

PhD TÉZISEK

**A glukokortikoid hormon indukálta thymocyta apoptózis
mechanizmusának vizsgálata:
A mitokondriális glukokortikoid receptor transzlokáció és a
thymus epithelsejtek szerepe**

Dr. Talabér Gergely

PTE KK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Boldizsár Ferenc, Dr. Berki Timea

Programvezető:

Prof. Dr. Németh Péter

A Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Lénárd László

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

Pécs

2010

BEVEZETÉS

A mellékvese által termelt glukokortikoid hormonoknak (GC-k) szerteágazó élettani hatásai vannak és mindezek mellett alapvetően befolyásolják az immunrendszer különböző sejtjeinek funkcióit. A szintetikus GC-analógokat (pl. Dexamethasone, Methylprednisolone) kiterjedten használják a klinikumban immunszuppresszív gyógyszerként különböző autoimmun és más betegségek kezelésében.

A GC-k intracelluláris receptoron, a glukokortikoid receptoron (GR) hatnak. A GR ligandkötés után különböző jelátviteli útvonalakat indíthat el, melyek magyarázzák egyrészt a lassan kifejlődő klasszikus, genomikus hatásokat, másrészt a rövidebb idő alatt létrejövő alternatív, nem-genomikus hatásokat. A GR a citoplazmában egy fehérjekomplexhez kapcsolódik (melynek fontosabb tagjai a hősokk- és különböző immunofilin fehérjék) majd ligandkötés hatására erről a komplexről leválva a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS meghatározott szakaszaihoz, a GRE-khez (glucocorticoid response element) kötődik és a géntranszkripciót szabályozza (genomikus hatás). A genomikus hatások általában órák-napok alatt következnek be. Az utóbbi évek kutatásai szerint a GC-knek a klasszikustól eltérő nem-genomikus hatásai is vannak, amelyek akár percek alatt is létrejöhetnek: **1.)** A GC-k képesek a membrántranszport-folyamatok és a membránpermeabilitás befolyásolására **2.)** Egyes GC-indukálta apoptózisra rezisztens sejtekben, például monocytákon és B-sejteken membrán-GR-t is azonosítottak **3.)** A GR képes más citoplazmatikus fehérjékhez kapcsolódni (Például Jurkat humán T-sejtes leukémia sejtvonalban, a T-sejt jelátvitelben kulcsszerepet betöltő ZAP-70 kináz a GR egyik molekuláris partnere).

A legújabb eredmények szerint a GR a GC-indukálta apoptózisra érzékeny sejtekben, a GC-rezisztensekben nem, nemcsak a sejtmagba, hanem a mitokondriumba is transzlokálódik, és ezáltal képes egyelőre még ismeretlen mechanizmussal az apoptotikus kaskádot aktiválni. A GR mitokondriális transzlokációja után lehetséges hatásmechanizmusként felvetődik: **1.)** a mitokondriális membránpotenciál szabályozása **2.)** a GR pro-, illetve antiapoptotikus fehérjékhez való kötődése **3.)** a mitokondriális DNS-hez való kötődés és a mitokondriális génátírás szabályozása **4.)** a nukleáris receptorokon kívül egyéb transzkripciófaktorokat is azonosítottak a mitokondriumban, mint pl. NF- κ B, AP-1, NFAT, szerepük azonban nem teljesen ismert.

A T-sejtek az adaptív immunrendszer fő sejtjei közé tartoznak a B-sejtek mellett. Antigénreceptoruk a T-sejt receptor (TcR), láncösszetétele alapján $\alpha\beta$ - és

$\gamma\delta$ - TcR-t különböztetünk meg. A T-sejtek az antigént, mely általában fehérje, az antigénbemutatás folyamata során ismerik fel, ami a $CD4^+$ T-sejtek esetében az MHC II komplexen keresztül történik, a $CD8^+$ T-sejtek esetében pedig az MHC I-en. A T-sejtek többlépcsős, bonyolult érési folyamata a csontvelőben kezdődik, majd a thymusban folytatódik, melynek végeredménye az a naív, antigénnel még nem találkozott T-sejt készlet („repertoire”), amely a perifériás nyirokszervekbe vándorol, hogy effektorsejteké differenciálódjon és ellássa feladatát.

