonnal (DX- szintetikus glükokortikoid analóg, DMSO-ban oldva) inkubáltuk 2 percig. Ez a koncentráció megfelel a klinikumban alkalmazott nagy dóziséjú szteroid kezelésnek [93,94]. Kombinált kezelés esetén 2 perces DX előkezelést további 2 perces anti-CD3 aktiváció követett. A kezeléseket  $37^\circ\text{C}$ -on, állandó keverés mellett Thermo Mixer (Eppendorf) készüléken végeztük. A Western blothoz a reakciót folyékony nitrogénben, a Foszfó-Flow mérésekhez 4% PFA-ban állítottuk le. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel vizsgálatokor a kombinált kezelés esetén a sejteket 10 percig  $10^{-5}\text{M}$  DX-al kezeltük elő.

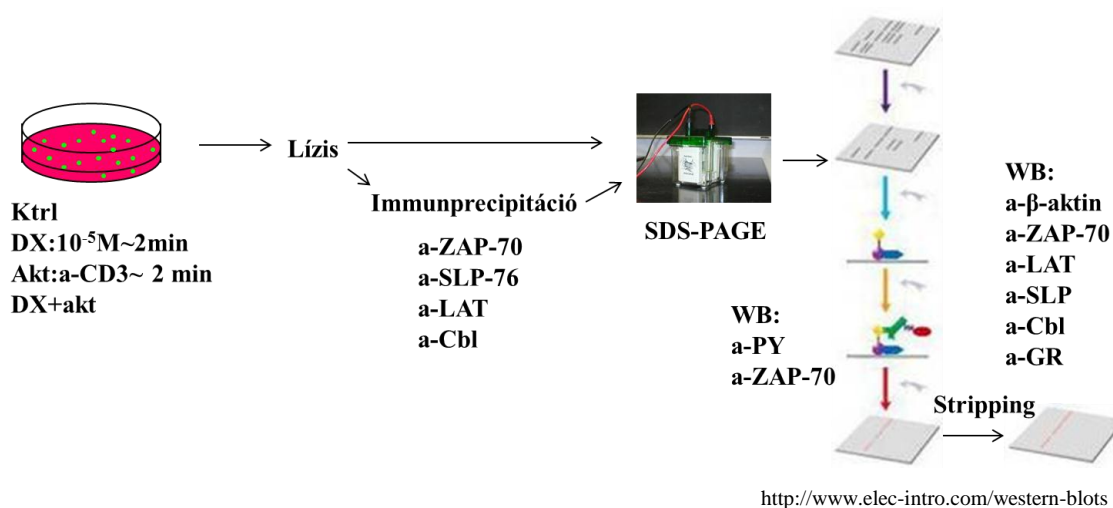
#### **4.8 Immunprecipitáció, Western blot**

A kontroll vagy kezelt mintákat Triton X lízis pufferben (50mM HEPES, 10mM nátrium-pirofoszfát, 10mM EDTA, 100mM nátrium-fluorid, 10% glicerol és 1% Triton X-100, pH 7,3 frissen kiegészítve proteáz gátlóval és Na-ortovanadáttal) lizáltuk 30 percig jégen, majd 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. A felülúszót SDS mintapufferben (125mM Tris, 4% SDS, 10 % glicerol, 0,006% Bromo-fenol-kék és 10% merkaptóetanol) főztük 10 percig, vagy immunprecipitációhoz használtuk tovább.

Immunprecipitáció során a sejtek lizátumát, a blokkoló puffert (TBS, 10% BSA és 0,1%  $\text{NaN}_3$ ) és a megfelelő mennyiségű antitestet (ld. 4.5 fejezet) éjszakán át, majd Protein-G-vel (GE Healthcare) további 2 órán keresztül inkubáltuk. A mintákat 5-ször mostuk WB-mosóval (10mM Tris, 100mM nátrium-klorid és 0,1% Tween-20, pH 7.4), majd az immunkomplexeket SDS mintapufferben 10 perces forralás során választottuk le a Protein-G-ről.

A lizátumokat és a precipitátumokat 7,5% vagy 10%-os SDS-poliakrilamid gélben választottuk el a MiniProtean rendszerben (Bio-Rad), majd éjszakán át nitrocellulóz

membránra blottoltuk a Trans-Blot (Bio-Rad) készülékben. Blottolást követően a membránokat blokkoló pufferben (2% BSA vagy 5% NFDM (Bio-Rad), 10mM Tris, 100mM nátrium-klorid, 0,1% Tween-20, pH 7,4) telítettük egy órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően a megfelelően hígított elsődleges antitestekkel (ld. 4.5 fejezet) inkubáltuk a blotokat 2 órán át szintén szobahőmérsékleten. A membránokat WB-mosóval mostuk, majd mosást követően HRPO konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Újabb mosást követően a blotokat Super Signal West Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) hívtuk elő. A jeleket a Fuji LAS4000 készülékkel detektáltuk. Az elsődleges és másodlagos antitesteket Restore Western Blot Stripping pufferrel (Pierce) távolítottuk el a membránról és blokkolást követően további antitestekkel hívtuk elő őket. A kapott jeleket denzitometriás méréssel kvantifikáltuk, amit Scion Image software (Scion Corporation) segítségével végeztünk [18. ábra].

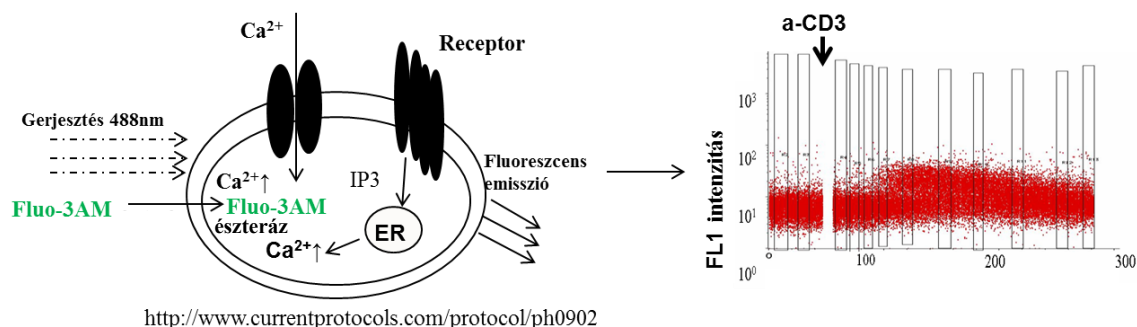


**18. ábra: Immunprecipitáció és Western blot.**

#### 4.9 Az intracelluláris kalcium szint mérése áramlási citometriával

A szabad intracelluláris kalcium szint méréséhez a sejteket Fluo-3AM (Invitrogen) kalcium szelektív indikátor festékkel töltöttük föl Minta és munkatársainak protokollja szerint [122]. Az áramlási citometriás méréseket és az eredmények analízisét a FACSCalibur áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük. Kezeletlen vagy DX előkezelt sejteken 50 másodpercig mértük az alap kalcium szintet, majd hozzáadtuk az anti-CD3-antitestet és így vizsgáltuk tovább az intracelluláris kalcium szint

változását. Az FL1 intenzitásban észlelt változások arányosak az intracelluláris kalcium szintjével [123] [19. ábra].



<http://www.currentprotocols.com/protocol/ph0902>

**19. ábra:** Az intracelluláris kalcium szint mérése áramlási citometriával.

#### 4.10 Az anti-CD3 indukálta foszforiláció változások mérése Foszfo-Flow technikával

A nyugvó vagy anti-CD3 kezelt sejteket 4% PFA-ban fixáltuk 37°C-on 10 percig, majd Phosflow Perm Buffer III-ban (BD Biosciences) 30 percig, jégen permeabilizáltuk. A mintákat PBS/0,1% BSA/0,1% NaN<sub>3</sub>-ban mostuk, majd anti-SLP-76 pY128 vagy anti-LAT pY171 antitestekkel 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően ismét mostuk, majd PBS-ben vettük fel a sejteket. Az áramlási citometriás mérést és analízist a FACS Calibur (Becton Dickinson) áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük

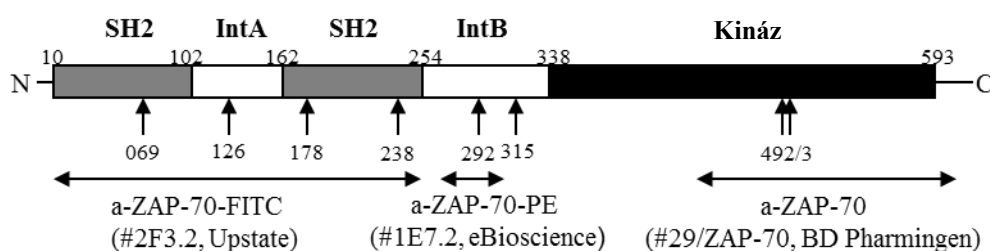
#### 4.11 Statisztika

Munkánk során a diagramokon az adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk. A Student-féle t-tesztet használtunk a különböző csoportok eredményeinek összehasonlítására és a  $P < 0,05$  eltérést fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

## 5. Eredmények

### 5.1 Tirozin (Y)-fenilalanin (F) pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expressziójának vizsgálata

A ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak vizsgálatára olyan transzgénikus Jurkat sejteket hoztunk létre, amelyek stabilan expresszálnak Y-F pontmutáns ZAP-70-et. Ehhez P116 sejteket transzfektáltunk lentivirális vektorral, ami WT vagy Y-F pontmutáns ZAP-70-et kódol. A pontmutáns sejtekben a 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 és 493 pozícióban lévő Y maradékokat cseréltük F-ra. Az egyes pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expresszióját Western bloton és intracelluláris jelölést követően áramlási citometriás mérésekkel ellenőriztük. Áramlási citometriás mérések során 2 antitestet használtunk, melyek a ZAP-70 kináz 2 különböző epitópját ismerik fel, míg a Western blothoz használt antitest a ZAP-70 egy további epitópjához kötődik [20. ábra].



**20. ábra: Epitópok, amiket a ZAP-70 kináz expressziójának vizsgálatához használt antitestek felismernek.** In: Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87. [60].

Ahogy az a 21. ábrán látható, a ZAP-70 kináz valamennyi transzgénikus sejtvonalba hasonló mértékben expresszálódik.

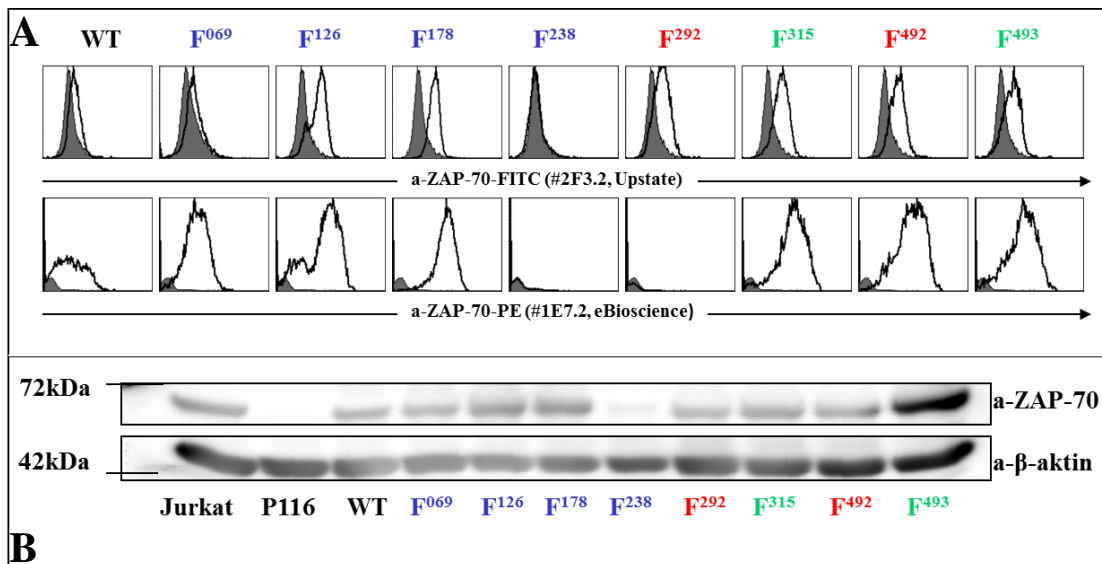
Kivételt képez ez alól az F238-ZAP-70 sejtvonala. A P116 sejteket háromszor próbáltuk transzfektálni az F238-ZAP-70 konstrukciót kódoló vektorral, de egyszer sem sikerült az F238-at expresszáló sejtvonala létrehozni, bár a szekvencia és a restriktációs elemzések szerint a konstrukciónk teljes volt. A Y238 vizsgálata azért lett volna különösen érdekes munkánk során, mert az előzetes szekvencia elemzések alapján ez a Y maradék



egy potenciális ITIM motívum ( $^{236}\text{VEYLKL}^{241}$ ) része lehet. Nincs direkt bizonyítékunk arra, hogy az F238-ZAP-70 expresszió miért nem volt sikeres, de feltételezzük, hogy a mutáció olyan poszttranszlációs módosulásokat befolyásol, amik a molekula inkomplett vagy károsodott foldingjához és ennek következtében lebomlásához vezethetnek.

A F292-ZAP-70 sejtvonal nem jelölődött az anti-ZAP-70-PE antitesttel (1E7.2 klón), ami azzal magyarázható, hogy az antitest a kináz 284-307 aminosavak közötti szakaszát ismeri fel és az F292-ZAP-70 sejtvonal esetében a pontmutáció éppen ebben az epitópban található.

A sejtvonalak ZAP-70 expresszióját munkánk során folyamatosan ellenőriztük és azt mindvégig stabilnak találtuk.



## 21. ábra: Pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expressziója.

**A:** Az áramlási citometriás mérésekhez 2 különböző anti-ZAP-70 antitestet használtunk. A hisztogramokon az FL1 (anti-ZAP-70-FITC (#2F3.2, Upstate)) és FL2 (anti-ZAP-70-PE (#1E7.2, eBioscience)) csatornában mért fluoreszcens jeleket ábrázoltuk. A szürke hisztogramok a P116 sejtek (negatív kontroll), míg az üres hisztogramok az egyes pontmutáns sejtek ZAP-70 expresszióját mutatják.

**B:** A pontmutáns sejtek ZAP-70 expresszióját Western bloton is vizsgáltuk (felső panel). Töltési kontroll vizsgálathoz anti-β-aktin antitestet használtunk (alsó panel).

