

# GLUKOKORTIKOID-INDUKÁLT APOPTÓZIS VIZSGÁLATA ÉRETLEN ÉS ÉRETT T SEJT ALCSOPORTOKBAN

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



**Dr. Prenek Lilla**

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet  
Klinikai Központ  
Pécsi Tudományegyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Témavezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár  
Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár  
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar

Pécs  
2018

## **1. Bevezetés**

### **1.1 A glukokortikoid hormonok hatásai**

A glukokortikoid hormonokat (GC) a mellékvese-kéreg zona fasciculata sejtjei termelik. Emberben a legfontosabb GC a kortizol, rágcsálókban pedig a kortikoszteron. A hormonok elválasztását a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely szabályozza és mind pszichés, mind fizikai stressz kiválthatja. A GC-ok számos élettani hatással rendelkeznek; szerepet játszanak a szénhidrátok, zsírok, fehérjék anyagcseréjében, hatással vannak fejlődési folyamatokra, a víz- és elektrolit háztartásra, erek tónusára, illetve mindezek mellett befolyásolják az immunrendszert. Biológiaiilag aktív GC-ok termelődnek például a thymusban, belekben, bőrben, agyban és a zsírszövetben is.

A GC-ok jelentős hatással vannak az immunrendszer működésére. Befolyásolják a fejlődő thymocyták apoptózisát, szabályozzák a T sejt receptoron (TcR) keresztül érkező szignálokat. Az érett T sejtek funkciójában is fontosak; szükségesek a megfelelő T sejt válasz fenntartásához. A szintetikus GC-analógokat (pl. dexamethasone (DX)) elterjedten alkalmazzák a klinikai gyakorlatban autoimmun betegségek, hematológiai malignitások és allergiák kezelésében, mivel elősegítik a leukémiás sejtek, fejlődő thymocyták és bizonyos érett, aktivált T sejtek apoptózisát.

### **1.2 A glukokortikoid receptor**

A GC-ok intracelluláris GC receptoron (GR) keresztül fejtik ki hatásaikat. A GR a nukleáris receptor szupercsalád tagja, ligand-dependens transzkripciós faktor. A GR konzervált fehérje; a humán, egér és patkány GR aminosavsorrendje közel 90%-ban megegyezik. A humán GR-nak több izoformája közül leginkább ismertek a GR $\alpha$  és GR $\beta$ . A GR $\alpha$  a citoplazmában található, ez a domináns forma, a béta állandóan a sejtmagban helyezkedik el. A GR $\beta$  izoforma funkciója kevésbé ismert. Egérben is sikerült bizonyítani a GR $\alpha$  és GR $\beta$  jelenlétét. Itt is a GR $\alpha$  a fontosabb izoforma, a GR $\beta$  szerepe hasonló, mint emberben. A GR a legtöbb sejtben, szövetben expresszálódik.

### **1.3 A glukokortikoid receptor jelátviteli útvonalak**

A GC-ok hatásait főleg kétféle útvonalon keresztül fejtik ki. Ezen két útvonal a lassabban kialakuló genomikus hatásokat és a gyorsabban végbemenő nem-genomikus hatásokat foglalja magában.

#### 1.3.1 Genomikus hatások

A GC-ok genomikus hatásait írták le először. A GR a citoplazmában, inaktív formában, fehérjekomplexhez (pl. hőszokkfehérje- (Hsp-) 90, Hsp-70, p23) kapcsolódva helyezkedik el. A GR ligand-kötődés hatására leválik a komplexről és dimerizálódva a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS meghatározott szakaszaihoz, GRE-ekhez (glucocorticoid responsive elements) kötődik és ezáltal a génexpressziót befolyásolja. A géntranszkripciós változások megvalósulásához hosszabb időre, több órára, esetleg napra van szükség. Az aktivált GR képes transzkripciós faktorként direkt, illetve más transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva (pl. AP-1, NF- $\kappa$ B, NFAT) indirekt módon befolyásolni számos gén expresszióját. Bizonyos gének átírását serkenti (pl. annexin-1, interleukin- (IL-) 10), másokét gátolja (pl. IL-2, IL-1 $\beta$ ).

### 1.3.2 Nem-genomikus hatások

A nem-genomikus hatások, amelyek akár percekben belül is kialakulhatnak, nem közvetítik transzkripcionális változások, hanem egyéb alternatív útvonalakon keresztül valósulnak meg. A következő nem-genomikus hatásokat írták le eddig:

1. A GC-ok bizonyos sejttípusokon képesek direkt membránhatásuk révén membrántranszport-folyamatok befolyásolására. Nagy dózisu szteroid kezelés megváltoztatja a membrán lipidek mobilitását, mert a GC-ok lipidoldékonyságukkal képesek, befolyásolni a plazmamembrán fiziko-kémiai tulajdonságait.

2. A membrán GR-t (mGR) monocytákon és B sejteken is megfigyelték. Rheumatoid arthritisben és spondylitis ankylopoeticában szenvedők B sejtjein és monocytáin megemelkedik az expressziója, ezért elképzelhető, hogy ezen betegségekben patológiás szerepet tölt be.

3. A GR képes más citoplazmatikus fehérjékhez hozzákapcsolódva jelátviteli útvonalakat befolyásolni. Humán CD4<sup>+</sup> T sejtekben TcR stimulációt követően a GR asszociálódott TcR jelátviteli molekulákkal, az Lck-val és Fyn-nel. Rövid idejű DX kezelés gátolta a TcR aktiváció által indukált Lck/Fyn foszforilációt, ami a GR-TcR-Lck-Fyn multimolekuláris komplex szétesése miatt következett be. Jurkat, human T sejt vonalban 2-5 perc nagy dózisu DX kezelés TcR aktiváció nélkül átmeneti ZAP-70 tirozin foszforilációt okoz, melyet GR antagonistá, RU486-tal gátolni lehetett. Szintén Jurkat sejtekben a GR a ZAP-70 kinázzal asszociálódott, illetve, a GR a ZAP-70 kinázzal és a Hsp-90-nel egy multimolekuláris komplexet hozott létre. A GC-ok hatékonyan gátolják a T sejtek funkcióit, amelynek molekuláris hátterében a fent említett folyamatok is fontos szerepet játszanak.

4. Ligand kötődést követően az aktivált GR képes transzlokálódni a mitokondriumba lymphoid és nem-lymphoid sejtekben egyaránt, ahol hozzájárulhat az apoptotikus kaszkád elindításához. Kutatócsoportunk korábbi munkája során kettős pozitív (DP) thymocytákban figyelte meg, hogy 30 perc GC-analóg kezelés hatására a GR inkább a mitokondriumba vándorolt (transzlokálódott), mint a sejtmagba, és a bekövetkező mitokondriális membránpotenciál csökkenés jelezte, hogy az apoptózis folyamata is aktiválódott ezekben a sejtekben. Ez a transzlokáció jól korrelált a DP sejtek jelentős GC-indukált apoptózis érzékenységgel. Nem tudjuk, pontosan milyen módon járul hozzá a GR mitokondriális transzlokációja az erre érzékeny sejtek apoptózisához.

### **1.4 Apoptózis**

Az apoptózis, vagy programozott sejthalál, számos fiziológias folyamatban szerepet játszik, beleértve az immunsejtek fejlődését és az immunválaszt is. A sejthalálnak sokféle formája ismert, amelyek mindegyike sok, komplex molekuláris folyamatot foglal magában.