A thymus a 3. és 4. garattasakból kezd el fejlődni, az embrionális fejlődés 10-11. napján, amiben a „forkhead box” transzkripció faktor családba tartozó Foxn1 molekula kulcsszerepet játszik. A Foxn1 transzkripció faktor expresszióját a Wnt-4 glikoprotein molekula indukálja egyelőre még ismeretlen jelátviteli lépéseken keresztül. Részleteiben még nem tisztázott a Foxn1-nek a thymus későbbi fejlődésében betöltött szerepe. A thymusban az embrionális fejlődés 14. napjára alakul ki a cortex-medulla kompartmentalizáció, biztosítva a megfelelő molekuláris és stróma környezetet a fejlődő T-sejteknek. Az epithelium további differenciálódása és szegregálódása a keratin (K) és más különböző gének expressziós-szintjeinek változásaival függ össze. Minden thymus epithelialis sejt (TEC) expresszálja a felszínén az EpCAM-molekulát, a medullaris epithelsejtek (mTEC) magasabb arányban, mint a corticalisak (cTEC), a cTEC ezen kívül pedig Ly51 marker koexpressziójával is azonosítható ($EpCAM^+Ly51^+$), ez az antigén az mTEC felszínén nem található meg ($EpCAM^{++}Ly51^-$). Ezenkívül pedig az mTEC $K5^+K8^-$, a cTEC pedig $K5^-K8^+$ fenotípusúak.

A T-sejtek fejlődését a thymusban **1.)** thymocyták és a strómasejtek közötti direkt sejt-sejt kapcsolatok (Notch a thymocytákon és ligandpárja a Jagged thymus epithelsejteken) és **2.)** strómasejtek által szekretált szolubilis molekulák – citokinek (IL-7), kemokinek (CCL19, CCL25), a Wnt-glikoprotein-család tagjai (különösen a Wnt-4) és különféle hormonok (pl. GC-k) - befolyásolják. A fejlődési szakaszok feloszthatóak **korai** (az éretlen, $CD4^-CD8^-$ kettősen negatív (DN) sejtek proliferációja) és **késői** (a $CD4^+CD8^+$ kettősen pozitív (DP) sejtek szelekciója és az érett sejtek kikerülése a perifériára) szakaszra.

A DP-sejtek a pozitív szelekció során a cortexben közvetlen kapcsolatba kerülnek a cTEC-ekkel, amelyek MHC-n keresztül különböző peptideket prezentálnak nekik. Ha a DP-sejtek nem tudnak az epithelialis sejtek MHC-jéhez kötődni túlélési szignál hiányában

apoptózissal elpusztulnak („death by neglect”). A túlélő sejtek ezután negatív szelekción esnek át, amely a saját antigénekhez túl erősen kötődő, potenciálisan autoreaktív sejteket pusztítja el az aktiváció indukálta sejthalál (AICD) mechanizmusával. A thymusból kikerülő érett sejtek, CD4⁺ vagy CD8⁺ egyszeresen pozitív (SP) fenotípusúak. Az mTEC a negatív szelekcióban az egyszeresen pozitív sejteknek szöveti antigéneket (TRA-tissue related antigens) expresszál bizonyos kombinációkban („promiscuous gene expression”) az AIRE (autoimmune regulatory element) transzkripciós faktor segítségével, hogy a thymuson kívül meg tudják különböztetni a sajátot a nem sajáttól és így kialakul a centrális tolerancia a thymusban.

