

**A GLUKOKORTIKOID HORMON SZEREPE A THYMOCYTÁK SZELEKCIÓJÁBAN:  
MODELLVIZSGÁLATOK BALB/C ÉS T-SEJT RECEPTOR TRANSZGENIKUS (AND)  
EGEREKEN**

**Dr. Boldizsár Ferenc**

PTE - ÁOK  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

**Alprogramvezető:** Dr. Németh Péter

**Témavezető:** Dr. Berki Timea

P é c s  
2004

## TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	4.
<b>BEVEZETÉS</b>	5.
1. <i>A T-sejt differenciálódás lépései</i>	5.
2. <i>Szelekciós folyamatok a thymusban</i>	8.
3. <i>Humorális szabályozó tényezők a thymocyta differenciációjában</i>	10.
4. <i>A glukokortikoid receptor (GCR)</i>	11.
5. <i>A kölcsönös antagonizmus modell („mutual antagonism theory”)</i>	14.
6. <i>GCR-/- egér modellek</i>	15.
<b>CÉLKITŰZÉSEK</b>	17.
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	18.
1. <i>Egerek</i>	18.
2. <i>Vegyszerek és pufferek</i>	18.
3. <i>Monoklonális antitestek</i>	19.
4. <i>Egerek oltása és thymocyta preparálás</i>	19.
5. <i>Sejtfelszíni és intracelluláris fluoreszcens jelölés</i>	19.
6. <i>Áramlási citometria és sejtszeparálás (FACS)</i>	20.
7. <i>RNS izolálás és reverz transzkripció</i>	20.
8. <i>Real-time PCR</i>	21.
9. <i>Statisztikai analízis</i>	21.
<b>EREDMÉNYEK</b>	22.
<b>BALB/c modell</b>	22.
1. <i>DX, anti-CD3 illetve RU 486 hatása Balb/c egerek thymusának sejtes összetételére</i>	22.
2. <i>A CD69 expresszió változásai</i>	24.
3. <i>Anti-CD3 illetve DX kiváltotta apoptózis vizsgálata</i>	25.
4. <i>A thymocyta alcsoportok GCR expressziója</i>	26.
5. <i>A DX kezelés hatása a GCR expresszióra</i>	27.
<b>AND TcR transzgenikus modell</b>	31.
1. <i>Thymocyta szám változás antigén, DX illetve kombinált kezelés hatására</i>	31.

<i>2. A thymocyta összetétel változásai</i>	<b>31.</b>
<i>3. A V<math>\beta</math>3 TcR expresszió változásai PCC, DX illetve kombinált kezelésre</i>	<b>33.</b>
<i>4. A DP és CD4 SP sejtek CD69 expressziója</i>	<b>34.</b>
<i>5. Korai apoptózis vizsgálata</i>	<b>35.</b>
<b>ÖSSZEFOGLALÁS, MEGBESZÉLÉS</b>	<b>37.</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>45.</b>
<b>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK</b>	<b>46.</b>
<b>IRODALOM</b>	<b>48.</b>
<b>MELLÉKLETEK</b>	<b>57.</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIM: Activation Inducer Molecule (aktiváció indukáló molekula)

CCL: CC kemokin receptor ligand

CD: cluster of differentiation (sejtfelszíni markerek)

CREB: cAMP response element binding protein (cAMP válasz elem kötő fehérje)

CXCL: CXC kemokin receptor ligand

CyC: Cychrome

DEPC: dietil-pirokarbonát

DN: double negative (kettős negatív)

DP: double positive (kettős pozitív)

DX: dexamethason

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FL (1, 2, 3): fluoreszcencia csatornák áramlási citométeren

FTOC: fetal thymic organ culture (fetalis thymus szerv kultúra)

GC: glukokortikoszteroid hormon

GCR: GC receptor

GRE: glucocorticoid response element (glukokortikoid válasz elem)

Jnk: Jun kináz

MHC: major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási antigén)

NFAT: nuclear factor of activated T cells (aktivált T sejt nukleáris faktor)

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B

PCC: pigeon cytochrome C (galamb citokróm c)

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz lánreakció)

PE: phycoerythrin

PFA: paraformaldehid

PHEX: phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on X chromosome (X kromoszóma endopeptidázokhoz hasonló foszfát szabályozó gén)

PS: foszfatidil-szerin

RT: reverz transzkriptáz

SD: standard deviáció

SP: single positive (egyszeresen pozitív)

TcR: T-sejt receptor

## BEVEZETÉS

Az immunrendszerben található  $10^{12}$  lymphocytából naponta  $10^9$  sejt cserélődik ki [1]. Az elsődleges (primer vagy központi) nyirokszervekben keletkeznek a limfociták a limfoid őssejtekből; itt válnak elkötelezetté és itt érnek funkcióképes limfocitákká (antigén kötő receptor kialakulása) [1]. Míg a B-lymphocyták esetében az érési folyamatok a csontvelőben zajlanak, a T-sejtek prekursorai egy korai stádiumban kivándorolnak a csontvelőből és a thymust kolonizálják, ahol további proliferációs és differenciációs lépéseken keresztül érett T sejtekké alakulnak [1].

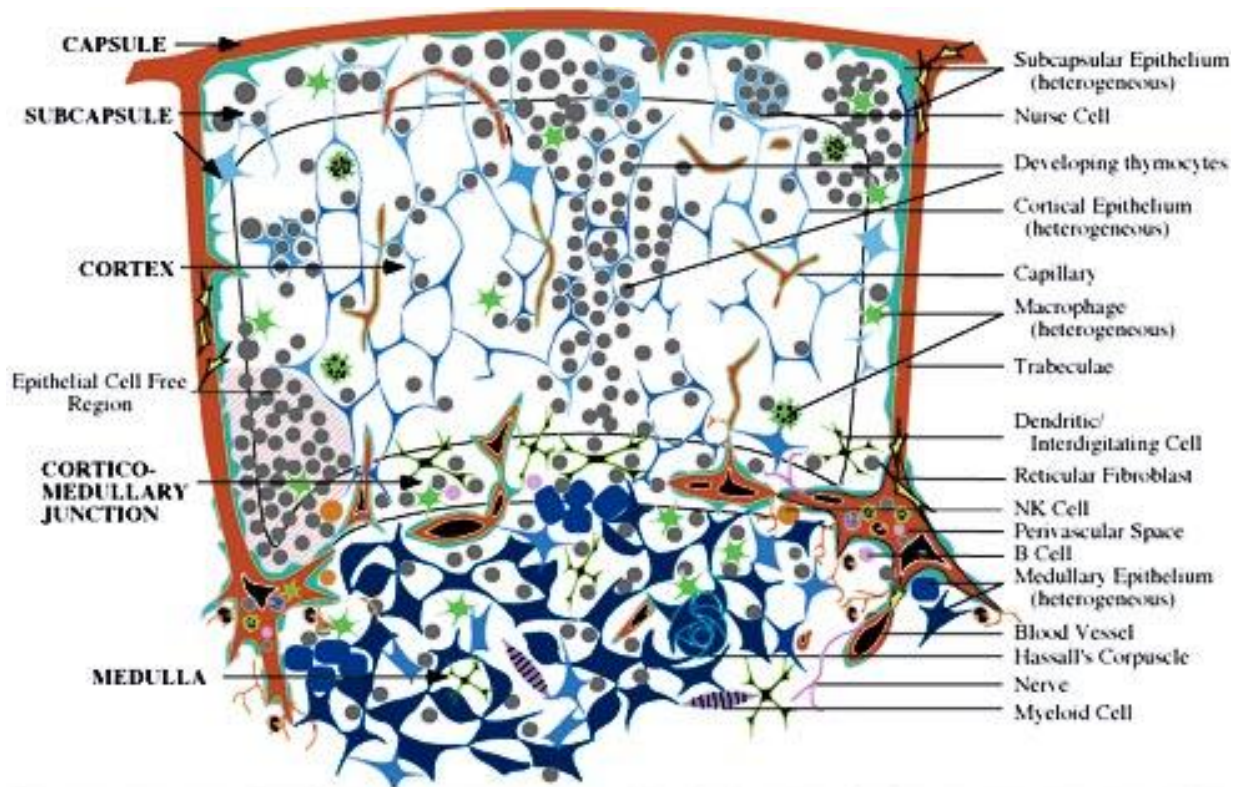
### *1. A T-sejt differenciálódás lépései*

A T-lymphocyta előalakok a közös lymphoid őssejtből differenciálódnak a csontvelőben, ahonnan a thymusba vándorolnak [2]. A korai T-sejt progenitorok CD117-t (c-kit), CD43-t (leukoszialin), integrineket CD11a-t, CD11b-t, CD29-t, CD49f-t, és CD44-t expresszálnak [3]. A T-sejt irányú elköteleződést a Notch-1 receptor jelátvitel irányítja [4]. A thymusba való homingban központi szerepet játszik a CD44 molekula, amelynek két izoformáját írták le [3]. A „v” izoforma a korai T-sejt prekursorokon expresszálódik, míg az „s” izoforma inkább az érett lymphocytákon található meg [3]. Anti-CD44„v” antitest kezeléssel gátolható volt a prekursorok migrációja a thymusba [3]. Tehát a T-sejt prekursorokat a CD44 „v” izoformája irányítja a thymusba.

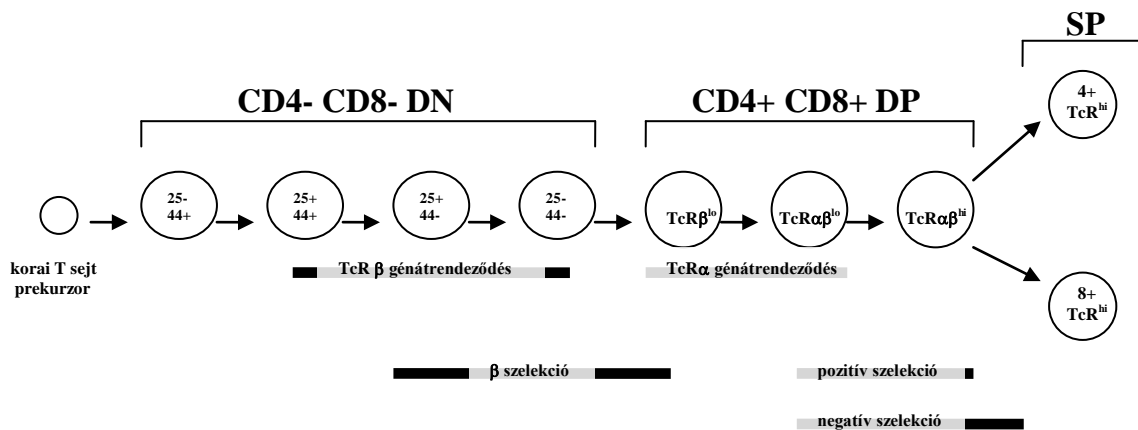
A T sejt progenitoroknak a nem hemopoetikus eredetű stróma sejtek (mesenchimalis fibroblastok illetve thymus epithel sejtek) biztosítanak megfelelő mikrokörnyezetet fejlődésükhöz [5] (1. ábra). A T sejt előalakok thymusban történő vándorlásuk során különböző mikrokörnyezetbe kerülnek, amely megfelelő jeleket biztosít a differenciáció további lépéseihez [5] (1. ábra). Thymus hiányában (emberben DiGeorge szindróma, egérben „nude” fenotípus) nem fejlődnek ki T-sejtek, ami a celluláris immunitásban okoz súlyos zavarokat. [1]. Érdekes azonban, hogy nude egérben IL-7 kezelést követően helyreáll a T-sejt képzés, ami arra utal, hogy megfelelő körülmények között extrathymikusan is lezajlik T-sejt érés [1].

A differenciációt különböző sejtfelszíni molekulák (CD25, CD44, CD4, CD8) megjelenésével illetve eltűnésével jellemezhetjük [2]. A korai T sejt előalakok a T sejt receptor (TcR) géneket még csíravonal („germ-line”) állapotban tartalmazzák, így nem képesek antigén felismerő receptor kifejezésére. A T-sejtérés jól definiált lépéseken keresztül történik [2., 6.] (2. ábra), aminek eredményeképp az éretlen, TcR -, kettős negatív (DN - CD4-/CD8-) sejtekből szigorúan szabályozott folyamatok során érett, TcR-t expresszáló, egyszeresen pozitív (CD4 SP vagy CD8 SP) sejtek keletkeznek, melyek képesek a saját és nem saját antigének elkülönítésére [1]. A thymocyták random szomatikus génátrendeződéssel alakítják ki az antigén kötésére alkalmas T sejt receptort (TcR) [1]. Ezek az ún. DP sejtek az  $\alpha\beta$ TcR megjelenése mellett már CD3, CD4 és CD8 molekulákat is expresszálnak (2. ábra) [1]. A CD4 illetve CD8 SP irányú elköteleződést a TcR MHC specificitása határozza meg („instrukciós modell”) [7], de ebben is szerepet játszhat a Notch-1 receptor szignalizáció [4].

A differenciáció mellett a thymusban jelentős sejt proliferáció is zajlik [1], amelyet a thymusban termelődő citokinek komplex mintázata szabályoz. A DN thymocyták proliferációjában központi szerepet játszik a stróma sejtek által termelt IL-7 [8] és SCF [9]. Anti-IL-7 antitest kezelés után [10], illetve IL-7 receptor deficiens egerekben csökkent thymocytaszámot írtak le [11]. SCF -/- illetve c-kit -/- egerekben szintén jelentősen csökkent a thymusban a sejtek száma [9]. A proliferáció irányításában a CD25 (IL-2 receptor  $\alpha$ -lánc) is fontos szerepet játszik [12]. Szintén proliferációt serkentő hatású az IL-12 [13], míg a TNF- $\alpha$ -nak gátló szerepet tulajdonítanak [14].



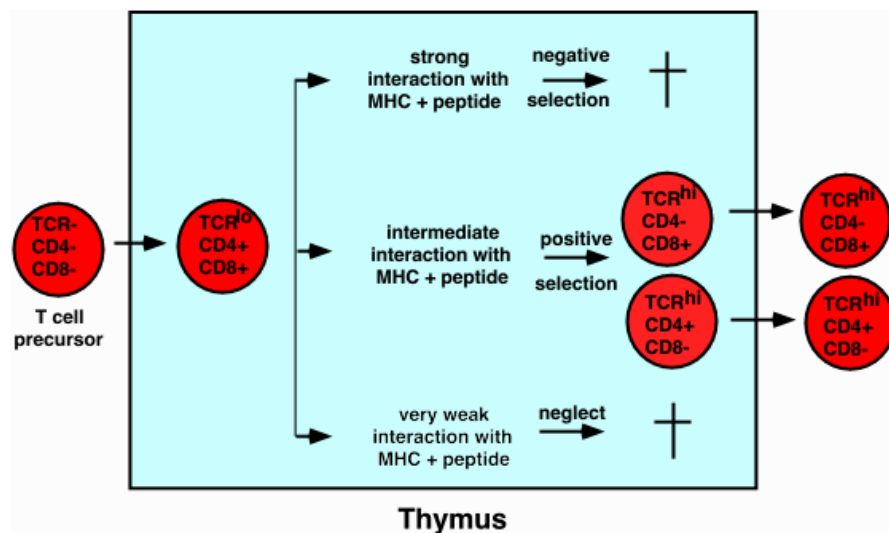
1. ábra A thymus sémás szerkezete Boyd és tsai. nyomán.



2. ábra A thymocyták érési stádiumai. DN: double negative (= CD4-, CD8- kettős negatív thymocyták); DP: double positive (= CD4+, CD8+ kettős pozitív thymocyták); SP: single positive (= CD4 vagy CD8 egyszeresen pozitív thymocyták); TcR: T cell receptor (T-sejt receptor) (Sebzda és munkatársai nyomán [6.]