Galluzzi és munkatársai a Nomenclature Committee on Cell Death-nek készített legújabb, 2018-as ajánlásukban 2 fő formáját különítették el a sejthalálnak; a véletlen, vagy akaratlan sejthalált (ACD; accidental cell death) és szabályozott sejthalált (RCD; regulated cell death). ACD bekövetkezhet, ha a sejtet extrém fizikai, kémiai és mechanikai hatások érik. A RCD egy szigorúan szabályozott, összetett folyamat. Ide tartozik az apoptózis is. Három fő apoptotikus útvonalat (extrinsic, intrinsic és caspase-independens) különböztetnek meg, amelyek alapvetően három fázisra oszthatóak; az iniciációra vagy aktivációra, a végrehajtásra (execution) és a sejtpusztulásra.

#### 1.4.1 Extrinsic apoptózis

Az extrinsic útvonalat extracelluláris stressz szignálok indítják el, amelyeket a sejt felszínén található receptorok érzékelnek. Ezek a receptorok a halálreceptorok (DR, death receptor). A leginkább tanulmányozottak: tumor nekrosis faktor (TNF) receptor (TNFR), Fas receptor (FasR), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Intracelluláris doménjük, a haláldomén (death domain), a receptorok aktivációját követően kötőhelyet biztosít intracelluláris fehérjéknek. A keletkező szupramolekuláris komplexet a death-inducing signaling complex (DISC) ismeri fel, mely ezt követően aktiválja a procaspase-8-at. Az ún. I-es típusú sejtekben (pl. érett lymphocyták) a nagy mennyiségű aktív caspase-8 aktiválja a caspase-3 és -7-et és ez elegendő a sejt elpusztulásához. Az ún. II-es típusú sejtekben (pl. hepatocyták, pancreas  $\beta$  sejtek, daganatos sejtek többsége) kevés aktív caspase-8 képződik, illetve a caspase-3 és -7 aktiválódását XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) gátolja. A sejt pusztulásához a caspase-8-nak hasítania kell a Bid-et. A hasított Bid (tBid) a mitokondriumhoz vándorol, és ott a „BH3-only” fehérjékkel elindítja az intrinsic apoptotikus útvonalat.

#### 1.4.2 Intrinsic apoptózis

Az intrinsic útvonalat elindíthatja irreverzibilis DNS károsodás, magas citoplazmatikus  $Ca^{2+}$  koncentráció, oxidatív stressz, növekedési faktor megvonás, endoplazmatikus retikulumot erő stressz. A szabályozásért a Bcl-2 fehérjecsaldá felelős. Ezeknek a fehérjéknek közös jellemzője, hogy legalább 1, maximum 4 konzervált Bcl-2 homology (BH) domént tartalmaznak. A fehérjecsaldá tagjait proapoptotikus (Bax, Bak, Bad, Bcl-x<sub>S</sub>, Bid, Bik, Bim, Hrk) és anti-apoptotikus fehérjékre (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1) lehet osztani az alapján, hogy az apoptózis folyamatát elősegítik vagy gátolják. A proapoptotikus fehérjéken belül két további alcsoportot lehet elkülöníteni az alapján, hogy hány BH domént tartalmaznak; a Bax, vagy multidomén proapoptotikus, fehérjéknek (Bax, Bak, Bok, Mtd) BH1-BH3 vagy BH1-BH4 doménjük van, a „BH3-only” alcsoportnak (Bim, Bid, Bad, PUMA, Noxa) csak egy BH3 doménjük van. A BH3-only fehérjék direkt aktiválhatják a multidomén pro-apoptotikus fehérjéket, hogy azok pórust képezzenek a mitokondrium külső membránján. Másrészt indirekt módon gátolják az anti-apoptotikus fehérjék apoptózist gátló hatását.

Az aktivált Bax és Bak molekuláris komplexet hoznak létre, amellyel pórust formálnak a mitokondrium külső membránján (MOMP; mitochondrial outer-membrane permeabilization), és ezzel lehetővé teszik a citokróm c felszabadulását a mitokondrium belső membránjából. Az anti-apoptotikus fehérjék, mint a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ezen folyamat ellen dolgoznak, neutralizálva a pro-apoptotikus fehérjéket, megakadályozzák a citokróm c citoplazmába való kijutását. A mitokondrium külső membránján a pórus kialakulása („point of no return”) nehezíti az ATP szintézist, toxikus fehérjék szabadulnak ki a citoplazmába, mint pl. citokróm c, apoptózis indukáló faktor (AIF), endonukleáz G (EndoG), Smac (más néven Diablo), HtrA2 (más néven Omi), végül pedig a légzési lánc gátlásához és reaktív oxigén szabadgyökök felszaporodásához vezet. A citoplazmába került citokróm c asszociálódik az Apaf-1-el (apoptosis protease-activating factor-1) és a procaspase-9-el, ami így aktiválódik. Ezt a multimolekuláris komplexet apoptoszómának nevezik. A caspase-9 pedig aktiválja a caspase-3 és caspase-7-et, amelyek a sejt halálához vezetnek.

## 1.5 Glukokortikoidok hatása thymocyták és T sejtek apoptózisára

A GC-ok immunrendszerre kifejtett hatásai már régóta ismertek. Nagy dózisu GC beadása a thymus gyors involúcióját okozza a thymocyták és a TEC-ek depléciója révén. Érdekes módon mind a thymocyták, mind a TEC képesek GC szintézisre. GC szintézist azonban nem találtak a SP thymocytákban, és a perifériás T sejtekben, sem nyugvó, sem aktivált formában. Úgy tűnik a GC szintézis a fejlődő thymocyták sajátos tulajdonsága.

A GC-ok bizonyos körülmények között a TcR-on keresztül elindított apoptózissal szemben meg is védhetik a sejteket. Alacsonyabb koncentrációban a GC-ok képesek gátolni a TcR-on keresztül elinduló jelátvitelt a thymocytákban, amikor azok mindkét receptoron keresztül érkező szignált egyszerre kapják. Ez képes azokat a thymocytákat a TcR-on keresztül indukált apoptózistól megmenteni, amelyek egyébként a negatív szelekció során elpusztulnának. Ez a kölcsönös antagonizmus modell. A kétféle szignált egyidejűleg kapó thymocytákban a Bcl-2 fehérje up-regulálódik. Más kutatócsoport a kölcsönös antagonizmus modellt alapul véve bizonyította, hogy a GC-ok a pozitív szelekcióban is szerepet játszanak.

Más kutatócsoportok érett, naiv T sejtekben írták le a GR és a TcR jelátviteli molekulák közötti cross-talk-ot; a GC-ok gátolták az Lck, Fyn molekulákat. Feltételezhető, hogy a mellékvese által termelt GC-ok elsősorban szisztémás immunválaszokat befolyásolnak, ugyanakkor a thymusban lokálisan képződő hormonok inkább helyileg befolyásolják a T sejtek érését.

A thymocyták közül a DP sejtek a legérzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra, annak ellenére, hogy ebben a thymocytá alcsoportban a legalacsonyabb a GR expressziója. Megfigyeltük DP thymocytákban DX hatására a GR mitokondriumba való transzlokációját és a mitokondriális membránpotenciál csökkenését. Egy TcR transzgenikus egérmodellen kimutattuk, hogy azok a thymocyták, amelyek túlélnek a T sejt szelekciót, up-regulálják („felülszabályozzák”) az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjét.

Bcl-2 fehérjék fontos szerepet játszanak a DX-indukált thymocytá apoptózisban. Megfigyelték, hogy a Bax és a Bak fontos szerepet játszik a DX-indukált apoptózisban. A GC-okról kimutatták, hogy szabályozzák a Bcl-2 fehérjék expressziós szintjét is, genomikus hatásaik révén megváltoztatják a Bim és a Bcl-x<sub>L</sub> expresszióját. Ezek az eredmények a sajátjainkkal együtt megerősítették annak a lehetőségét, hogy a DP thymocyták GC-indukált apoptózisában az intrinsic apoptotikus útvonal szerepet játszhat.