A GC-k egyik régóta ismert hatása, hogy a thymus involúcióját és a perifériás T-sejtek, illetve a thymocyták (főleg a DP sejtek) apoptózisát okozzák. Újabb adatok szerint, a terápiásan széles körben alkalmazott immunszuppresszív szerek (ciklofoszamid, ciklosporin A), valamint a GC-analóg Dexamethasone (DX) blokkolják a thymus epithelsejtek funkcióját is. Így tehát a GC-indukált thymus involúcióban valószínűleg mind a thymocyták pusztulása, mind pedig az epithelsejtek funkciójának megváltozása szerepet játszhat. Bár a thymocyták GC-indukálta apoptózisáról sok adat gyűlt össze, a GC-k thymus epithelsejtekre kifejtett hatásai még feltárára várnak.

Érdekes, hogy a thymocytá alcsoportok közül a DP-sejtek a legérzékenyebbek a GC-indukálta apoptózisra, alacsony GR fehérje és mRNS expressziójuk ellenére, és a GC okozta GR downreguláció is defektív ezekben a sejtekben. Továbbra sem ismert ennek a fokozott GC-érzékenységnek a háttere. Korábbi munkánk alapján, T-sejt receptor transzgenikus egérben a DP thymocyták GC-indukálta apoptózisa már 4 órán belül mérhető. A túlélő DP-sejtekben pedig az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje jelentősen emelkedett szintjét találtuk. Azonban a GR intracelluláris eloszlása és „mozgása“ a thymocytákban ezen folyamatok során még ismeretlen volt.

A GC-indukált apoptózis során különböző sejtekben (így thymocytákban is) több biokémiai változást azonosítottak: ezek a Ca²⁺-mobilizáció, az Src- és a Cdk2-kinázok aktivációja, majd ceramidképződés a foszfatidilinozitol-specifikus foszfolipáz C és a savanyú szfingomielináz aktivációjakor. Az előbb említett számos irodalmi adat más munkacsoportok, valamint a mi előző munkánk eredményei alapján felmerült, hogy alternatív GR-jelátviteli útvonalak és a Bcl-2 fehérje érintettsége miatt a mitokondriális útvonal is aktívan részt vehetnek a DP-thymocyták GC-indukálta apoptózisában.

CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetőben részletezett kérdések alapján munkánk során az alábbi célokat tűztük ki: Mivel a GR mind a genomikus, mind a nem-genomikus GC hatások közvetítésében szerepet játszik, ezért vizsgálni kívántuk:

1. A GR celluláris eloszlását/morfológiáját thymocytá alcsoportokon.

Mivel a morfológiai vizsgálatok során felmerült a **mitokondriális GR** jelenléte a thymocytákban, valamint esetleges részvétele az apoptózis folyamatainak irányításában, ezért

2. A GR ligand indukált mitokondriális transzlokációját vizsgálni kívántuk thymocytákban különös tekintettel a GC-indukált apoptózisra érzékeny DP-sejtekre.

3. Jellemezni kívántuk az *in vitro* nagydózisú GC kezelés mitokondriális funkcióra gyakorolt hatását.

Munkánk másik részében a **thymus epithelsejtek GC-indukált funkció zavara** mögött rejlő molekuláris mechanizmusok vizsgálatát tűztük ki célul.

4. Elemezni szeretnénk volna a DX-kezelés thymus epithelialis sejtek szerveződésére gyakorolt *in vivo* hatását.

5. Jellemezni akartuk a thymus epithelialis sejtek altípusait, valamint a T-sejt fejlődést befolyásoló génjeik expresszióját *in vivo* DX-kezelés után.

6. Tanulmányozni kívántuk a DX-kezelt thymus epithelsejtek T-sejt fejlődést támogató funkciójának változását *in vitro* T-sejt fejlődés modellben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Munkánk során 3-4 hetes BALB/c egerekkel dolgoztunk. A kísérletes munkák megfeleltek a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által megállapított szabályoknak.