## 5.2 A T-sejt aktiváció vizsgálata a Y-F ZAP-70 pontmutáns sejtekben

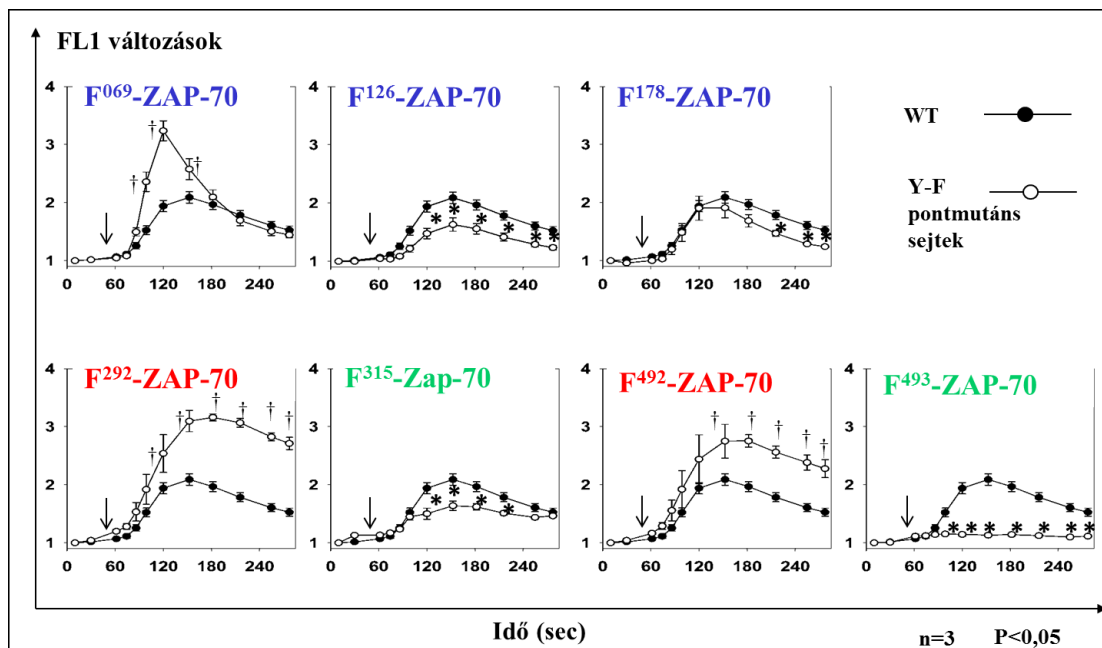
### 5.2.1 Az anti-CD3 indukálta intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -jel változása ZAP-70 pontmutáns sejtekben

Következő kísérleteinkben az vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 különböző pozícióiban létrehozott pontmutációk hogyan befolyásolják az aktiváció indukálta intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását. ZAP-70 hiányában a T-sejt aktiváció korai fázisban gátlódik, így intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedés sem alakul ki. Ahogy azt korábbi kísérleteink során már megfigyeltük, a WT-ZAP-70-el transzfektált P116 sejtekben a Jurkat sejtekhez hasonló  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet lehetett detektálni, azaz a ZAP-70 expresszió helyreállította a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet [22. *ábra*] [116].

A ZAP-70 Y-F pontmutációi különbözőképpen befolyásolták az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását [22. *ábra*]. A gátló funkciójú Y292 és Y492 aminosavak cseréje F-ra – a vártnak megfelelően – a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet eredményezett anti-CD3 kezelést követően. A Y-F aminosav csere az aktivációs 493-as pozícióban teljes mértékben gátolta az anti-CD3 indukálta intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását. A szomszédos Y492 és Y493 ellentétes funkcióját a  $\text{Ca}^{2+}$  méréseink is igazolták, ami megerősítette, hogy célzott mutagenézisünk valóban pontos volt. A szabályozó/aktivációs Y315 mutációja részleges  $\text{Ca}^{2+}$ -jel csökkenéshez vezetett [22. *ábra*].

Az F069-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalban szignifikánsan nagyobb  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet kaptunk, mint a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ezért feltételezzük, hogy a Y292 és Y492-höz hasonlóan, a ZAP-70 Y069 is gátló szerepet tölt be a T-sejt aktivációs folyamatokban. Az F069-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalban a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel hamarabb érte el maximumát, így kinetikája is eltért a többi sejtvonaltól. A Y126 mutációja a Y315 mutációjához hasonló részleges  $\text{Ca}^{2+}$ -jel csökkenéshez vezetett, így feltételezzük, hogy a Y126 hasonló aktivációs/szabályozó szerepet tölt be az interdomén A-ban, mint a Y315 az interdomén B-ben. A 178-as pozícióban létrehozott Y-F aminosavcsere nem befolyásolta jelentősen az anti-CD3 indukálta  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet [22. *ábra*].

Annak kizárására, hogy a pontmutációk befolyásolják a sejtek CD3 expresszióját, sejtfelszíni jelöléseket végeztünk anti-CD3 antitesttel, mely során nem találtunk különbséget a különböző sejtek CD3 expressziójában.

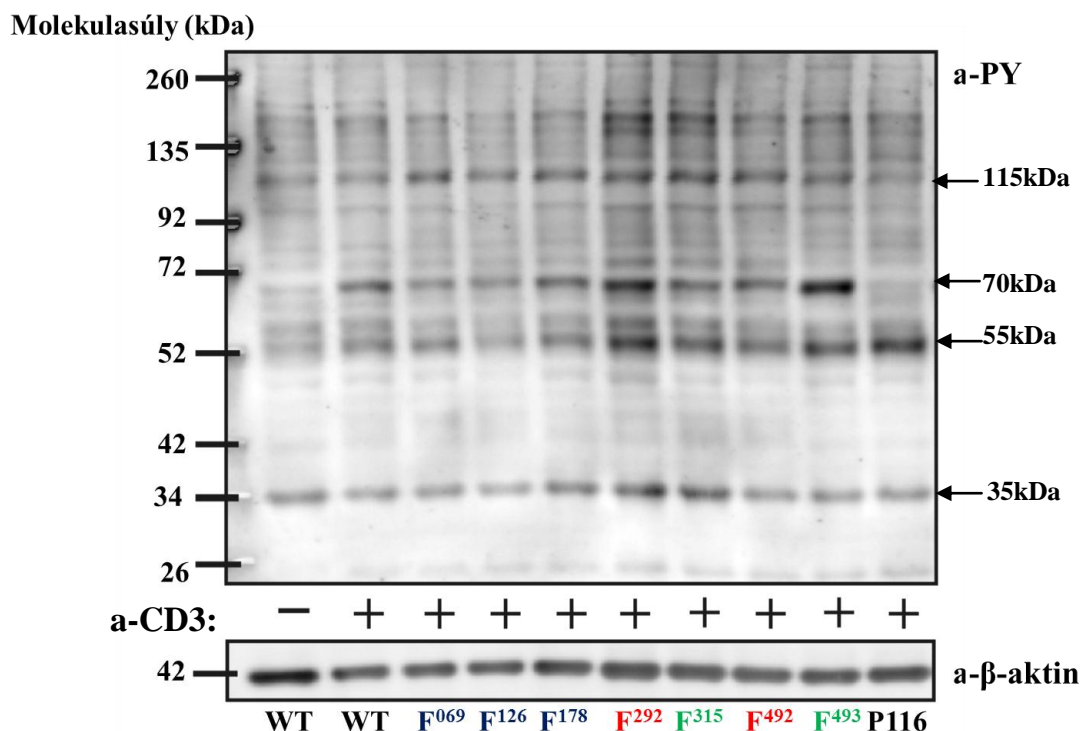


**22. ábra:** A Y-F aminosavcsere hatásai az anti-CD3 indukálta intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulására. A sejteket Fluo-3AM indikátorral töltöttük fel és áramlási citometriás mérések során vizsgáltuk az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel változásait. Az FL1 intenzitás változásokat (arányos a szabad intracelluláris  $Ca^{2+}$  szinttel) az idő függvényében ábrázoltuk. A pontmutáns sejtekben kialakuló  $Ca^{2+}$ -jelet a WT-ZAP-70-et expresszáló (kontroll) sejtekéhez viszonyítottuk, a szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) magasabb (\*) vagy alacsonyabb (†) értékeket jelöltük. Az átlag  $\pm$  SEM értékeket 3 független mérés eredményéből számítottuk. A fekete nyilak azt az időpontot jelzik, amikor az anti-CD3-at hozzáadtuk a sejtekhez (50 sec), a mérést ezt követően további 4 percig folytattuk.

### 5.2.2 A ZAP-70 kináz Y aminosav maradékainak pontmutációi megváltoztatják az anti-CD3 indukálta tirozin foszforiláció mintázatát és a ZAP-70 autoregulációját

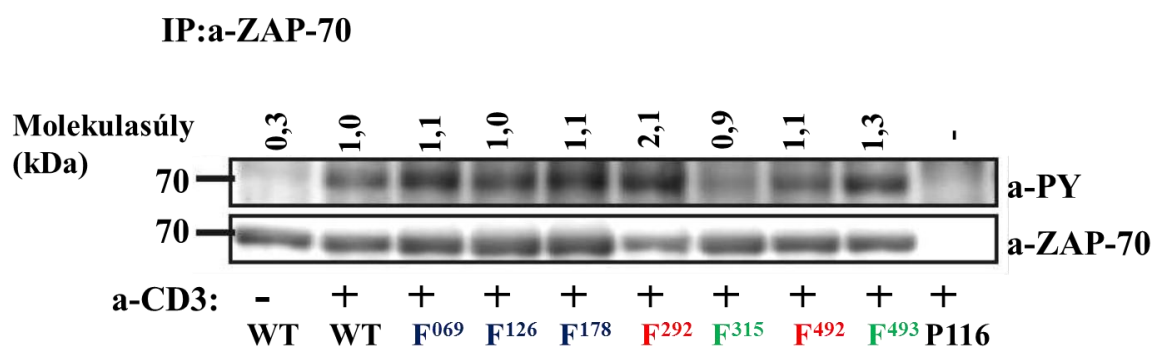
Western bloton először azt vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 pontmutációi hogyan befolyásolják a sejtvonalak anti-CD3 indukálta tirozin foszforiláció mintázatát. A 35, 55, 70 (feltehetően a ZAP-70) és a 115 kDa molekulásúlynak megfelelő fehérjékben jelentős

foszforiláció különbségeket találtunk [23. *ábrán nyilakkal jelölve*]. A F292-ZAP-70-et expresszáló sejtvonal lizátuma hiperfoszforilációt mutatott a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekhez viszonyítva. Ahogy vártuk, a ZAP-70 deficiens P116 sejtek nem aktiválódtak anti-CD3 kezelés hatására. Az F493-ZAP-70-et expresszáló sejtvonal 70 kDa-os csíkja (feltehetően a ZAP-70 kináz) anti-CD3 kezelés hatására fokozottan foszforilálódott [23. *ábra*].



**23. ábra:** Az anti-CD3 indukálta tirozín foszforiláció mintázatának változásai ZAP-70 Y-F pontmutáns sejtekben. A sejtek lizátumát 10%-os SDS-PAGE-n választottuk el, majd blotolást követően anti-foszfortirozín antitesttel végeztük az előhívást (felső panel). Töltési kontroll vizsgálathoz anti-β-aktin antitestet használtunk (alsó panel).

Annak megerősítésére, hogy a lizátumon látott 70kDa molekulásúlyú csík valóban a ZAP-70-nek felel meg, immunprecipitációt végeztünk anti-ZAP-70 antitesttel [24. *ábra*]. Anti-CD3 kezelést követően az F292 és F493-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalak mutattak növekedett ZAP-70 foszforilációt a WT-ZAP-70-et expresszáló mintákhoz viszonyítva. A Y-F aminosav csere a 315-ös pozícióban a kináz csökkent foszforilációját eredményezte [24. *ábra*]. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a ZAP-70 specifikus Y maradékainak mutációi befolyásolják a kináz autofoszforilációját (autoregulációját) is.



**24. ábra:** A ZAP-70 Y-F pontmutációjának hatása a kináz anti-CD3 indukálta tirozin foszforilációra. Az ábrán egy reprezentatív blot és annak denzitometriás eredménye látható. A blotokat anti-foszfortirozin (felső panel) majd strippinget követően anti-ZAP-70 (alsó panel) antitestekkel hívtuk elő. A számok a relatív foszforiláció változásokat jelzik a WT, anti-CD3 aktivált mintához viszonyítva.

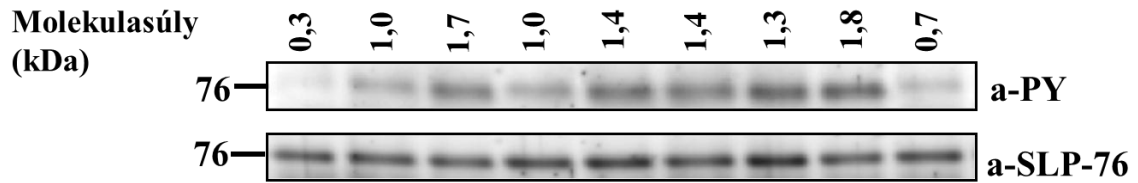
### 5.2.3 Az SLP-76 és a LAT foszforilációját a ZAP-70 specifikus Y aminosav maradékai szabályozzák

Az SLP-76 és a LAT a ZAP-70 szubsztrátjai, amik fontos szerepet játszanak a PLC $\gamma$  aktivációjában és így az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-jel szabályozásában [27-29]. Ezért immunprecipitációt követően Western bloton vizsgáltuk ezen két fehérje foszforilációját.

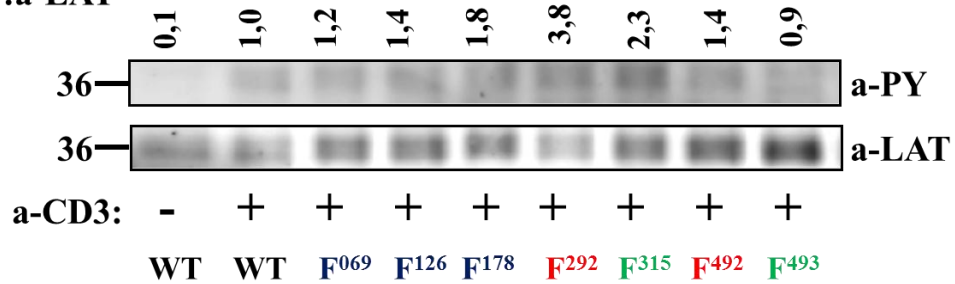
Aktivációt követően az SLP-76 hiperfoszforilációját találtuk a F069-, F178-, F292-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben WT-ZAP-70-et expresszáló mintához viszonyítva. A Y-F aminosav csere a ZAP-70 493-as pozíciójában gátolta az SLP-76 foszforilációját [25. *ábra A*].

A LAT esetében a ZAP-70 Y292 és Y315 mutációja emelkedett, míg a Y493-é csökkent foszforilációt eredményezett anti-CD3 kezelést követően a WT aktivált mintához viszonyítva [25. *ábra B*].