## 2. Szelekciós folyamatok a thymusban

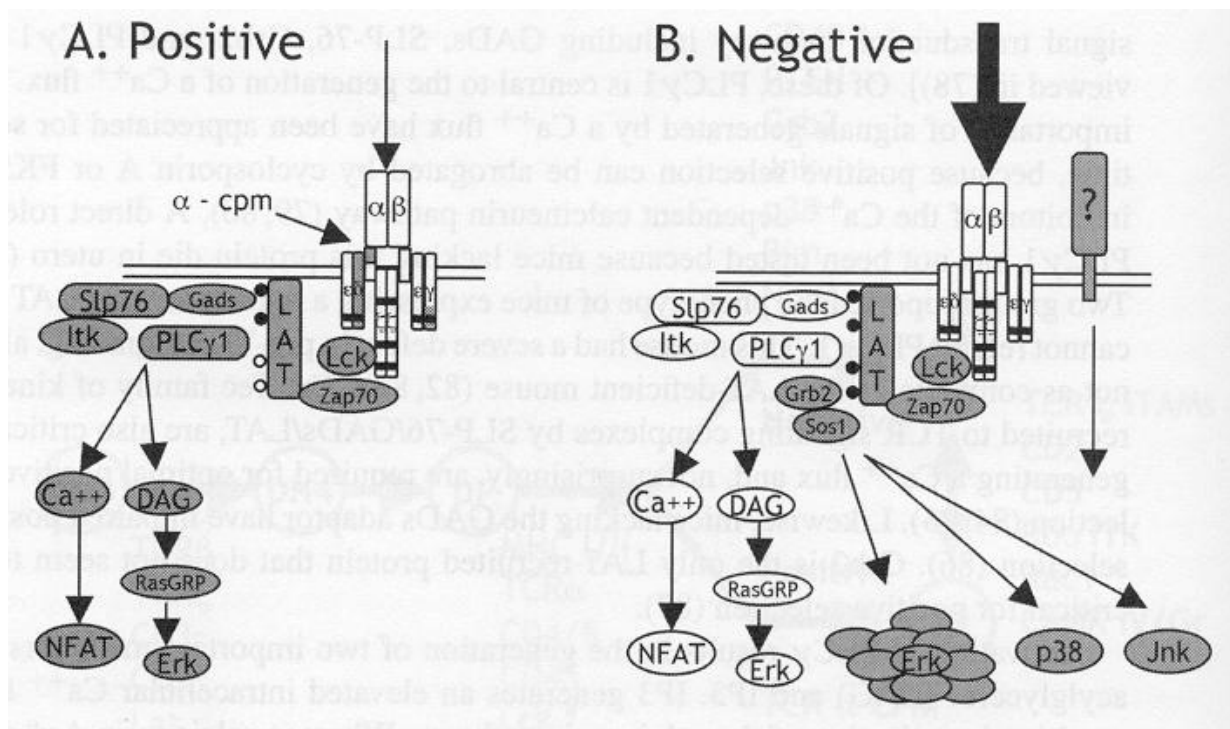
A köztes érési stádiumot képviselő kettős pozitív sejtek (DP - CD4+ és CD8+) szelekciós lépéseken esnek át [15]. A thymus kérgi részében főleg epithel sejteken, a cortico-medulláris határon pedig makrofágokon és dendritikus sejteken nagy sűrűségben expresszálódnak MHC-I és -II molekulák, melyek kulcsszerepet töltenek be a DP thymocyták szelekciójában [16]. Érdekes, hogy a szelekciós folyamatokban a TcR-en keresztül érkező szignál egyes esetekben pozitív szelekciót okoz, azaz a sejt túlél, más esetekben viszont apoptosist indukál. Ennek magyarázatára két elmélet van: a kvalitatív / peptid modell [17] és a kvantitatív / aviditás modell [18]. A kvalitatív elmélet szerint a pozitív vagy negatív szelekciót az MHC molekulán prezentált peptid fragmens dönti el, amellyel a DP sejt kapcsolatba kerül. Bizonyos peptidek pozitív szelekciós jelet, míg mások negatív jelet adnának a sejteknek [17]. A jelenleg elfogadottabb, kvantitatív elmélet szerint a TcR MHC-peptid kölcsönhatás affinitása határozza meg a szelekció irányát [18]. Eszerint a saját MHC-hez kapcsolódni nem képes, jelátvitelre nem alkalmas TcR-t expresszáló thymocyták elpusztulnak („death by neglect”), a nagy affinitású, potenciálisan autoreaktív TcR-t expresszáló thymocyták szintén kiszelektálódnak (negatív szelekció) és csak az alacsony-közepes affinitású TcR-t hordozó thymocyták élnek túl (pozitív szelekció) [18] (3. ábra).



**3. ábra** A thymocyták szelekciója (kvantitatív modell). Az MHC + peptid fragmensekkel nagy affinitással reagáló thymocyták negatívan szelektálódnak (felső nyíl). A közepes affinitással kapcsolódó DP thymocyták túlélnek (középső nyíl), pozitívan szelektálódnak, míg a saját MHC molekulákkal kapcsolódni nem képes thymocyták elpusztulnak („death by neglect”) (alsó nyíl).



Kimutatták, hogy a pozitív szelekción áteső sejteken a TcR jelátvitel főleg NFAT és Erk aktivációt okoz, míg negatív szelekció esetén Erk, p38 és Jnk aktiváció történik [15] (4. ábra). Arra nézve azonban csak feltevések vannak, hogy mi irányítja a jelátvitelt egyik vagy másik útra. Számos adat mutat arra, hogy ennek a szabályozásában a LAT fehérje foszforiláltsági foka kulcsszerepet tölthet be [15] (4. ábra).



**4. ábra** Pozitív illetve negatív szelekciós jelátviteli utak thymocytákban. **A:** Pozitív szelekció: a közepes, alacsony erősségű TcR szignál (kis affinitású ligand kötődése) parciális LAT foszforiláció révén Ca<sup>++</sup> beáramlást, majd NFAT, illetve tartós alacsony szintű Erk aktivációt okoz, ami pozitív szelekciót eredményez. **B:** Negatív szelekció: az erős TcR jel (nagy affinitású ligand kötődése) teljes LAT foszforilációt okoz, ami Jnk, p38 illetve átmeneti erős Erk aktivációhoz vezet, ami végső soron negatív szelekciót, vagyis apoptosist okoz. (in Starr et al.: Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 139-76. [15])

A pozitív szelekció egyik korai jele a CD69 expresszió fokozódása a DP sejteken [19, 20]. A CD69 vagy AIM (Activation Inducer Molecule) egy 24 kD nagyságú diszulfid hiddal összekapcsolt dimer molekula, amely a C-típusú lektinek családjába tartozik [21]. Bár a molekula fiziológiás ligandja eddig ismeretlen, a CD69 molekula stimulációja  $Ca^{2+}$  szint emelkedést [22], citokin és citokin receptor expresszió fokozódást [23], a c-myc és c-jun proto-onkogének expresszió fokozódását [24] és proliferációt eredményez [25]. CD69  $-/-$  egerekben normális haemopoetikus aktivitást írtak le. A CD69 molekula hiányában kismértékű B-sejt differenciáció eltérés mellett, normális a T-sejt érés és a perifériás T-sejt aktivitás [26].

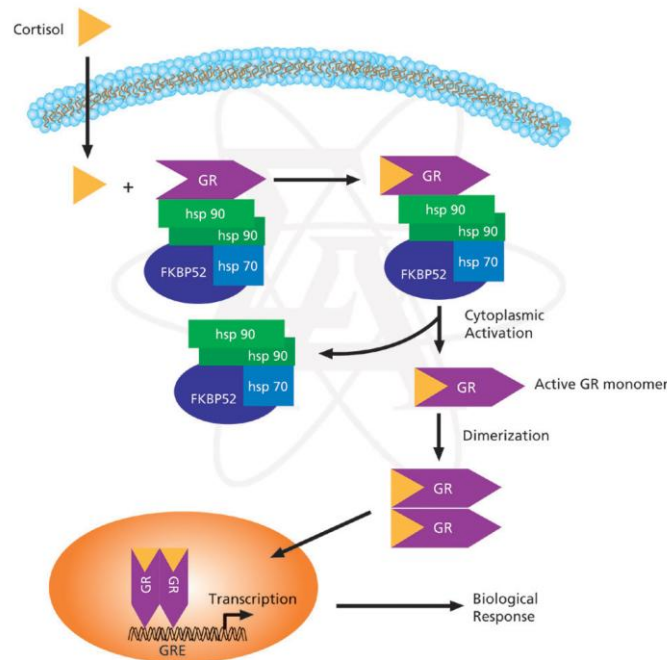
A differenciációs és szelekciós lépések eredményeképp, végül a perifériára csak a saját MHC-t felismerő, de nem autoreaktív T-sejtek kerülhetnek („thymic education”). A szelekciós folyamatok során a naponta újonnan keletkezett thymocyták körülbelül 98 %-a elpusztul [1].

### *3. Humorális szabályozó tényezők a thymocyta differenciációban*

Amellett, hogy a thymocyták érésük során folyamatosan sejt-sejt interakcióban vannak a thymus strómáját alkotó elemekkel, a helyileg termelődő különböző humorális tényezőknek is fontos szabályozó szerepük van [27]. A citokinek proliferációt irányító szerepét már az előzőekben tárgyaltuk (ld. 1.1 fejezet). A thymocyták migrációját kemokinek irányítják [28]. CXCL9 (MIG), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) és CCL25 (TECK) termelést mutattak ki a cortexben, míg CXCL10 (IP-10), CCL19 (ELC / MIP-3 $\beta$ ), CCL21 (SLC) és CCL22 (MDC) termelést a medullában. A thymusban egyéb hormon szerű anyagok is termelődnek, pl.: thymozinek, prothymozin  $\alpha$ , thymulin (FTS-Zn), thymopoietin, thymostimulin (TP-1), thymic humoral factor (THF) és THF- $\gamma$ 2 [27]. Vacchio és munkatársai 1994-ben közölték, hogy egérben a thymus epithel sejtek lokálisan glukokortikoidokat (GC) is termelnek [29] és felvetették annak a lehetőségét, hogy a GC-k szerepet játszhatnak a thymocyta szelekció szabályozásában [29]. A thymus epithel sejtek glukokortikoid termelő képességét később más munkacsoportok is kimutatták: 1999-ben Pazirandeh és munkatársai [30] illetve 2000-ben Lechner és társai [31]. Ez utóbbi munkacsoportnak később sikerült csirke thymusban és bursában kimutatni a steroid szintézishez szükséges enzimeket [32].

#### 4. A glukokortikoid receptor (GCR)

A glukokortikoid receptor (GCR) a szteroid receptor szupercsalád tagja, 3 doménből áll: hormonkötő domén, egy erősen konzervatív, DNS kötő domén és egy kevésbé konzervatív N-terminális domén építi fel [33]. Az inaktív hormon receptor a citoplazmában a hsp90, hsp70 chaperon fehérjékkel és az FKBP52 immunophilin molekulával alkot komplexet [34, 35]. Ligand jelenlétében a receptor leválik a hsp-90-ről és dimereket alkot [36], majd transzlokálódik a sejtmagba, ahol transzkripciós faktorként specifikus konzervált palindróm DNS szekvenciákhoz (GGTACAnnnTGTTCT) GRE-k („glukokortikoid response elements” = glukokortikoid válasz elemek) kötődik [37] (5. ábra).



**5. ábra** A GCR jelátviteli lépései. A citoplazmatikus GCR, ligand kötése után leválik a hsp90-hsp70-FKBP52 komplexről, majd homodimereket alkotva a magba transzlokálódik, ahol GRE-khez kötődve befolyásolják a transzkripciót.

GRE-ket (6. ábra) találtak sok gén promoter régiója körül különböző fajokban, például a patkány feniletanolamin-N-metiltransferáz [38] és béta2-adrenerg receptor génben [39], az egér tirozin-hidroxiláz [40], parathormon [41], PHEX [42] és bél típusú IIB Na-P(i)

kotranszporter génben [43], valamint a humán sgk-1 génben [44], ami magyarázhatja a GC-k szerteágazó szöveti hatásait.



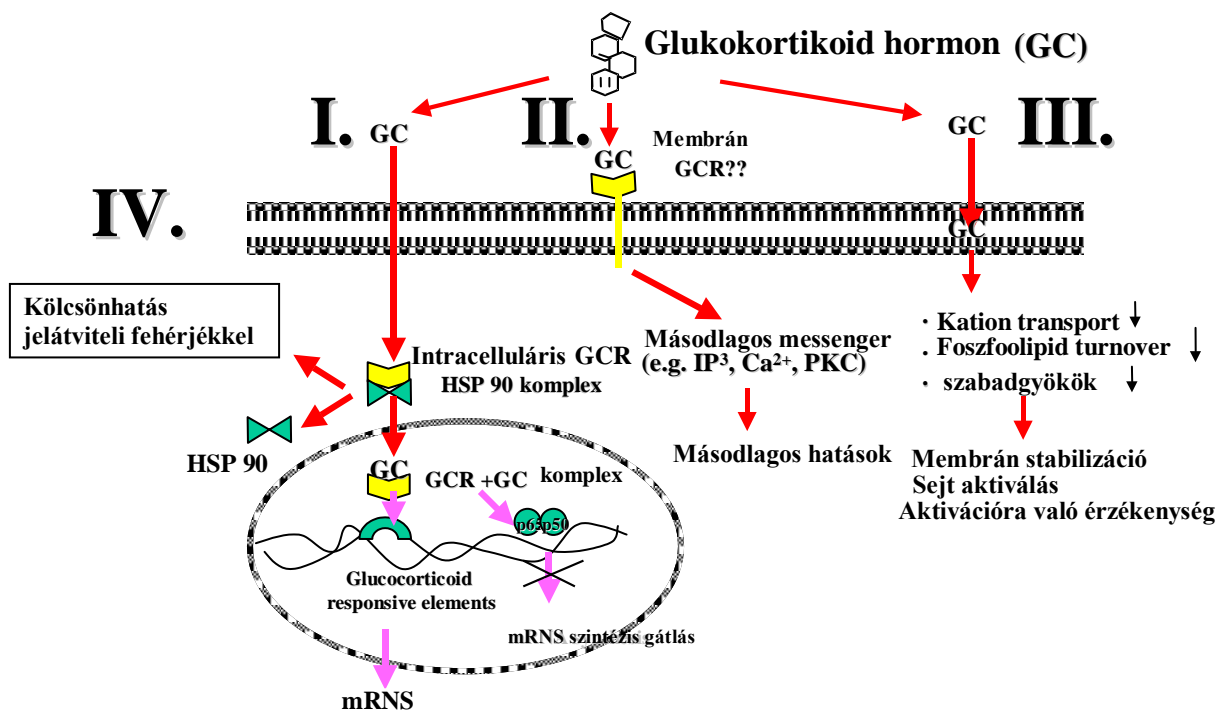
**6. ábra** GRE konszenzus szekvenciák. (MMTV: mouse mammary tumor virus, hGH: human growth hormon, MSV: murine sarcoma virus, hMT: human metallothionein, TO: tyrosine-oxidase, TAT: tyrosine-aminotransefrase)

A klasszikus genomikus szteroid hatás [36, 37] mellett az utóbbi időben három nem-genomikus hatásmechanizmus létezését is feltételezik (7. ábra) [45], a citoplazmatikus GCR kölcsönhatása más jelátviteli utakkal (pl. Src) [45], nem specifikus membránhatások [45], például az iontranszport változásai a plazma membránon keresztül [46], illetve felmerült membrán receptor létezésének lehetősége is [45].

Membrán GCR-t sikerült kimutatni CCRF-CEM (humán ALL) sejtvonalban [47], egér lymphoma sejtekben [48], növényekben [49], illetve legújabban normál perifériás fehérvérsejtekben [50]. Buttgereit és munkatársai szerint normál egészséges véradók monocytái és B-sejtjei membrán GCR-t hordoznak, és a monocyták mGCR expressziója LPS kezelés hatására fokozódik [50]. A mGCR, hasonlóan a citoplazmatikus GCR-hez, hsp-90 és hsp-70 fehérjékkel kapcsolódik [51]. Gametchu munkacsoportja korrelációt talált a glukokortikoidok lymphoid sejtekre kifejtett proapoptotikus hatásai és a sejtek mGCR expressziója között [52].

Másrészt ismeretes, hogy a hsp-90 a citoplazmában kapcsolatban van a T-sejt receptor jelátviteli kaszkád egyes kulcsfehérjéivel, például Src kinázokkal (Lck, Fyn) és a Raf-1-el [53]. Csermely Péter és munkatársai kimutatták, hogy Jurkat sejtekben anti-CD3 aktiváció után geldanamycinnel gátolható a sejtek proliferációs válasza, az IL-2 receptor upregulációja, az IL-2 szekréciónja, az Lck, a Fyn és a Raf-1 foszforilációja, valamint az IL-2 gén transzkripciója [53]. A geldanamycin gátolja a hsp-90 és a jelátviteli fehérjék kapcsolódását, ami a jelátviteli fehérjék lebomlásához, illetve alulfoszforiláltságához vezet. Elképzelésük

szerint a hsp-90 a TcR jelátvitel egyes fehérjéit megfelelő konformációban tartja, ha ez a kapcsolat felbomlik, zavart szenved a TcR jelátvitel [53]. Emellett a hsp-90 direkt szerepe is felvetődött a T sejt jelátvitelben, mivel a chaperon molekula maga is tartalmaz ITIM szekvenciákat [53]. Más szerzők is rámutattak a hsp-90 szerepére a MAPK kaszkádban, a Src kinázok, a Raf és a MEK aszociációja révén [54, 55]. Hízósejtekben dexametason kezelés gátolta a Raf-1 jelátviteli utat, a hsp-90 és a Raf-1 kapcsolódásának megakadályozásával [56].



**7. ábra** A glukokortikoidok hatásmechanizmusai, klasszikus (genomikus) (I.) és nem genomikus (II., III., IV.) útvonalak (Buttgereit és munkatársai nyomán). A nem genomikus hatások létrejöhetnek egyrészt membrán GCR-en keresztül (II.), másrészt direkt fiziko-kémiai membránhatások révén (III.) illetve a citoplazmatikus GCR és egyéb jelátviteli fehérjék kölcsönhatásain keresztül (IV.).

Az egér GCR gén kb. 110 kilobázis hosszú, 9 exonból áll, az N-terminális domént a 2-es exon, a DNS kötő cink-ujj domént a 3-as, 4-es exonok, míg a C-terminális hormonkötő domént a fennmaradó 5 exon kódolja [57]. Emberben két GCR izoforma van: az  $\alpha$  (777 aminosav) és a  $\beta$  (742 aminosav), amik a karboxil végükön különböznek egymástól [58], de egérben eddig csak egy izoformát sikerült azonosítani [59].

A GCR expressziót a GC-k autoregulálják különböző szövetekre jellemző módon [60] vagy magában a GCR génben található GRE-n keresztül, vagy más a GCR gént szabályozó transzkripciós faktorok által (pl. AP-1 [61]). Repressziót írtak le 3T3 sejtvonalban [62], humán IM-9 lymphocytákban és patkány acinus AR42J sejtekben [63], míg serkentést találtak egy humán leukémiás T-sejt vonalban (CEM-C7) [64].

Újabb adatok rámutatnak arra, hogy a GCR nem csak klasszikus transzkripciós faktorként képes egyes gének transzkripcióját befolyásolni, hanem más transzkripciós faktorokkal kölcsönhatásba lépve komplex szabályozási hálózatokban vehet részt ami magyarázhatja a szerteágazó hatásait [65]. A GCR kölcsönhatását („cross-talk”) írták le AP-1-el [66], NF- $\kappa$ B-vel [67], CREB-el [68], STAT3-al [69] illetve STAT5-el [70]. Az NF- $\kappa$ B p65 alegységével direkt fehérje-fehérje kapcsolatot mutattak ki a citoplazmában HeLa illetve F9 egér embrionális carcinóma sejtekben [67]. Az IL-6 által aktivált STAT-3 transzaktiváló/jelátvivő komplexet alkot a ligand kötött GCR-el és így IL-6 válasz elemekhez és GRE-hez kötődnek patkány hepatoma H4IIE illetve Cos-7 sejtekben [69].