Sejtvonalak

Sp-2 egér myeloma és RBL2H3 patkány bazofil leukémia sejtvonalakat használtunk munkánk során. A sejteket hagyományos 10% FCS tartalmú DMEM médiumban tenyésztettük, penicillin (10 egység/ml) és streptomycin (10 egység/ml) antibiotikum kombináció jelenlétében.

Thymocytá és thymus epithel sejt preparálás

A kísérleti állatok feláldozása után thymusukat eltávolítottuk, mechanikusan homogenizáltuk, majd a kapott szuszpenziót vattán átszűrtük. A sejtek viabilitását tripánkéék festék kizárásos teszttel határoztuk meg.

A DP-sejteket mágnesesen Easysep anti-PE (StemCell Technologies) szelekciós kottéllal, pozitív szelekcióval izoláltuk, anti-CD4-FITC és anti-CD8-PE antitestkottéllal történő kettős jelölés után.

Thymus epithelsejteket (EpCAM⁺-sejtek) RNS-izolálásra a thymus kollagenázzal való emésztése után, a CD45⁺ lymphoid sejtek deplécióját követően, szintén mágneses sejtszeparálással, EpCAM-FITC antitesttel történt jelölés után, pozitív szelekcióval izoláltuk.

***In vivo* és *in vitro* Dexamethasone kezelés**

In vivo, a kísérleti egereknek 20 mg/kg glukokortikoid-analóg Dexamethasone-t (DX) (Organon, Oradexon) adtunk (PBS-ben oldva) intraperitonealisan, a kontroll állatoknak pedig PBS-t. Az állatokat 24 óra, 72 óra, illetve 1 hét után áldoztuk fel.

In vitro, a thymocytákat és a sejtvonalakat szérumentes médiumban, 1 μ M DX-nal (Sigma) kezeltük 30 percig, a reakciót pedig jéghideg PBS-aziddal állítottuk le. A kontroll sejteket a megfelelő hígításban oldószerrel (a DX-t DMSO-ban tartottuk) kezeltük.

CMX-Ros feltöltés, sejtfelszíni és intracelluláris jelölések

A mitokondriumok jelölésére és a mitokondriális funkció mérésére a CMX-Ros (chloromethyl-X-rosamine) mitokondriális indikátort használtuk 1 µg/ml-es koncentrációban, amely a vörös csatornában detektálható (áramlási cytometriával FL2-ben, ex. 579 nm, em: 599 nm). A feltöltést 37°C fokon végeztük, 30 percig, szérumentes RPMI médiumban, a DX-kezeléssel párhuzamosan. A sejtfelszíni a-CD4 és a-CD8 jelölést (Pacific blue és Alexa fluor 647 fluorokrómmal konfokális mikroszkópiára; és FITC, valamint CyC fluorokrómmal áramlási cytometriára) jégen, jelölőpufferben (0,1 % BSA-t és 0,1 % NaN₃-t tartalmazó PBS) 30 percig végeztük. Ezután jelölőpufferrel mostuk a sejteket, majd 20 percig 4%-os PFA fixálás következett, mely után az Intézetünkben előállított monoklonális a-GR antitesttel (5E4-B1-klón) jelöltük a sejteket intracellulárisan 0,1% szaponin tartalmú jelölőpufferben. A sejteket végül cytocentrifugával tárgylemezre centrifugáltuk, vagy FACSFix (0,5% PFA PBS-ben) oldatban tartottuk a flow cytometriás mérésig. Az áramlási cytometriás analízist a CellQuest programmal végeztük, 10.000 eseményt rögzítettünk, a törmeléket és az elpusztult sejteket morfológiájuk alapján kizártuk az analízisből, a thymocytá alcsoportokat pedig a sejtfelszíni CD4 és CD8 expresszió alapján különítettük el. A thymocytá alcsoportok CMX-Ros átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) hisztogramokon ábrázoltuk.