A GC-oknak nem csak a DP thymocytákra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Egy másik munkánk során *in vivo* DX beadását követően figyeltük meg a különböző nyirokszervek sejtösszetételében bekövetkező változásokat. Figyelmünket különös tekintettel az immunrendszer szabályozásában fontos szerepet játszó regulatórikus T sejtekre összpontosítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy a thymusban lévő regulatórikus T sejtek (tTreg) bizonyos fokú rezisztenciát mutattak a DX-indukált apoptózissal szemben, ezzel ellentétben a lépben található Treg-ek (pTreg) viszont érzékenyek voltak a DX-indukált apoptózisra. Ennek molekuláris hátterét azonban még nem ismerjük.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a GR mitokondriális transzlokációja, ezáltal nem-genomikus hatása, valószínűleg fontos szerepet játszik a thymocytá apoptózisában, habár ennek pontos folyamata még nem teljesen tisztázott. Ugyanakkor más sejtek eltérő reakciója az *in vivo* DX kezelésre felveti annak a lehetőségét, hogy bennük a GR talán más apoptotikus folyamatokat aktivál, esetleg más nem-genomikus folyamatok révén.

## 2. Célkitűzések

A GC-ok fontos szerepet játszanak az immunsejtek fejlődésében és apoptózisában, azonban a különböző sejtek eltérő mértékű érzékenységgel reagálnak a szteroid kezelésre. A thymocytá alcsoportok közül a DP thymocyták bizonyultak a legérzékenyebbnak a DX-indukált apoptózisra. Amelyért a GC-ok nem-genomikus hatásai közül feltehetően az aktivált GR mitokondriumba való transzlokációja és az ennek következtében bekövetkező mitokondriális membránpotenciál csökkenés a felelős. A folyamat molekuláris mechanizmusai azonban még nem ismertek.

Munkánk során a GC-ok DP thymocyták apoptotikus folyamatokra gyakorolt hatásait akartuk vizsgálni, különös tekintettel a GR-nak a Bcl-2 fehérjékkel való interakciójára, illetve a caspase-ok aktivációjára.

1. GR interakciójának vizsgálata Bcl-2 fehérjékkel DP thymocytákban
2. Bcl-2 fehérjék szubcelluláris eloszlásbeli változásainak megfigyelése rövid idejű DX kezelés hatására
3. Citokróm c citoplazmatikus megjelenésének detektálása
4. Caspase aktiváció kinetikájának jellemzése

Korábban végezett *in vivo* DX kezelés során megfigyeltük, hogy a különböző T sejt alcsoportok eltérő GC-indukált apoptózis érzékenységet mutatnak, a tTreg-ek különösen ellenállóknak tűntek a többi sejthez képest.

Az ennek hátterében meghúzódó folyamatok azonban még nem ismertek, ezért szeretnénk volna őket alaposabban feltárni.

5. Korai apoptotikus jelek vizsgálata Annexin V segítségével CD4<sup>+</sup> thymocytákban, tTreg-ekben, CD4<sup>+</sup> lépsejtekben és pTreg-ekben
6. Caspase aktiváció kinetikájának nyomon követése CD4<sup>+</sup> thymocytákban és lépsejtekben, valamint Treg-ekben
7. GR és Foxp3 közötti kolokalizáció vizsgálata pTreg-ekben és tTreg-ekben

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1 Egerek

A kísérletekhez 4-6 hetes *BALB/c* egereket használtunk. Az állatokat konvencionális körülmények között tartottuk, kereskedelmi forgalomban kapható egértápot és vizet *ad libitum* kaptak. Minden kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság előírásainak megfelelően hajtottuk végre (#BA 02/2000-16/2015).

### 3.2 Izolált thymocyták és lépsejtek *in vitro* GC-analóg kezelése

Az egerek feláldozását követően eltávolítottuk thymusukat és lépüket. Ezt követően a szerveket mechanikusan homogenizáltuk, majd a sejteket átszűrtük.  $5 \times 10^7$  thymocytát és

lépsejtet kezeltünk  $10^{-6}$ M DX-nal szérum-mentes RPMI-ben. A kontroll mintákat azonos körülmények között tartottuk, azonos ideig inkubáltuk az oldószer jelenlétében.

### 3.3 Antitestek

Áramlási citometriához a következő antitesteket használtuk: anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-CD8-PE-Cy5, anti-CD25-APC. Az aktivált, hasított caspase-ok vizsgálatához a következő antitesteket használtuk elsődleges antitestként: nyúl anti-caspase-3, nyúl anti-caspase-8 és nyúl anti-caspase-9, másodlagos antitestként a kecske anti-nyúl IgG-Alexa Fluor 488-t használtuk.

Konfokális mikroszkópiához anti-CD4-Pacific Blue, anti-CD8-Pacific Orange, anti-GR-FITC, anti-Foxp3-Alexa Fluor 647 valamint nyúl anti-Bak, -Bax, -Bcl-x<sub>L</sub> és nyúl anti-Bim elsődleges és kecske anti-nyúl IgG-Cy3 valamint kecske anti-nyúl IgG-FITC másodlagos antitesteket használtuk.

Az aktivált caspase-ok Western blot vizsgálatához elsődleges antitestként nyúl anti-caspase-3, -8, -9-et használtuk, másodlagos antitestként anti-nyúl IgG-peroxidázt. A citokróm c kimutatásához egér anti-citokróm c-t és anti-egér-PO-t használtuk. A nyúl anti-Bax anti-nyúl-PO-zal alkalmaztuk. Töltési kontroll vizsgálatához egér anti-β-aktin-t és anti-citokróm c-t használtuk anti-egér-PO másodlagos antitesttel.

Immunprecipitációhoz anti-GR-t használtuk. Az immunprecipitált minták Western blot analíziséhez a következő antitesteket használtuk: egér anti-Bcl-x<sub>L</sub> anti-egér-PO másodlagos antitesttel, nyúl anti-Bak, anti-Bax és nyúl anti-Bim anti-nyúl-PO másodlagos antitesttel. Töltési kontroll vizsgálatához anti-GR-t és anti-egér-PO másodlagos antitestet használtuk.

### 3.4 Annexin V jelölés

Thymocytákban és lépsejtékben az apoptózis korai kimutatására Annexin V jelölést végeztünk a sejteken.  $10^6$  kontroll és DX kezelt sejt sejt felszíni anti-CD4-PE, anti-CD8-PE-Cy5 és anti-CD25-APC jelölése után Annexin V-FITC jelölést végeztünk. A mintákat áramlási citométerrel analizáltuk.

### 3.5 Mitotracker chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros) jelölés konfokális mikroszkópiára

A Mitotracker CMX-Ros egy fluorescens festék, ami a mitokondriumok jelölésére alkalmas.  $10^6$  thymocytát inkubáltunk szérum-mentes RPMI-ben, amihez CMX-Ros törzsoldatot adtunk, 30 percig 37°C-on. Konfokális mikroszkópiához sejteket tovább jelöltük; sejt felszíni anti-CD4-Pacific Blue, anti-CD8-Pacific Orange és intracelluláris nyúl anti-Bax és anti-nyúl IgG-FITC jelölést végeztünk.