##### *5. A glukokortikoidok szerepe a T-sejt differenciációban, a „kölcsönös antagonizmus modell” („mutual antagonism theory”)*

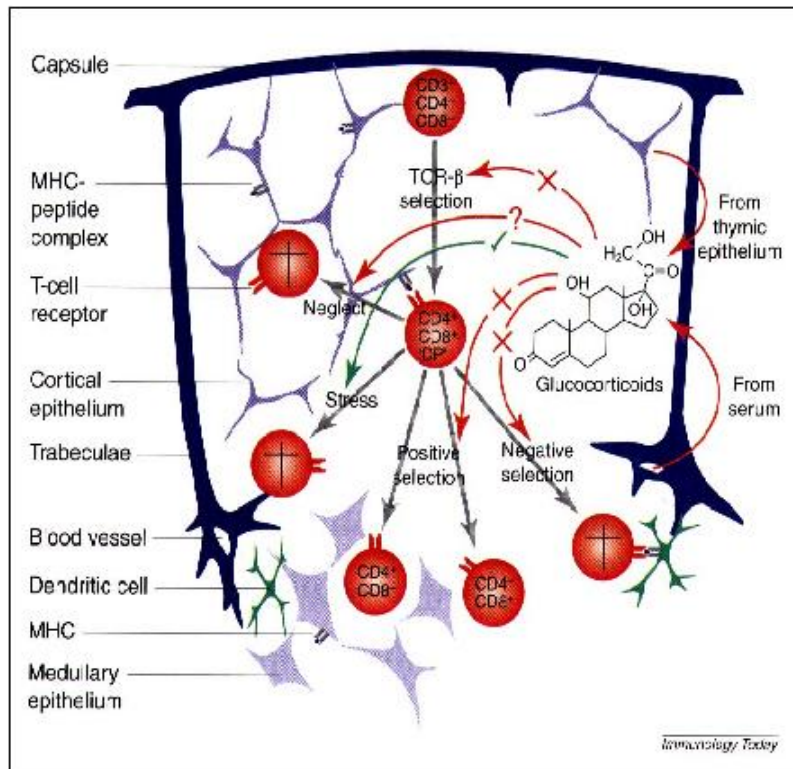
Több mint száz éve vannak adatok arról, hogy a glukokortikoidok befolyásolják a thymus működését. Star a 19. század végén felismerte, hogy mellékvese alulműködés (Addison-kór) emberben thymus hypertrophiához vezet [71]. Az 1920-as években patkány modellben megmutatták, hogy adrenalectomiát követően thymus hypertrophia alakul ki, amit adrenalinnal nem lehetett meggátolni [72, 73], illetve, hogy stressz vagy gyógyszer által indukált thymus atrophia meggátolható volt adrenalectomiával [74].

Ashwell és társai 1990-ben megjelent közleményükben T-sejt hibridómákban és Th sejtvonalakon leírták, hogy a glukokortikoszteroidok illetve a TcR-en keresztüli aktiváció által indukált apoptosis *in vitro* kölcsönösen antagonisztikusak, azaz a glukokortikoidok által kiváltott apoptosis a TcR-en keresztüli egyidejű aktivációval gátolható [75]. Ugyancsak a

fenti kutatócsoport 1994-ben közölte, hogy a thymus epithel sejtek lokálisan glukokortikoidokat termelnek és feltételezték, hogy ezek parakrin módon szabályozhatják a thymocyták érését [29]. A kölcsönös antagonizmus modell szerint („mutual antagonism theory”) a GC-k módosíthatják a TcR-en keresztül érkező szignált, így megakadályozzák a DP sejtek apoptózisát és pozitív szelekciót indukálnak [76, 77]. Azok a sejtek, amelyek egy bizonyos határérték alatti „erősségű” („subthreshold”) TcR jelet kapnak elpusztulnak „death by neglect” (részben a steroidok által indukált apoptosissal), a nagy affinitású TcR-el rendelkező DP sejtekbe olyan „erős” TcR szignál érkezik, amit a GC-k nem tudnak antagonizálni, ez negatív szelekcióhoz vezet. Végül azok a DP sejtek élnek túl (pozitív szelekció), amelyek „közepes erősségű” TcR jelet kapnak GC-k jelenlétében [78]. Tehát mind a TcR szignál, mind a GC szignál apoptosist okoz, ha azonban együtt érik a DP sejteket, túléléshez, pozitív szelekcióhoz vezetnek.

## 6. GCR<sup>-/-</sup> egér modellek

Más kísérletek ugyanakkor azt mutatták, hogy a glukokortikoid hormon nem vesz részt a pozitív szelekció szabályozásában. A Cole és munkatársai által előállított GCR<sup>-/-</sup> egerek [79] thymusában normális thymocyta differenciáció zajlik (sem a pozitív sem a negatív szelekcióban nem találtak eltérést a normál vad típusú egerekhez képest) annak ellenére, hogy teljesen rezisztensek a GC-k által indukált apoptosissra [80]. Ez az adat ugyan megkérdőjelezi a glukokortikoidok thymocyta fejlődésben betöltött szerepét (8. ábra) [81], de az eltéréseket magyarázhatják a kísérleti rendszerek közti különbségek. A GCR<sup>-/-</sup> egerek életképtelenek, születésük után néhány órával elpusztulnak légzési elégtelenség miatt [79] ezért csak *ex vivo* illetve FTOC (fetal thymus organ culture) kísérleteket lehet velük végezni [80]. FTOC-ban *in vitro* hoznak létre fetalis thymusból származó DN thymocyta és epithel sejtekből álló aggregátumot [82]. Bár 12 nap után FTOC-ban is kimutatható érett SP sejtek megjelenése [82], mégis kérdés mennyiben tekinthető ez a thymocyta differenciáció ekvivalensnek azzal, ami *in vivo* zajlik normál felnőtt egerekben.



**8. ábra** Cole és munkatársai szerint a GC-k nem játszanak kritikus szerepet a thymocyta differenciációban. (in [81])

Mások által előállított GCR antisense egerekben leírt adatok sok esetben ellentmondásosak: King és társai (Ashwell munkacsoport) által előállított GCR antisense egérben csökkent thymocyta számot és DP sejt arányt találtak [83]. Sacedon és társai ezzel szemben felnőtt GCR antisense egerekben fokozott thymocyta számot figyelt meg, jelentős stroma sejt defektusokkal, normális apoptosis mellett, fetalisan viszont fokozott apoptosist és részleges differenciációs blokkot írtak le [84]. Morale és társai fokozott DP sejt arányt írtak le GCR antisense egérben [85]. Az antisense egerekben kapott eredmények ellentmondásossága és az a tény, hogy ezekben az állatokban a GCR expresszió egy jelentős része megmarad (kb. 50 %-a a vad típusnak) megkérdőjelezi a modell használhatóságát a GC-k szerepének vizsgálatában.



## **CÉLKITŰZÉSEK**

A glukokortikoidok T sejt fejlődésben betöltött szerepének tisztázására kétféle modellen végeztünk kísérleteket: BALB/c és TcR transzgenikus AND beltenyésztett egereken. BALB/c modellben a GC-k hatásait tudtuk elsősorban tanulmányozni, a TcR szignál helyettesítésére pedig anti-CD3 antitest kezelést alkalmaztunk. A TcR transzgenikus modellben viszont lehetőségünk nyílt a TcR specifikus antigén felhasználásával közvetlenül a TcR GC kölcsönhatás vizsgálatára.

### **BALB/c egér modell:**

1. Vizsgáltuk, hogy a nagy és kis dózisu szintetikus GC (dexamethason – DX) kezelés hogyan módosítja a thymocita alcsoportok megoszlását és gátolható-e ez GC antagonistá előkezeléssel?
2. Befolyásolja-e az anti-CD3 antitest kezeléssel kiváltott TcR aktivációt a nagy, illetve a kis dózisu GC kezelés, kiváltható-e így a DP thymocyták fokozott pozitív szelekciója?
3. A thymocita alcsoportok citoplazmatikus GCR- és GCR mRNS expressziójának jellemzése és változásainak követése nagy, illetve kis dózisu szintetikus GC kezelés hatására GC antagonistá előkezelés után vagy nélkül.
4. A szintetikus GC ill. GC antagonistá hatás időfüggésének vizsgálata GCR mRNS ill. protein expresszió szintjén.

### **TcR transzgenikus egér (AND) modell:**

1. Az antigén ill. GC kezelés hatásainak vizsgálata a thymocita összetételre valamint a pozitív és negatív szelekcióra.
2. A fenti kezelés hogyan befolyásolja a transzgént hordozó V $\beta$ 3 TcR sejtek arányát az egyes thymocita alcsoportokon belül?
3. Hogyan befolyásolja a GC, illetve antigén hatás a thymocyták apoptosizását?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *1. Egerek*

3-4 hetes (10-15 g-os) BALB/c illetve AND TcR V $\beta$ 3V $\alpha$ 11 galamb citokróm C (pigeon cytochrome C – PCC) transzgenikus egértörzseket [86] használtunk kísérleteinkben. A transzgenikus egerekben a PCC specifikus TcR-t hordozó T-sejtek I-E<sup>k</sup> (MHC-II) molekulán prezentált peptideket képesek felismerni. Az egereket SPF körülmények között tenyésztettük. A különféle kezeléseket követően az állatokat gyors dekapitációval öltük le. Az állatkísérleteket a PTE állatkísérleti szabályainak megfelelően végeztük.

### *2. Vegyszerek és pufferek*

GC hormon analógnak Dexamethasont (DX) (Oradexon, Organon) (4 mg/ml törzsoldat) használtunk, amely az Organontól (N.V. Organon Oss Holland) származott. Az RU 486-ot (Mifepristone) (10mg/ml törzsoldat etanolban) és a galamb citokróm C-t (PCC) (10 mg/ml törzsoldat) a Sigmától szereztük be. RNS izoláláshoz Tri Reagenst (Sigma) és glikogént (Sigma), a genomikus DNS emésztésére Deoxyribonuclease I-t (Sigma) használtunk. A reverz transzkripciót M-MLV RT, RNase H (-) pont mutáns enzimmel (Promega) vagy SuperScript II RNase H (-) reverz transzkriptázzal (Invitrogen), oligothymidylic acid (Sigma) és RNaseOut recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) jelenlétében végeztük. A real-time PCR reakciókhoz Light-Cycler – Fast Start DNA Master SYBR Green I kitet (Roche) használtuk. A sejteket foszfát pufferolt sóoldatban (PBS) mostuk és tartottuk felhasználásukig. A sejtfelszíni jelöléseket 0.1 % NaN<sub>3</sub> és 0.1 % BSA tartalmú jelölő pufferben, az intracelluláris jelöléseket pedig 0.1 % szaponin, 0.1 % NaN<sub>3</sub> és 0.1 % BSA tartalmú (szaponin puffer) pufferekben végeztük. Az Annexin V jelöléshez Annexin jelölő puffert (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl és 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) használtunk. Intracelluláris jelölést megelőzően a sejteket 4 %-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk. A sejteket a jelölések után 500  $\mu$ l 0.1 %-os PFA tartalmú PBS-ben vettük fel.

### *3. Monoklonális antitestek*

Phycoerythrin (PE) konjugált patkány anti-egér CD4 (H 129.19 klón, BD Pharmingen, CA), CyChrome (CyC) konjugált patkány anti-egér CD8 (53-6.7 klón, BD Pharmingen, CA), FITC konjugált patkány anti-egér CD8  $\alpha$  (IBL-3/25 klón) [87], FITC konjugált hörcsög anti-egér CD69 (HI.2F3, Serotec), PE konjugált hörcsög anti-egér V $\beta$ 3 TcR (KJ25 klón, BD Pharmingen, CA), FITC konjugált egér anti-GCR (5E4 klón) [88], hörcsög anti-egér CD3 (145.2C11 klón). A korai apoptotikus sejteket AnnexinV-FITC (Pharmingen) jelöléssel azonosítottuk.

### *4. Egerek oltása és thymocytá preparálás*

BALB/c egereket alacsony (1 mg / ttkg) ill. magas dóziszú (10 mg / ttkg) DX-al oltottunk 100  $\mu$ l PBS-ben i.p., majd azt 24 óra múlva megismételtük. A thymusokat a második oltás után 24 órával izoláltuk. A DX hatás időfüggésének vizsgálatakor egyszer oltottunk magas dóziszú DX-al az egereket, majd ezt követően különböző időpontokban öltük le az állatokat. A GC hatás gátlására RU 486 előkezelést alkalmaztunk (1 mg / ttkg, 100  $\mu$ l szezámolajban oldva, i.p.) 2 órával a DX beadása előtt. Az anti-CD3 antitestet 50  $\mu$ g / állat dózisban, 100  $\mu$ l PBS-ben i.v. adtuk.

AND egereket PCC-vel (40  $\mu$ g / állat, 100  $\mu$ l PBS-ben), magas vagy alacsony dóziszú DX-al illetve a PCC és alacsony dóziszú DX kombinációjával oltottunk i.p., majd 24 óra múlva megismételtük a kezelést. Kontrollként csak PBS-el oltott állatokat használtunk.

Az állatok thymusát eltávolítás után PBS-ben homogenizáltuk, majd mostuk, szortoláshoz  $10^7$ , áramlási citometriára  $10^6$ , AnnexinV jelölésre pedig  $5 \times 10^5$  sejt / minta sejtszámot állítottunk be.

### *5. Sejt felszíni és intracelluláris fluoreszcens jelölés*

Háromszoros jelöléseket használtunk a thymocyták CD4, CD8, CD69 vagy CD4, CD8, V $\beta$ 3 vagy CD4, CD8, AnnexinV vagy CD4, CD8 és GCR molekulák expressziójának párhuzamos áramlási citometriás detektálására. A sejt felszíni molekulák jelöléséhez  $10^6$  sejtet inkubáltunk jelölő pufferben a megfelelő antitest kombinációkkal 30 percig, 100  $\mu$ l jelölő pufferben, majd kétszer mostuk a mintákat PBS-ben és végül 500  $\mu$ l 0.1 %-os PFA, PBS-ben

vettük fel. A citoplazmatikus GCR jelöléshez a mintákat 20 perc 4 %-os PFA fixálást követően szaponin pufferben mostuk kétszer, majd 30 percig inkubáltuk antitest jelenlétében 100 µl szaponin pufferben, ezután kétszer mostuk szaponin pufferben, egyszer pedig PBS-ben, végül pedig 500 µl 0.1 %-os PFA, PBS-ben vettük fel. Az AnnexinV jelöléshez a mintákat 15 percig inkubáltuk szobahőn AnnexinV-FITC-el 100 µl Annexin kötő pufferben, majd 400 µl Annexin kötő pufferrel felhígítottuk és azonnal lemértük áramlási citométeren.

#### *6. Áramlási citometria és sejtszeparálás (FACS)*

A mintákat FACS Calibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose, CA) mértük, a Cell Quest Software segítségével. A thymocytákat nagyság és granularitás alapján kapuztuk, a kezeletlen thymocyták kapuját használtuk az összes minta analíziséhez. A thymocyta szubpopulációkat CD4 és CD8 fluoreszcens jelük alapján határoztuk meg. Az egyes alcsoportok CD69-FITC, Vβ3-PE, GCR-FITC vagy AnnexinV-FITC fluoreszcencia értékeit fluoreszcens hisztogramokon ábrázoltuk, majd az átlag fluoreszcencia intenzitásokat hasonlítottuk össze, illetve a pozitívan jelölt sejtek százalékos arányát vizsgáltuk. A thymocyta alcsoportok szétválasztását FACS Vantage SE (Becton Dickinson, San Jose, CA) berendezéssel végeztük a Cell Quest Pro software segítségével. A sejteket CD4 / CD8 fluoreszcens jelük alapján (FL2-FL3 csatornán mért fluoreszcencia) alapján szeparáltuk, így 90 % feletti tisztaságú DN, DP, CD4 ill. CD8 SP sejtszoportokat nyertünk.

#### *7. RNS izolálás és reverz transzkripció*

Teljes thymocyta minták esetén  $10^7$  sejtől, szortolt minták esetén pedig  $5 \times 10^5$  sejtől izoláltunk totál RNS-t Tri Reagens-el a gyártó utasításai szerint. Röviden a sejteket Tri Reagensben lizáltuk, majd 1-bromo-3-kloro-propán hozzáadása után elválasztottuk a minták fehérje, DNS és RNS frakcióit. Az RNS frakció (vizes fázis) leszívása után további kicsapási (izopropanol, 70 % etanol) lépésekben tisztítottuk az RNS-t. Az alacsonyabb sejtszámú szortolt minták esetén 10 µg glikogén hozzáadásával tovább fokoztuk az RNS kicsapódását. Végül DEPC vízben oldottuk az RNS-t, majd a minták RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriás úton (260 ill. 280 nm-en mért fényelnyelés alapján) ellenőriztük. 1 µg RNS-ből végeztünk reverz- transzkripciót 0.5 µg oligo(dT)<sub>16</sub>, M-MLV RT 1 X reakció puffer,

1 mM minden dNTP, 40 egység RNase Inhibitor és 1 egység M-MLV RT enzim (Promega) vagy SuperScript II reverz transzkriptáz (Invitrogen) jelenlétében.