Konfokális mikroszkópia

Az Olympus Fluoview 300 konfokális mikroszkópot és az Olympus Fluoview FV1000S-IX81 fotórendszert használtuk munkánkhoz. A jeleket négy különböző csatornában detektáltuk: DIC (differenciál interferencia kontraszt), a CD4-et UV közeli csatornában, a GR-t a FITC (zöld) csatornában, a CMX-Rost a vörös csatornában, a CD8-at pedig a távoli vörösben. Szekvenciális pásztázási módot, valamint Kalman zajszűrést használtunk, hogy a spektrális átfedést a csatornák között elkerüljük. A jeleket 3-3 látótérben gyűjtöttünk és a CMX-Ros és a GR közötti morfológiai kapcsolatot (kolokalizáció) elemeztük.

Digitális képelemzés, kvantitatív mikroszkópia

100 kontroll és 100 DX-kezelt DP sejtben elemeztük a GR - CMX-Ros kolokalizáció mértékét. Az ImageJ szoftvert (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) használtuk a kolokalizációs kiegészítő modullal (pluginnal). A szoftver a GR – CMX-Ros kolokalizált pontokat egy

külön képen fehér pontokként jelenítette meg, amely pixeleket megszámláltuk majd ábráztuk.

Szubcelluláris frakcionálás

A mitokondrium frakciók izolálásához mitokondrium izoláló kitet (Pierce) használtunk a gyári előírásokat követve, kisebb módosításokkal. Az oldószerrel és DX-nal kezelt thymocytaikat megmostuk jéghideg PBS-ben, majd a sejteket lizáltuk. 800g-vel való centrifugálás után a magfrakciókat háromszor 0,5% NP-40 detergenst tartalmazó TBS pufferrel mostuk, majd a pelletet 10 %-os merkaptotetanolt is tartalmazó SDS-mintapufferben (125 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0,006% brómfenolkék) vettük fel és megfőztük. A poszt nukleáris szupernatánst egyszer 3000g-vel 15 percig, majd 12000g-vel 5 percig centrifugáltuk, a pelletet 10% merkaptotetanolt tartalmazó SDS-mintapufferben felvettük, majd megfőztük. Citoplazma frakcióként a 3000g utáni centrifugálási lépés szupernatánsát használtuk fel.

Western blot és denzitometria

A sejtfrakciókat megfőztük és 7, 10 vagy 15%-os poliakrilamid gélen futtattuk meg. A géleket egy éjszakán át blottoltuk nitrocellulóz membránra a Bio-Rad Trans-Blot rendszer segítségével. A blottolás után a membránokat 2%-os BSA – vagy 1% tejpor tartalmú pufferrel (2% BSA, 10 mM Tris, 100 mM NaCl és 0.1% Tween 20, pH 7.4) telítettük. A blotokat anti-GR, anti- β -aktin, anti-citokrom c egér monoklonális antitestekkel, anti-hisztón-H1 nyúl poliklonális antitesttel inkubáltuk, majd a megfelelő anti-egér-HRP és anti-nyúl-HRP másodlagos ellenanyagokkal hívtunk elő. A blotokat denzitometriával analizáltuk, a GR relatív denzitásokat a megfelelő frakciókban az aktin, citokrom c, hisztón H1 csíkok denzitásához normalizáltuk. A denzitometriás méréseket a BioRad Quantityone szoftvercsomaggal végeztük el.

Immunfluoreszcencia thymus metszeteken

Az egerek eltávolított thymusából 5-10 μ m vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, majd a következő ellenanyagokkal festettük acetón fixálás és 5% BSA-tartalmú PBS pufferrel való telítés után: GR-FITC (5E4-B1) és EpCAM/a-patkány-Cy3; EpCAM-FITC és Ly51-PE; EpCAM-FITC és MHC II/a-patkány-PE, EpCAM-FITC együtt a poliklonális kecske Wnt-4/a-kecske-PE párral. A metszeteket Olympus fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk.