### 3.6 Jelölés konfokális mikroszkópiára

30 perc DX kezelést követően sejt felszíni jelölést végeztünk anti-CD4-Pacific Blue és anti-CD8-Pacific Orange antitestekkel jelölőpufferben, fixálás után az intracelluláris jelölést permeabilizáló pufferben végeztük, nyúl anti-Bak, -Bax, -Bcl-x<sub>L</sub>, és -Bim elsődleges antitestekkel, majd anti-nyúl IgG-Cy3 másodlagos antitesttel, végül 1 μg/ml anti-GR-FITC antitesttel.

### **3.7 GR-Foxp3 interakció vizsgálata konfokális mikroszkópiával**

A negatívan szeparált CD4 pozitív (EasySep Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit) thymocytákat és lépsejteket tovább szeparáltuk pozitívan CD25-re (EasySep Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit). 30 perc DX kezelést követően a sejteket anti-CD4-Pacific Blue antitesttel, majd anti-GR-FITC és anti-Foxp3-Alexa Fluor 674-tel Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set segítségével jelöltük a GR-Foxp3 interakció vizsgálata érdekében.

### **3.8 Konfokális mikroszkópia**

A minták vizualizálása és analízise Olympus Fluoview 300 konfokális mikroszkóppal, a Olympus Fluoview FV1000S-IX81 Image Acquisition Software System segítségével történt. Szekvenciális pásztázási módot használtunk. A jeleket 3-3 látótérben gyűjtöttük és a Bak, Bax, Bcl-x<sub>L</sub>, Bim fehérjék és a GR, valamint a Bax-CMX-Ros közötti, továbbá a GR-Foxp3 közötti kolokalizációt, analizáltuk ImageJ szoftver co-localisation plug-in-ja segítségével. 100 kontroll és 100 DX kezelt sejtben elemeztük a kolokalizált pixeleket a Cy3-GR, a CMX-Ros-Bax és a GR-Foxp3 között.

### **3.9 Aktivált caspase-ok jelölése áramlási citometriára**

10<sup>6</sup> thymocytát és lépsejtet kezeltünk DX-nal 0,5, 1, 2, 3 és 6 óráig. A sejt felszíni jelölést anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-PE és anti-CD25-APC segítségével végeztük, az intracelluláris jelöléshez elsődleges antitestként nyúl anti-caspase-3, -8, -9-et használtunk, másodlagosként pedig anti-nyúl IgG-Alexa Fluor 488-at. A mintákat áramlási citométerrel analizáltuk.

### **3.10 Áramlási citometria**

A mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel és a CellQuest Pro programmal mértük le és analizáltuk. Thymocytá és lépsejt szubpopulációkat külön analizáltuk a sejt felszíni CD4, CD8 és CD4 és CD25 együttes expressziójuk alapján. A populációkban az Annexin V-FITC-et és Alexa Fluor 488-at az FL1 csatornában detektáltuk. Fluoreszcencia hisztogramok segítségével határoztuk meg a különböző mintákban az aktív caspase-3, -8, -9-et expresszáló sejtek (Alexa Fluor 488 pozitív sejtek), illetve az Annexin V pozitív sejtek arányát.

### **3.11 Szubcelluláris frakcionálás**

Thymocytákból mitokondriális, citoplazmatikus és nukleáris frakciók izolálásához Mitochondrial Isolation Kit-et használtunk, követve a gyári előírásokat, kisebb módosításokkal. A citoplazmatikus és mitokondriális frakciókat vagy közvetlenül Western blotra használtuk, vagy immunprecipitációra. Immunprecipitációhoz a mitokondriális pelletet tovább lizáltuk TEGM lízis pufferben. 30 percig jégen inkubáltuk, majd 10 percig 13 000 rpm-el centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk fel immunprecipitációhoz.

### **3.12 Immunprecipitáció**

A citoplazmatikus és mitokondriális frakciókat a precipitáló antitesttel, anti-GR, egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on, folyamatos forgatás mellett. Másnap Portein-G-vel további 2 órán át forgattuk őket. A Protein-G-ről az immunkomplexeket SDS mintapufferben való forralással távolítottuk el, centrifugálást követően a felülúszót használtuk fel a Western blotra.



### 3.13 Western blot

A mitokondriális és citoplazmatikus frakciókkal SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Az elsődleges antitestek; anti-caspase-3, -8, -9 és anti-Bax, az immunprecipitált minták esetében: anti-Bak, -Bax, -Bcl-x<sub>L</sub>, -Bim és anti-GR. A töltési kontroll vizsgálatot anti-β-aktin és anti-citokróm c antitestek segítségével végeztük. A másodlagos antitestek; anti-egér-PO vagy anti-nyúl-PO. Vizualizáláshoz kemilumineszcens módszert és a Fujifilm LAS 4000 Blot Documentary System-et használtuk.

### 3.14 Blotok analízise

A blotok denzitometriás analízisét az Image J software segítségével végeztük. A vizsgált fehérjék relatív denzitását a β-aktin, citokróm c és a GR denzitásához volt normalizáltuk.

### 3.15 Statisztikai analízis

GraphPad Prism programot használtuk az ábrák készítéséhez és a statisztikai analízis, Student-féle *t* próba, elvégzéséhez. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat mint átlag ± SEM ábráztuk.

## 4. Eredmények

### 4.1 DX indukálta változások a GR és a Bcl-2 fehérjecsalád tagjainak kolokalizációjában

Az aktivált GR-nak potenciális molekuláris partnereket kerestünk, amelyek szerepet játszhatnak a mitokondriális, intrinsic, apoptotikus útvonalban a GC-indukált apoptózis során. Ehhez megvizsgáltuk a GR és a Bak, Bax, Bcl-x<sub>L</sub> és a Bim kolokalizációját kontroll és 30 percig nagy dózisu DX-nal kezelt DP thymocytákban konfokális mikroszkóp segítségével. Megfigyeltük, hogy a GR bizonyos mértékig kolokalizálódott mind a négy vizsgált Bcl-2 fehérjével. A kolokalizáció mértékének kvantifikálásához meghatároztuk és összehasonlítottuk a kolokalizált pixelek számát a kontroll és a 30 percig DX-nal kezelt DP thymocytákban. DX kezelést követően a kolokalizált pixelek száma minimálisan változott a GR és Bak között, enyhén csökkent a GR és a Bax esetében. A GR és a Bcl-x<sub>L</sub> kolokalizációja szignifikánsan csökkent DX kezelés hatására. Továbbá jelentős emelkedést figyeltünk meg a GR és a Bim kolokalizációjában 30 perc DX kezelést követően, amely azonban nem volt statisztikailag szignifikáns.

### 4.2 A GR interakciója a Bcl-2 fehérjecsalád tagjaival a thymocyták citoplazmájában és mitokondriumában

A konfokális mikroszkóppal kapott eredményeinket megerősítendő megvizsgáltuk a GR és a Bcl-2 fehérjecsalád tagjai; a Bak, Bax, Bcl-x<sub>L</sub> és a Bim fehérjék interakcióját ko-immunprecipitációs kísérletekben. Ezekben a kísérletekben a precipitációhoz anti-GR antitestet használtunk. Azt is vizsgálni akartuk, hogy a DX kezelés okoz-e valamilyen változást a GR-Bcl-2 fehérje komplexek szubcelluláris eloszlásában. Hogy ezt kiderítsük szubcelluláris fracionálást végeztünk és izoláltuk szeparátlan, kontroll és 30 percig DX-nal kezelt thymocyták citoplazmáját és mitokondriumát.