### 8. *Real-time PCR*

A cDNS mintákból real-time PCR-t végeztünk  $\beta$ -aktin (forward: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC-3', reverz: 5'-TCT GCG CAA GTT AGG TTT TGT C-3', termék mérete 825 bp,  $T_m$ : 57 °C) és egér GCR (forward: 5'-TGG TGT GCT CCG ATG A-3', reverz: 5'-AGG GTA GGG GTA AGC-3', termék mérete: 328 bp,  $T_m$ : 60 °C) primerekkel Roche Light Cycler készüléken LightCycler – Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit-el. A reakciókeverék (20  $\mu$ l / kapilláris cső) 4 mM  $MgCl_2$ -t, 0.5  $\mu$ M primert, 1  $\mu$ l cDNS-t és 2  $\mu$ l LightCycler - Fast Start DNA Master SYBR Green I-t tartalmazott DEPC vízben. A SYBR green fluoreszcenciát az aktin primer esetében 87 °C-on, GCR primer esetén pedig 82 °C-on mértük a 35 ciklus hosszúságú reakciók során. A reakciók specificitását olvadási görbe analízissel (patkány-egér aktin olvadási hőmérséklet: 89 °C, GCR olvadási hőmérséklet: 84 °C) ill. gélelektroforézissel ellenőriztük. Mindkét primerrel relatív kvantifikációt végeztünk: először hígítási sor segítségével kiszámoltuk a reakciók hatékonyságát, majd a görbék x-tengelyre extrapolált metszési pontjait összehasonlítva kiszámoltuk a cDNS-ek relatív koncentrációit, amit az aktin cDNS koncentráció értékekkel korrigáltunk.

### 9. *Statisztikai analízis*

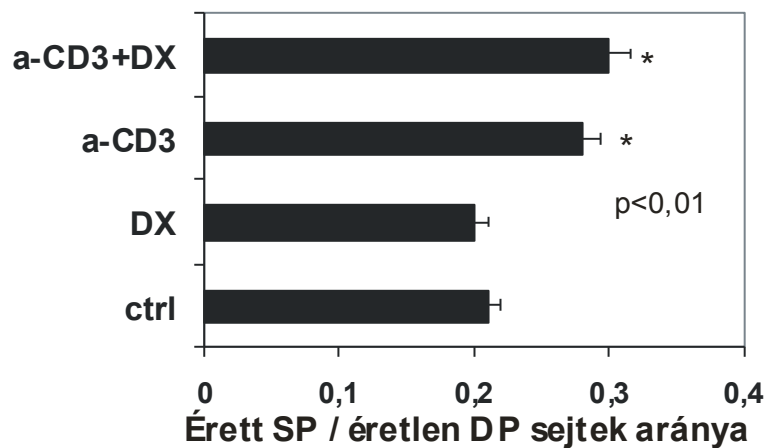
A különböző kezelések hatásainak szignifikanciáját Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze.  $P < 0.05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### BALB/c modell

#### 1. DX, anti-CD3 illetve RU 486 kezelés hatása BALB/c egerek thymusának sejtes összetételére

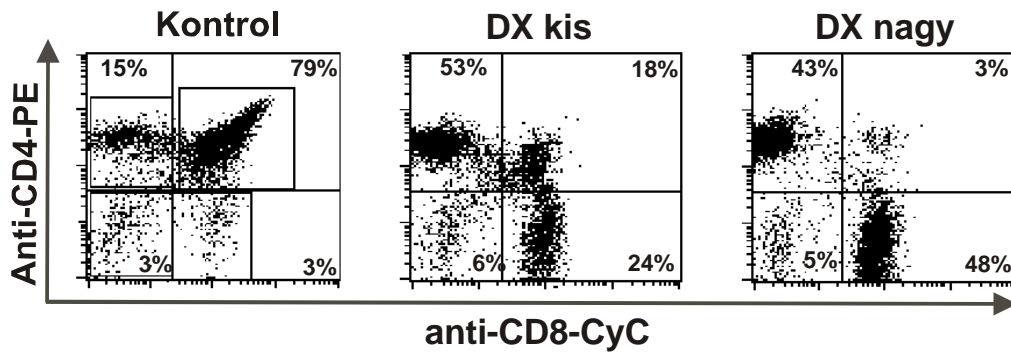
3-4 hetes BALB/c egerek thymusában a thymocyták tipikus megoszlása: 2-3 % DN, 70-80 % DP, 8-15 % CD4 SP és 4-5 % CD8 SP sejt, azaz az éretlen, átmeneti érési stádiumot képviselő DP thymocyták jelentős túlsúlya figyelhető meg az érett sejtekhez viszonyítva. Mivel az érett SP sejtek és az éretlen DP sejtek aránya jól jellemzi a thymusban zajló T-sejt differenciációt, ezért megvizsgáltuk az érett (CD4 SP és CD8 SP sejtek) valamint az éretlen (DP) sejtek arányának változásait (9. ábra). Egyszeri anti-CD3 kezelés, és kombinált anti-CD3 + alacsony dózisú DX kezelések hatására szignifikánsan nőtt az érett – éretlen sejtek aránya (mindkét esetben körülbelül 0.3) (9. ábra), míg alacsony dózisú DX kezelés önmagában nem befolyásolta ezt az arányt (0.2) a kontrolhoz viszonyítva (0.21) (9. ábra).



**9. ábra** Érett (SP) és éretlen (DP) thymocyta arány változásai egyszeri DX, anti-CD3 vagy kombinált kezelések hatására.

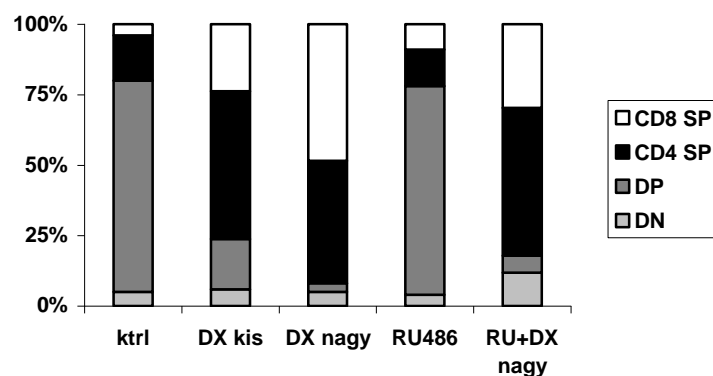
Mivel az egyszeri kezelések csak kismértékű változásokat okoztak a thymocyták összetételében, megvizsgáltuk az ismételt DX kezelések hatását is. A DP sejtarány szignifikánsan csökkent ismételt alacsony illetve magas dózisú DX kezelésre (18 % illetve 3 %-ra) a kontrolhoz viszonyítva (79 %) (10. ábra). Az érett CD4 SP és CD8 SP sejtek aránya

viszont fokozódott mind alacsony, mind magas dóziszú DX hatására (CD4 SP 53 % illetve 43 %; CD8 SP: 24 % illetve 48 %) a kontrolhoz képest (CD4 SP: 15 %; CD8 SP: 3 %) (10. ábra). A DN sejtek aránya nem változott a DX kezelések hatására (10. ábra).



**10. ábra.** Thymocyta populációk változásai BALB/c egérben ismételt nagy illetve kis dóziszú DX kezelések hatására. A flow citometriás ábrán egy reprezentatív kísérlet adatait tüntettük fel. A thymocyta alcsoportokat anti-CD4-PE és anti-CD8-CyC jelölés után áramlási citométeren különítettük el egymástól.

Ezek után vizsgáltuk, hogy egy GC antagonistával (RU 486) gátolhatók-e a thymus összetételének DX indukált változásai. RU 486 előkezelés nem gátolta a thymocyta alcsoportok arányaiban DX kezelések hatására kialakuló változásokat (11. ábra), és az RU 486 kezelés önmagában nem okozott a thymocyta arányban eltérést (11. ábra).

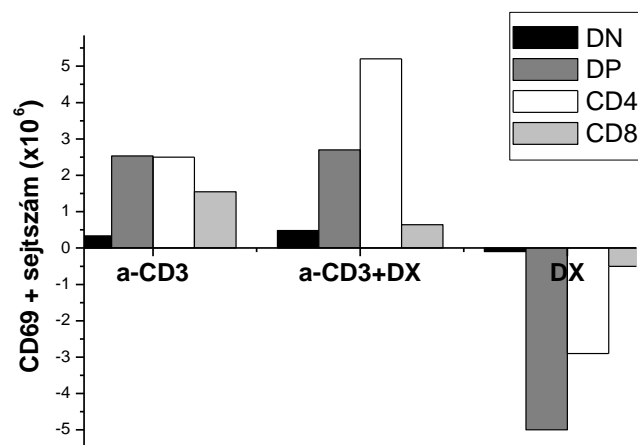


**11. ábra** Thymocyta összetétel változásai ismételt kis illetve nagy dóziszú DX, RU486 vagy kombinált kezelésre BALB/c egérben. Az oszlopok a thymocyták százalékos összetételét jelzik áramlási citometriás analízis után.

A fenti adatokból kiszámolva az érett SP / éretlen DP arányokat, a kontrollban tapasztalt 0.27-ről ismételt kis illetve nagy dózisú DX kezelés hatására szignifikáns növekedést találtunk (4.28-ra, ill. 30.34-re) az egyszeri DX oltásokhoz viszonyítva (9. ábra), ami nem volt gátolható RU 486-al. Az RU486 kezelés önmagában nem változtatta meg a thymus összetételét.

## 2. A CD69 expresszió változásai

A CD69 expresszió fokozódása a DP és CD4 SP sejteken a pozitív szelekció egyik jellemző markere [19, 20]. Ezért megvizsgáltuk a kis dózisú DX, anti-CD3 és kombinált kezelés hatásait a thymocyták CD69 expressziójára (12. ábra). A CD69 pozitív DP sejtek száma szignifikánsan nőtt mind anti-CD3 ( $2.5 \times 10^6$ -al több CD69+ DP sejt, mint a kontrollban), mind kombinált anti-CD3 és DX kezelésre ( $2.5 \times 10^6$ -al több CD69+ DP sejt, mint a kontrollban) (12. ábra). A CD69 pozitív CD4 SP sejtszámot az anti-CD3 kezelés önmagában is fokozta ( $2.5 \times 10^6$ -al több CD69+ DP sejt, mint a kontrollban), a kombinált anti-CD3 és DX kezelés pedig még további növekedést okozott ( $5 \times 10^6$ -al több CD69+ CD4 SP sejt, mint a kontrollban) (11. ábra). A DX kezelés önmagában jelentősen csökkentette a CD69 pozitív DP ( $5 \times 10^6$ -al kevesebb CD69+ DP sejt, mint a kontrollban) illetve CD4 SP ( $3 \times 10^6$ -al kevesebb CD69+ CD4 SP sejt, mint a kontrollban) sejtek számát (12. ábra).



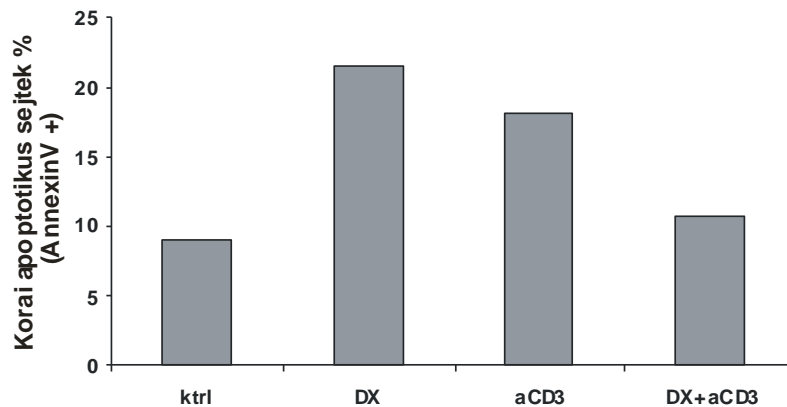
**12. ábra** A CD69 + sejtszám változásai az egyes thymocytá alcsoportokban. Az ábrán a kontrol, kezeletlen állatok CD69 + sejtszámát vettük nullának, a kezelések hatásait ehhez viszonyítottuk.



Ezek az adatok arra utalnak, hogy az anti-CD3 önmagában és DX-al kombinálva is pozitív szelekciót váltott ki BALB/c egérben, a DX önmagában viszont nem fokozta a pozitív szelekciót..

### 3. Anti-CD3 illetve DX kiváltotta apoptózis vizsgálata

A thymocyták érésében és szelekciójában kulcsszerepet játszik az apoptózis [1]. Ismert, hogy a DX kezelés illetve a TcR-CD3 komplexen keresztül kiváltott jelátvitel is apoptózist válthat ki T sejt hibridómákban [75] illetve thymocytákban [76]. A programozott sejthalál egyik nagyon korai eseménye a sejtmembránban a foszfatidil-szerin (PS) molekuláknak a belső lipid rétegből a külsőbe való transzlokációja [89]. A külső lipid rétegben megjelenő PS molekulákat AnnexinV-el lehet kimutatni [90], ezért a korai apoptotikus sejteket AnnexinV jelölés után áramlási citométeren detektáltuk. DX vagy anti-CD3 kezelés hatására nőtt a korai apoptotikus sejtek aránya (21.5 illetve 18.1 %-ra) a kontrolhoz képest (9 %), míg a kombinált kezelésre nem változott szignifikánsan a korai apoptotikus sejtarány (10.7 %) (13. ábra).



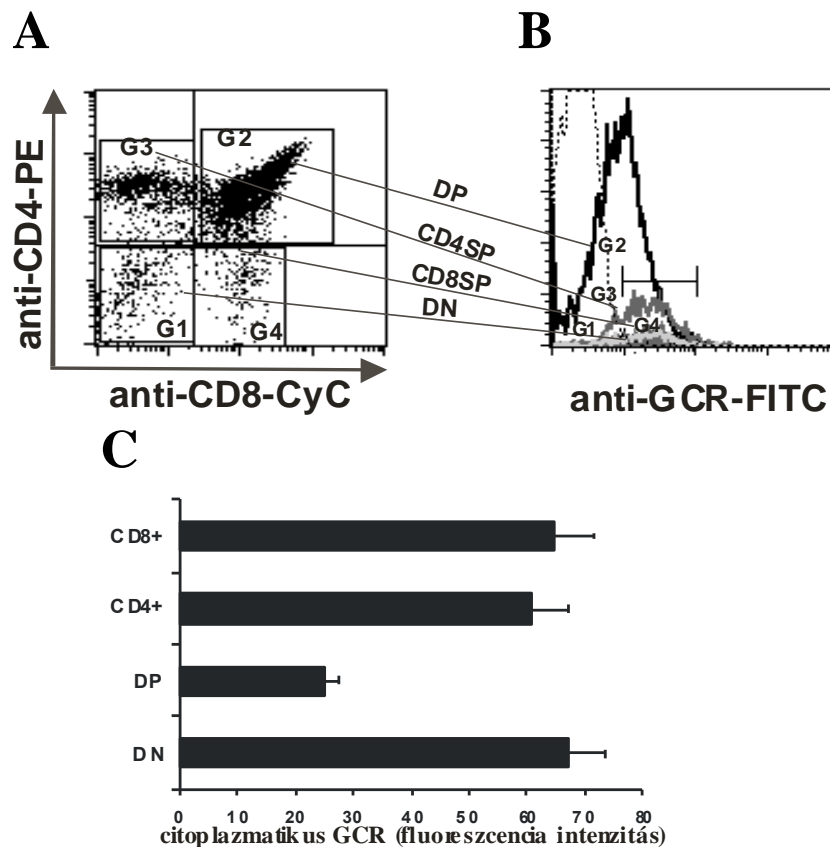
**13. ábra** A korai apoptotikus sejtek arányának változásai BALB/c thymusban DX, anti CD3 vagy kombinált kezelésekre. Az oszlopok az AnnexinV pozitív sejtek százalékos arányát mutatják.

Tehát a CD3 molekulán keresztül érkező, illetve a GC jelek önmagukban fokozták a korai apoptotikus sejtek számát *in vivo*, együttesen azonban a thymocyták túlélését eredményezték.

#### 4. A thymocyta alcsoportok GCR expressziója

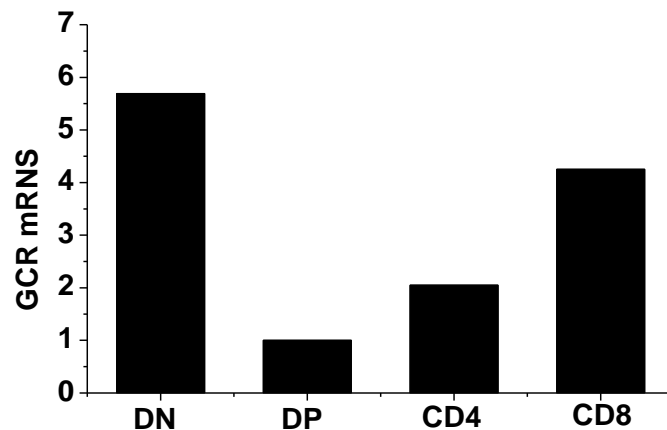
Mivel irodalmi adatok felvetették, hogy a thymocyták eltérő szinten expresszálják a GCR-t, mint a periférás T-sejtek [91], illetve hogy az egyes thymocyta alcsoportok eltérő GC érzékenységet mutattak [92], megvizsgáltuk a thymocyták GCR expresszióját fehérje és mRNS szinten.

A thymocyta alcsoportok citoplazmatikus GCR fehérje szintjét áramlási citométeren jellemeztük (14. A, B ábra). DP sejtekben mértük a legalacsonyabb GCR expressziót, ezeket követték a CD4 SP, CD8 SP és DN sejtek (14. C ábra).



**14. ábra** BALB/c thymocyta alcsoportok citoplazmatikus GCR fehérje expressziója. A thymocyta alcsoportokat anti-CD4-PE és anti-CD8-CyC sejt felszíni jelölés segítségével FL2-FL3 dot-ploton különítettük el (A), majd az egyes csoportok intracelluláris GCR-FITC jelölődését hisztogramokon analizáltuk (B). GCR expresszió (fluoreszcencia intenzitás) a különböző thymocyta csoportokban (C).

Az egyes thymocyta alcsoportok GCR mRNS expresszióját a sejtek szeparálása után real-time PCR-el jellemeztük. DP thymocytaiban találtuk a legalacsonyabb a GCR mRNS szintet, a CD4 sejtekben kétszeres, a CD8 SP sejtekben körülbelül négyszeres, a DN sejtekben pedig 5.5-szeres GCR mRNS szintet mértünk a DP sejtekéhez viszonyítva (15. ábra). A GCR mRNS szint változásokat a minták aktin expresszió szintjéhez korrigáltuk.