Reaggregált thymus szerv kultúra (RTOC)

A thymus epithelsejteket a CD45 expresszió hiánya és az EpCAM pozitivitás alapján szelektáltuk mágnesesen. A TN (triple negative), éretlen thymocyta (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) kezeletlen felnőtt egérből, CD3/CD4/CD8 mágneses deplécióval izoláltuk. A thymus epithelsejteket 4:1 arányban centrifugáltuk össze a thymocyttal, majd 1 hét után a kultúrákban a thymocyta CD4/CD8 expresszióját analizáltuk. Ahhoz, hogy az RTOC-ből származó thymocyta alcsoportokat helyesen el tudjuk különíteni, párhuzamosan festési kontrollként teljes thymocyta szuszpenzió is elvégeztük a CD4 és CD8 jelölést.

Real-time PCR

A mágnesesen szeparált thymus epithelsejtekből RNeasy mini kit (Qiagen) segítségével RNS-t izoláltunk, majd DNase (Sigma) emésztés után „High Capacity RNA to cDNA Kit“ (Applied Biosystems) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. A real-time PCR reakciót az „Sybrgreen master mix“ vagy „Taqman master mix“ (mindkettő Applied Biosystems) segítségével végeztük. A felhasznált primerek szekvenciái az **alábbi táblázatban** olvashatóak.

Gén	Forward primer	Reverse primer
CD45	5'-CCG GAA TTC CGG ATG GGT TTG TGG CT-3'	5'-CCG CTC GAG CGG CTA ATC ACT GGG TG-3'
GR	5'-TGG TGT GCT CCG ATG A-3'	5'-AGG GTA GGG GTA AGC-3'
FoxN1	Applied Biosystems TaqMan probe PN4351272 (Mm00477457_m1)	
Keratin 5 (K5)	5'-CCCTCT GAA CCT GCA AAT CG-3'	5'-TGA TCT GCT CCC TCT CCT CAG T-3'
Keratin 8 (K8)	5'-TCA GCT ACG GAA TGA GCT CCT T-3'	5'-GTG GTG CGG CTG AAA GTG T-3'
Keratin 14 (K14)	5'-CCT CTG GCT CTC AGT CAT CCA-3'	5'-TGC ACA TCC ATG ACC TTG GT -3'
Keratin 18 (K18)	5'-CGC TTG GTG GAG GAT GGA-3'	5'-TGC ACA GTT TGC ATG GAG TTG-3'
CIITA	5'-CTA GCC AAG TCC CTC CTA AGG-3'	5'-ATC TCA GAC TGA TCC TGG CAT-3'
AIRE	5'-ACC TAA ACC AGT CCC GGA AAG-3'	5'-CGA GGC TCC AGT GCT T-3'
MHC I (H2D1)	5'-ACCT GCA GTT CGC CTA TGA AG-3'	5'-CCG CCG TCC ACG TTT TC-3'
IL-7	5'-ACT ACA CCC ACC TCC CGC A-3'	5'-TCT CAG TAG TCT CTT TAG G-3'
Wnt4	5'-CTC AAA GGC CTG ATC CAG AG-3'	5'-TCA CAG CCA CAC TTC TCC AG-3'
18S rRNA	5'-GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT-3'	5'-AGA AAC GGC TAC CAC ATC CAA-3'
18S rRNA Taqman	Applied Biosystems TaqMan probe 4352656-0701012	

Statisztikai analízis

Munkánk során az adatokat átlag \pm standard deviációként (SD) tüntettük fel és Student-féle t-tesztet használtunk a különböző csoportok eredményeinek összehasonlítására, a $p < 0,05$ eltérést fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A mitokondriális GR DP-thymocytyákban