A ko-immunprecipitációs kísérletek megerősítették a konfokális mikroszkóppal kapott eredményeinket. A Bak koprecipitálódott a GR-ral és DX kezelést követően a Bak-GR koprecipitáció mértéke megemelkedett a citoplazmatikus és kis mértékben a mitokondriális frakcióban is. A GR-Bcl-x<sub>L</sub> koprecipitáció mértéke emelkedett a citoplazmatikus és csökkent a mitokondriális frakcióban a kontrollhoz képest. A GR-Bim asszociáció csak minimálisan változott a citoplazmatikus frakcióban, viszont jelentősen emelkedett a mitokondriálisban. A Bim jelentős mitokondriális felhalmozódása jelezheti potenciális szerepét a GC-indukált thymocytá apoptózis mitokondriális (intrinsic) apoptotikus útvonalában. Egyedül a Bax nem mutatott direkt asszociációt a GR-ral sem a citoplazmatikus, sem a mitokondriális frakcióban.

#### **4.3 A DX kezelés a Bax akkumulációját okozza a mitokondriumban**

A Bax esetében nem tudtuk megerősíteni a konfokális mikroszkóppal kapott kolokalizációs eredményeket ko-immunprecipitációval. Ezért ko-immunprecipitáció nélkül vizsgáltuk meg, hogy a nagy dózisu DX kezelés okoz-e változást a Bax citoplazmatikus és mitokondriális eloszlásában. Megfigyeltük, hogy a Bax DX kezelésre akkumulálódott a thymocyták mitokondriális frakciójában 30 perc DX kezelést követően. Ezt az eredményt sikerült konfokális mikroszkóppal is megerősítenünk, a Bax-CMX-Ros kolokalizálódott pixelek száma megemelkedett a DX kezelést követően.

#### **4.4 A caspase-ok aktivációjának kinetikája DP thymocytákban**

DP thymocytákban vizsgáltuk a caspase-ok aktivációját. Az aktivált, hasított caspase-9-et tartalmazó sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett 2 és 3 óra DX kezelést követően. Az aktivált caspase-3-at tartalmazó DP sejtek aránya már 1 óra kezelést követően emelkedett, és 2, 3 óra DX kezelést követően ez az arány már szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest. A caspase-9 és caspase-3 aktivációja DX kezelést követően az intrinsic apoptotikus útvonal aktivációját jelzi. Az aktív caspase-8-at tartalmazó DP sejtek aránya 30 perc és 1 óra DX kezelést követően enyhén emelkedett, és ez emelkedés szignifikánssá vált 2 és 3 óra kezelést követően, hasonló tendenciát mutatva a caspase-9 aktivációjához. A caspase-9 aktivációban megfigyelhető változások kifejezettebbnek tűnnek, mint a caspase-8 esetében 2 és 3 óra DX kezelést követően, ami a caspase-9 fontosabb szerepét jelzi a DX-indukált thymocytá apoptózisban.

#### **4.5 DX-indukált caspase aktiváció és citokróm c felszabadulás thymocyták citoplazmájában**

*In vitro* DX kezelt és kezeletlen thymocyták sejtlizátumában összehasonlítottuk az aktív caspase-3, -8, -9 és citokróm c szinteket. A citokróm c citoplazmába való felszabadulását 1 óra DX kezelést követően vizsgáltuk. Egy óra, nagy dózisu DX kezelés szignifikáns emelkedést okozott a citokróm c citoplazmatikus szintjében. Megfigyeltük az aktív caspase-9, -3 szintek szignifikáns emelkedését a kontrollhoz képest 3 óra DX kezelést követően.

#### **4.6 Annexin V vizsgálata CD4<sup>+</sup> T sejtekben és regulatórikus T sejtekben**

Sejtfelszíni CD4, CD8, CD25 jelölés után Annexin V jelölést végeztünk thymocytákon és lépsejteken kezelés előtt és 0, 2 és 4 óra DX kezelés után. A thymus eredetű CD4<sup>+</sup> T sejtekben 4 óra DX kezelést követően szignifikánsan megemelkedett az Annexin V pozitív sejtek aránya. A tTreg-ek esetében még 4 óra elteltével sem figyeltük meg a DX apoptózis indukáló hatását. A lép eredetű CD4<sup>+</sup> T sejteknél már kettő óránál emelkedett az

Annexin V pozitív sejtek aránya, 4 óránál az emelkedés továbbra is fennállt, habár kisebb mértékű volt. A pTreg-ek esetében szintén kettő óránál láttunk emelkedést, 4 óránál a kezelt és a kezeletlen mintában nem volt kimutatható különbség. Érdekes, hogy a kontrol CD4<sup>+</sup> thymocytákban és a tTreg-ekben is emelkedik 4 óra után az Annexin V pozitív sejtek aránya. Ez a jelenség azonban nem figyelhető meg a kezeletlen CD4<sup>+</sup> lépsejtek és a pTreg-ek esetében.

#### **4.7 Caspase-ok aktivációjának vizsgálata CD4<sup>+</sup> T sejtekben és regulatórikus T sejtekben**

Thymocytákon és lépsejteken is elvégeztük az aktív caspase-ok jelölését. Ez alkalommal is CD4, CD8, CD25 sejtfelszíni jelölést alkalmaztunk a vizsgálni kívánt populációk elkülönítésére. Mind a thymus, mind a lép eredetű sejtek esetében elmondható, hogy az aktivált caspase-okat tartalmazó sejtek aránya minden esetben jóval alacsonyabb volt a DP thymocytákban megfigyelteknél.

DX kezelés hatására a thymus eredetű CD4<sup>+</sup> T sejtekben 2 és 3 óra DX kezelés után szignifikáns volt az aktivált caspase-okat tartalmazó sejtek aránya, 6 óra után pedig jelentős emelkedés figyelhető meg az aktivált caspase-okat tartalmazó sejtek arányában. A tTreg-ek esetében csak minimális emelkedést figyeltünk meg DX kezelés hatására. Csak a caspase-3 pozitív sejtek aránya volt szignifikáns 6 óra kezelés után.

A lép eredetű CD4<sup>+</sup> T sejtek 2 és 3 óra DX kezelés után már szignifikánsan magasabb arányban tartalmaztak aktivált caspase-okat, és ez a tendencia 6 óra kezelés után is hasonló maradt, de az emelkedés mértéke nem volt olyan mértékű, mint a thymus eredetű CD4<sup>+</sup> sejtek esetében. Összességében az aktivált caspase-okat tartalmazó lép eredetű CD4<sup>+</sup> T sejtek aránya minden vizsgált időpontban kevesebb volt, mint a thymus eredetű CD4<sup>+</sup> sejtek esetében. A pTreg-ek esetében csak 3 óra DX kezelés után figyeltük meg az aktivált caspase-3 és -8-at tartalmazó sejtek arányának szignifikáns emelkedését, ami további emelkedést mutatott 6 óra kezelés után, de ez az emelkedés kisebb volt, mint amit a lép eredetű CD4<sup>+</sup> sejtek esetében láttunk.

#### **4.8 GR és Foxp3 közötti interakció vizsgálata konfokális mikroszkópiával**

Megvizsgáltuk, hogy van-e valamilyen kapcsolat a GR és a Treg-ek esetében központi fontosságú Foxp3 transzkripciós faktor között, és ez változik-e DX kezelésre. tTreg-ekben és pTreg-ekben 30 perc DX kezelés előtt és után vizsgáltunk konfokális mikroszkóppal a GR-Foxp3 kolokalizációt. DX kezelés nélkül a GR és a Foxp3 jelentős kolokalizációt mutatott mind a thymus, mind a lép eredetű regulatórikus T sejtekben, a DX kezelés hatására ez a kolokalizáció tovább emelkedett a pTreg-ekben, de a tTreg-ekben nem mutatkozott változás.