## A IP:a-SLP-76



## B IP:a-LAT

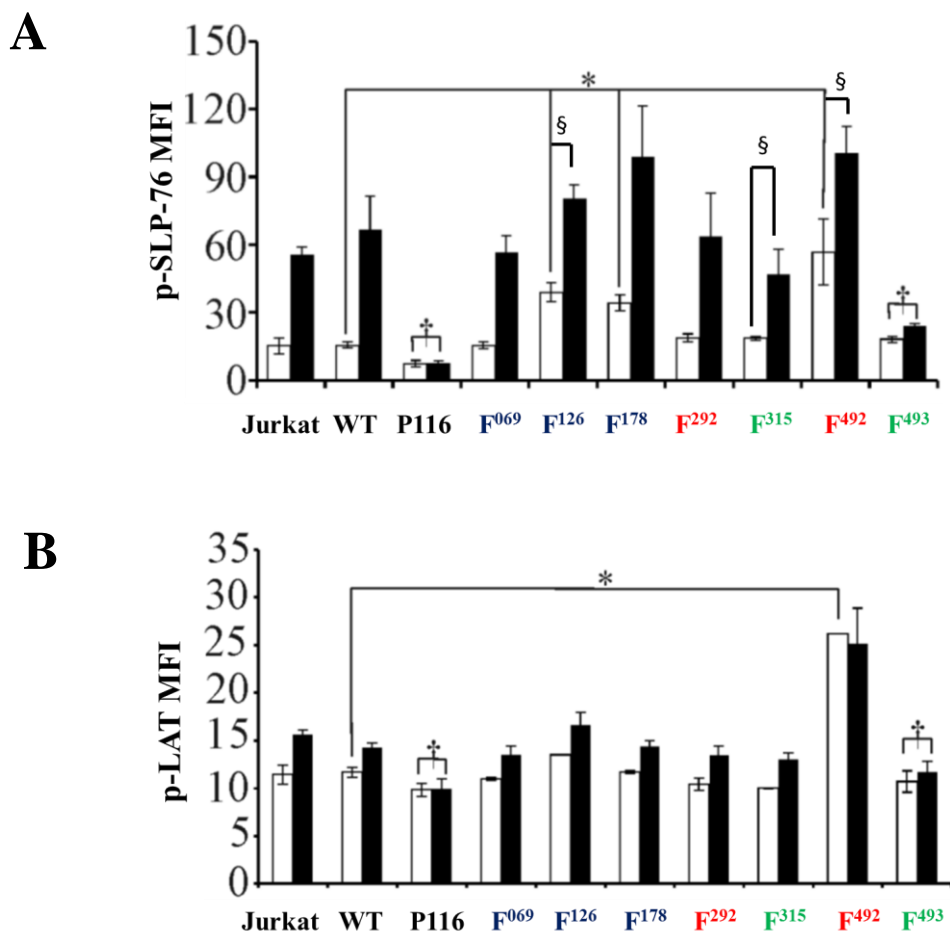


**25. ábra: A ZAP-70 Y-F pontmutációinak hatása az SLP-76 (A) és LAT (B) anti-CD3 indukálta tirozin foszforilációjára.** Az ábrán reprezentatív blotok és azok denzitometriás eredményei láthatók. A blotokat anti-foszfortirozin (felső panelek), majd strippinget követően anti-SLP-76 (A) és anti-LAT (B) antitestekkel hívtuk elő (alsó panelek). A számok a relatív foszforiláció változásokat jelzik a WT, anti-CD3 aktivált mintához viszonyítva.

A Foszfo-Flow módszer segítségével a foszforilációs események még pontosabban, Y specifikus módon vizsgálhatók. Foszfo-specifikus antitestek segítségével elemeztük az SLP-76 Y128 és a LAT Y171 foszforilációját mind nyugvó, mind anti-CD3 aktivált pontmutáns sejtekben. Szignifikánsan csökkent SLP-76 Y128 foszforilációt mértünk az anti-CD3 stimulált F493-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalban a WT-ZAP-70-transzfectált P116 sejtekhez viszonyítva [26. ábra A]. Ez összhangban volt az immunprecipitációs kísérletek eredményével és arra utal, hogy az SLP-76 Y128 tirozinjának foszforilációja a ZAP-70 Y493 foszforilációjától függ. Jelentős SLP-76 Y128 foszforiláció csökkenést kaptunk anti-CD3 kezelést követően az F126-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben (MFI változás:  $2.1 \pm 0.1$ ,  $2.5 \pm 0.6$  és  $1.3 \pm 0.1$ ) a WT-ZAP-70 transzfectált sejtekhez viszonyítva (MFI változás:  $4.5 \pm 1.31$ ) [26. ábra A].

A Y-F aminosavcsere az SLP-76 Y128 nyugalmi hiperfoszforilációjához vezetett az F126, F178- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ami arra utalhat, hogy a ZAP-70 ezen tirozin maradékai gátló szerepet tölthetnek be a kináz foszforilációs állapotának szabályozásában [26. ábra A].

A Y-F aminosavcsere a kináz 492-es pozíciójában a LAT-Y171 hiperfoszforilációjához vezetett nyugvó sejtekben. Az immunprecipitációs eredményekhez hasonlóan a LAT Y171 anti-CD3 indukálta foszforilációját a ZAP-70 Y493 pontmutációja gátolta [26. ábra B].



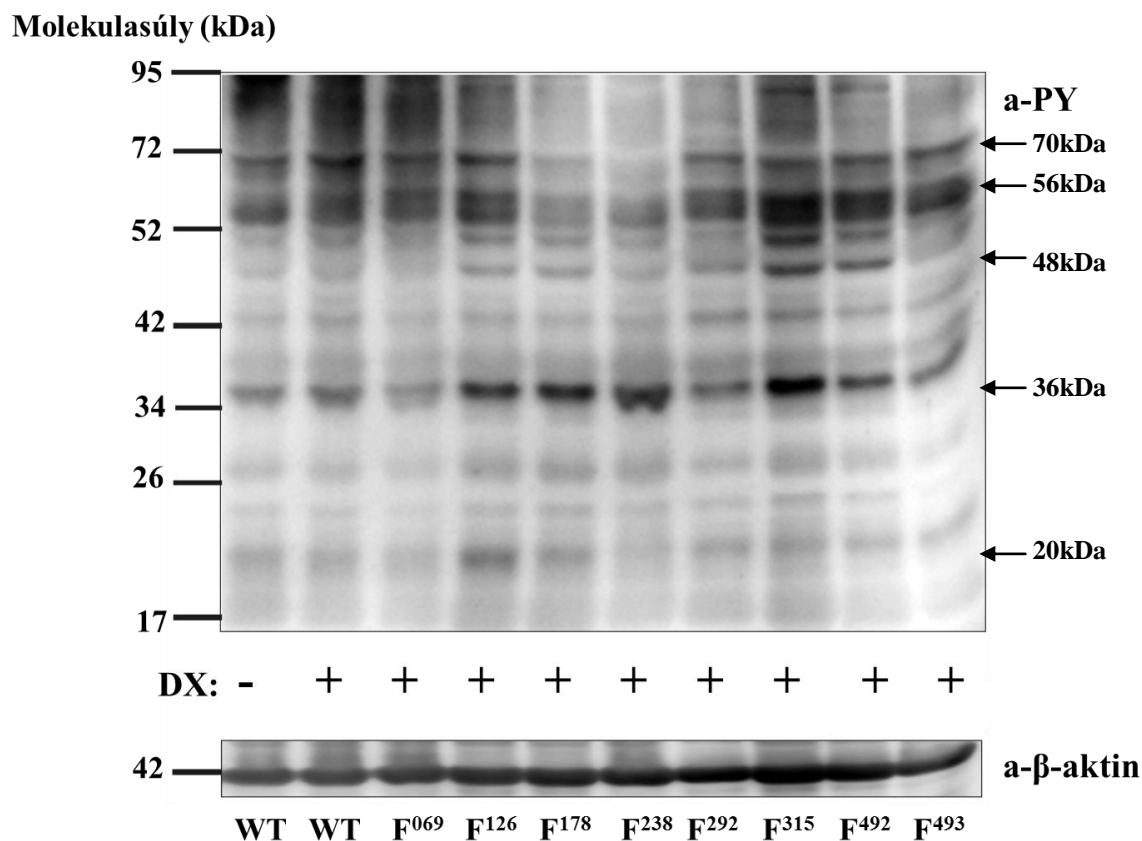
26. ábra: Az SLP-76 és LAT molekulák Y-specifikus foszforiláció változásainak vizsgálata Foszfó-Flow technikával WT és Y-F pontmutáns ZAP-70-et expresszáló P116 sejtekben. Áramlási citometriás méréseket követően az SLP-76 Y128 (A) és a LAT Y171 (B) foszforiláció változásainak MFI értékeit ábrázoltuk nyugvó (fehér oszlop) és aktivált (fekete oszlop) sejtekben. Az oszlopok 3 független mérés átlagát és a  $\pm$  SEM értékeket ábrázolják. A WT mintákhoz viszonyított szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) magasabb értékeket jelöltük (\*). Az anti-CD3-indukált SLP-76 Y128 és LAT Y171 foszforiláció teljesen hiányzott a P116 és F493-ZAP-70 sejtekben (†). Csökkent anti-CD3 indukált SLP-76 Y128 foszforilációt találtunk az F126-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalakban (§).

## **5.3 A nem-genomikus glükokortikoid (GC) hatások vizsgálata a Y-F pontmutáns ZAP-70-et expresszáló sejtvonalakban**

### **5.3.1 A ZAP-70 kináz tirozinjainak pontmutációja megváltoztatja a DX indukálta foszforiláció mintázatot**

Korábbi eredményeink szerint rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés hatására számos jelátviteli molekula mutat emelkedett foszforilációt Jurkat sejtekben [115]. Jelen kísérleteinkben Western bloton vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 kinázban létrehozott Y-F aminosavcsere hogyan változtatja meg 2 perces DX kezelést követően az egyes sejtvonalak foszforiláció mintázatát. Ahogy az a **27. ábrán** látható, az F069-, F126-, F178- és F238-ZAP-70-et expresszáló sejtek csak mérsékelt foszforiláció emelkedést mutattak DX kezelés hatására és a foszforiláció mintázat molekulasúly szerinti eloszlása is eltérő az egyes sejtvonalakban. A 315 és 492 pozíciókban létrehozott aminosavcsere általános hiperfoszforilációt eredményezett a WT-ZAP-70-et expresszáló DX kezelt sejtekhez viszonyítva. A 20, 36, 48, 56 és 70 kDa (feltehetően a ZAP-70) molekulasúlynak megfelelő fehérjék jelentős foszforiláció különbségeket mutattak [**a 27. ábrán nyilakkal jeleztük**].



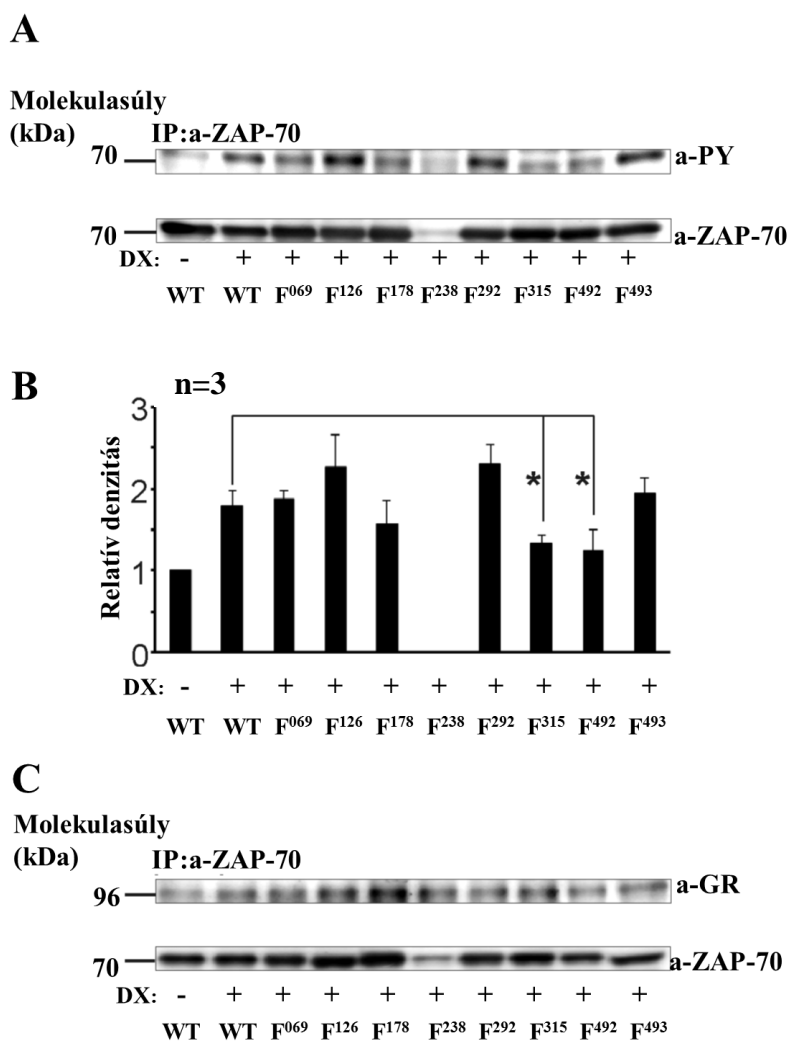


**27. ábra:** Két perces nagy dózisú DX indukálta tirozin-foszforiláció mintázat változásai ZAP-70 Y-F pontmutáns sejtekben. A sejtek lizátumát 10%-os SDS-PAGE-n választottuk el, majd blotolást követően anti-foszfortirozin antitesttel végeztük az előhívást (felső panel). Töltési kontrollként anti-β-aktin antitestet használtunk (alsó panel).

### 5.3.2 A ZAP-70 kináz Y315 és Y492 maradékai vesznek részt a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában

Korábbi eredményeink szerint 2 perces, nagy dózisú DX kezelés a ZAP-70 kináz foszforilációjához és GR asszociációjához vezet [115, 116]. Jelen kísérleteinkben anti-ZAP-70 antitesttel végzett immunprecipitációt követően azt vizsgáltuk, hogy a kináz egyes tirozinjainak pontmutációja befolyásolja-e a GC-analóg kiváltotta foszforilációt és a ZAP-70-GR asszociációt. A WT DX kezelt mintához viszonyítva, szignifikáns foszforiláció csökkenést kaptunk azokban a sejtvonalakban, amelyekben az aminosavcsere a 315 és 492 pozíciókban történt, így feltételezzük, hogy a nem-genomikus glükokortikoid hatások közvetítésében a ZAP-70 ezen két tirozin maradéka vesz részt [28. ábra A és B]. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a fent leírt foszforiláció változások megváltoztatják-e a

ZAP-70-GR ko-precipitációt. Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés a WT és valamennyi pontmutáns sejtvonalban növekedett ZAP-70-GR asszociációt eredményezett [27. *ábra C*]. Az F315 és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a 2 perces DX kezeléskor kapott csökkent tirozin foszforiláció ellenére nem változott meg a ZAP-70-GR asszociáció, ami arra utal, hogy a Y maradékok nem vesznek részt direkt módon a 2 molekula fizikai kapcsolatának szabályozásában [28. *ábra C*].