Korábbi munkánk során flow cytometriás mérésekkel és kvantitatív PCR-al is igazoltuk (más laboratórium eredményeivel egyezően), hogy a DP-sejtek expresszálják a GR-t a legalacsonyabb szinten. A receptor intracelluláris eloszlása azonban ezekben a sejtekben nem volt ismert, ezért jelenlegi munkánk során ezt tisztáztuk először. Áramlási cytometriával, valamint real-time PCR-ral kapott eredményeinkhez hasonlóan konfokális mikroszkópos módszerrel vizsgálva a DP-sejtekben expresszálódik a legkevesebb GR az éretlen DN és az érett $CD4^+$, valamint a $CD8^+$ SP sejtekhez viszonyítva. Emellett eltérő festődési mintázatot is találtunk. A DP-sejtekben a GR eloszlása granuláris, míg a $CD4^+$ SP-sejtekben homogén. A DP-sejtek domináns granuláris festődési mintázata utalt arra, hogy a GR ezekben a sejtekben mitokondriális elhelyezkedésű lehet. A CMX-Ros – GR közötti átfedést mind a 4 kontroll thymocytá alcsoportban megvizsgáltuk és minden sejtcsoportban találtunk bizonyos szintű kolokalizációt.

A DP sejtekben tovább analizáltuk a CMX-Ros és a GR közötti morfológiai kapcsolatot és érdekes módon azt találtuk, hogy *in vitro* DX kezelés hatására a GR főleg a mitokondriumba, nem pedig a sejtmagba transzlokálódott. Mivel a GR a DP-sejtekben nem transzlokálódott a sejtmagba, ezért morfológiai (és módszertani) kontrollként ugyanazon protokoll szerint elvégeztük a jelöléseket két sejtvonalon is, az Sp-2 egér myeloma- és az RBL2H3-patkány leukémia sejtvonalakon is. Az Sp-2 sejtvonalban a GR nem transzlokálódott a magba 30 perces DX-kezelés hatására. Az RBL2H3-sejtvonalban a GR már 10 perces DX expozíció után a sejtmagba transzlokálódott, ez 30 perces expozíció után már teljes volt, tehát módszerünk alkalmas a GR transzlokáció szubcelluláris morfológiai vizsgálatára.

Ahhoz, hogy a GR mitokondriális transzlokációjának változását kvantitatív módon követni tudjuk, több látóterben véletlenszerűen kiválasztott 100 kontroll és 100 DX-kezelt

DP-sejtben a CMX-Ros és a GR csatornában is detektálható, kolokalizált pixeleket meghatároztuk az ImageJ szoftvercsomag kolokalizációs pluginje segítségével. Érdekes, hogy a kontroll sejtekben is megfigyelhető volt kolokalizáció alacsony szinten, amely valószínűleg azzal magyarázható, hogy a thymocyták a thymusban egy GC-gazdag mikro környezetben találhatók, ami már *in vivo* mitokondriális GR lokalizációt eredményezhet. Egy másik lehetséges magyarázat az lehet, hogy egy GR frakció eredendően a mitokondriumban is megtalálható, mint ahogy azt egyes sejtvonalakban is leírták.

A CMX-Ros áramlási cytometriás mérésre is használható, hiszen a fluoreszcencia intenzitás (MFI) a mitokondriális membránpotenciáltól függ. Sejtfelszíni jelölésekkel kombinálva meghatároztuk az egyes thymocyta alcsoportokban a CMX-Ros átlag fluoreszcencia intenzitást, amely a DP sejtekben bizonyult a legalacsonyabbnak összehasonlítva a DN, valamint a CD4⁺ és a CD8⁺ SP sejtekkel. Mivel a DP sejtek a legérzékenyebbek a GC kiváltott apoptózisra, ezért vizsgáltuk a CMX-Ros MFI változásokat a DP-sejtekben DX hatására. Harminc perc DX-kezelés hatására szignifikáns CMX-Ros MFI csökkenést tapasztaltunk a DP-sejtekben, ami valószínűleg a mitokondriális funkció romlásának egyik korai indikátora.