### **5. Összefoglalás, megbeszélés**

A GR fontos szerepet játszik az immunsejtek szelekciójában és apoptózisában. A nukleáris transzlokációja mellett a ligand kötött GR mitokondriális transzlokációja szoros összefüggést mutat a sejtek apoptózis érzékenységgel. Korábbi munkáinkban megfigyeltük, hogy a GC-indukált apoptózisra a thymocytá alcsoportok közül leginkább érzékeny DP thymocytákban, rövid idejű *in vitro* GC kezelés hatására a GR inkább a mitokondriumba transzlokálódott és nem a nukleuszba. Ehhez kapcsolódóan sikerült azt is megfigyelni

ugyannezen sejtszóportban, hogy a DX kezelés hatására a sejtek mitokondriális membránpotenciálja szignifikánsan csökkent, ami az apoptózis egyik korai és meghatározó eseménye. A GR DX hatására bekövetkező mitokondriális transzlokációja csak GC-indukált apoptózis érzékeny sejtekben figyelhető meg, mint amilyenek a DP thymocyták is. Mindezekből arra követeztettünk, hogy a mitokondriális, intrinsic, apoptotikus útvonal kiemelten fontos a GC-indukált apoptózisban.

Megfigyeltük, hogy a thymocytákban a Bak asszociálódott a GR-ral. Ez az asszociáció nem változott a mitokondriális frakcióban, de megemelkedett a citoplazmában rövid idejű, nagy dóziszú DX kezelés hatására. A Bak GC-indukált apoptózisban betöltött esetleges szerepét nem tudjuk kizárni az eredményeink alapján, de elképzelhető, hogy az apoptózis egy későbbi fázisában aktiválódik, mint amit mi vizsgáltunk. Ezt a feltevésünket mások korábbi eredményei is alátámasztják, Bax/Bak kettős KO egerek teljesen rezisztensnek bizonyultak a GC-indukált apoptózissal szemben, ugyanakkor a Bax vagy Bak egyszeresen KO egerek thymocytaí megőrizték GC érzékenységüket. A thymocytaák szelekciója Bax/Bim KO egér esetében felgyorsult, zavart szenvedett, a Bak/Bim KO egér esetében inkább a vad típusú egére hasonlított. Ez arra utal, hogy a Bax és a Bak is rész vesznek a thymocytaák apoptózisában, de a Bak önmagában nem elegendő a folyamat véghezviteléhez. Ehhez hasonló következtetést vonhatunk le a GC-indukált apoptózis estében is; a Bak is fontos szerepet játszik benne, de inkább a Bax szerepe az elsődleges, esetenként viszont a Bax és a Bak egymás hiányát kompenzálhatják.

Munkánk során sikerült kimutatnunk a Bim, egy „BH3-only” fehérje, és a GR asszociációját, ami a DX kezelés hatására jelentősen megemelkedett a mitokondriális frakcióban. Feltehetően a Bim ezt követően aktiválja a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjét, vagy gátolja az anti-apoptotikusokat, és ezzel elindítja az intrinsic apoptotikus útvonalat. Korábban Bim knock out egérben a GC-indukált apoptózis zavarát írták le, ami a Bim fontos, de nem kizárólagos szerepére utal a folyamatban. Két vagy 3 óra DX kezelést követően a GC-ok képesek a Bim expresszióját fokozni rágszálók thymocytaíban, ezt a megnövekedett expressziót összefüggésbe hozták a GC-indukált apoptózis érzékenységgel.

A GC-okat lymphocytá elpusztító képességük miatt gyakran alkalmazzák lymphoid malignitások kemoterápiás protokolljában, különösen gyermekkori akut lymphoblastos leukémiában (ALL). A betegség kedvezőbb kimenetelét összefüggésbe hozták a betegek egy részében azzal, hogy a GC kezelés képes-e a Bim transzkripcióját elősegíteni, a Bim megnövekedett expressziója ugyanis korrelált a GC-indukált apoptózis szenzitivitással. A Bim génjének hibás szabályozása előfordul hematológiai malignitásoknál. Csökkent expressziója, illetve bizonyos single nucleotid polimorfizmusai rosszabb anti-tumor terápiás válasszal hozhatóak összefüggésbe. A mi eredményünk is azt a tényt erősíti, hogy a Bim-nek fontos szerepe van szteroid érzékeny, DP thymocytaák GC-indukált apoptózisának iniciálásában; a Bim megnövekedett asszociációja a GR-ral a mitokondriumban elősegítheti a Bax aktivációját és oligomerizációját a mitokondrium külső membránjában, ezáltal a mitokondriális apoptotikus útvonal elindítását.

Érdekes módon a GR interakcióba lépett az anti-apoptotikus Bcl-x<sub>L</sub> fehérjével is. A Bcl-x<sub>L</sub>-ről kimutatták, hogy képes visszahelyezni (retrotranszlokálni) a Bax-ot a mitokondriumból a citoplazmába azáltal, hogy hozzákapcsolódik és gátolja pro-apoptotikus hatását. Feltételezzük, hogy a GR és a Bcl-x<sub>L</sub> közötti kapcsolat gátló hatással van a Bcl-x<sub>L</sub>

ezen funkciójára. 30 perc DX kezelés után a GR-Bcl-x<sub>L</sub> komplex aránya megemelkedett a citoplazmában és csökkent a mitokondriumban, ami arra utal, hogy miután a Bcl-x<sub>L</sub> áthelyeződött a citoplazmába a mitokondriumból, hozzákötődött GR-hoz és ez gátolta a Bcl-x<sub>L</sub> apoptotikus folyamatra kifejtett gátló hatását. Ezen feltevésünket támogatja más kutatócsoport eredménye is, ahol megfigyelték, hogy a Bcl-x<sub>L</sub> expressziója csökkent 2 vagy 3 óra DX kezelést követően. Tehát a DX Bcl-x<sub>L</sub>-t gátló hatása nem csak fehérje, hanem génextpresszió szinten is megfigyelhető.

Jóllehet a Bcl-x<sub>L</sub> és a GR kolokalizációja szignifikánsan csökkent a DX kezelést követően, ez azonban származhat abból, hogy a kolokalizációs eredmények csak DP sejtekből származtak és egy össz-kolokalizációt mutatnak mind a citoplazmában, mind a mitokondriumban, ugyanakkor a ko-immunprecipitációhoz szeparálatlan thymocytákat használtunk és a citoplazmát és a mitokondriumot külön vizsgáltuk.

A Bax citoplazma és mitokondrium közötti ingázása fontos szabályozója az intrinsic (mitokondriális) apoptotikus útvonalnak. Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a GR és Bax közötti kolokalizáció alig változott DX kezelés hatására, és nem tudtuk a kolokalizációs eredményeket megerősíteni ko-immunprecipitációval. Ennek oka lehet, hogy a kolokalizáció csak molekulák közelségét mutatja meg, de nem feltétlenül utal közvetlen molekuláris interakcióra, asszociációra két molekula között. A Bax és a GR esetében, ahol nem sikerült a kolokalizációt megerősítenünk, ez arra utal, hogy a két molekula nagyon közel volt egymáshoz, de nem volt közöttük közvetlen kapcsolat. A GR egy 94 kDa molekulatömegű fehérje, ami más Bcl-2 fehérjékkel asszociálódik, melyek a Bax közelében vannak. Mások munkájából ismert, hogy a Bcl-2 fehérjék egymással interakcióba lépnek. Ezek alapján a közvetlen kapcsolat nélküli kolokalizáció könnyen elképzelhető a Bax és a GR között, mivel a GR más Bcl-2 fehérjével való asszociációját sikerült kimutatnunk.