**28. ábra: Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés indukálta ZAP-70 foszforiláció és GR asszociáció a pontmutáns sejtekben.** **A.** Anti-ZAP-70-el végzett immunprecipitációt követően a Western blotot anti-foszfortirozin (felső panel), majd anti-ZAP-70 (alsó panel) antitestekkel hívtuk elő. **B.** A diagram a ZAP-70 kináz relatív foszforiláció változásait mutatja. Az átlag  $\pm$  SEM értékeket 3 független blot denzitometriás eredményéből számítottuk, a szignifikáns ( $P \leq 0,05$ ) változást jelöltük (\*). **C.** A Western blotok a ZAP-70-GR ko-precipitáció eredményeit mutatják pontmutáns sejtekben. ZAP-70 precipitációt

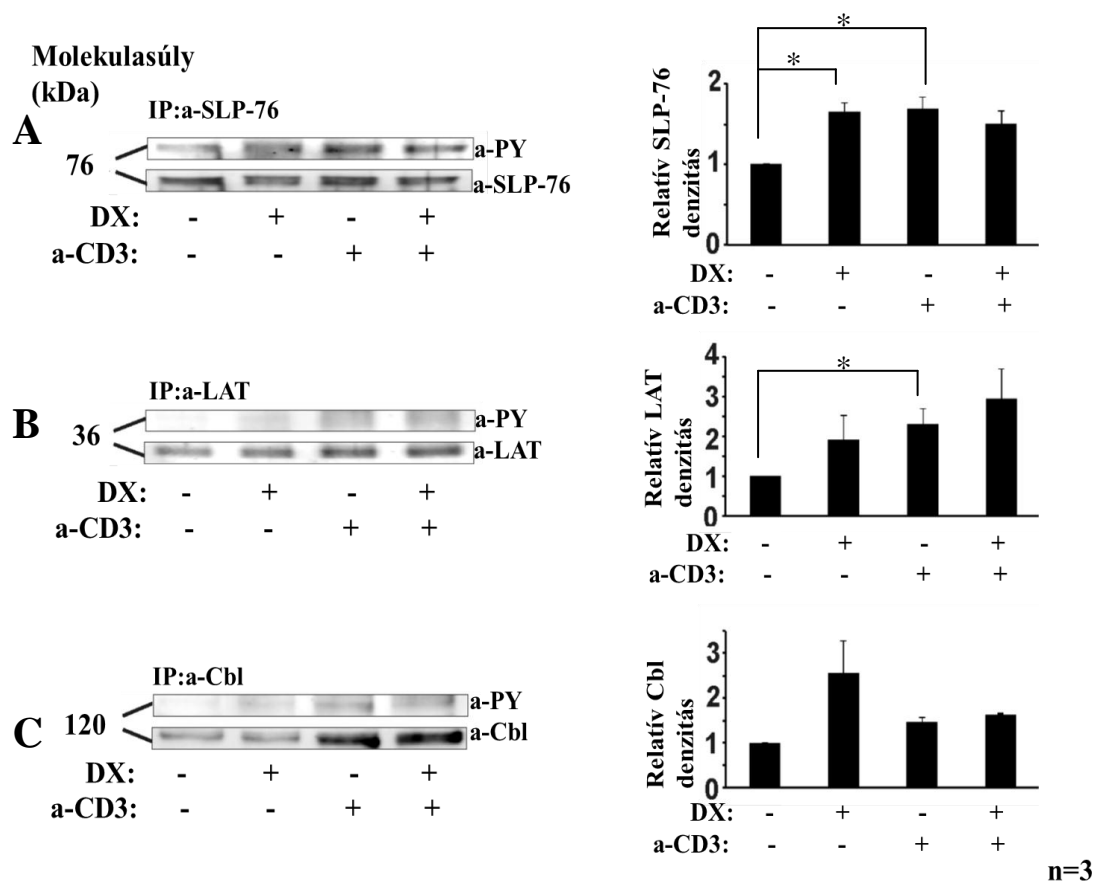
követően a blotot anti-GR (felső panel), majd anti-ZAP-70 (alsó panel) antitesttel hívtuk elő.

### **5.3.3 Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatásai a TcR/CD3 jelátviteli utakra**

A sejtek lizátumából készített Western blotokon látható, hogy a ZAP-70 kináz mellett további molekulák foszforilációja is megváltozik rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatására. A T-sejt aktiváció során a ZAP-70 szubsztrátjai az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulák, ezért WT-ZAP-70-et expresszáló P116 sejtekben tovább vizsgáltuk, hogy ezen molekulák foszforilációja megváltozik-e 2 perces DX kezelés hatására. Ahogy az a **29. ábrán** látható, a DX kezelés önmagában megnövelte az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációját is [**29. ábra A, B és C**].

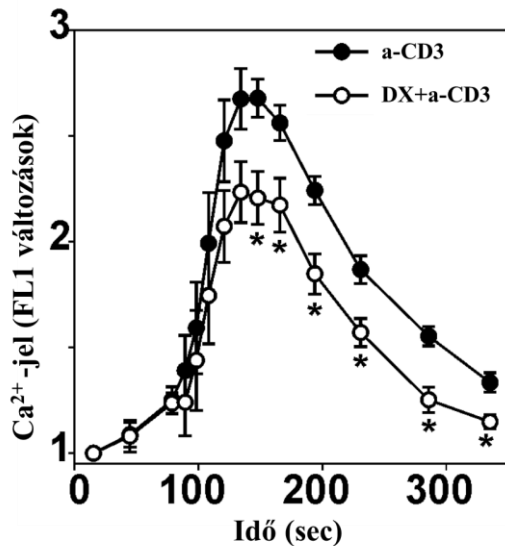
Klinikai szempontból a TcR/CD3 és a nem-genomikus GC hatások által kiváltott jelátviteli utak kapcsolódási pontjai különösen fontosak, mivel feltételezhetően ezen mechanizmusok állnak az immunszuppresszív hatások kialakításának hátterében. Ennek modellezésére kombinált kezelést (DX+anti-CD3) alkalmaztunk. A kísérleteink során használt DX koncentráció megfelel a klinikumban alkalmazott nagy dózisú szteroid kezelésnek [93,94,97]. Korábbi eredményeink szerint ez a kombinált kezelés a ZAP-70 hiperfoszforilációjához vezetett, akár a csak DX-al vagy a csak anti-CD3-mal kezelt mintákhoz viszonyítottuk a foszforilációt [115].

Jelen eredményeink szerint a DX kezelés részben gátolta az SLP-76 anti-CD3 indukálta foszforiláció növekedését [**29. ábra A**]. A LAT esetében a kombinált kezelés nagyobb mértékű tirozin foszforilációt eredményezett, mint akár a DX vagy az anti-CD3 kezelések önmagában [**29. ábra B**]. A Cbl anti-CD3 és kombinált kezelések hatására is foszforilálódott, de ennek mértéke nem érte el azt a tirozin foszforiláció növekedést, amit a DX önmagában okozott [**29. ábra C**].



**29. ábra: Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatása TcR/CD3 jelátviteli utakra.** Az ábrán az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforiláció változásai láthatók DX, anti-CD3 és kombinált (DX+ anti-CD3) kezelés hatására P116 WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekben. A sejteket DX-al és/vagy anti-CD3-mal kezeltük, a kontroll minták esetében a sejteket kezeletlenül hagytuk. Anti-SLP-76 (A), anti-LAT (B) vagy anti-Cbl (C) antitestekkel immunprecipitációt végeztünk. A blotokat anti-foszfortirozin (felső panelek), majd strippinget követően anti-SLP-76, anti-LAT és anti-Cbl (alsó panelek) antitestekkel hívtuk elő. A diagramok a megfelelő molekulák relatív foszforiláció változásait mutatják három független kísérlet denzitometriás eredményei alapján. Az oszlopokon az átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltuk, a szignifikáns ( $P \leq 0,05$ ) változásokat jelöltük (\*).

Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulása a T-sejt aktiváció további fontos eseménye. Kísérleteink során megvizsgáltuk azt is, hogy rövid idejű (10 perces) DX előkezelés hogyan befolyásolja az anti-CD3 kiváltotta  $Ca^{2+}$ -jelet.  $10^{-5}$ M DX kezelés az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint szignifikáns csökkenéséhez vezetett a csak anti-CD3-mal kezelt mintához viszonyítva [30. ábra].



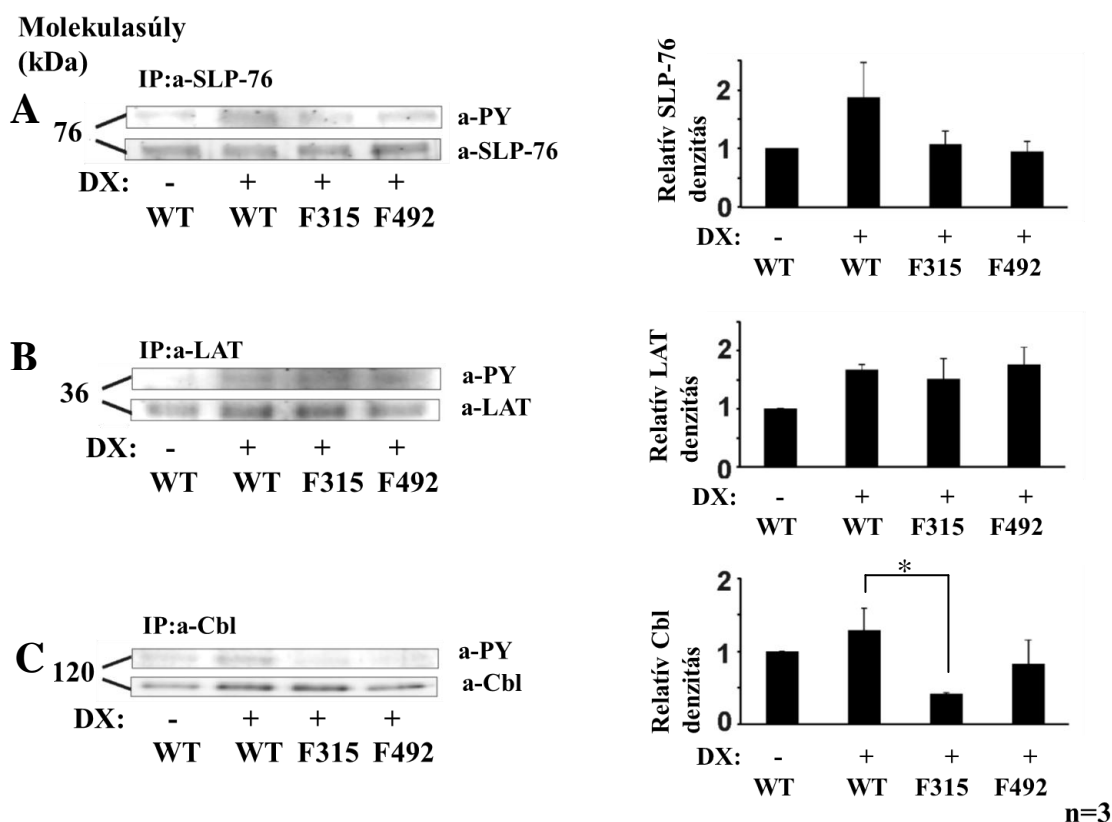
**30. ábra:** Az anti-CD3 indukálta  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását a DX részlegesen gátolja Jurkat sejtekben. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jelben bekövetkező változások vizsgálatához a sejteket Fluo-3AM indikátorral töltöttük föl, majd áramlási citometriás méréseket végeztünk. Az FL-1 intenzitásban bekövetkező változást (arányos az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jellel, y-tengely) az idő függvényében vizsgáltuk (x-tengely).

A 10 percig DX-al előkezelt, majd anti-CD3 által aktivált mintákban kialakuló  $Ca^{2+}$ -jelet (üres pont) a csak anti-CD3-mal kezelt mintákhoz viszonyítottuk (fekete pontok). 50 másodpercig mértük az alap  $Ca^{2+}$  szintet, majd hozzáadtuk az anti-CD3-at a mintákhoz, és további 5 percig folytattuk a mérést. A diagram 5 független mérés eredményének átlagát és a  $\pm$ SEM értékeket mutatja. A szignifikáns ( $P \leq 0,05$ ) különbségeket jelöltük (\*).

### 5.3.4 A ZAP-70 Y-F pontmutációja a 315 és 492 pozíciókban meggátolja a rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés indukálta SLP-76 és Cbl foszforilációt

Ahogy az 5.3.2 fejezetben bemutattuk, a ZAP-70 315 és 492 tirozinjai vesznek részt a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában. Megállapítottuk továbbá, hogy az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulák a ZAP-70 célmolekulái lehetnek a nem-genomikus glükokortikoid jelátvitelben. Annak megerősítésére, hogy a ZAP-70 315 és 492 tirozinjai valóban részt vesznek a nem-genomikus glükokortikoid hatások továbbításában, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, LAT és Cbl foszforilációját 2 perces DX kezelést követően. A WT kontroll, valamint DX kezelt WT-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtek lizátumából immunprecipitációt végeztünk, majd a foszforiláció változásokat Western bloton vizsgáltuk. A Y-F aminosavcsere a ZAP-70 315 és 492 pozíciójában gátolta az SLP-76 és a Cbl DX indukálta foszforilációját. A

LAT esetében egyik pontmutáció sem befolyásolta a DX indukálta foszforiláció növekedést [31. ábra].



**31. ábra:** A ZAP-70 Y315 és Y492 pontmutációi befolyásolják az SLP-76 és Cbl DX indukálta foszforiláció növekedést. Kezeletlen WT-, valamint DX kezelt WT-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtek lizátumából immunprecipitációt végeztünk anti-SLP-76 (A), anti-LAT (B) és anti-Cbl (C) antitestekkel. A blotokat anti-foszfortirozin (felső panelek), majd strippinget követően anti-SLP-76, anti-LAT vagy anti-Cbl (alsó panelek) antitestekkel hívtuk elő. A diagramok a megfelelő molekulák relatív foszforiláció változásait mutatják három független kísérlet denzitometriás eredményei alapján. Az oszlopokon az átlag ± SEM értékeket ábrázoltuk, a szignifikáns ( $P \leq 0,05$ ) változásokat jelöltük (\*).

## 6 . Az új eredmények összefoglalása

1. Létrehoztunk folyamatos, humán T-sejtes leukémia alapú, stabil transzgénikus sejtvonalatokat, melyekben a ZAP-70 nyolc (069, 126, 178, 238, 292, 315, 492, 493) tirozinjának funkcióját külön-külön vizsgálhattuk, különös tekintettel a még ismeretlen funkciójú (069,126, 178 és 238) tirozinokra.
2. A ZAP-70 Y069 gátló, a Y126 aktivációs, míg a Y178 részben gátló szerepet tölt be a T-sejt aktivációs folyamatokban.
3. Eredményeink szerint a ZAP-70 Y292 és Y492 a kináz negatív autoregulációjában vesz részt, míg a Y315 pozitív autoregulációs hely.
4. A Y-F aminosavcsere a ZAP-70 Y126 és Y178 pozíciókban az SLP-76 Y128; a Y492 pozícióban pedig mind az SLP-76 Y128, mind a LAT Y171 nyugalmi hiperfoszforilációjához vezetett.
5. Kísérleteink alapján a ZAP-70 az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását elsősorban az SLP-76-on, nem a LAT-on keresztül szabályozza.
6. A ZAP-70 Y315 és Y492 vesznek részt a nem-genomikus GC hatások közvetítésében.
7. Mind a LAT, az SLP-76 és a Cbl részt vesznek a nem-genomikus GC jelátviteli folyamatokban, de a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik, nem a LAT.
8. A DX az anti-CD3 indukálta T-sejt aktivációban, a ZAP-70 kinázban megfigyelt változásokhoz hasonlóan, a LAT és a Cbl tirozin foszforilációját tovább növelte. Az SLP-76 aktiváció indukálta foszforilációját és az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását a DX részben gátolta.

## 7. Összefoglalás, megbeszélés

### 7.1 A ZAP-70 kináz tirozinjainak funkcionális jellemzése a TcR/CD3 jelátviteli út szabályozásában

A TcR/CD3 jelátviteli útvonal részleteinek felderítésére intenzív kutatások folytak az elmúlt 20 évben. Miután sikerült a legfontosabb jelátviteli molekulákat azonosítani, egyre több olyan mutáns - általában Jurkat sejtek mutagenéziséből származó - T-sejt vonal vált elérhetővé, amelyekben valamelyik molekula hiányzik, például az Lck deficiens JCaM1A, a ZAP-70 deficiens P116, a LAT deficiens JCaM2.5 vagy az SLP-76 deficiens J14 sejt vonalak.