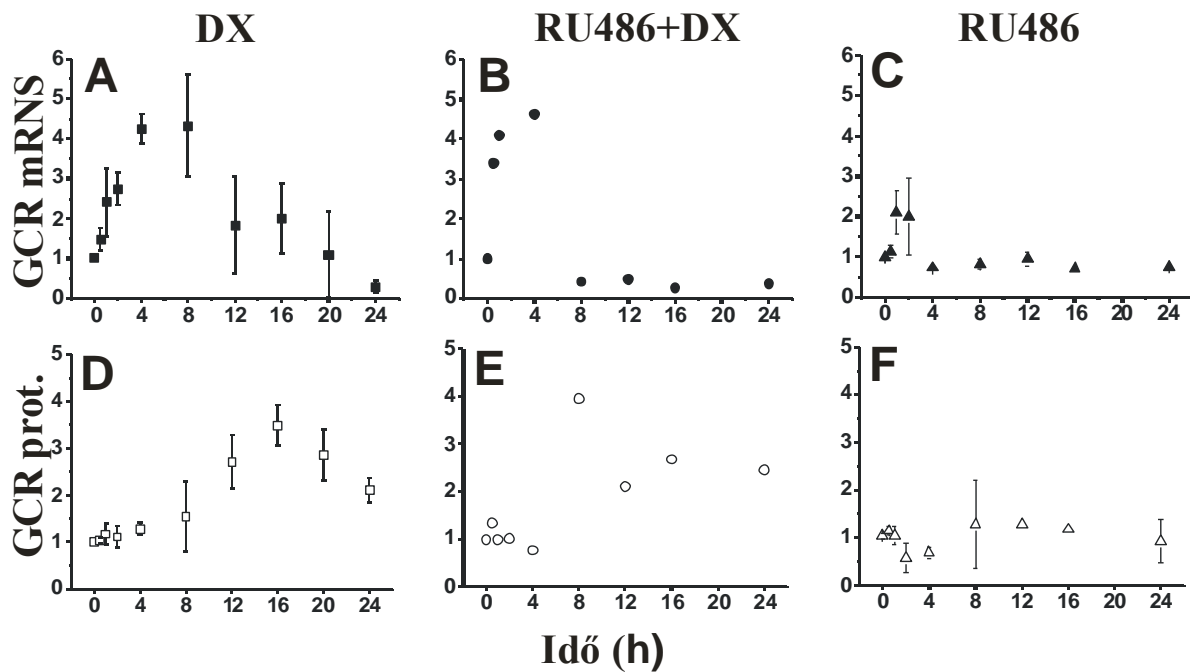
**15. ábra** BALB/c thymocyta alcsoportok GCR mRNS expressziója. Az oszlopok a relatív kvantifikálás utáni real-time PCR értékeket mutatják.

A flow citometriával mért citoplazmatikus GCR fehérje szintek és a real-time PCR-al kapott GCR mRNS szintek jól korreláltak (lásd 14. C és 15. ábrák). Érdekes módon a DP sejtek mutatták a legalacsonyabb GCR expressziót, holott ez a thymocyta alcsoport a legérzékenyebb a GC hatásokra. Ennek pontos oka, illetve jelentősége egyelőre nem ismeretes.

#### *5. A DX kezelés hatása a GCR expresszióra*

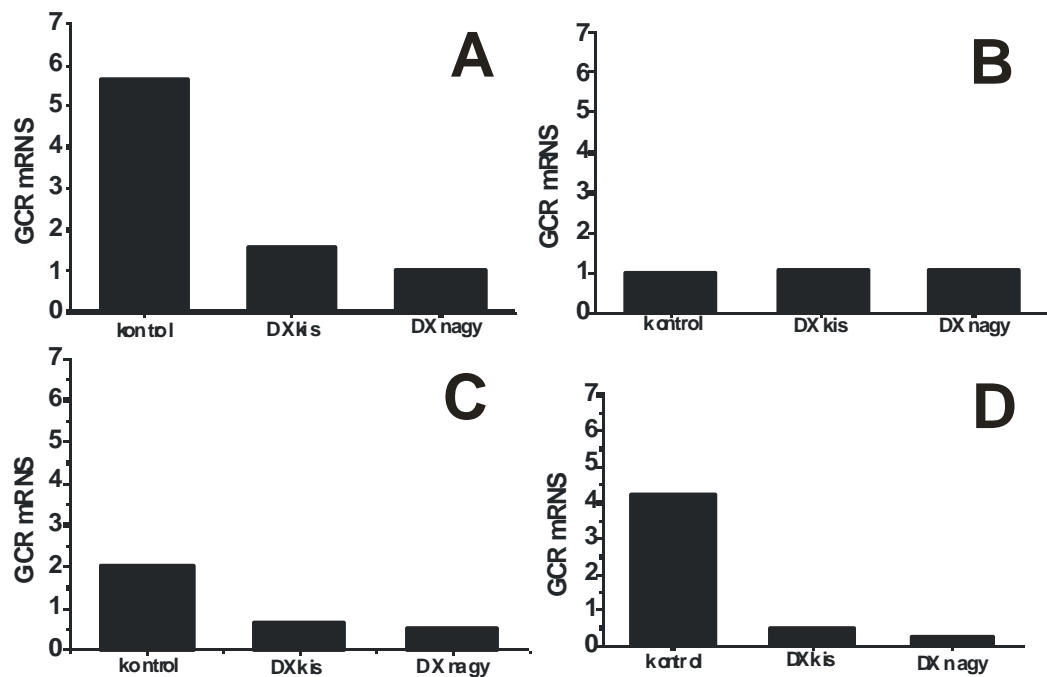
A továbbiakban vizsgáltuk a GCR expresszió időbeni változásait egyszeri, nagy dózisú DX kezelést követően. 4-8 órával a DX beadását követően a GCR mRNS szint 4-5-szörös emelkedést mutatott, ezután viszont fokozatos csökkenés következett be 24 óráig, amikor a GCR mRNS szint a kezdeti érték 40-50 %-ra esett (16. A ábra). Párhuzamosan

vizsgáltuk a citoplazmatikus GCR szint változásait is áramlási citométeren. A GCR fehérje szint kb. 8 órás latenciával követte a GCR mRNS szint változásait (16. D ábra). RU 486 (GC antagonist) előkezeléssel nem lehetett a GCR mRNS (16. B ábra) illetve fehérje szint (16. E ábra) változásait gátolni. Az RU 486 önmagában adva nem okozott szignifikáns változást a GCR expresszióban (16. C, F ábra).



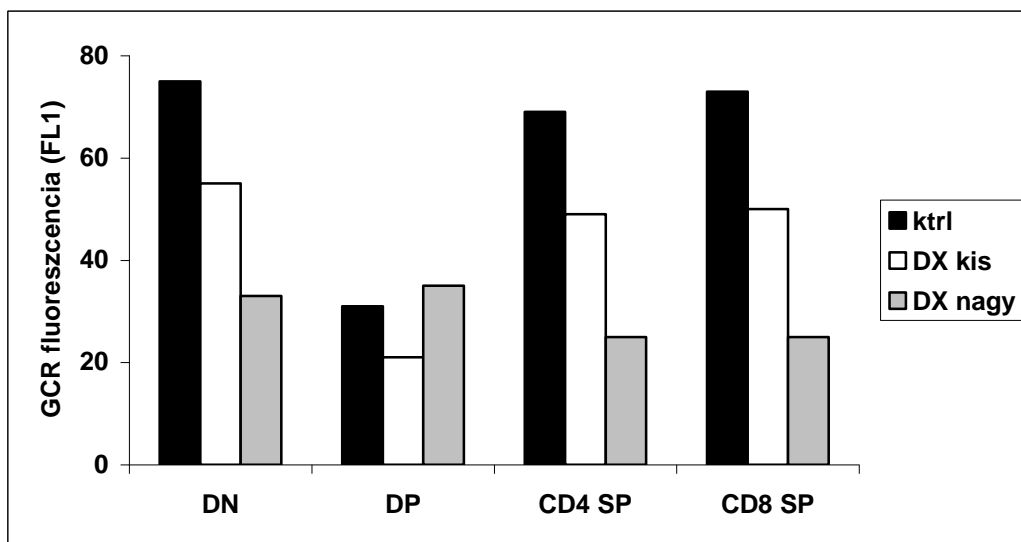
**16. ábra** A GCR mRNS (A, B, C) illetve fehérje (D, E, F) expresszió változásai egyszeri nagy dózisú DX kezelést követően. A, D: DX kezelés, B, E: RU 486 + DX kezelés C, F: RU 486 kezelés. Az A, B, C ábra részekén az adatpontok a real-time PCR relatív kvantifikálás utáni értékeit jelentik, a D, E és F ábra részekén pedig az átlagos fluoreszcencia intenzitás változást tüntettük fel a kontrollhoz viszonyítva.

Ezután vizsgáltuk az egyes thymocyta alcsoportokban a GCR mRNS expresszió változását kis vagy nagy dózisu DX kezelés után egy nappal (17. ábra). A GCR mRNS szint DN sejtekben 73 % illetve 81 %-al (17. A ábra), CD4 SP sejtekben 67 % illetve 74 %-al (17. C. ábra), míg CD8 SP sejtekben 88 % illetve 93 %-al csökkent (17. D ábra), DP sejtekben viszont változatlan maradt (17. B ábra). GCR mRNS szinten nem találtunk különbséget a nagy illetve kis dózisu DX kezeléseket hatásaik között.



**17. ábra** Az egyes thymocyta alcsoportok GCR mRNS szint változásai nagy illetve kis dózisu DX kezelés után egy nappal. **A:** DN, **B:** DP, **C:** CD4 SP, **D:** CD8 SP. Az oszlopok a real-time PCR eredmények relatív kvantifikációja után kapott adatokat reprezentálják.

A GCR mRNS szint változása mellett megvizsgáltuk a thymocyta alcsoportok citoplazmatikus GCR fehérje szintjének változásait is, anti-GCR-FITC antitesttel végzett intracelluláris jelölés után áramlási citométeren (18. ábra). Kis illetve nagy dózisu DX kezelés hatására szignifikáns citoplazmatikus GCR szint csökkenést tapasztaltunk DN, CD4 SP és CD8 SP sejtekben (18. ábra), nem változott azonban a DP sejtek GCR szintje (18. ábra). A nagy dózisu DX kezelés fehérje szinten nagyobb mértékű GCR szint csökkenést okozott, mint az alacsony dózisu DX (18. ábra).



**18. ábra** A thymocytá alcsoportok citoplazmatikus GCR szint változásai kis illetve nagy dózisu DX kezelésre. Az oszlopok a GCR FL1 csatornán mért fluoreszcencia átlagait ábrázolják.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a DN, CD4 SP illetve CD8 SP thymocytákban GC-k a GCR szint csökkenéséhez vezettek mind fehérje mind mRNS szinten, míg DP sejtekben nem változott a GCR expresszió.

## AND TcR transzgenikus modell

BALB/c egérben anti-CD3 kezeléssel tudtuk a TcR szignált helyettesíteni. Azért, hogy direkt TcR stimulációt tudjunk alkalmazni, AND TcR transzgenikus egértörzset választottunk, amelynek perifériás T-sejtjeinek 99%-a galamb citokróm C (PCC) enzimre specifikus TcR-t expresszál.

### 1. Thymocyta szám változás antigén, DX illetve kombinált kezelés hatására.

A glukokortikoidok egyik jól ismert hatása, hogy a thymusban jelentősen csökkentik a sejtszámot [93]. Kis illetve nagy dózisu DX, antigén (PCC) és kombinált kezelések hatására is thymocyta szám csökkenés következett be. Kontroll AND thymusokban  $69.4 \pm 27.6$  millió sejt volt, amely antigén (PCC) kezelés hatására kismértékben ( $56.4 \pm 22.6$  millió sejtre), kis vagy nagy dózisu DX kezelésre ( $12.9 \pm 4.2$  illetve  $5.6 \pm 5.1$  millió sejtre), illetve kombinált antigén és DX kezelésre ( $4.3 \pm 3.5$  millió sejtre) jelentősen csökkent (1. táblázat).

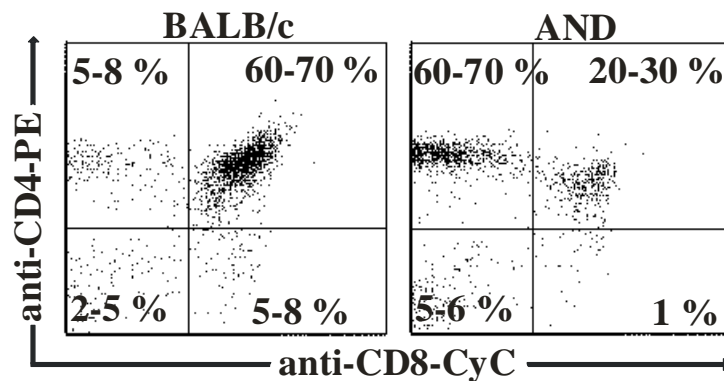
	thymocyta szám $\pm$ SD (x $10^6$ )
<b>kontroll</b>	<b><math>69.4 \pm 27.6</math></b>
<b>PCC</b>	<b><math>56.4 \pm 22.6</math></b>
<b>DX nagy</b>	<b><math>5.6 \pm 5.1^*</math></b>
<b>DX kis</b>	<b><math>12.9 \pm 4.2^*</math></b>
<b>PCC+DX kis</b>	<b><math>4.3 \pm 3.5^*</math></b>

**1. táblázat:** Thymocyta sejtszám változások PCC, kis vagy nagy dózisu DX illetve kombinált kezelések hatására. A táblázatban szereplő értékek három független mérés átlagát és a szórást ( $\pm$ SD) reprezentálják (\* $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ).

### 2. A thymocyta összetétel változásai

AND thymusban a sejtpopulációk arányai jelentősen eltérnek a normál Balb/c egéretől (19. ábra) [86]. Balb/c thymusban a DP sejtek alkotják a legnagyobb sejtcsoportot (60-70%), emellett 10-15% CD4 SP, 5-8% CD8 SP és 2-5% DN sejtet találunk (17. ábra) [75]. AND

thymusban a legnagyobb sejtpopuláció a CD4 SP (60-70 %), a DP sejtarány 20-30 %, a DN sejt arány pedig 5-6 %, CD8 SP sejt gyakorlatilag nincs az AND thymusban (19. ábra) [86].



**19. ábra** Kezeletlen BALB/c és AND thymus sejtes összetétele. Anti-CD4 PE és anti-CD8-CyC jelölés után négy sejtpopuláció (DN: bal alsó kvadráns, DP: jobb felső kvadráns, CD4 SP: bal felső kvadráns, CD8 SP: jobb alsó kvadráns) különíthető el a fluoreszcens dot plotokon áramlási citométer segítségével.

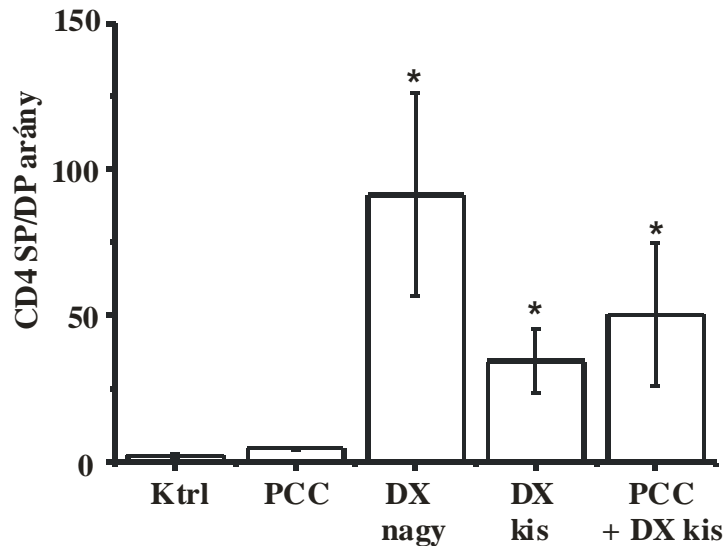
A DP sejtarány szignifikánsan csökkent mind PCC ( $14 \pm 2.2$  %), mind kis ( $2.7 \pm 0.8$  %) illetve nagy dóziszú ( $0.9 \pm 0.3$  %) DX, mind pedig kombinált ( $2.2 \pm 1.9$ %) kezelés hatására (2. táblázat). Ezzel párhuzamosan szignifikáns CD4 SP sejtarány növekedést figyeltünk meg: PCC ( $65.7 \pm 5.6$  %), kis vagy nagy dóziszú DX ( $87.6 \pm 1.9$  % illetve  $78.5 \pm 13.6$  % ), vagy kombinált kezelésre ( $74.2 \pm 1.1$  %) (2. táblázat).

	kontroll	PCC	DX nagy	DX kis	PCC + DX kis
DP % $\pm$ SD	$28.3 \pm 6.7$	$14 \pm 2.2^*$	$0.9 \pm 0.3^{**}$	$2.7 \pm 0.8^{**}$	$2.2 \pm 1.9^{**}$
CD4 SP % $\pm$ SD	$61 \pm 3.2$	$65.7 \pm 5.6$	$78.5 \pm 13.6^*$	$87.6 \pm 1.9^*$	$74.2 \pm 1.1^*$

**2. táblázat** A DP illetve CD4 SP sejtek arányának változásai PCC, kis vagy nagy dóziszú DX illetve kombinált kezelések hatására. A táblázat értékei három független mérés eredményeinek átlagát és a szórást ( $\pm$ SD) mutatják. (\*P<0.05, \*\*P<0.005).



Az érett CD4 SP és éretlen DP sejtek aránya kontrol AND thymusban  $2.3 \pm 0.7$  volt (20. ábra). PCC kezelés hatására kétszeres emelkedés következett be ( $4.7 \pm 0.4$ ) (20. ábra), kis vagy nagy dózisu DX illetve kombinált kezelésre további szignifikáns emelkedést tapasztaltunk ( $91.4 \pm 34.6$ ,  $34.5 \pm 11.2$  illetve  $50.4 \pm 24.3$ ) (20. ábra).