Mindezek mellett, ko-immunprecipitáció nélkül, megfigyeltük a Bax felhalmozódását a mitokondriumban, amely eredmény jól korrelált másokéval, és arra utal, hogy a Bax fontos szerepet játszik a thymocyták DX-indukált apoptózisában. A Bax mitokondriális külső membránban való oligomerizációja révén egy pórust formál, ami a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozza, ahogy azt a korábbi munkánk során már megfigyeltük.

A caspase-ok mind az extrinsic, mind az intrinsic apoptotikus útvonalak fontos szabályozói. A kísérleteink során megvizsgáltuk a caspase-ok aktivációját 30 perc, 1, 2, és 3 óra DX kezelést követően. Megfigyeltük, hogy szignifikánsan emelkedett az aktív caspase-3, -8, -9-et tartalmazó DP thymocyták aránya 2 és 3 óra DX kezelést követően. 1 óra után a caspase-3 aktivációja lehetett a caspase-9 aktiváció következménye, ami a mitokondriális membránpotenciál 30 perc DX kezelést követő csökkenése után következett be. Ugyanakkor részben okozhatta más apoptotikus útvonal aktiválódása is, mint például a ceramid és szfingozin képződése, amik szintén képesek a caspase-3-at aktiválni. A caspase-9 prominens aktivációját (2 óra DX kezelést követően) jelentős caspase-3 aktiváció követte (3 óra DX kezelés után). Az aktivált caspase-9-et tartalmazó DP sejtek aránya majdnem kétszeresére emelkedett 2 óra kezelést követően. Az aktív caspase-8-at tartalmazó DP thymocyták számának emelkedése is szignifikáns volt, de nem annyira jelentős, mint a caspase-9 esetében, ami arra utalhat, hogy a caspase-9 aktivációja elsődleges a caspase-8-éval szemben.

Ez tovább erősíti azt az elgondolásunkat, hogy a mitokondriális apoptotikus útvonal kiemelt szerepet játszik a DP thymocyták DX-indukált apoptózisában.

Ezen eredményeinket más kutatócsoportok munkája is alátámasztja. Néhány eredmény a caspase-9 elsődleges szerepét hangsúlyozza a GC-indukált apoptózisban, mások épp az ellenkezőjét állítják. Caspase-9 KO thymocyták rezisztensek voltak DX-indukált apoptózisra, de továbbra is érzékenyek maradtak TNF- $\alpha$ , a-CD95 által indukált sejthalálra. Apaf<sup>-/-</sup> KO thymocyták csak részleges rezisztenciát mutattak a DX-indukált apoptózissal szemben, de érzékenyek maradtak a Fas ligáció révén indukált apoptózisra. Ezzel szemben a caspase-8 deléciója nem okozott a thymocyták GC-indukált apoptózisában változást. Érdekes módon a caspase-3 hiányos egérben sem írtak le zavart a GC-indukált apoptózisban. Ezzel szöges ellentétben áll a caspase-3 gátlókkal kapott eredmény, mely a caspase-3 fontosságát emeli ki a folyamatban. Elképzelhető, hogy a caspase fehérjecsaldó egyes elemei képesek kompenzálni egymást ilyen körülmények között. Ugyanakkor a peptid inhibitorok alkalmazásakor végzett tanulmányok, a caspase-3 és -8 fontosságát hangsúlyozzák a GC-indukált thymocyták apoptózisban, habár ezen inhibitorok specificitása olykor megkérdőjelezhető. A GC-indukált apoptózis semmilyen zavarát nem észlelték Bid deficiens egérben, ami utalhat az extrinsic apoptotikus útvonal kevésbé fontos szerepére a GC-indukált sejthalálban. A caspase-8 aktivációja lehet a caspase-9 aktivációjának a következménye is, a cathepsin B vagy a caspase-3 aktivációja révén, ami aztán a caspase-6-ot majd a caspase-8-at aktiválja. De az aktivációját okozhatja más apoptotikus útvonalak aktivációja is; pl. ceramid szfingozin termelés, cyclin-dependens kináz 2 aktiváció, cathepsin B lizozómából való felszabadulása.

Kísérleteinkben, ahol az *in vivo* beadott DX hatását vizsgáltuk a nyirokszervek sejtes összetételére nézve, azt tapasztaltuk, hogy a thymusban a regulatórikus T sejtek aránya jelentősen megnőtt a DX kezelés hatására, azonban ez csak aránybeli növekedés volt, amely a többi sejt, elsősorban a GC érzékeny DP thymocyták, másrészt a CD4, CD8 egyszeresen pozitív thymocyták pusztulása miatt következett be. Ez arra utalt, hogy a tTreg-ek bizonyos fokú rezisztenciát mutatnak a GC-indukált apoptózissal szemben. A lép esetében nem tudtuk megfigyelni a regulatórikus T sejtek arányának növekedését. A lép össz-sejtszáma jelentősen csökkent DX kezelés hatására, és a pTreg-ek egy része a CD4<sup>+</sup> T sejtekhez hasonlóan elpusztultak. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a lépben található pTreg-ek GC érzékenysége eltér a thymusban található tTreg-ekétől.

A thymusban lévő CD4<sup>+</sup> sejtek már 2 óra DX kezelés után szignifikánsan nagyobb arányban tartalmaztak aktivált caspase-3, -8, -9 -et, és 4 óra elteltével az Annexin V pozitív sejtek aránya is szignifikánsan megemelkedett. Ezzel szemben a tTreg-ek esetében ugyanezen időpontoknál csak minimális caspase aktivációt figyeltünk meg, Annexin V jelölésnél pedig nem tapasztaltunk változást. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a tTreg-ek kevésbé érzékenyek a DX-indukált apoptózisra, mint a CD4<sup>+</sup> thymocyták vagy a DP sejtek. A lép esetében szintén 2 és 3 óra DX kezelés után már szignifikánsan megemelkedett az aktivált caspase-okat tartalmazó CD4<sup>+</sup> T sejtek aránya, és 3 óra elteltével a pTreg-ekben is szignifikánsan nagyobb arányban fordultak elő az aktivált caspase-3, és -8-at tartalmazó sejtek, valamint mindkét sejtpopuláció Annexin V pozitivitása emelkedett 2 óra DX kezelés után. Ezek alapján a lépben lévő Treg-ek apoptózis érzékenysége kifejezettebb volt, mint a tTreg-eké, és inkább a lépben lévő CD4<sup>+</sup> sejtekéhez volt hasonló.

A GC-ok regulatórikus T sejtek apoptózisára gyakorolt hatásával, különösen az aktiválódó apoptotikus útvonalak vizsgálatával, kevés tanulmány foglalkozik. A legtöbb ráadásul valamilyen betegségmodellben vizsgálja a GC-ok Treg-ek számára gyakorolt hatását, azonban ezek az eredmények néha ellentmondóak. Rágcsálókban megfigyelték, hogy a DX hatására megemelkedett a Treg-ek aránya perifériás vérben és a másodlagos nyirokszervekben. Ugyanakkor asthma és sclerosis multiplex egérmodellekben a GC-ok a Treg-ek számának csökkenését okozták. A humán eredmények is ellentmondásosak: asthmás betegek szteroiddal történő kezelése során először a keringő Treg-ek számának növekedését írták le, és hasonló jelenséget figyeltek meg autoimmun betegeknél is; szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek vérében, akik GC kezelést kaptak, magasabb CD25<sup>+</sup> T sejt számot figyeltek meg, mint a GC kezelésben nem részesülő betegek esetében, vagy az egészséges kontrollokban. Más kutatócsoportok viszont a GC-ok ellenkező hatását tapasztalták hasonló betegeknél. Human perifériás vérből izolált Treg-ek vizsgálatánál egy kutatócsoport azt találta, hogy a Treg-ek érzékenyebbek a DX-indukált apoptózisra, mint az effektor T sejtek. Azonban ezt az érzékenységet minimális dózisú IL-2 ellensúlyozni tudta, valószínűleg a rajtuk expresszálandó nagyszámú IL-2 receptornak (CD25) köszönhetően. Az eredmények összehasonlíthatóságát nehezíti, hogy különböző modellekben, eltérő szteroid dózissal végezték a GC kezeléseket, illetve a Treg-ek azonosítására használt markerek is eltérőek voltak.