A ZAP-70 kináz szükséges a teljes TcR/CD3 jelátviteli kaszkád kialakításához. A ZAP-70 deficiens P116 sejtekben a T-sejt jelátvitel, a ZAP-70 deficiens egerekben a T-sejt jelátvitel és a T-sejt fejlődés is súlyos zavart szenved. Emberben a ZAP-70 hiánya vagy defektusa SCID fenotípushoz vezet [44,61,62,63,124]. A kinázok funkcióját foszforilációs események szabályozzák, így az egyes foszforilációs helyek vizsgálata, pl. pontmutáns sejt vonalakban, különösen értékes információt nyújthat a jelátviteli folyamatok finom szabályozásának megértéséhez. A ZAP-70 esetében a pontmutációs vizsgálatok azért különösen fontosak, mert a kinázban bekövetkező finom genetikai változások egérben reumatoid artritisz-szerű betegséghez vezetnek [64]. Ezért jelen munkánkban a ZAP-70 kinázban található 7 Y maradék pontosabb szerepét vizsgáltuk a TcR/CD3 illetve a nem-genomikus GC jelátviteli utakban, Y-F pontmutáns konstrukciókat expresszáló sejt vonalak felhasználásával.

Mivel a ZAP-70 Y292, Y315, Y492 és Y493 tirozinjainak szerepét már korábbi vizsgálatokban jellemezték, ezek kontrollként is szolgáltak jelen kísérleteinkben [44]. A Y292 és Y492 gátló, míg a Y315 és Y493 aktivációs szerepet tölt be a TcR/CD3 jelátvitelben [46,54,55]. Eredményeink összhangban voltak a korábban megfigyeltekkel, miszerint a Y292 és Y492 mutációja emelkedett, míg a Y315 és Y493 aminosavak cseréje pedig csökkent anti-CD3 indukálta  $Ca^{2+}$ -jelet eredményezett a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekhez viszonyítva. Ezek a méréseink megerősítették, hogy a kísérleti rendszerünk megbízhatóan működik.

Az előzőekkel szemben viszonylag keveset tudunk a ZAP-70 SH2 doménjeiben valamint az interdomén A-ban található tirozinok szerepéről. Annak ellenére, hogy Watts



és munkatársai 1994-ben tömegspektrometriás kísérleteik során 3 tirozin maradékot azonosítottak ebben a régióban, sem sejtvonalakban, sem egerekben nem történtek vizsgálatok ezen tirozinok funkciójának pontosabb megismerésére [45]. A Y238-ról szekvencia analízisünk során derült ki, hogy egy potenciális ITIM, azaz gátló foszforilációs motívum tagja lehet. Ezért különösen fontosnak tartottuk a ZAP-70 Y069, Y126, Y178 és Y238 szerepének tisztázását a TcR/CD3 jelátviteli folyamatokban. Habár Watts és munkatársainak eredményei szerint a Y069, Y126 és Y178 nem foszforilálódik anti-CD3 kezelés hatására, az Lck indukálhatja foszforilációjukat, a Y126 pedig a kináz autofoszforilációjában is szerepet játszhat [45]. A Y-F aminosavcsere a 069 és 126 pozícióban ellentétes hatást eredményezett az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában, az előző növelte, míg az utóbbi csökkentette a  $Ca^{2+}$  szintet a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekhez viszonyítva [22. *ábra*, 3. *táblázat*]. A Y-F pontmutáció a 178-as pozícióban nem befolyásolta jelentősen az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását [22. *ábra*, 3. *táblázat*]. A Y069 maradék a ZAP-70 N-terminális SH2 doménjében található, így a TcR/CD3 jelátvitel során szerepet játszhat az aktivált ZAP-70 kináz és a CD3 molekula  $\zeta$  láncai közötti kapcsolat kialakításában (szerkezeti magyarázat), vagy befolyásolhatja a molekula kináz aktivitását (funkcionális magyarázat). Ennek pontos megismeréséhez még további vizsgálatok szükségesek. A Y126 mutációja az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel csökkenéséhez vezetett, hasonlóan, mint ahogy azt a Y315 mutációjának esetében tapasztaltuk [22. *ábra*, 3. *táblázat*]. Ezen analógia alapján feltételezzük, hogy a Y126 az interdomén A-ban hasonló pozitív szabályozó szerepet tölthet be, mint a Y315 az interdomén B-ben. A ZAP-70 Y126 mutációja az SLP-76 Y128 nyugalmi hiperfoszforilációját eredményezte [26. *ábra*, 3. *táblázat*], tehát szerepet játszhat az anti-CD3 indukálta csökkent  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában.

Munkánk során vizsgáltuk azt is, hogy a ZAP-70 egyes Y maradékai milyen szerepet töltenek be az SLP-76 és a LAT adapter molekulák közvetítette  $Ca^{2+}$ -jel szabályozásában a TcR/CD3 jelátvitelben. T-sejtekben az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításához nélkülözhetetlen a PLC $\gamma$  aktivációja. Az SLP-76 és LAT adapter fehérjék a PLC $\gamma$  fő aktiválói, kapcsolatot képeznek a ZAP-70 és a PLC $\gamma$  között [28,30,32]. Korábbi adatok azt mutatták, hogy a PLC $\gamma$  aktivációja a LAT és az SLP-76 aktivációjától függ [125]. Jelen kísérleteinkben ezt a két párhuzamosan futó útvonalat részletesen vizsgáltuk. A ZAP-70 általunk vizsgált Y-F pontmutációinak többsége anti-CD3 kezelést követően az SLP-76 emelkedett foszforilációjához vezetett a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekhez viszonyítva. Kivételt képez az aktivációs Y493, aminek mutációja - nem meglepő módon - az SLP-76

foszforiláció csökkenéséhez vezetett, valamint a Y-F aminosavcsere a 126-os pozícióban, ami az SLP-76 foszforilációját nem befolyásolta [25. *ábra*, 3. *táblázat*]. A ZAP-70 Y126, Y178 és Y492 szabályozza továbbá az SLP-76 Y128 alap foszforilációját is [26. *ábra A*, 3. *táblázat*]. A T-sejt aktiváció során a foszforilált SLP-76 Y128-hoz kapcsolódnak az Nck, PAK1 és WASP molekulák, melyek asszociációja a citoszkeleton újraszerveződéséhez vezet. Így a ZAP-70 az SLP-76 molekulán keresztül közvetve részt vehet citoskeletális folyamatok szabályozásában is [66].

Csökkent LAT foszforilációt találtunk az F493-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, míg az F292- és F315-ZAP-70-et expresszálóokban emelkedett volt a LAT foszforiláció anti-CD3 kezelést követően [25. *ábra B*, 3. *táblázat*]. A ZAP-70 gátló Y492 mutációja a LAT Y171 emelkedett alapfoszforilációjához vezetett [26. *ábra B*, 3. *táblázat*]. A LAT Y171 foszforilációja a PI3-K és a PLC $\gamma$  kötődéséhez szükséges [72]. Mivel a ZAP-70 pontmutáns sejtek a LAT foszforilációját kevésbé befolyásolták, így feltételezzük, hogy a ZAP-70 az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-jel kialakulását elsősorban az SLP-76-on keresztül szabályozza [25., 26. *ábra*, 3. *táblázat*].

A ZAP-70 Y315 eredményeink szerint befolyásolja mind az SLP-76 és a LAT foszforilációját (mindkét molekula hiperfoszforilációjához vezet [25. *ábra*, 3. *táblázat*]). Korábbi kísérletekben Bridicka és munkatársai a ZAP-70 Y315 és Y319 kettős YYFF mutációját hozták létre, és ezekben a sejtekben mindkét adapter molekula foszforilációja csökkent, aktivációt követően [126]. Ezek alapján feltételezzük, hogy a Y319 fontosabb szerepet játszhat a LAT és SLP-76 szabályozásában, míg a Y315 inkább a kináz autoregulációjában tölthet be jelentős funkciót. A Y315 és Y319 foszforilációja szerkezeti átrendeződéshez, úgynevezett „autoinhibitory switch”-hez is vezethet a kinázban, amely során a ZAP-70 kináz doménjének aktivációs hurka könnyebben hozzáférhetővé válik, elősegítve ezzel a Y493 foszforilációt és a molekula aktivációját [126]. Jelen adatok arra utalnak, hogy a ZAP-70 315Y-F pontmutációja csak részben gátolhatja ezt a molekuláris átalakulást, mivel mind a LAT, mind az SLP-76 foszforilálódik a sejtvonalban [25. *ábra*, 3. *táblázat*].

A ZAP-70 493-as pozíciójában végrehajtott Y-F aminosavcsere a korai jelátviteli folyamatok súlyos defektusához vezet, hasonlóan ahhoz, mint amit P116 sejtekben megfigyeltek. Ezért a Y493 foszforilációja különösen fontos szerepet játszik a T-sejt aktiváció downstream lépéseinek beindításában. A 493-as tirozin maradék hiánya, vagy defektusa a T-sejt aktiváció funkcionális blokkjához vezet [3. *táblázat*], ahogy azt korábbi kísérletek is igazolták [47,127]. Az F493-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a kináz

hiperfoszforilációját figyeltük meg, feltehetően más tirozin maradék(ok) hiperfoszforilációjának következtében, ami azt mutatja, hogy a ZAP-70 Y493-nak fontos negatív autoregulációs szerepe is lehet [24. ábra, 3. táblázat].

Eredményeink szerint nem a Y493 az egyetlen tirozin maradék, ami részt vehet a ZAP-70 autoregulációjában. A ZAP-70 anti-CD3 kezelés hatására bekövetkező autofoszforilációja információt adhat az egyes tirozin maradékok autoregulációban betöltött funkciójáról: a ZAP-70 növekedett foszforilációja egy pontmutáns sejtben az adott tirozin maradék negatív, míg csökkent foszforilációja pozitív autoregulációs szerepére utal. Ezek alapján a ZAP-70 Y493 mellett a Y292 is negatív autoregulációs funkcióval rendelkezik, mivel mutációjakor a ZAP-70 hiperfoszforilálódik [24. ábra, 3. táblázat]. A ZAP-70 csökkent foszforilációját találtuk a F315-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ami ezen tirozin maradék pozitív autoregulációs szerepére utal [24. ábra, 3. táblázat]. Ezek az eredmények kiegészítik a Watts és munkatársai által leírt *in vitro* eredményeket a Y126 és Y292 autofoszforilációjáról [45], valamint megerősítik azt a korábbi feltételezést, miszerint a Y315 és Y319 pozitív autoregulációs szerepet játszanak és részt vesznek az úgy nevezett „autoinhibitory switch”-ben, ami által a ZAP-70 katalitikus aktivitását szabályozzák.

**3. táblázat: A ZAP-70 pontmutáns sejteken végzett kísérletek eredményeinek összefoglalása nyugvó és aktivált sejtekben**

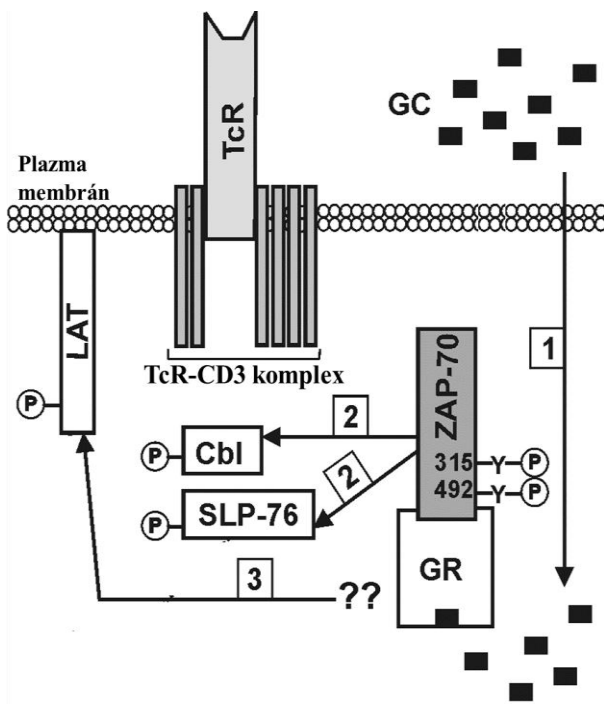
Y-F pozíció	Ca <sup>2+</sup>	ZAP-70*	SLP-76*	SLP-76 <sup>Y128</sup>		LAT*			LAT <sup>Y171</sup>	Funkció	
a-CD3	+	+	+	-	+	+	-	+	-	TcR/CD3	Autoreguláció
069	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	gátló	-
126	↓	-	-	↑	↓	-	-	-	-	aktivációs	-
178	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	részben gátló	-
238	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	?	?
292	↑	↑	↑	-	-	↑	-	-	-	gátló	negatív
315	↓	↓	↑	-	↓	↑	-	-	-	aktivációs	pozitív
492	↑	-	↑	↑	↓	-	↑	-	-	gátló	-
493	↓	↑	↓	-	↓	↓	-	↓	↓	aktivációs	negatív

Valamennyi változást a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalonban kapott eredményekhez viszonyítottunk. A kapott változásokat nyilakkal jelöltük: ↑ növekedés, ↓ csökkenés, -: nincs változás. NE: nem vizsgáltuk, \*immunprecipitáció.

## 7.2 A nem-genomikus glükokortikoid hatások molekuláris célpontjai Jurkat sejtekben

Ahogy a Bevezetésben (ld. 2.2.4 fejezet) bemutattuk, intézetünkben folytatott korábbi munkánk során megállapítottuk, hogy a ZAP-70 kináz nem csak a T-sejt aktiváció egyik kulcsmolekulája, hanem fontos szerepet játszik a nem-genomikus GC jelátviteli útvonal közvetítésében is [115,116]. Jelen kísérleteink során az általunk létrehozott ZAP-70 pontmutáns sejtvonalakban vizsgáltuk a rövid idejű, nagy dózisu GC hatások további részleteit [60]. Elemeztük, hogy a kináz mely tirozin maradékai vesznek részt a nem-genomikus GC hatások kialakításában, valamint azt, hogy a kialakult jelet mely downstream célmolekulák közvetíthetik. Rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés csökkent ZAP-70 foszforilációhoz vezetett az F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben [28. *ábra A, B, 4. táblázat B*], ami azt mutatja, hogy a ZAP-70 ezen 2 tirozin maradéka vehet részt a nem-genomikus GC jelátvitelben. Érdeemes megjegyezni, hogy ezen két tirozin ellentétes szerepet tölt be a T-sejt aktivációban, -ahogy arról korábban már részletesen szó esett- a Y315 aktivációs, míg a Y492 gátló funkciójú tirozin [60]. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy finom különbségek figyelhetők meg a ZAP-70 foszforilációs mintázatában a nem-genomikus GC és a TcR/CD3 jelátvitel során. Korábbi kísérleteink során GC indukálta ZAP-70-GR asszociációt figyeltünk meg, így a fenti foszforiláció csökkenés magyarázatául szolgált volna, ha a Y-F aminosavcsere hatására a ZAP-70-GR asszociáció is megváltozik [116]. Nem találtunk azonban különbséget a pontmutáns sejtek ZAP-70-GR asszociációjában, ami további alternatív mechanizmusokra pl.: a ZAP-70 kináz aktivitásának lehetséges csökkenésére, vagy a T-sejt jelátviteli kaszkád során a ZAP-70-től proximálisan elhelyezkedő molekulák (pl.: Lck) szerepére hívja fel a figyelmet [28. *ábra C*]. Vizsgáltuk továbbá a ZAP-70 kináz közvetlen szubsztrátjainak szerepét a nem-genomikus GC jelátvitelben. A LAT és az SLP-76 adaptereken kívül különös figyelmet fordítottunk a Cbl molekulára, mivel negatív regulátorként fontos szerepet játszhat az immunszuppresszív folyamatok szabályozásában [31,73,74]. Mindhárom molekula foszforilációja emelkedett rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés hatására, tehát valamennyien szerepet játszhatnak a nem-genomikus GC hatások közvetítésében [29. *ábra, 4. táblázat A*]. Megvizsgáltuk azt is, hogy a F315 és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a mutáció hogyan befolyásolja a LAT, SLP-76 és Cbl foszforiláció növekedését. A Cbl és SLP-76 esetében a mutációk meggátolták a DX indukálta foszforiláció

növekedést, míg a LAT foszforilációját nem befolyásolták [31., 32. ábra, 4. táblázat B]. Ez arra utal, hogy a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik. A LAT-ot a ZAP-70-en kívül az I $\kappa$ k és az Lck is foszforilálja, így feltehetően a LAT-on megfigyelt nem-genomikus GC hatásokat ezek a molekulák idézik elő [128].