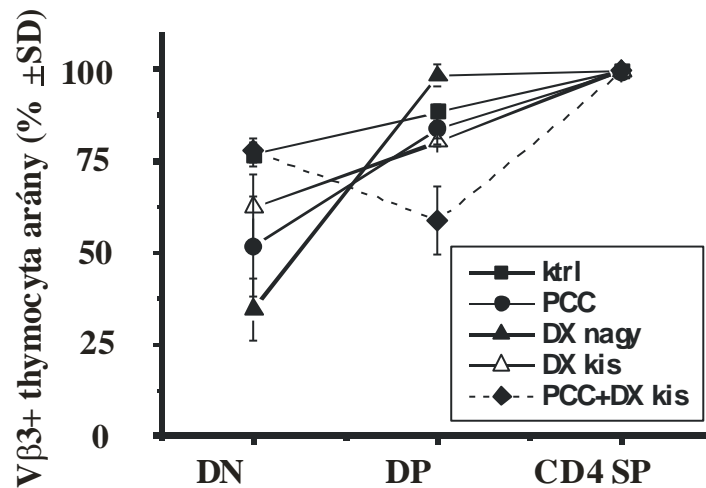
**20. ábra** Az érett CD4 SP és éretlen DP sejtek arányainak változása a különböző kezelésekre hatására. Az oszlopok három független mérés eredményeinek átlagát és szórását ( $\pm$  SD) reprezentálják. (\* $P < 0.05$ )

AND egérben kis illetve nagy dózisu GC vagy kombinált antigén és GC hatás két nap alatt az érett sejtek arányának növekedéséhez vezetett, ami valószínűleg részben a DP sejtek fokozott kiérésének köszönhető.

### 3. A $V\beta 3$ TcR expresszió változásai PCC, DX illetve kombinált kezelésre

Kontrol, kezeletlen AND egérben a  $V\beta 3$  TcR transzgenét expresszáló thymocyták aránya az érés során fokozatosan nő (DN:  $76.8 \pm 3.4$  %, DP:  $88.3 \pm 2$  %, CD4:  $99.5 \pm 0.3$  %) (21. ábra). PCC kezelés hatására a DN sejtek között csökkent ( $51.8 \pm 13.5$  %), a DP stádiumban viszont változatlan maradt ( $83.8 \pm 4.4$  %) a  $V\beta 3$  pozitív sejt arány (21. ábra). Kis dózisu DX hatására mind a DN, mind a DP thymocyták között szignifikánsan csökkent a  $V\beta 3$  arány ( $62.3 \pm 9.1$  % és  $80.2 \pm 1$  %) (21. ábra). Nagy dózisu DX szignifikánsan csökkentette a

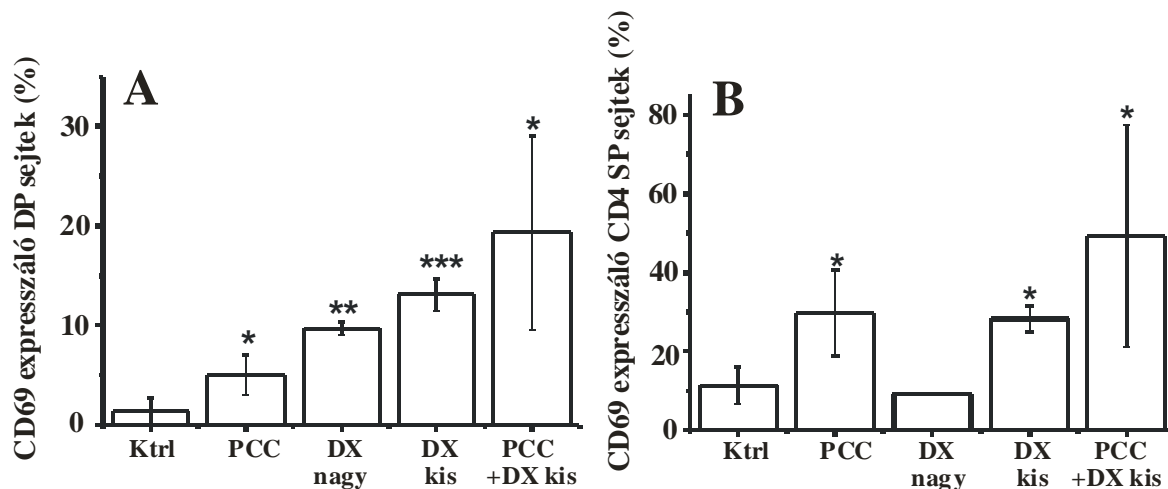
V $\beta$ 3 pozitív DN thymocytá arányt ( $34.5 \pm 8.6$  %), míg kismértékben, de szignifikánsan növelte a V $\beta$ 3 DP sejtek arányát ( $98.2 \pm 3.1$  %) (21. ábra). A kombinált PCC és DX kezelés hatására szignifikáns esés következett be a V $\beta$ 3 pozitív DP sejtek arányában ( $58.7 \pm 9.1$  %) (21. ábra). Egyik kezelés sem befolyásolta a V $\beta$ 3 pozitív CD4 SP sejtek arányát (21. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kombinált kezelés hatására az éretlen sejtek közül elsősorban a V $\beta$ 3 transzgén expresszáló sejtek mutatnak fokozott kérészt.



**21. ábra** A V $\beta$ 3 TcR expresszió változásai a különböző thymocytá alcsoportokban. Minden adatpont három független mérés átlagát és szórását ( $\pm$  SD) ábrázolja.

#### 4. A DP és CD4 SP sejtek CD69 expressziója

Ezek után azt vizsgáltuk, hogy ki lehet-e váltani CD69 expresszió fokozódást, azaz pozitív szelekciót PCC, DX vagy kombinált kezeléssel. Kontrol egerekben a DP sejtek csak körülbelül 1 %-a expresszált CD69-et a sejt felszínen (22. A ábra). Mindegyik kezelés szignifikánsan megnövelte a CD69 expressziót a DP sejteken (PCC:  $5.1 \pm 2$  %, kis dózisu DX:  $13.1 \pm 1.6$  %, nagy dózisu DX:  $9.8 \pm 0.6$  %, PCC + DX kis:  $19.4 \pm 9.7$  %) (22. A ábra). A CD69 pozitív CD4 SP sejtek arányát a PCC, a kis dózisu DX és a kombinált kezelés szignifikánsan fokozta (PCC:  $29.7 \pm 10.9$  %, DX kis  $28.2 \pm 3.4$  % és PCC + DX kis  $49.3 \pm 28.2$  %), a nagy dózisu DX viszont nem okozott jelentős változást a CD69 pozitív CD4 SP sejtek arányában ( $9.2 \pm 0.3$  %), a kezeletlen kontrol értékekhez viszonyítva ( $11.5 \pm 4.7$  %) (22. B ábra).



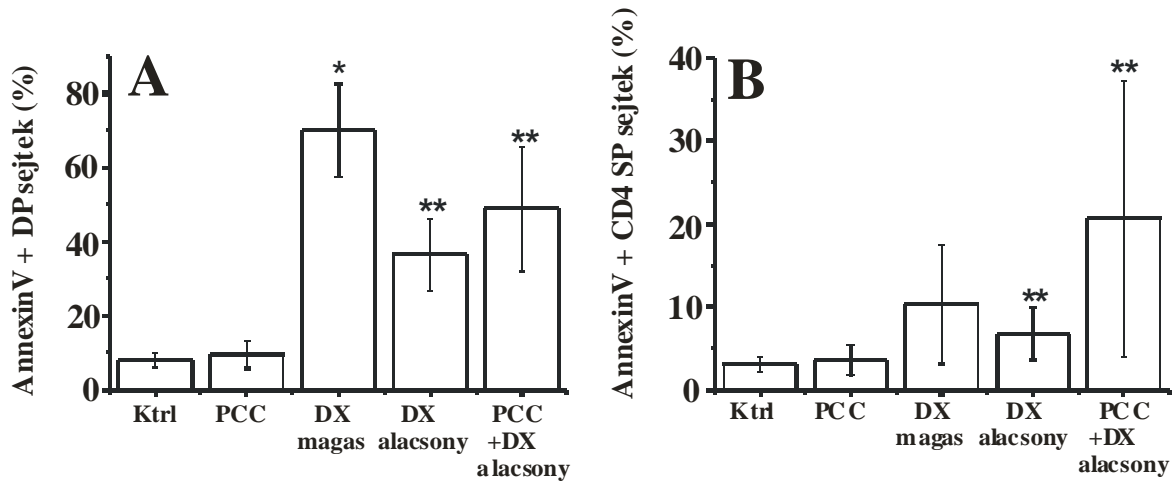
**22. ábra** A DP (**A**) és CD4 SP (**B**) thymocyták CD69 expresszió változásai különböző kezelésekre. Az oszlopok három független mérés adatainak átlagát és szórását ( $\pm$  SD) ábrázolják. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

AND egérben antigén, alacsony dózisu GC vagy kombinált kezelés esetén tehát pozitív szelekció fokozódást észleltünk (mind a DP, mind a CD4 SP sejteken nőtt a CD69 expresszió).

### 5. Korai apoptózis vizsgálata

Hasonlóan a BALB/c modellhez, a korai apoptózis meghatározására a sejtek AnnexinV kötését vizsgáltuk. Kontrol AND egerekben a DP sejtek  $8.1 \pm 1.9$  %-a mutatott AnnexinV pozitivitást (23. A ábra). PCC kezelés nem okozott szignifikáns változást a korai apoptotikus DP sejtek arányában ( $9.5 \pm 3.6$  %) (23. A ábra). Kis dózisu DX és kombinált PCC + DX kezelés szignifikánsan növelte az AnnexinV pozitív DP sejtek arányát ( $36.5 \pm 9.7$  % illetve  $48.9 \pm 16.7$  %-ra) (23. A ábra). A legjelentősebb korai apoptotikus DP sejt aránynövekedést nagy dózisu DX kezelés után tapasztaltuk ( $70 \pm 12.45$  %) (23. A ábra). A CD4 SP populációban kis dózisu DX és kombinált PCC + DX kezelés okozott szignifikáns AnnexinV

pozitivitás növekedést ( $6.8 \pm 3.2$  % és  $20.6 \pm 16.6$  %) a kontrolhoz viszonyítva ( $3.1 \pm 1$  %) (23. B ábra).



**23. ábra** Az AnnexinV pozitív DP (**A**) és CD4 SP (**B**) sejtek aránya különböző kezelések hatására. Az oszlopok az AnnexinV pozitív sejtek arányát mutatják. Az értékek három független mérés átlagát és szórását ( $\pm$  SD) jelzik. (\* $P < 0.005$ , \*\* $P < 0.05$ )

DP sejtekben a nagy dózisu GC okozta a legnagyobb mértékű apoptosist, míg az érett CD4 SP sejtekben a kombinált antigén GC hatás indukált legerősebben apoptosist.

## ÖSSZEFOGLALÁS, MEGBESZÉLÉS

BALB/c illetve AND TcR transzgenikus egér modellekben vizsgáltuk a glukokortikoid hormon szerepét a thymocyta érés során. A „kölesönös antagonizmus modell” szerint a GC hatás és a TcR-en keresztüli aktiváció is apoptózist indukálnak önmagukban a köztes érési stádiumban lévő DP sejteken, ha azonban a két hatás együttesen érvényesül, akkor túlélést eredményez [79]. Ez valószínűleg úgy jön létre, hogy a GC-k antagonizálják az egyébként letális TcR jelet [75, 76, 77].

A GC hatást kis illetve nagy dózisu DX oltással modelleztük. A TcR szignált BALB/c modellben anti-CD3 antitest kezeléssel, AND egerek esetében pedig a TcR specifikus antigén kezeléssel váltottunk ki. Ebben a tekintetben a két modell egymástól jelentősen eltér, ugyanis az anti-CD3 kezelés a sejtfelszíni CD3 jelátviteli komplexet nagy affinitással keresztköti, ezzel szemben a transzgenikus TcR az antigén fragmentumait MHC prezentált formában különböző affinitással ismerheti fel, így tehát a jelek erőssége és minősége is különbözik.

Legfontosabb eredményeink:

1. **BALB/c egér modellben** a különböző thymocyta alcsoportokban eltérő intracelluláris GCR fehérje expressziót mutattunk ki. Legalacsonyabbnak a DP sejtekben találtuk a GCR szintet annak ellenére, hogy ez a sejtcsoport a legérzékenyebb a GC indukált apoptózisra.
2. Az eltérő citoplazmatikus GCR szintek háttérében eltérő GCR mRNS expressziót mértünk a thymocyta alcsoportokban.
3. A GC kezelést követően 4-8 órával 4-5-szörös GCR mRNS expresszió fokozódás volt tapasztalható, amit fokozatos csökkenés követett 24 óráig a kezdeti szint kb. felére. Az mRNS szint változásokat 8 órás latenciával követték a GCR fehérje szint változásai. GC antagonistával nem tudtuk a fenti hatásokat gátolni és az antagonista önmagában sem befolyásolta a GCR expresszióját.
4. Nagy dózisu GC kezelésnek jelentős pro-apoptotikus hatása volt a DP sejtekre, kis dózisban viszont inkább a pozitív szelekció irányába hatottak. Ezeket a hatásokat GC antagonistával nem lehetett gátolni. Anti-CD3 antitest és alacsony dózisu GC együttes jelenlétében tovább fokozta a pozitívan szelektálódott sejtek számát.

5. **AND TcR transzgenikus egér modellben** kimutattuk, hogy bár önmagában mind az antigén kezelés, mind pedig a DX kezelés is fokozhatja a pozitív szelekciót (nőtt a CD4 SP sejtek aránya a DP sejtekhez képest ill. fokozódott a CD69 expresszió a DP és CD4 SP sejtek felszínén), a kombinált kezelés jóval hatékonyabbnak bizonyult ebben.
6. A pozitív szelekció mellett a negatív szelekció jeleként jelentősen csökkent thymus össz sejt számot mértünk mind antigén, mind DX mind pedig a kombinált kezelések után.
7. Fokozott apoptosist tapasztaltunk főleg nagy dózisú DX, a kombinált antigén és DX kezelést követően.

Mind a BALB/c mind pedig az AND egerekben a DP sejtek voltak legérzékenyebbek a GC hatásokra. Korábban Screpanti és munkatársai hasonló adatokat közöltek a thymocytá alcsoportok eltérő glukokortikoid érzékenységről [91]. Azt találták, hogy rövid távú 17- $\beta$ -ösztradiol illetve dexamethason kezelés hatására a DP sejtek aránya csökkent, míg az érett SP sejtek és a legéretlenebb DN thymocyták aránya nőtt [91]. Szintén a DN sejtek GC rezisztenciáját és a DP sejtek érzékenységét írták le Chow és társai [92]. Kísérleteinkben mind nagy és kis dózisú GC beadása után jelentősen csökkent a DP sejtek aránya mindkét egér modellben, amely valószínűleg apoptosist mediált folyamat. Bár mi kísérleteinkben csak az apoptosist egyik legkorábbi jelét: a PS külső membrán rétegben való megjelenését vizsgáltuk, a GC apoptosist indukáló hatását thymocytákban más módszerekkel többször igazolták [94]. Irodalmi adatok szerint a DP sejtek (osteoclastokkal, osteocytákkal, dendritikus sejtekkel és néhány idegsejt-elemmel) azon sejtek közé tartoznak, melyekben a glukokortikoidok apoptosist indukálnak [79]. A GC-k kaspáz-3 mediált, bcl-2 regulált módon okoznak apoptosist WEHI7.2 egér lymphoma sejtekben [95]. Bak<sup>-/-</sup>, Bax<sup>-/-</sup> egerekben, melyekben a mitokondriális apoptosist út vonal zavart szenved, DX kezelés nem vált ki apoptosist [96], ami azt bizonyítja, hogy a T-sejtekben a GC-k a mitokondriális apoptosist útvonalon keresztül hatnak.

A DP sejtek arányának csökkenésével egyidejűleg az érett SP sejtek aránya fokozódott, azaz az érett SP / éretlen DP sejtarány nagymértékben eltolódott az érett sejtek javára. Ez amellest, hogy az SP sejtek ellenállóbbak a GC-k proapoptotikus hatásaival szemben, részben a DP sejtek fokozott kiérésének is tulajdonítható, bár erre nézve modelljeink csak indirekt bizonyítékokkal szolgáltak (növekvő érett / éretlen sejt arány). Friss irodalmi adatok azt mutatják, hogy thymocyták különböző glukokortikoid érzékenységében valószínűleg fontos szerepet játszik a CD28 molekulán keresztüli jelátvitel

[97]. A CD28 ligandjai a B7.1 és B7.2 molekulák a thymusban főleg a corticomedullaris zónában és a medullában található epithel és dendritikus sejtek felszínén expresszálódnak. A thymocyták fejlődésük során egyre több CD28-at expresszálnak a felszínükön és eközben a cortexből a medulla felé vándorolnak, ahol magasabb a CD28 ligand expresszió, így a sejtek egyre erősebb jelet kapnak, amely a GC indukált apoptosist meggátolja [97]. Ez a folyamat természetesen főleg a késői fejlődési stádiumokban levő thymocytákban érvényesülhet nagyobb mértékben [97]. Ennek megfelelően CD28 deficiens egérben megnövekedett glukokortikoid indukált apoptosist észleltek az érett SP thymocyták között [97]. Ennél egy korábbi érési stádiumban a CD8 molekula megjelenésével egyidőben következik be növekedés a GC érzékenységekben a CD4-, CD8+, CD3- sejteken, amelyek közvetlenül a DP sejtek prekursorainak tekinthetők [92].