Treg-ekben a GR és Foxp3 interakcióját vizsgáltuk. Már a kezeletlen tTreg-ekben és pTreg-ekben megfigyeltük a két molekula kolokalizációját, amit a DX kezelés csak a pTreg-ek esetében növelt meg, a tTreg-ek esetében a kolokalizáció mértéke nem változott.

Összefoglalva az eredményeink jól mutatják a GC-indukált korai apoptotikus folyamatok komplexitását DP thymocytaiban. Ligand kötődés nélkül is megfigyelhető némi asszociáció a GR és a Bcl-2 fehérjék között (Bak, Bim, Bcl-x<sub>L</sub>). Nagy dózisú DX kezelés hatására azonban az aktiválódott GR megváltoztatja a Bcl-2 fehérjék egyensúlyát olyan módon, hogy az elősegítse az apoptózist. A GR transzlokálódik a mitokondriumba, ahol az interakciója jelentősen megnövekszik a Bim-mel. A Bim feltehetően aktiválja a Bax-ot, ami a Bax mitokondriális akkumulációját okozza és a mitokondrium külső membránjában pórust formál, mely a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez vezet, valamint a citokróm c felszabadulásához és a caspase-9 aktivációjához. A Bcl-x<sub>L</sub> Bax pórusformálására kifejtett negatív hatását a GR-val való megnövekedett citoplazmatikus asszociációja gátolja. A GR-Bak asszociáció szerepének megértése még tovább vizsgálatokat igényel. A caspase-8 aktiváció lehet a GR-nak más apoptotikus útvonalakkal való interakciójának a következménye. Összességében elmondhatjuk, hogy az eredményeink megerősítik a mitokondriális apoptotikus útvonal és a nem-genomikus hatások fontosságát a thymocyta GC-indukált apoptózisában. A CD4<sup>+</sup> sejtek és a regulatórikus T sejtek esetében tapasztalt, a DP sejtekénél kisebb, apoptózis érzékenység lehet más, nem-genomikus útvonalak, aktiválódásának következménye, és szükség van az ezt feltáró, további, alaposabb vizsgálatok elvégzésére.

## 6. Új eredmények összefoglalása

1. Megfigyeltük, hogy DP thymocytákban az aktivált GR kolokalizálódott a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival; a Bax, Bak, Bcl-x<sub>L</sub> és Bim fehérjékkel, illetve jellemeztük, hogy a kolokalizáció mértéke hogyan változott 30 perc DX kezelés hatására.
2. Immunprecipitációval sikerül alátámasztanunk a kolokalizációs eredményeinket. A Bak, Bcl-x<sub>L</sub> és a Bim precipitálódott a GR-ral, a Bax azonban nem. Jellemeztük továbbá, hogy DX kezelés hatására hogyan változott a fehérjék megoszlása a DP sejtek citoplazmája és mitokondriuma között.
3. Immunprecipitáció nélkül tanulmányoztuk, hogy hogyan változik a Bax szubcelluláris eloszlása DX kezelés hatására. A Bax felhalmozódott a mitokondriumban.
4. Kimutattuk, hogy 1 óra DX kezelés után a citokróm c szintje szignifikánsan megemelkedett DP sejtek citoplazmájában, annak következményeként, hogy a mitokondrium külső membránjában a pro-apoptotikus fehérjék pórust formáltak.
5. Jellemeztük a caspase-3, -8 és -9 aktivációját különböző időtartamú DX kezelést követően. 2 óra DX kezelést követően már szignifikáns változást tudunk kimutatni. A caspase-9 aktivációja kifejezettebb volt, mint a caspase-8-é.
6. Az áramlási citometriával végzett caspase aktivációs kísérleteinket sikerült Western blottal is megerősítenünk. 3 óra DX kezelést követően a DP sejtek citoplazmájában szignifikánsan magasabb volt az aktivált caspase-ok mennyisége.
7. CD4<sup>+</sup> thymocytákban szignifikánsan magasabb Annexin V szintet figyeltünk meg 4 óra DX kezelést követően, mint a kontrollban. A lép eredetű CD4<sup>+</sup> sejtekben, a tTreg-ekben és a pTreg-ekben az Annexin V pozitivitás jóval alacsonyabb volt.
8. Jellemeztük a caspase-3,-8 és -9 aktivációjának kinetikáját thymus és lép eredetű CD4<sup>+</sup> sejtekben és tTreg-ekben valamint pTreg-ekben. A tTreg-ek jelentős rezisztenciát mutattak a DX-indukált apoptózissal szemben.
9. Kimutattuk a GR és a Foxp3 kolokalizációját konfokális mikroszkóppal tTreg-ekben és pTreg-ekben.



## 7. Publikációk

### 7.1 A tézis alapját képező közlemények (összesített impakt faktor: 4,649)

1. Prenek Lilla, Ugor Emese, Papp Ramóna, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea  
A glukokortikoid hormon nem genomikus hatásai a T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára  
IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 6:(3-4) pp. 54-58. (2014)
2. Prenek L, Boldizsar F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, Nemeth P, Berki T  
The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells.  
APOPTOSIS 22:(2) pp. 239-253. (2017) **IF: 3,833**
3. Ugor E, Prenek L, Pap R, Berta G, Ernszt D, Najbauer J, Németh P, Boldizsár F, Berki T  
Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression  
IMMUNOBIOLOGY 223:(4-5) pp. 422-431. (2018) **IF: 2,702 (ebből 0,816 IF-t használtam a tézishez)**

Egyéb publikáció:

Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Prenek L, Berki T, Balogh P, Boldizsar F  
Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knockout mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes.  
CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY &: p. &. (2018) IF: 3,410

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy lehetővé tette a kutatómunkába való bekapcsolódásomat az Immunológia és Biotechnológiai Intézetben, és támogatta munkám megvalósulását.

Köszönet Dr. Boldizsár Ferencnek tudományos diákköri, majd PhD hallgatói munkám segítéséért.

Köszönöm Dr. Szabó Mariannak, hogy segítette a kísérleti módszerek elsajátítását.

Hálásan köszönöm a segítségét Prof. Dr. Balogh Péternek, akihez mindig bizalommal fordulhattam a kísérletek megvalósításával kapcsolatos kérdéseimmel.

Köszönet illeti Dr. Berta Gergelyt, a konfokális mikroszkópos felvételek készítésében nyújtott sok segítségéért.

Köszönöm az Immunológia és Biotechnológiai Intézet minden munkatársának, hogy segítettek a munkám során.

Köszönöm barátomnak és munkatársamnak Kugyelka Rékának, hogy velem volt a munkám során, végig segítette azt, meghallgatta és építő kritikával illette ötleteimet és, hogy tüzetesen elolvasta kéziratomat.

Köszönöm szépen barátaimnak és családomnak, akik türelmesen támogattak a munkám során, mindvégig mellettem álltak tanulmányaim alatt, és akik nélkül nem sikerült volna elképzeléseimet megvalósítanom.

Munkám a következő támogatások segítségével valósult meg:

OTKA K105962, K101493, EFOP-3.6.1.-16-2016-00004; GINOP 2.3.2-15-2016-00050.  
TÁMOP 4.2.2.B-15 KONV-2015-0011