**32. ábra: Nem-genomikus GC hatások feltételezett mechanizmusai a TcR jelátvitel általunk vizsgált molekuláira.** A GC-ok a plazma membránon történő diffúziót követően kötődnek citoplazmatikus receptorukhoz (1. nyíl). A ligand aktivált GR asszociál a ZAP-70 kinázzal, miközben annak Y315 és Y492 maradékai foszforilálódnak. Az SLP-76 és a Cbl tirozinjait a ZAP-70 foszforilálja (2. nyíl), míg a LAT a ZAP-70-től függetlenül (eddig ismeretlen módon, feltehetően upstream szabályozó molekulák révén) foszforilálódik (3. nyíl).

### 7.3 A nem-genomikus glükokortikoid hatások T-sejt aktivációra gyakorolt hatásai: cross-talk a TcR/CD3- és glükokortikoid receptor jelpályák között

Miután részletesen megvizsgáltuk a GC-ok T-sejtekre kifejtett önálló hatását, arra kerestük a választ, hogy a DX kezelés hogyan befolyásolja a T-sejt aktivációt és ezáltal hogyan járulhat hozzá az immunszuppresszív hatásokhoz. Ezért GC analóggal előkezelt sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációját, valamint az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-jelet anti-CD3 aktivációt követően. A ZAP-70 kinázban megfigyelt változásokhoz hasonlóan kombinált kezeléskor a LAT és a Cbl tirozin foszforilációja tovább nőtt a csak anti-CD3 kezelt mintákhoz képest, míg az SLP-76 aktiváció indukálta foszforilációját a

DX kezelés részben gátolta [115] [29. *ábra*, 4. *táblázat A*]. Ez arra utal, hogy a nem-genomikus GC hatás megváltoztatja a TcR/CD3 jelátviteli utak foszforilációját, azaz a két -a TcR/CD3- illetve a nem-genomikus GR- jelpálya között komplex „cross-talk” („párbeszéd”) zajlik. Löwenberg és munkatársainak primer T-limfocitákban történt vizsgálatai szerint a LAT Y171 foszforilációja csökken a DX kezelt sejtekben, az anti-CD3 és anti-CD28 kezelt mintákhoz viszonyítva [113]. Ez a különbség a két kísérletsorozat eredménye között adódhat a kísérletek során használt sejtek eltérő típusától (primer T-sejtek - tumor sejtvonala), de lehet a különböző aktivációs protokollok (anti-CD3+anti-CD28 - csak anti-CD3) következménye is. A Y171 nem az egyetlen tirozin a LAT-ban, ami részt vesz a T-sejt aktivációban, a molekula N-terminális részében több tirozin foszforilálódik aktiváció hatására [71,72].

A foszforiláció változások mellett az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel is a T-sejt aktiváció kulcseményei közé tartozik. Az anti-CD3 indukálta  $Ca^{2+}$ -jel részben gátolható rövid idejű, nagy dózisu DX előkezeléssel, hasonlóan az SLP-76 foszforilációjához [29., 30. *ábra*]. Ez az adat összhangban lehet azzal a megfigyelésünkkel, miszerint a  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását Jurkat sejtekben inkább az SLP-76 szabályozza [60]. A DX kezelés más módon is befolyásolhatja a  $Ca^{2+}$ -jelet, például a membránok ioncsatornáira kifejtett hatáson keresztül. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel csökkenésének a kalcineurin-NFAT tengely gátlása lehet a következménye.

Természetesen a korábban bemutatott GC analóg indukált ZAP-70-GR asszociáció felveti annak a lehetőséget is, hogy a nem-genomikus GC hatás fizikailag „kivonja” a ZAP-70-et a TcR/CD3 jelátviteli út proximális komplexéből, így gátolva/csökkentve a TcR/CD3 aktiváció hatékonyságát.

**4. táblázat: A DX, valamint az anti-CD3+DX kezelés hatására bekövetkező változások összefoglalása Jurkat és ZAP-70 pontmutáns sejtekben**

**A**

	ZAP-70	LAT	LAT*	SLP-76	SLP-76*	Cbl	Cbl*	$Ca^{2+}$
DX	+	+	+	+	+	+	+	+
a-CD3	-	-	+	-	+	-	+	+
Jurkat/ WT	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓

## B

Y-F pozíció	ZAP-70	LAT	SLP-76	Cbl
<b>DX</b>	+	+	+	+
315	↓	-	↓	↓
492	↓	-	↓	↓

*A: Jurkat/WT sejteken végzett kísérletek eredményei DX, valamint kombinált (anti-CD3+DX) kezelést követően. A változásokat a Jurkat/WT kezeletlen mintákhoz, vagy a Jurkat/WT anti-CD3 kezelt mintákhoz viszonyítottuk (\*). B: F315- vagy F492-ZAP-70-et expresszáló pontmutáns sejtek foszforiláció változása DX kezelés hatására. A foszforiláció változásokat a WT DX kezelt mintákhoz viszonyítottuk.*

*A változásokat nyilakkal jeleltük: ↑ növekedés, ↓ csökkenés, -: nincs változás.*

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a TcR/CD3 jelátvitelt a T-sejt aktiváció molekuláinak finom összehangolt működése szabályozza. Az aktiváció kezdeti folyamatainak szabályozásában a ZAP-70 tirozin maradékai kiemelkedő szerepet játszanak, emellett fontos szerepet töltenek be a kináz (auto)regulációjában is.

A ZAP-70 tirozinjai, valamint a kináz szubsztrátjai kulcsfontosságúak a nem-genomikus GC hatások kialakításában is. A GC vagy kombinált (anti-CD3+DX) hatások a proximális jelátviteli molekulák finom kölcsönhatásának, komplex szabályozásának köszönhetően, részben eltérő módon továbbítódnak.

A ZAP-70 kinázban található tirozinok szerepének pontos megismerése a T-sejt aktivációban és a nem-genomikus GC hatásokban közelebb vihet minket leukémiák, autoimmun betegségek patomechanizmusának felderítéséhez, az immunszuppresszió mechanizmusának pontosabb megértéséhez, valamint esetleges későbbi terápiás célpontok kifejlesztéséhez. Távol vagyunk azonban még attól, hogy a T-sejt aktiváció és a nem-genomikus glükokortikoid hatások komplex szabályozásának pontos részleteit maradéktalanul ismerjük.

## 8. Hivatkozások

1. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
2. Res P, Spits H. Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol.* 1999 Feb;11(1):39-46.
3. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Mar;5(3):247-53.
4. Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Agace WW, Takahama Y, Jenkinson EJ, Anderson G. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol.* 2007 Aug;37(8):2090-6.
5. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):3892-904.
6. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 139-76.
7. Alt FW, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today.* 1992 Aug;13(8):306-14.
8. Murata S, Takahama Y, Tanaka K. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol.* 2008 Apr;20(2):192-6.
9. Pitkänen J, Peterson P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun.* 2003 Jan;4(1):12-21
10. Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2004 Jul;25(7):374-80.
11. Bommhardt U, Beyer M, Hünig T, Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Feb;61(3):263-80.
12. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
13. Laing KJ, Hansen JD. Fish T cells: Recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol.* 2011 Dec;35(12):1282-95.
14. Chien Y, Bonneville M. Gamma delta T cell receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006 Sep;63(18):2089-94.



15. Brigl M, Brenner MB. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol*. 2010 Apr;22(2):79-86.
16. Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, Premel V, Devys A, Moura IC, Tilloy F, Cherif S, Vera G, Latour S, Soudais C, Lantz O. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol*. 2009 Mar 10;7(3):e54.
17. Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*. 1975 Jun 28;1(7922):1406-9.
18. Marrack P, Hannum C, Harris M, Haskins K, Kubo R, Pigeon M, Shimonkevitz R, White J, Kappler J. Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol Rev*. 1983;76:131-45.
19. Miceli MC, Parnes JR. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Semin Immunol*. 1991 May;3(3):133-41.
20. Bjørgo E, Taskén K. Novel mechanism of signaling by CD28. *Immunol Lett*. 2010 Mar 10;129(1):1-6.
21. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):973-83.
22. Kwekkeboom J, de Rijk D, Kasran A, Barcy S, de Groot C, de Boer M. Helper effector function of human T cells stimulated by anti-CD3 mAb can be enhanced by co-stimulatory signals and is partially dependent on CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol*. 1994 Mar;24(3):508-17.
23. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):133-9.
24. Fodor S, Jakus Z, Mócsai A. ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett*. 2006 Apr 15;104(1-2):29-37.
25. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7990-8000.
26. Barber EK, Dasgupta JD, Schlossman SF, Trevillyan JM, Rudd CE. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(9):3277-81.
27. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992 Nov 13;71(4):649-62.

28. Brdička T, Cerný J, Horejší V. T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 20;248(2):356-60.
29. Sommers CL, Samelson LE, Love PE. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays*. 2004 Jan;26(1):61-7.
30. Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jan;6(1):67-78.
31. Rao N, Dodge I, Band H. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002 May;71(5):753-63.
32. Braiman A, Barda-Saad M, Sommers CL, Samelson LE. Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *EMBO J*. 2006 Feb 22;25(4):774-84.
33. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
34. Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG. The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Exp Mol Med*. 2000 Sep 30;32(3):101-9.
35. Matthews SA, Cantrell DA. The role of serine/threonine kinases in T-cell activation. *Curr Opin Immunol*. 2006 Jun;18(3):314-20.
36. Genot E, Cantrell DA. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2000 Jun;12(3):289-94.
37. Isakov N, Altman A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:761-94.
38. Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2008 Jun;20(3):250-8.
39. Savignac M, Mellström B, Naranjo JR. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch*. 2007 Jul;454(4):523-33.
40. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Avots A. NFAT in lymphocytes: a factor for all events? *Sci STKE*. 2007 Aug 7;2007(398):pe42.
41. Paetkau V, Shaw J, Caplan B, Mills GB, Lee KC. Interleukin 2 in cell-mediated immune responses. *J Supramol Struct*. 1980;13(2):271-80.
42. Bismuth G, Moreau JL, Sommé G, Duphot M, Dautry-Varsat A, Robb RJ, Théze J. Regulation of interleukin 2 (IL2) receptor expression: IL2 as an inducing signal for

- the expression of its own receptor on a murine T helper cell line. *Eur J Immunol.* 1985 Jul;15(7):723-7.
43. Kepley CL, Wilson BS, Oliver JM. Identification of the Fc epsilonRI-activated tyrosine kinases Lyn, Syk, and Zap-70 in human basophils. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Aug;102(2):304-15.
  44. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev.* 2009 Mar;228(1):41-57.
  45. Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem.* 1994 Nov 25;269(47):29520-9.
  46. Kong G, Dalton M, Bubeck Wardenburg J, Straus D, Kurosaki T, Chan AC. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):5026-35.
  47. Zhao Q, Weiss A. Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol Cell Biol.* 1996 Dec;16(12):6765-74.
  48. Lupher ML Jr, Songyang Z, Shoelson SE, Cantley LC, Band H. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26;272(52):33140-4.
  49. Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med.* 1997 May 19;185(10):1877-82
  50. Gelkop S, Gish GD, Babichev Y, Pawson T, Isakov N. T cell activation-induced CrkII binding to the Zap70 protein tyrosine kinase is mediated by Lck-dependent phosphorylation of Zap70 tyrosine 315. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8123-32.
  51. Di Bartolo V, Mège D, Germain V, Pelosi M, Dufour E, Michel F, Magistrelli G, Isacchi A, Acuto O. Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5;274(10):6285-94.
  52. Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, Chini CC, Yacyshyn E, Bubeck Wardenburg J, Dalton M, Chan AC, Abraham RT. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is

- required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J*. 1999 Apr 1;18(7):1832-44.
53. Gong Q, Jin X, Akk AM, Foger N, White M, Gong G, Bubeck Wardenburg J, Chan AC. Requirement for tyrosine residues 315 and 319 within zeta chain-associated protein 70 for T cell development. *J Exp Med*. 2001 Aug 20;194(4):507-18.
  54. Magnan A, Di Bartolo V, Mura AM, Boyer C, Richelme M, Lin YL, Roure A, Gillet A, Arrieumerlou C, Acuto O, Malissen B, Malissen M. T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *J Exp Med*. 2001 Aug 20;194(4):491-505.
  55. Di Bartolo V, Malissen M, Dufour E, Sechet E, Malissen B, Acuto O. Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur J Immunol*. 2002 Feb;32(2):568-75.
  56. Pacini S, Ulivieri C, Di Somma MM, Isacchi A, Lanfrancone L, Pelicci PG, Telford JL, Baldari CT. Tyrosine 474 of ZAP-70 is required for association with the Shc adaptor and for T-cell antigen receptor-dependent gene activation. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20487-93.
  57. Wange RL, Guitián R, Isakov N, Watts JD, Aebersold R, Samelson LE. Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18730-3.
  58. Mège D, Di Bartolo V, Germain V, Tuosto L, Michel F, Acuto O. Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32644-52.
  59. Zeitlmann L, Knorr T, Knoll M, Romeo C, Sirim P, Kolanus W. T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19;273(25):15445-52.
  60. Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol*. 2012 Feb;24(2):79-87.
  61. Elder ME, Hope TJ, Parslow TG, Umetsu DT, Wara DW, Cowan MJ. Severe combined immunodeficiency with absence of peripheral blood CD8+ T cells due to ZAP-70 deficiency. *Cell Immunol*. 1995 Oct 1;165(1):110-7.
  62. Williams BL, Schreiber KL, Zhang W, Wange RL, Samelson LE, Leibson PJ, Abraham RT. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to

- the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol*. 1998 Mar;18(3):1388-99.
63. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, Zhang Q, Chan AC, Loh DY. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature*. 1995 Aug 3;376(6539):435-8.
  64. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 2003 Nov 27;426(6965):454-60.
  65. Mougalian SS, O'Brien S. Adverse prognostic features in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* . 2011 Jul;25(8):692-6, 699.
  66. Wu JN, Koretzky GA. The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin Immunol*. 2004 Dec;16(6):379-93.
  67. Bubeck Wardenburg J, Fu C, Jackman JK, Flotow H, Wilkinson SE, Williams DH, Johnson R, Kong G, Chan AC, Findell PR. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem*. 1996 Aug 16;271(33):19641-4.
  68. Raab M, da Silva AJ, Findell PR, Rudd CE. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity*. 1997 Feb;6(2):155-64.
  69. Jordan MS, Sadler J, Austin JE, Finkelstein LD, Singer AL, Schwartzberg PL, Koretzky GA. Functional hierarchy of the N-terminal tyrosines of SLP-76. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2430-8.
  70. Balagopalan L, Coussens NP, Sherman E, Samelson LE, Sommers CL. The LAT Story: A Tale of Cooperativity, Coordination, and Choreography *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010 Aug;2(8):a005512.
  71. Aguado E, Martínez-Florensa M, Aparicio P. Activation of T lymphocytes and the role of the adapter LAT. *Transpl Immunol*. 2006 Dec;17(1):23-6.
  72. Paz PE, Wang S, Clarke H, Lu X, Stokoe D, Abo A. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J*. 2001 Jun 1;356(Pt 2):461-71.