Amíg BALB/c egérben az anti-CD3 kezeléssel ki tudtuk védeni a GC-k proapoptotikus hatását, AND egérben az antigénnek nem volt ilyen hatása *in vivo*. Ez lehetséges, hogy a transzgenikus illetve normál egér TcR-en keresztül beinduló jelátviteli folyamatok különbségének köszönhető, mivel az anti-CD3 kezelés BALB/c egérben a valencia és affinitásbeli különbségek miatt nem teljesen feleltethető meg a TcR specifikus antigénnel történő kezelésnek AND egérben. Érdekes ugyanakkor, hogy Ashwell munkacsoportjának *in vitro* T-sejt hibridómákban antigénnel illetve anti-Thy antitesttel történő aktivációval sikerült kivédenie a GC-k proapoptotikus hatását [75]. Az ellentmondás feloldására szolgálhat, hogy az *in vivo* kísérletekben a szervezet komplex válaszaként értelmezhetjük eredményeinket, amelynek minden összetevőjét nem ismerjük. Ezek közül a tényezők közül fontos szerep juthat például a citokin mintázat megváltozásának lokálisan a thymusban, illetve szisztémásan is [98]. Tovább árnyalja a képet, hogy az *in vivo* beadott anti-CD3 kezelés BALB/c egérben illetve a PCC antigén kezelés AND egérben a periférián tömeges T-sejt aktivációhoz vezethet, amely glukokortikoid termeléssel is jár [99], így nehéz elkülöníteni a GC illetve anti-CD3 indukált hatásokat. Szintén elképzelhető, hogy a TcR transzgenikus egérben az antigén kezelés tömeges perifériás T-sejt aktivációt hoz létre, ami különböző mediátorok révén visszahathat a thymocyta fejlődésre is. CD4 SP sejtekben alacsony dózisú GC önmagában és antigénnel együtt okozott megnövekedett korai apoptotikus sejt arányt. Ez hasonló az irodalmi adatokból is ismert, aktivált perifériás T sejtekre GC által kifejtett pro-apoptotikus hatáshoz [100].

A TcR-en keresztüli sejt aktiváció (anti-CD3 antitest- illetve PCC kezelés) önmagában szintén az érett sejtek javára tolta az egyensúlyt mindkét modellben. GC-vel együtt ez a hatás még jobban érvényesült. A GC-k feltehetően a TcR-en keresztül beinduló jelátviteli

folyamatok megváltoztatásán keresztül fokozzák a DP sejtek kiérését (24. ábra). Korábbi közlemények rámutattak, hogy ha a TcR jel az Erk, NFAT irányba tolódik, akkor pozitív szelekción, ha viszont Erk, Jnk és p38 irányba, akkor negatív szelekción lesz az eredmény [15]. Elképzelhető, hogy a GCR a citoplazmában kölcsönhatásba lép ezekkel a jelátviteli fehérjékkel és ezáltal a TcR jelet a pozitív szelekcións irányba tolja el (24. ábra). A GCR más jelátviteli fehérjékkel való kölcsönhatása többféleképpen képzelhető el: direkt fehérje-fehérje kölcsönhatások révén a citoplazmában, illetve előfordulhat, hogy a GC-k módosíthatják a membrán lipid raftok (tutajok) szerkezetét és így egyes jelátviteli- (pl. Lck) illetve adapter fehérjék (LAT) aszociációját a TcR jelátviteli komplexhez [101, 102] (24. ábra).

A Hsp-90 chaperon valószínűleg kulcsszerepet tölt be a GCR és más jelátviteli utak közötti „párbeszéd” szabályozásában (24. ábra). Csermely Péter és munkatársai rámutattak a Hsp-90 és Lck, Raf, ERK közötti kölcsönhatások fontosságára a T sejt receptoron keresztüli jelátvitelben (24. ábra). Mivel a GCR citoplazmatikus és membrán asszociált formájáról is leírták, hogy hsp-90-hez kötődnek inaktív formájukban [34, 35, 51], könnyen elképzelhető, hogy a ligand jelenlétében a chaperonról leváló GCR konformáció változást idéz elő a hsp-90 szerkezetében, ami a többi kapcsolódó jelátviteli fehérje funkcióját módosíthatná és ezáltal a TcR jelpályát befolyásolná. Mivel a Hsp-90 tartalmaz ITIM szekvenciákat is, ezért a direkt fehérje-fehérje kölcsönhatások mellett elképzelhető a foszforiláltságban bekövetkező változáson keresztül megvalósuló szabályozás is.

AND egérben lehetőségünk volt a transzgen által megszabott, PCC specifikus TcR-t hordozó thymocyták arányának nyomonkövetésére. Érdekes módon a DN sejtek külön-külön mind antigén, mind GC hatásra érzékenyek voltak, a DP sejtek viszont az antigén és GC együttes jelenlétére reagáltak legérzékenyebben. Nem változott ugyanakkor egyik kezelésre sem a V $\beta$ 3+ CD4 SP sejtek aránya. A T sejtek csak MHC-I vagy -II molekulákon bemutatott, feldolgozott antigéneket képesek felismerni TcR-al az antigén prezentáló sejtek felszínén [103]. AND egérben antigén kezelés után a thymusban található dendritikus sejtek és makrofágok felszínén nagy mennyiségben prezentálódnak PCC fragmensek I-E<sup>k</sup> molekulákon, melyeket a V $\beta$ 3 + DP sejtek különböző affinitással ismerhetnek fel. Az „aviditás modell” [18] alapján azok a DP sejtek szelektálódnak pozitívan, amelyek alacsony-közepes affinitással kapcsolódnak a makrofágokon illetve dendritikus sejteken prezentált PCC peptid - I-E<sup>k</sup> (MHC-II) komplexekhez, amelyek nagy affinitású TcR-t hordoznak, azok viszont negatív szelekción esnek át.

A sejt arányok jelentős megváltozása mellett TcR aktivációval mind BALB/c mind AND egérben CD69 expresszió növekedést tudunk kiváltani DP illetve CD4 SP sejteken, ami

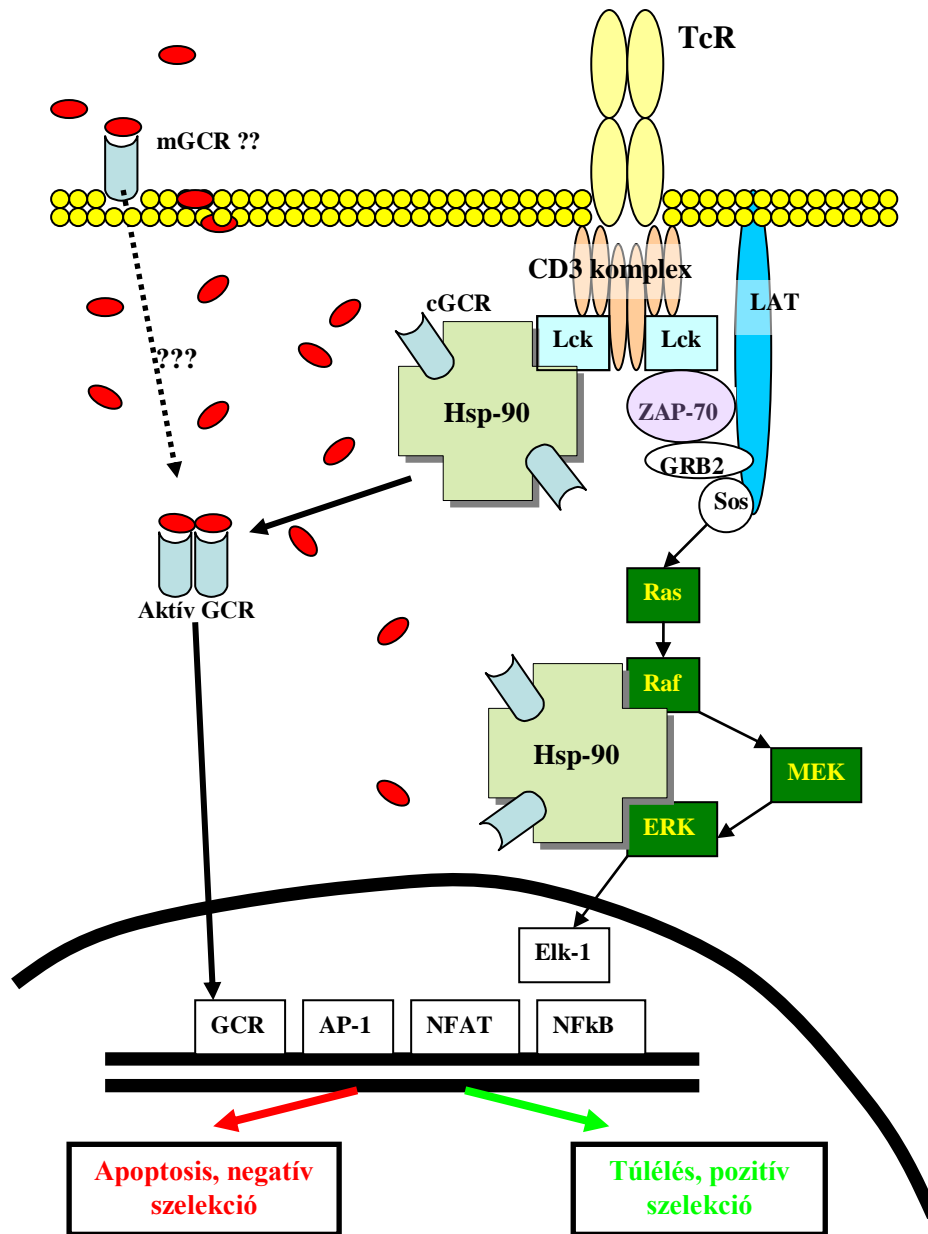


a pozitív szelekció általánosan elfogadott jele [19, 20]. Bár a CD69 molekula fiziológiás ligandja egyelőre nem ismert [26], illetve CD69  $-/-$  egérben nem tapasztalható thymocytá differenciációs zavar [26], így a T-sejt érésben betöltött pontos szerepe bizonytalan. GC jelenlétében a CD69 expresszió fokozódás még nagyobb mértékű volt. Érdekes módon AND egérben a GC jelenléte nagy illetve kis dózisban önmagában is fokozta a CD69 expresszáló DP sejtek arányát, azonban a CD4 SP sejteken csak kis dózis tartományban tapasztaltuk a CD69 molekula megjelenését. Az átmeneti CD69 expresszió növekedés DP sejteken nagy dózisú GC hatásra valószínűleg apoptosist megelőző állapot jelez, melyhez hasonló *in vitro* thymocytá kultúrában is leírtak [104].

Összegezve tehát sikerült **pozitív szelekciót indukálnunk** (szignifikáns érett SP sejt arány növekedés és CD69 expresszió fokozódás DP és CD4 SP sejteken) *in vivo* mindkét egér modellben alacsony dózisú GC és TcR stimuláció hatására.

A kölcsönös antagonizmus modell kritizálói GCR knock-out egérben normális thymocytá differenciációt figyeltek meg [80], ami arra utal, hogy a GC hatás vagy nélkülözhető a thymocytá fejlődéshez [81], vagy a GC hatás nem a klasszikus receptor mediált úton zajlik. Ezek alapján felmerülhet egy esetlegesen még nem ismert GCR jelítviteli út jelenléte is, ugyanakkor kétséges a kísérleti rendszerek közötti összehasonlíthatóság is (*ex vivo* ill. FTOC kísérletek vs. *in vivo* adatok) a GCR ko egerek életképtelensége miatt. Mivel a GC-k hatásukat többféleképpen fejthetik ki: a klasszikus, genomikus hatás mechanizmus [36] mellett lehetséges a membrán receptoron keresztüli illetve a direkt membrán hatások létezése is (7. ábra) [45], ezért a GCR $-/-$  egér modell nem biztos, hogy minden GC hatást felfüggeszt. Mivel a GC-k a thymusban lokálisan termelődnek és parakrin módon hatnak [29, 30, 31], a thymocyták környezetében valószínűleg magas koncentrációt érhetnek el, ami a direkt membránhatást valószínűsíti.

Az már a 90-es évek végén ismert volt, hogy a thymocyták nagyobb mennyiségben expresszálják GCR-t, mint a lépben található T-sejtek [105]. Mivel a különböző thymocytá alcsoportok eltérően reagáltak a GC hatásokra, vizsgáltuk a sejtek GCR expresszióját mRNA és fehérje szinten. Más munkacsoporttal egyidőben [106] a DP thymocytákban találtuk a legalacsonyabb citoplazmatikus GCR expressziót, annak ellenére, hogy ezek a sejtek voltak legérzékenyebbek a GC hatásokra. Ez az eredmény is a nem-konvencionális GC hatásmechanizmus részvételére utal. A GCR mRNA szint is a DP sejtekben volt a legalacsonyabb.

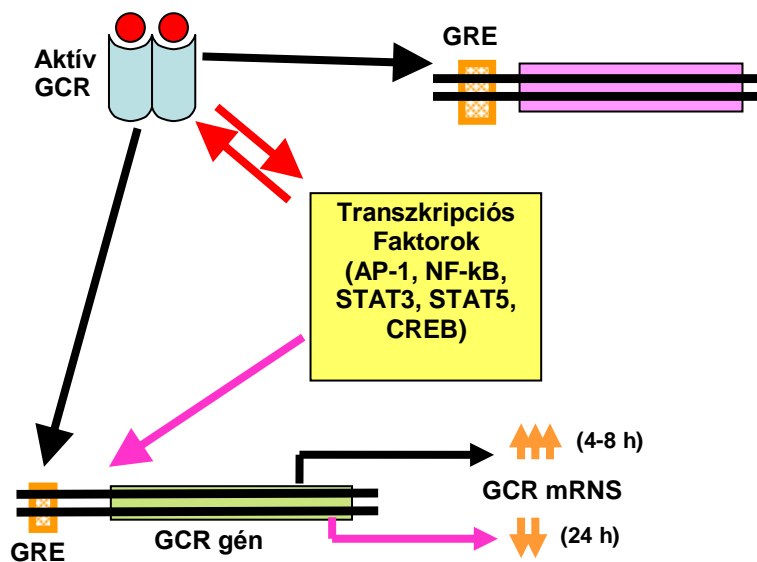


**24. ábra** A GCR és a TcR jelátviteli utak kölcsönhatásainak lehetséges pontjai. A GCR nem csak transzkripciós faktorként befolyásolhatja a DP thymocyták sorsát, hanem citoplazmáris kölcsönhatások is részt vehetnek a pozitív illetve negatív szelekciós jel kialakításában.

Annak tisztázására, hogy a kísérleteinkben a GC-k genomikus vagy nem-genomikus úton fejtik ki hatásukat a thymocytákra, GC antagonistával próbáltuk gátolni a GC hatásokat Balb/c egérben. A GC-k antagonista előkezelés után is az érett SP thymocyták irányába tolták el a az érett SP / éretlen DP arányt. A DP sejtek CD69 expresszió növekedését szintén nem gátolta az RU 486. Ezek alapján valószínű, hogy a pozitív szelekció során a GC hatás nem a

klasszikus receptoriális mechanizmuson [36] keresztül érvényesül, ugyanis korábbi közleményekben megmutatták, hogy az RU 486 thymocytákban gátolja a GCR transzlokációját a magba [107], illetve erősíti a Hsp-90-el való aszociációját eger lymphoma sejtekben [108]. Így a klasszikus GC hatás két fontos lépését is meggátolja [36]: az aktivált GCR nem tud disszociálni a hsp-90-től, illetve nem tud transzlokálódni a sejtmagba. Továbbra is kérdés azonban, hogy esetleges membrán receptorok részvétele, direkt membránhatások vagy citoplazmatikus kölcsönhatásokon át szabályozzák a GC-k a DP sejtek szelekcióját.

Kísérleteink másik részében azt vizsgáltuk, hogy a GCR expressziót hogyan befolyásolják a GC-k. Egyszeri nagy dózisú GC hatására 4-8 órán belül szignifikáns GCR expresszió fokozódást tapasztaltunk, 24 óra elteltével azonban már expresszió csökkenés következett be a kezdeti szinthez képest. A kezdeti növekedést valószínűleg az okozza, hogy a GC-GCR komplex a GCR gén promoterében található GRE-hez kötődik és ott expresszió fokozódást indukál. (25. ábra) Ehhez hasonló hatást írtak le humán T sejt leukémia sejtvonalban is [64]. A későbbi csökkenésért más transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatás (AP-1 [66], NF- $\kappa$ B [67], CREB [68], STAT3 [69] illetve STAT5 [70]) révén kifejlődő gátlás lehet felelős. (25. ábra)



**25. ábra** A GCR transzkripciós faktorként számos más transzkripciós faktoral lehet kölcsönhatásba, így változhat a GCR transzkripcióra kifejtett hatás.

A különböző thymocytá alcsoportok különbözően reagáltak a GC hatásra: DN, CD4 illetve CD8 SP sejtekben down-regulációt figyeltünk meg mind mRNS mind fehérje szinten egy nappal a GC hatást követően, míg DP sejtekben nem változott a GCR expressziója. Elképzelhető, hogy a DP thymocyták fokozott GC érzékenysége annak is köszönhető, hogy nem képesek GC jelenlétében a GCR expresszió csökkentésére, így tartósan éri a GC jel a sejteket, ami a proapoptotikus hatások felerősödését okozhatja.

**Összefoglalva** kísérleteink eredményeit, sikerült kétféle egértörzsben jellemeznünk a glukokortikoidok szerepét thymocyták érésében illetve szelekciójában *in vivo*. TcR szignál és GC jelenlétében a DP sejtek pozitív szelekcióját tudtuk indukálni. Megmutattuk, hogy a thymocytá alcsoportok különböző mértékben expresszálnak a GCR-t, illetve a GC-k hatására különbözőképpen változik a GCR expresszió DP sejtekben, mint a másik három alcsoportban. Ezen eredményeink felvetik a nem klasszikus GC hatásmechanizmusok részvételét thymocytákban. A továbbiakban az egyes jelátviteli utakkal való kölcsönhatások tisztázásával még pontosabb képet nyerhetünk a GC-k szabályozó szerepéről a thymusban.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szondi Zsuzsannának (DE-OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) az AND egerekért. Balogh Péternek a kézirat kritikus átolvasásáért és hasznos tanácsaiért. Pápa Lászlónénak a technikai segítségért. Munkánkhoz az NKFP 1/48/2001, NKFP 1/26/2001 illetve az ETT – 593/2003 pályázati támogatásokat használtuk fel.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

### A tézisek alapját képező publikációk

1. **Ferenc Boldizsár**, László Pálinkás, Domokos Bartis, Péter Németh, Tímea Berki: *Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model* (Immunology Letters, 90 (2-3): 97-102, 2003)
2. Tímea Berki, László Pálinkás, **Ferenc Boldizsár**, Péter Németh: *Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations* (International Immunology, Vol. 14., No. 5.: 1-7, 2002)
3. **Boldizsár F.**, Czömpöly T., Berki T., Pálinkás L., Bartis D., Németh P.: *Real-time PCR analysis of murine thymocyte glucocorticoid receptor (GCR) mRNA expression* (közlésre előkészítve)

### Idézhető absztraktok:

1. **Boldizsár F.**, Czömpöly T., Berki T., Pálinkás L., Bartis D., Németh P.: *Real-time PCR analysis of murine thymocyte glucocorticoid receptor (GCR) mRNA expression* (Immunology Letters, Special issue: Abstracts of the 15th European Immunology Congress EFIS 2003, June 8-12 2003, Vol. 87 (1-3), W01.10)
2. **Boldizsár F.**, Berki T., Pálinkás L., Bartis D., Németh P.: *Antigen and glucocorticoid hormone induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model* (Immunology Letters, Special issue: Abstracts of the 15th European Immunology Congress EFIS 2003, June 8-12, 2003, Vol. 87 (1-3), W11.09)
3. L. Pálinkás, **F. Boldizsár**, T. Berki, P. Németh.: *Glucocorticoid hormone influence T-cell receptor signaling in developing thymocytes in vitro.* (Immunology Letters, Special issue: Abstracts of the 15th European Immunology Congress EFIS 2003, June 8-12, 2003, Vol. 87 (1-3), W11.02)

4. Berki T., **Boldizsár F.**, Pálinkás L., Németh P.: *Glucocorticoid hormone and anti-CD3 induced thymocyte apoptosis: genomic or membrane effect?* (Scand. J. Immunology, Vol. 54, Suppl. 1, 2001)

#### Egyéb publikációk

1. Tibor Hajtó, Tímea Berki, László Pálinkás, **Ferenc Boldizsár**, Gergely Nagy, Péter Németh: *Galactoside-specific mistletoe lectin modulates dexamethasone induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes* (In Vivo, Vol. 17.: 163-168, 2003)
2. Tibor Hajtó, Tímea Berki, **Ferenc Boldizsár**, Péter Németh: *Galactoside-specific plant lectin, Viscum album agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes in vivo* (Immunology Letters, Vol. 86.: 23-27, 2003)
3. **Boldizsár Ferenc**, Berki Tímea, Miseta Attila, Németh Péter: *A T-lymphocyták jelátvitelének változásai hyperglykaemia hatására* (Magyar Immunológia, 2002, 1(2): 4-10)
4. **Ferenc Boldizsár**, Tímea Berki, Attila Miseta, Péter Németh: *Effect of hyperglycemia on the basal cytosolic free calcium level, calcium signal and tyrosine-phosphorylation in human T-cells* (Immunology Letters, 82: 159-164, 2002)

#### Idézhető absztraktok:

1. **Boldizsár F.**, Berki T., Miseta A., Kvell K., Németh P.: *Effects of in vitro hyperglycemia on Jurkat cells* (Scand. J. Immunology, Vol. 54, Suppl. 1, 2001)
2. **Ferenc Boldizsár**, Tímea Berki, Istvan Wittman: *Glucose and insulin dependent changes in free cytoplasmic Ca<sup>++</sup> following activation of human lymphocytes: an in vitro diabetes model.* (Cytometry Suppl. 10. 99., 2000)

## IRODALOM

1. Jan Klein and Václav Hořejší: Immunology (2nd edition, 1997, Blackwell Science)
2. Res P, Spits H: Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol.* 1999; 11 (1): 39-46.
3. Schwarzler C, Oliner S, Gunthert U: Variant isoforms of CD44 are required in early thymocyte development. *Eur J Immunol.* 2001; 31(10): 2997-3005.
4. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR: Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004; 5 (3): 247-53.
5. Anderson G, Jenkinson EJ: Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(1): 31-40.
6. Sebзда E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS: Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 829-74.
7. Singer A, Bosselut R, Bhandoola A: Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin Immunol.* 1999; 11 (4): 273-81.
8. Sakata T, Iwagami S, Tsuruta Y, Teraoka H, Tatsumi Y, Kita Y, Nishikawa S, Takai Y, Fujiwara H: Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol.* 1990; 48 (3): 205-12.
9. Rodewald HR, Kretzschmar K, Swat W, Takeda S: Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity.* 1995; 3 (3): 313-9.
10. Bhatia SK, Tygrett LT, Grabstein KH, Waldschmidt TJ: The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation. *J Exp Med.* 1995; 181 (4): 1399-409.
11. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, et al: Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 1994 Nov 1;180(5):1955-60.
12. Varas A, Romo T, Jimenez E, Alonso L, Vicente A, Zapata AG: The IL-2/IL-2-receptor complex in the maturation of rat T-cell progenitors. *Dev Immunol.* 1998; 6 (1-2): 141-7.
13. Li L, Hsu HC, Stockard CR, Yang P, Zhou J, Wu Q, Grizzle WE, Mountz JD: IL-12 inhibits thymic involution by enhancing IL-7- and IL-2-induced thymocyte proliferation. *J Immunol.* 2004; 172 (5): 2909-16.
14. Baseta JG, Stutman O: TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset. *J Immunol.* 2000; 165 (10): 5621-30.



15. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA: Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 139-76.
16. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ: Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 73-99.
17. Mannie MD: A unified model for T cell antigen recognition and thymic selection of the T cell repertoire. *J Theor Biol.* 1991; 151 (2): 169-92.
18. Ashton-Rickardt PG, Tonegawa S: A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol Today.* 1994;15 (8): 362-6.
19. Schuurman HJ, van Wichen D, de Weger RA: Expression of activation antigens on thymocytes in the 'common thymocyte' stage of differentiation. *Thymus.* 1989; 14 (1-3): 43-53.
20. Yamashita I, Nagata T, Tada T, Nakayama T: CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol.* 1993; 5 (9): 1139-50.
21. Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F: Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21:2317–2325.
22. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15: 479.
23. Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Tugores A, Alonso MA, Yague E, Pivel JP, Sanchez-Madrid F: Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol.* 1992 May;22(5):1253-9.
24. Tugores A, Alonso MA, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO: Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1. *J Immunol.* 1992; Apr 1;148(7):2300-6.
25. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F: Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med.* 1988; Nov 1;168(5):1621-37.
26. Lauzurica P, Sancho D, Torres M, Albella B, Marazuela M, Merino T, Bueren JA, Martinez-A C, Sanchez-Madrid F: Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood.* 2000; 95 (7): 2312-20.
27. Ben-Efraim S, Keisari Y, Ophir R, Pecht M, Trainin N, Burstein Y: Immunopotentiating and immunotherapeutic effects of thymic hormones and factors with special emphasis on thymic humoral factor THF-gamma2. *Crit Rev Immunol.* 1999; 19 (4): 261-84.

28. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V: Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *TRENDS in Immunology* 2002; 23 (6): 305-313.
29. Vacchio MS, Papadopoulos V, Ashwell JD: Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J Exp Med.* 1994; 179 (6): 1835-46.
30. Pazirandeh A, Xue Y, Rafter I, Sjovall J, Jondal M, Okret S: Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J.* 1999; 13 (8): 893-901.
31. Lechner O, Wieggers GJ, Oliveira-Dos-Santos AJ, Dietrich H, Recheis H, Waterman M, Boyd R, Wick G: Glucocorticoid production in the murine thymus. *Eur J Immunol.* 2000; 30 (2): 337-346.
32. Lechner O, Dietrich H, Wieggers GJ, Vacchio M, Wick G: Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus. *Int Immunol.* 2001; 13 (6): 769-776.
33. Evans RM: The steroid and thyroid receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
34. Smith, DF, Toft DO: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7: 4-11.
35. Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Litwack G: The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct.* 1997; 7(2): 85-98.
36. Drouin J, Sun YL, Tremblay S, Lavender P, Schmidt TJ, de Lean A, Nemer M: Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 1992; 6(8): 1299-1309.
37. Berg JM: DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; 57: 1065-1068.
38. Tai TC, Claycomb R, Her S, Bloom AK, Wong DL: Glucocorticoid responsiveness of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 1385-1392.
39. Cornett, LE, Hiller FC, Jacobi SE, Cao W, McCraw DW: Identification of a glucocorticoid response element in the rat beta2-adrenergic receptor gene. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54: 1016-23.
40. Hagerty T, Fernandez E, Lynch K, Wang SS, Morgan WW, Strong RT: Interaction of a glucocorticoid-responsive element with regulatory sequences in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurochem.* 2001; 78: 1379-1388.
41. He B, Tong TK, Hiou-Tim FF, Al-Akad B, Kronenberg HM, Karapli AC: The murine gene encoding parathyroid hormone: genomic organisation, nucleotide sequence and transcriptional regulation. *J. Mol. Endocrinol.* 2002; 29: 193-203.

42. Hines ER, Collins JF, Jones, MD, Serey SH, Ghishan FK: Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002; 283: 356-363.
43. Arima K, Hines ER, Kiela PR, Drees JB, Collins JF, Ghishan FK: Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIb Na-P(i) cotransporter during ontogeny. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283 (2): 426-34.
44. Itani OA, Liu KZ, Cornish KL, Campbell JR, Thomas CP: Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5' flanking region. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002; 283: 971-979.
45. Buttgerit F, Scheffold A: Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids.* 2002; 67 (6): 529-534.
46. Borski RJ, Hyde GN, Fruchtman S, Tsai WS: Cortisol suppresses prolactin release through a non-genomic mechanism involving interactions with the plasma membrane. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001; 129 (2-3): 533-541.
47. Gametchu B, Watson CS, Wu S: Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J.* 1993; 7 (13): 1283-92.
48. Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS: Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids.* 1999; 64 (1-2): 107-19.
49. Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J: BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature.* 2001 Mar 15; 410(6826): 380-3.
50. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit 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; 18 (1): 70-80.
51. Powell CE, Watson CS, Gametchu B: Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine.* 1999 Jun; 10(3): 271-80.
52. Gametchu B, Watson CS: Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines. *J Cell Biochem.* 2002; 87 (2): 133-46.

53. Schnaider T, Somogyi J, Csermely P, Szamel M: The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signaling events of T-lymphocyte activation. *Cell Stress Chaperones*. 2000; 5 (1): 52-61.
54. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L: Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*. 2000; 33 (6): 341-365.
55. Pratt WB: The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998; 217 (4): 420-434.
56. Cissel DS, Beaven MA: Disruption of Raf-1/heat shock protein 90 complex and Raf signaling by dexamethasone in mast cells. *J Biol Chem*. 2000; 275 (10): 7066-7070.
57. Strähle U, Schmidt A, Kelsey G, Stewart AF, Cole TJ, Schmid W, Schütz G: At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *PNAS* 1992; 89: 6731-6735.
58. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. 1985; *Nature* 318: 635-641.
59. Otto C, Reichardt HM, Schutz G: Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. *J Biol Chem*. 1997; 272 (42): 26665-26668.
60. Sathiyaa R, Vijayan MM: Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 284 (6): 1508-15.
61. Cabral AL, Hays AN, Housley PR, Brentani MM, Martins VR: Repression of glucocorticoid receptor gene transcription by c-Jun. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 175 (1-2): 67-79.
62. Hoeck W, Rusconi S, Groner B: Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptor in cultured cells. *J. Biol. Chem*. 1989; 264: 14396-14402.
63. Rosewicz S, McDonald AR, Maddux BA, Goldfine ID, Miesfield RL, Logdson CD: Mechanism of glucocorticoid down-regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem*. 1988; 263: 2581-2584.
64. Eisen, LP, Elsasser MS, Harmon JM: Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids. *J. Biol. Chem*. 1988; 263: 12044-12048.
65. Reichardt HM, Schutz G: Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 146 (1-2): 1-6.

66. Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM: Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 1990; 62 (6): 1217-1226.
67. Ray A, Prefontaine KE: Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91 (2): 752-756.
68. Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK: Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1993; 268 (8): 5353-5356.
69. Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM: STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem.* 1997; 272 (49): 30607-30610.
70. Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B: Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature.* 1996; 383 (6602): 726-728.
71. Star P: An unusual case of Addison's disease; sudden death; remarks. *Lancet.* 1895; 1: 284..
72. Jaffe HL: The influence of the suprarenal gland on the thymus I. Regeneration of the thymus following double supradrenalectomy in the rat. *J. Exp. Med.* 1924; 40: 325-341.
73. Jaffe HL: The influence of the suprarenal gland on the thymus III. Stimulation of the thymus gland following double supradrenalectomy in young rats. *J. Exp. Med.* 1924; 40: 753-759.
74. Selye H: Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br. J. Exp. Pathol.* 1936; 17: 234-248.
75. Zacharchuk CM, Mercep M, Chakraborti PK, Simons SS Jr, Ashwell JD: Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol.* 1990; 145 (12): 4037-4045.
76. Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD: Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J Immunol.* 1999; 163 (3): 1327-1333.
77. Stephens GL, Ashwell JD, Ignatowicz L: Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire. *Int Immunol.* 2003;15 (5): 623-632.
78. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS: Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 309-45.

79. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G: Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 1995; 9 (13): 1608-1621.
80. Purton JF, Boyd RL, Cole TJ, Godfrey DI: Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity.* 2000;13 (2): 179-186.
81. Godfrey DI, Purton JF, Boyd RL, Cole TJ: Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol Today.* 2000; 21 (12): 606-611.
82. Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G: In vitro models of T cell development. *Semin Immunol.* 1999; 11 (1): 3-12.
83. King LB, Vacchio MS, Dixon K, Hunziker R, Margulies DH, Ashwell JD: A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity.* 1995; 3(5): 647-656.
84. Sacedon R, Vicente A, Varas A, Morale MC, Barden N, Marchetti B, Zapata AG: Partial blockade of T-cell differentiation during ontogeny and marked alterations of the thymic microenvironment in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J Neuroimmunol.* 1999; 98 (2): 157-167.
85. Morale MC, Batticane N, Gallo F, Barden N, Marchetti B: Disruption of hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in transgenic mice expressing type II glucocorticoid receptor antisense ribonucleic acid permanently impairs T cell function: effects on T cell trafficking and T cell responsiveness during postnatal development. *Endocrinology.* 1995; 136 (9): 3949-3960.
86. Kaye J, Hsu ML, Sauron ME, Jameson SC, Gascoigne NR, Hedrick SM: Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature.* 1989; 341 (6244): 746-749.
87. Czömpöly T, Lábadi A, Balázs M, Németh P, Balogh P: Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 307 (4): 791-796.
88. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Németh P: Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods.* 1998; 214 (1-2): 19-27.
89. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general

- feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995; 182 (5): 1545-1556.
90. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184 (1): 39-51.
  91. Screpanti I, Morrone S, Meco D, Santoni A, Gulino A, Paolini R, Crisanti A, Mathieson BJ, Frati L: Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J Immunol.* 1989; 142 (10): 3378-3383.
  92. Chow SC, Snowden R, Orrenius S, Cohen GM: Susceptibility of different subsets of immature thymocytes to apoptosis. *FEBS Letters.* 1997; 408 (2): 141-146.
  93. Barone KS, O'Brien PC, Stevenson JR: Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. *Cell Immunol.* 1993; 148 (1): 226-233.
  94. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980; 284 (5756): 555-6.
  95. McColl KS, He H, Zhong H, Whitacre CM, Berger NA, Distelhorst CW: Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 139 (1-2): 229-238.
  96. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB: Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol.* 2002; 3 (10): 932-939.
  97. Van Den Brandt J, Wang D, Reichardt HM: Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. *Mol Endocrinol.* 2003; Dec 30 [Epub ahead of print]
  98. Scott DE, Gause WC, Finkelman FD, Steinberg AD: Anti-CD3 antibody induces rapid expression of cytokine genes in vivo. *J Immunol.* 1990; 145 (7): 2183-2188.
  99. Brewer JA, Kanagawa O, Sleckman BP, Muglia LJ: Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo. *J Immunol.* 2002; 169 (4): 1837-1843.
  100. Cancedda C, Filaci G, Puppo F, Ghio M, Contini P, Indiveri F: Immune homeostasis requires several biologic factors including glucocorticoid hormones. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 966: 49-63.

101. Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D, Leo O: Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med.* 2001; 193 (7): 803-814.
102. Van Laethem F, Liang X, Andris F, Urbain J, Vandenbranden M, Ruyschaert JM, Resh MD, Stulnig TM, Leo O: Glucocorticoids alter the lipid and protein composition of membrane rafts of a murine T cell hybridoma. *J Immunol.* 2003; 170(6): 2932-2939.
103. Zinkernagel RM, Doherty PC: MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol.* 1979; 27: 51-177.
104. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J: Upregulation of surface markers on dying thymocytes. *J Exp Med.* 1995; 181 (2): 649-655.
105. Miller AH, Spencer RL, Pearce BD, Pisell TL, Azrieli Y, Tanapat P, Moday H, Rhee R, McEwen BS: Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell Immunol.* 1998; 186 (1): 45-54.
106. Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R, Wick G: CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol.* 2001; 31 (8): 2293-2301.
107. Lefebvre P, Danze PM, Sablonniere B, Richard C, Formstecher P, Dautrevaux: Association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90K nonsteroid-binding component is stabilized by both steroidal and nonsteroidal antiglucocorticoids in intact cells. *Biochemistry.* 1988; 27 (26): 9186-9194.
108. Distelhorst CW, Howard KJ: Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone RU486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *J Steroid Biochem.* 1990; 36 (1-2): 25-31.



**MELLÉKLETEK** (az értekezés alapját képező közlemények)