73. Rao N, Lupher ML Jr., Ota S, Reedquist KA, Druker BJ, Band H. The Linker Phosphorylation Site Tyr292 Mediates the Negative Regulatory Effect of Cbl on ZAP-70 in T Cells *J Immunol*. 2000;164:4616-4626
74. Paolino M, Penninger JM. Cbl-b in T-cell activation *Semin Immunopathol*. 2010 Jun;32(2):137-48.
75. Suzuki Y, Inoue T, Ra C. L-type Ca<sup>2+</sup> channels: a new player in the regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling, cell activation and cell survival in immune cells. *Mol Immunol*. 2010 Jan;47(4):640-8.
76. Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2008 Jun;20(3):250-8.
77. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):690-702.
78. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*, (2003) page 1300, Elsevier/Saunders
79. Heyns W, Coolens JL. Physiology of corticosteroid-binding globulin in humans. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;538:122-9.
80. Kronenberg HM, Memed S, Polonsky KS, Larsen RP. *Williams Textbook of Endocrinology: The Adrenal Cortex* Page: 451
81. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 2000 Jul;55(7):603-13.
82. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev*. 2011 Apr;10(6):305-10.
83. Flammer JR, Rogatsky I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol Endocrinol*. 2011 Jul;25(7):1075-86.
84. Krishnan JA, Davis SQ, Naureckas ET, Gibson P, Rowe BH. An umbrella review: corticosteroid therapy for adults with acute asthma. *Am J Med*. 2009 Nov;122(11):977-91.
85. Hricik DE, Almawi WY, Strom TB. Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation. *Transplantation*. 1994 Apr 15;57(7):979-89.
86. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):36863-4.

87. Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010 Jan;75(1):1-12
88. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Dec;102(1-5):11-21.
89. Kino T, Su YA, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Nov;66(21):3435-48.
90. Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17;381(4):671-5
91. Chen W, Dang T, Blind RD, Wang Z, Cavasotto CN, Hittelman AB, Rogatsky I, Logan SK, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol*. 2008 Aug;22(8):1754-66
92. Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med*. 2007 Apr;13(4):158-63
93. Buttgerit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the Treatment of Rheumatic Diseases *Arthritis Rheum*. 2004 Nov;50(11):3408-17.
94. Buttgerit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002 May;67(6):529-34.
95. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):513-56.
96. Gametchu B, Watson CS, Wu S. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J*. 1993 Oct;7(13):1283-92.
97. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology*. 2010 Jul;215(7):521-6.
98. Sackey FN, Watson CS, Gametchu B. Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *Am J Physiol*. 1997 Sep;273(3 Pt 1):E571-83.

99. Spies CM, Schaumann DH, Berki T, Mayer K, Jakstadt M, Huscher D, Wunder C, Burmester GR, Radbruch A, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Ann Rheum Dis*. 2006 Sep;65(9):1139-46.
100. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):70-80.
101. Tryc AB, Spies CM, Schneider U, Kunkel D, Berki T, Sieper J, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2006 Nov;33(11):2249-53.
102. Strehl C, Gaber T, Löwenberg M, Hommes DW, Verhaar AP, Schellmann S, Hahne M, Fangradt M, Wagegg M, Hoff P, Scheffold A, Spies CM, Burmester GR, Buttgereit F. Membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3779-88.
103. Rand PW, Lacombe E, Barker ND, Kallechey GL. Effects of methylprednisolone on the physical properties of the human red cell. *J Lab Clin Med*. 1977 Jun;89(6):1241-50.
104. Van Bömmel T, Marsen T, Bojar H. Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res*. 1987 Nov-Dec;7(6):1217-23.
105. Fukuda S, Mitsuoka H, Schmid-Schönbein GW. Leukocyte fluid shear response in the presence of glucocorticoid. *J Leukoc Biol*. 2004 Apr;75(4):664-70.
106. Peixoto EB, Collares-Buzato CB. Modulation of the epithelial barrier by dexamethasone and prolactin in cultured Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Cell Biol Int*. 2006 Feb;30(2):101-13.
107. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010 Jan;75(1):1-12.
108. Chang CP, Wang SW, Huang ZL, Wang OY, Huang MI, Lu LM, Tarn DC, Chien CH, Chien EJ. Non-genomic rapid inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange 1 and apoptotic



- immunosuppression in human T cells by glucocorticoids. *J Cell Physiol.* 2010 Jun;223(3):679-86.)
- 109.Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 2006 Jan 23;203(1):189-201.
- 110.Sionov RV, Kfir S, Zafirir E, Cohen O, Zilberman Y, Yefenof E. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle.* 2006 May;5(10):1017-26.
- 111.Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, Khairova R, Zhou R, Yuan P, Machado-Vieira R, McEwen BS, Manji HK. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009 Mar 3;106(9):3543-8.
- 112.Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálincás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol.* 2009 Nov;21(11):1269-76.
- 113.Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgerit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood.* 2005 Sep 1;106(5):1703-10.
- 114.Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgerit F, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ, Hommes DW. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* 2006 Oct;7(10):1023-9.
- 115.Bartis D, Boldizsar F, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P, Berki T. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Feb;98(2-3):147-54.
- 116.Bartis D, Boldizsár F, Kvell K, Szabó M, Pálincás L, Németh P, Monostori E, Berki T. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 2;354(1):253-8.
- 117.Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell.* 2000 Apr 14;101(2):173-85.

- 118.Zufferey R, Dull T, Mandel R J, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J.Virol.* 1998 Dec;72(12):9873-80.
- 119.Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol.Ther.* 2000 Aug;2(2):170-6.
- 120.O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J.Virol.* 2000 Nov;74(21):10074-80.
- 121.Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods.* 1998 May 1;214(1-2):19-27.
- 122.Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem.* 1989 May 15;264(14):8171-8.
- 123.Boldizsár F, Berki T, Miseta A, Németh P. Effect of hyperglycemia on the basal cytosolic free calcium level, calcium signal and tyrosine-phosphorylation in human T-cells. *Immunol Lett.* 2002 Jun 3;82(1-2):159-64.
- 124.Elder, M. E., Lin, D., Clever, J., Chan, A. C., Hope, T. J., Weiss, A., and Parslow, T. G. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science.* 1994 Jun 10;264(5165):1596-9.
- 125.Yablonski D, Kadlecsek T, Weiss A. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol.Cell Biol.* 2001 Jul;21(13):4208-18.
- 126.Brdicka T, Kadlecsek TA, Roose JP, Pastuszak AW, Weiss A. Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol.Cell Biol.* 2005 Jun;25(12):4924-33.
- 127.Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, Kurosaki T. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 1995 Jun 1;14(11):2499-508.
- 128.Perez-Villar JJ, Whitney GS, Sitnick MT, Dunn RJ, Venkatesan S, O'Day K, Schieven GL, Lin T A, Kanner SB. Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav. *Biochemistry.* 2002 Aug 27;41(34):10732-40.

## 9. Ábrák, táblázatok jegyzéke

### Ábrák:

1. ábra: A T-sejtek fejlődése a tímuszban.....	10
2. ábra: A Th-sejtek típusai, kialakulásukban szerepet játszó faktorok és a sejtek által termelt citokinek.....	11
3. ábra: A T-sejt aktiváció elindításához szükséges molekulapárok.....	13
4. ábra: A T-sejt aktiváció jelátviteli útvonalai.....	14
5. ábra: A ZAP-70 kináz szerkezete és a T-sejt aktivációban részt vevő tirozin maradékai.....	15
6. ábra: Az SLP-76 molekula szerkezete, foszforilált tirozinjai és az adapterhez asszociálódó molekulák.....	17
7. ábra: A LAT szerkezete; foszforilációban, ubiquitinációban és palmitilációban részt vevő aminosav maradékai.....	18
8. ábra: A Cbl molekulacsalád tagjainak szerkezete.....	19
9. ábra: A szteroid hormonok szintézise.....	21
10. ábra: A hipotalamo-hipofízis-mellékvesekéreg tengely.....	22
11. ábra: A glükokortikoid hormonok hatásai az immunrendszer sejtjeire.....	23
12. ábra: A humán glükokortikoid receptor gén és glükokortikoid receptor izoformák....	24
13. ábra: A GC genomikus és nem-genomikus hatásmechanizmusai.....	26
14. ábra: A ligand kötött GR feltételezett hatásai timociták mitokondriumában.....	27
15. ábra: Nem-genomikus glükokortikoid hatások aktivált humán CD4+ T-sejtekben.....	28
16. ábra: A ZAP-70, GR, Lck és HSP-90 molekulák interakciójának modellje Jurkat sejtekben.....	29
17. ábra: A lentivirális transzfekció folyamata és a pWPST lentivirális transzfer plazmid.....	35

18. <i>ábra:</i> Immunprecipitáció és Western blot .....	38
19. <i>ábra:</i> Az intracelluláris kalcium szint mérése áramlási citometriával .....	39
20. <i>ábra:</i> Epitópok, amiket a ZAP-70 kináz expressziójának vizsgálatához használt antitestek felismernek. ....	40
21. <i>ábra:</i> Pontmutáns sejt vonalak ZAP-70 expressziója. ....	41
22. <i>ábra:</i> A Y-F aminosavcsere hatásai az anti-CD3 indukálta intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -jel kialakulására .....	43
23. <i>ábra:</i> Az anti-CD3 indukálta tirozin-foszforilációs mintázat változásai ZAP-70 Y-F pontmutáns sejtekben. ....	44
24. <i>ábra:</i> A ZAP-70 Y-F pontmutációjának hatása a kináz anti-CD3 indukálta tirozin-foszforilációra. ....	45
25. <i>ábra:</i> A ZAP-70 Y-F pontmutációinak hatása az SLP-76 (A) és LAT (B) anti-CD3 indukálta tirozin foszforilációjára. ....	46
26. <i>ábra:</i> Az SLP-76 és LAT molekulák Y-specifikus foszforiláció változásainak vizsgálata Foszfó-Flow technikával WT és Y-F pontmutáns ZAP-70-et expresszáló P116 sejtekben. ....	47
27. <i>ábra:</i> Két perces nagy dózisu DX indukálta tirozin-foszforiláció mintázat változásai ZAP-70 Y-F pontmutáns sejtekben. ....	49
28. <i>ábra:</i> Rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés indukálta ZAP-70 foszforiláció és GR asszociáció pontmutáns sejtekben. ....	50
29. <i>ábra:</i> Rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés hatása TcR/CD3 jelátviteli utakra. ....	52
30. <i>ábra:</i> Az anti-CD3 indukálta Ca <sup>2+</sup> -jel kialakulását a DX részben gátolja Jurkat sejtekben. ....	53
31. <i>ábra:</i> A ZAP-70 Y315 és Y492 pontmutációi befolyásolják az SLP-76 és Cbl DX indukálta foszforiláció növekedést. ....	54
32. <i>ábra:</i> Nem-genomikus GC hatások feltételezett mechanizmusai a TcR jelátvitel általunk vizsgált molekuláira. ....	61

## **Táblázatok:**

<i>1. táblázat:</i> A Ca <sup>2+</sup> szerepe az immunrendszer különböző sejtjeiben. ....	20
<i>2. táblázat:</i> A kísérletekben használt primerek összefoglalása. ....	34
<i>3. táblázat:</i> A ZAP-70 pontmutáns sejteken végzet kísérletek eredményeinek összefoglalása nyugvó és aktivált sejtekben. ....	59
<i>4. táblázat:</i> A DX, valamint a anti-CD3+DX kezelés hatására Jurkat és ZAP-70 pontmutáns sejtekben bekövetkező változások összefoglalása. ....	62

## 10. Publikációk (össz IF: 21,217)

### 10.1 A tézis alapját képező közlemények (IF: 12,989)

1. **M. Szabo**, T. Czompoly, K. Kvell, G. Talaber, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki, F. Boldizsar: *Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells.*  
International Immunology 2012, 24(2):79-87.  
IF:3,301\*
2. Boldizsar F.<sup>1</sup>, **Szabo M.**<sup>1</sup>, Kvell K., Czompoly T., Talaber G., Bjorkan J., Bartis D., Nemeth P., Berki T. : *ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in Jurkat cells*  
Molecular Immunology (közlésre beküldve)
3. F. Boldizsár, G. Talabér, **M. Szabó**, D. Bartis L. Pálinkás, P. Németh and T. Berki: *Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid signaling in T cells*  
Immunobiology 2010, 215(7):521-6.  
IF: 4,114
4. D. Bartis, F. Boldizsar, K. Kvell, **M. Szabó**, L. Pálinkás, P. Németh, É. Monostori, T. Berki: *Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90.*  
Biochemical Biophysical Research Communications 2007, 354(1): 253-8  
IF:2,749
5. D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, L. Pálinkás, P. Németh and T. Berki: *Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells.*  
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2006, 98: 147-154  
IF:2,825

### 10.2 Egyéb közlemények (IF: 8,228)

6. **Szabó M.**: *Sokoldalú hormonterápia, Hatóanyag a mellékvesekéregből*  
Élet és Tudomány 2011, LXVI. évfolyam, 47. szám 1491-1493. oldal IF: -
7. G. Talabér, F. Boldizsár, D. Bartis, L. Pálinkás, **M. Szabó**, G. Berta, G. Sétáló Jr, P. Németh and T. Berki: *Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis.*  
International Immunology 2009, 21(11):1269-76

IF: 3,403

8. Y. Hayashi, P. Engelmann, R. Foldbjerg, **M. Szabó**, I. Somogyi, E. Pollák, L. Molnár, H. Autrup, D. S. Sutherland, J. Scott-Fordsmand, L.-H. Heckmann: *Earthworms and Humans in Vitro: Characterizing Evolutionarily Conserved Stress and Immune Responses to Silver Nanoparticles*.  
Environmental Science & Technology 2012, 46(7): 4166-4173.

IF:4,825\*

\*legutolsó (2010-es IF adat alapján)

<sup>1</sup>megosztott első szerzők

### 10.3 Idézhető absztraktok

1. **M. Szabo**, D. Bartis, K. Kvell, T. Czompoly, G. Talaber, P. Nemeth, T. Berki, F. Boldizsar: *Point mutations at various tyrosine residues in the ZAP-70 kinase influence TcR signaling and nongenomic glucocorticoid effects in Jurkat human T-cell line*. Eur J Immunol, Vol. 39, S1, 2009
2. G. Talabér, F. Boldizsár, D. Bartis, L. Pálkás, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor (GR) in double positive (DP) thymocytes might represent a novel apoptosis-regulating mechanism*. Eur J Immunol, Vol. 39, S1, 2009
3. D. Bartis, G. Talabér, J. Papp, F. Boldizsár, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Non-genomic glucocorticoid hormone signal transduction effects on mast cells*. Eur J Immunol, Vol. 39, S1, 2009
4. D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, L. Pálkás, P. Németh and T. Berki: *Glucocorticoid hormone elicited tyrosine-phosphorylation events involving T-cell specific kinases*. The FEBS Journal, July 2005. 272(Suppl.1): 482 Abstracts of the 30th FEBS-Congress 9th IUBMB Conference 2-7.

## 10.4 Előadások

1. **Szabó M.**, Kvell K., Czömpöly T., Talabér G., Németh P., Berki T., Boldizsár F.: *A ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak szerepe a T-sejt aktivációs folyamatokban - díjazott előadás (SOTE PhD Napok, 2011. Budapest)*
2. **Szabó M.**, Kvell K., Czömpöly T., Talabér G., Németh P., Berki T., Boldizsár F.: *A ZAP-70 kináz célzott tirozin-fenilalanin pontmutációi befolyásolják a nyugvó T-sejtek foszforilációs mintázatát, valamint a T-sejt aktivációt (39. MIT, 2010. Szeged)*
3. **Szabó M.**, Berki T., Boldizsár F.: *A ZAP-70 kináz tirozinjait érintő pontmutációk módosítják a T-sejt aktivációt (Biológus doktoranduszok konferenciája, 2010. Pécs)*
4. **Szabó M.**, Bartis D., Kvell K., Czömpöly T., Talabér G., Németh P., Berki T., Boldizsár F.: *A ZAP-70 kináz tirozinjainak szerepe a T-sejt aktivációban és a glukokortikoidok nem-genomikus hatásmechanizmusában –Sigma Aldrich II-díj, (MIT Ifjúsági Napok, 2009. Harkány)*
5. **M. Szabó**, F. Boldizsár, D. Bartis, T. Czömpöly, K. Kvell, G. Talabér, P. Németh, T. Berki: *Point mutations in various phosphorylation sites of the ZAP-70 kinase influence the T-cell signaling and rapid glucocorticoid effects in Jurkat human T cell line (5th International Conference of Postgraduate Medical Students, 2008. Hradec Králové)*
6. Berki. T., Talabér G., **Szabó M.**, Németh P., Boldizsár F.: *A glukokortikoid receptor által indukált apoptotikus útvonalak vizsgálata kettős pozitív thymocitákban (40. MIT, 2011. Kecskemét)*
7. Boldizsár F., **Szabó M.**, Talabér G., Németh P., Berki T.: *Nem-genomikus glukokortikoid jelátviteli utak T sejtekben (41. Membrán-Transzport Konferencia, 2011. Sümeg)*
8. Talabér G., Boldizsár F., Bartis D., Pálinkás L., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *Glukokortikoid receptor (GR) mitokondriális transzlokációja kettős pozitív (DP) timocitákban (39. Membrán-Transzport Konferencia, 2009. Sümeg)*
9. Bartis D., Talabér G., Boldizsár F., **Szabó M.**, Németh P., Berki T. : *Short term glucocorticoid hormone treatment influences mast cell activation through non-genomic pathway (15th efs-EJI Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, 2009. Balatonöszöd)*



10. Berki T., Bartis D., **Szabó M.**, Talabér G., Pálinkás L., Boldizsár F., Németh P.: *A glukokortikoid hormon gyors, nem-genomikus hatásainak molekuláris mechanizmusai* (38. Membrán-Transzport Konferencia, 2008. Sümeg)
11. D. Bartis, F. Boldizsár, K. Kvell, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Immunosuppression mediated by glucocorticoids: a new, non-genomic mechanism of action.* (14th symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, 2007. Balatonöszöd)
12. Bartis D., Boldizsár F., Kvell K., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *Új nem - genomikus immunszuppressziós mechanizmus: jelátviteli kapcsolat a glukokortikoid receptor és a ZAP-70 között* (37. Membrán - Transzport Konferencia, 2007. Sümeg)
13. Boldizsár F., Bartis D., Kvell K., Czömpöly T., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *A glukokortikoid hormon jelátviteli mechanizmusai T - limfocitákban* (36. Membrán - Transzport Konferencia, 2006. Sümeg)
14. Bartis D., Boldizsár F., Kvell K., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *Újonnan azonosított jelátviteli kapcsolat a glukokortikoid receptor, a ZAP-70 és a Hsp-90 között*, (MIT Ifjúsági Napja, 2006. Pécs)
15. D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Ligand induced glucocorticoid receptor association with ZAP-70 kinase in the cytoplasm of Jurkat T-cells* (13th Symposium on signals and signal processing in the immune system, 2005. Balatonöszöd.)

## 10.5 Poszterek

1. **M. Szabó**, K. Kvell, T. Czömpöly, G. Talabér, P. Németh, T. Berki, Ferenc Boldizsár: *Tyrosines of the ZAP-70 kinase regulate T-cell activation and non-genomic glucocorticoid signalling* (IMPULSE, 2011. Visegrád) Fialat Kutató Díj-III. helyezés
2. **Szabó M.**, Kvell K., Czömpöly T., Talabér G., Németh P., Berki T., Boldizsár F.: *Új szereplők a nem-genomikus glukokortikoid jelátvitelben humán T-sejt modellben* (41. Membrán Transzport Konferencia, 2011. Sümeg)
3. **M. Szabó**, D. Bartis, K. Kvell, T. Czömpöly, G. Talabér, P. Németh, T. Berki: *Glucocorticoid induced phosphorylation of various tyrosine residues of the ZAP-70 kinase modifies TcR signaling* (Autoimmunity, 2010. Ljubljana)

4. **Szabó M.**, Talabér G., Kohl Z., Németh P., Berki T., Boldizsár F.: *A ZAP-70 kináz szerepet játszik a nem-genomikus glukokortikoid hatásban humán perifériás T-sejtekben* (40. Membrán Transzport Konferencia, 2010. Sümeg)
5. **M. Szabó**, D. Bartis, K. Kvell, T. Czömpöly, G. Talabér, P. Németh, T. Berki, F. Boldizsár: *Point mutations at various tyrosine residues in the ZAP-70 kinase influence TcR signaling and non-genomic glucocorticoid effects in Jurkat human T-cell line* (ECI, 2009. Berlin)
6. **M. Szabó**, D. Bartis, K. Kvell, T. Czömpöly, G. Talabér, P. Németh, T. Berki, F. Boldizsár: *Various tyrosine-residue point mutations of the ZAP-70 kinase affect calcium signaling upon activation in Jurkat human T cell line* (ISDCI 2009. Prága)
7. **Szabó M.**, Bartis D., Kvell K., Czömpöly T., Talabér G., Németh P., Berki T., Boldizsár F.: *A ZAP-70 kináz tirozinjait érintő pontmutációk befolyásolják a T sejt receptor (TCR) jelátvitelét és a glukokortikoidok nem-genomikus hatásait Jurkat T-sejtekben* (39. Membrán-Transzport Konferencia, 2009. Sümeg)
8. **M. Szabó**, D. Bartis, F. Boldizsár, K. Kvell, T. Czömöy, G. Talabér, P. Németh, T. Berki: *Jurkat cells expressing Zap-70 kinases with point mutations at phosphorylation sites show different calcium levels after CD3 crosslinking* (ISAC, 2008. Budapest)
9. **Szabó M.**, Bartis D., Boldizsár F., Talabér G., Németh P., Berki T.: *Rövid idejű, nagy dóziséjú glukokortikoid hormonkezelés nem-genomikus úton gátolja humán T helper sejtek aktivációját* (38. Membrán – Transzport Konferencia, 2008. Sümeg)
10. **M. Szabó**. *Ligand – induced association of glucocorticoid receptor with ZAP-70 kinase in T cells* (14th ISCOMS, 2007. Groningen)
11. **M. Szabó**, F. Boldizsár, D. Bartis, P. Németh, T. Berki: *Sejtfelszíni glukokortikoid receptor vizsgálata Jurkat sejteken*, (36. Membrán – Transzport Konferencia, 2006. Sümeg)
12. T. Berki, F. Boldizsár, G. Talabér, **M. Szabó**: *Non-genomic glucocorticoid signalling pathway in DP thymocytes* (IMPULSE, 2011. Visegrád)
13. G. Talabér, F. Boldizsár, **M. Szabó**, D. Bartis, L. Pálincás, P. Németh, T. Berki: *New glucocorticoid hormone signaling pathways in thymocyte selection and beyond* (Autoimmunity, 2010. Ljubljana)
14. Talabér G., Boldizsár F., Bartis D., Pálincás L., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *A mitokondriális glukokortikoid receptor kölcsönhatásainak vizsgálata kettős pozitív*

- tymocytákban: a proapoptotikus fehérjék és hőszokkfehérjék lehetséges szerepe* (40. Membrán Transzport Konferencia, 2010. Sümeg)
15. G. Talabér, F. Boldizsár, D. Bartis, L. Pálinkás, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double positive thymocytes and its possible role in thymocyte apoptosis* (EMBO Conference on Nuclear Receptors, 2009. Catata/ Dubrovnik)
  16. D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, G. Talabér, K. Kvell, P. Németh, T. Berki: *Glucocorticoid receptor mediated non-genomic tyrosine phosphorylation of the ZAP-70* (EMBO Conference on Nuclear Receptors, 2009. Catata/ Dubrovnik)
  17. G. Talabér, F. Boldizsár, D. Bartis, L. Pálinkás, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor (GR) in double positive (DP) thymocytes might represent a novel apoptosis-regulating mechanism* (ECI, 2009. Berlin)
  18. D. Bartis, G. Talabér, J. Papp, F. Boldizsár, **M. Szabó**, P. Németh, T. Berki: *Non-genomic glucocorticoid hormone signal transduction effects on mast cells* (ECI, 2009. Berlin)
  19. Bartis D., Talabér G., Papp J., Boldizsár F., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *A glukokortikoid hormon nem-genomikus jelátviteli hatásainak vizsgálata hízósejteken* (39. Membrán-Transzport Konferencia, 2009. Sümeg)
  20. Bartis D., Talabér G., **Szabó M.**, Papp J., Boldizsár F., Németh P., Barki T.: *A nem-genomikus glukokortikoidhormon-hatások hasonlóságai és különbségei T-sejteken és hízósejteken* (Magyar Immunológiai Társaság XXXVII. Vándorgyűlése, 2008. Budapest)
  21. Talabér G., Bartis D., Boldizsár F., Pálinkás L., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *A glukokortikoid receptor mitochondrialis transzlokációjának lehetséges szerepe a thymocytaapoptózis és –szelekció során* (Magyar Immunológiai Társaság XXXVII. Vándorgyűlése, 2008. Budapest)
  22. G. Talabér, D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, L. Pálinkás, P. Németh, T. Berki: *The possible role of the mitochondrial glucocorticoid receptor in the differentiation and apoptosis of thymocytes* (ISAC, 2008. Budapest)
  23. Berki T, Bartis D, Papp J, **Szabó M**, Talabér G, Boldizsár F, Németh P: *Rapid non-genomic glucocorticoid effects on mast cells* (ISAC, 2008. Budapest)

24. Bartis D., Talabér G., **Szabó M.**, Papp J., Boldizsár F., Németh P., Berki T.: *Nem-genomikus glükokortikoid hatások vizsgálata T-sejteken és hízósejteken* (38. Membrán-Transzport Konferencia, 2008. Sümeg)
25. Talabér G., Bartis D., Boldizsár F., Pálinkás L., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *A glükokortikoidreceptor mitochondrialis transzlokációjának mintázata heterogén a thymocytapopulációkban.* (Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, 2007. Hajdúszoboszló)
26. Bartis D., Papp J., **Szabó M.**, Talabér G., Boldizsár F., Németh P., Berki T.: *Azonnali glükokortikoid hormon jelátviteli hatások in vitro vizsgálata patkány-hízósejtvonalon.* (Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, 2007. Hajdúszoboszló)
27. Bartis D., Boldizsár F., **Szabó M.**, Talabér G., Papp J., Németh P., Berki T.: *Nem-genomikus glukokortikoid hatások T-sejteken: A ZAP-70, mint potenciális célpont az immunszuppresszív terápiában* (Immunfarmakonok és biológiai hatóanyagok gyógyszertana konferencia, 2007. Debrecen)
28. Bartis D., Boldizsár F., Kvell K., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *Új glukokortikoid receptor mediált nem - genomikus immunszuppressziós mechanizmus.* (A Magyar Élettan Társaság LXX. Vándorgyűlése, 2007. Pécs)
29. D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, L. Pálinkás, P. Németh, T. Berki: *Glucocorticoid hormone elicited tyrosine-phosphorylation events involving T-cell specific kinases* (30th FEBS 9th IUBMB, 2005. Budapest)
30. Bartis D., Boldizsár F., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *Ligand kötés hatására a glukokortikoid receptor asszociálódik a ZAP-70 kinázzal Jurkat sejtek citoplazmájában* (35. Membrán transzport konferencia, 2005. Sümeg)
31. Bartis D., Boldizsár F., **Szabó M.**, Németh P., Berki T.: *Nem-genomikus glukokortikoid hormon hatások T-sejteken: a ZAP-70 lehetséges szerepe* (MIT 35. Kongresszusa, 2005. Sopron)

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Boldizsár Ferencnek** és **Prof. Dr. Berki Tímeának**, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódjak a kutatómunkába és végig támogatták annak megvalósítását.

Köszönet illeti **Dr. Németh Péter** intézetvezető professzort, aki lehetővé tette, hogy az Intézet PhD-programjába bekapcsolódjak.

Köszönet **Dr. Bartis Domokosnak** útmutatásaiért, **Dr. Kvell Krisztiánnak** és **Dr. Czömpöly Tamásnak** a ZAP-70 pontmutáns sejtek létrehozásában nyújtott segítségért.

Hálával tartozom **Dr. Talabér Gergely** és **Dr. Lábadi Árpád** munkatársaimnak az értékes szakmai segítségükért és barátságukért.

Köszönet illeti **Dr. Engelmann Pétert** a dolgozat kritikus átolvasásáért és a sok támogatásért az élet minden terén.

Hálával tartozom **Pápa Lászlónénak** a sejtenyésztésben nyújtott rengeteg segítségért.

Köszönöm **Pálné Katona Anikónak** a szervezésekben, logisztikában és a mindennapokban nyújtott segítségért.

Köszönet illeti az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet** minden munkatársát, akik mindig támogattak munkám során.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni **családomnak** a sok türelmet, biztatást és támogatást.

**12. Melléklet**  
**(a PhD tézis alapját képező közlemények)**