Ahhoz, hogy a morfológiai eredményeket Western-blottal is alátámasszuk, a thymocytákból citoplazma, mitokondrium és sejtmag frakciót izoláltunk. A szubcelluláris frakcionálást elvégeztük mind teljes thymocyta szuszpenzió (minden alcsoportot tartalmaz), illetve később tisztított DP-sejteken is. 3-4 hetes BALB/c egérben a thymocyták kb. 80%-a DP-sejt. A szeparálatlan sejtekben DX-kezelés hatására a GR szintje a citoplazmában szignifikánsan lecsökkent, míg egy határozott frakció vált detektálhatóvá a mitokondriumban és a sejtmagban. Az erős GR-reaktivitás a sejtmagban valószínűleg azzal magyarázható, hogy a többi thymocyta alcsoportban jóval magasabb a GR-expresszió, amely szignifikánsan hozzájárulhat a kapott magi reaktivitáshoz. A szubcelluláris frakcionálást megismételtük mágneses sejtszeparálással tisztított DP-sejteken is. Sikeresen igazoltunk, hogy a DP sejtekben a GR valóban csak a mitokondriumba transzlokálódik, a sejtmagba nem.

Mivel feltételeztük, hogy a GR a mitokondriumban az apoptózis kaszkádot proapoptotikus fehérjéken keresztül aktiválhatja, valamint ligandkötés után citoplazmatikus partneréről, a Hsp-90 fehérjéről leválva, esetleg egy másik

hősokkfehérjével kapcsolódik, ezért a további munkánkban lehetséges mitokondriális fehérje célpontként a Bak és a Bax proapoptotikus fehérjéket, valamint a Hsp60-at vizsgáltuk. A fehérjeasszociációk igazolására mágnesesen tisztított DP-sejtek mitokondriumából végeztünk immunprecipitációkat. Előzetes eredményeink alapján valószínűsítjük, hogy a GR a mitokondriumban a Hsp-60 és a Bak fehérjékhez asszociálódhat, ez azonban további megerősítést igényel.

A GC-k hatásának vizsgálata a thymus epitheliumon *in vivo*

A thymus epithelialis sejtek fontos szerepet játszanak a T-sejtek fejlődésében, azonban egyelőre elég kevés adat van arról, hogy a GC-k befolyásolják-e funkciójukat. Egy nemrég megjelent közlemény szerint magas dózisú DX-kezelés lecsökkenti mind a corticalis, mind pedig a medulláris epithelialis sejtek számát. Ezek alapján célunk volt azon molekulák azonosítása, amelyek ezt a folyamatot közvetítik.

A GC-k hatásaikat nagyrészt a GR-en keresztül fejtik ki, ezért elsőnek felmerült az a kérdés, hogy vajon az egér primer thymus epithelium expresszál-e GR-t. A GR több szerv epithelialis kompartmentjének fenntartásához is szükséges, mint például a bőr és a tüdő. A TEC és a thymocyták GR expresszióját PCR-technikával és immunfluoreszcenciával is igazoltuk.

Immunfluoreszcens vizsgálatokkal kimutattuk, hogy egyszeri DX-kezelés után 24 órával a thymusban csökken az epithelialis sejteken az EpCAM és a Ly51 expressziója. Ezen két molekula expressziója 72 órával a DX-injekció után részleges, 168 óra után pedig majdnem teljes regeneráció jeleit mutatják morfológiailag.

A továbbiakban a thymus epithelsejteken expresszálódó, a T-sejt fejlődést befolyásoló fehérjéket vizsgáltunk morfológiai szempontból a thymus epithelsejteken. Az MHC II jelenléte a thymus epithelialis sejteken fontos a megfelelő T-sejt készlet kialakításához, ezért vizsgáltuk expressziójának változását immunfluoreszcenciával. Az MHC II molekula expresszió csökkenését 24 órával a DX kezelés után detektáltuk a thymus epithelsejteken (EpCAM-festéssel együtt).

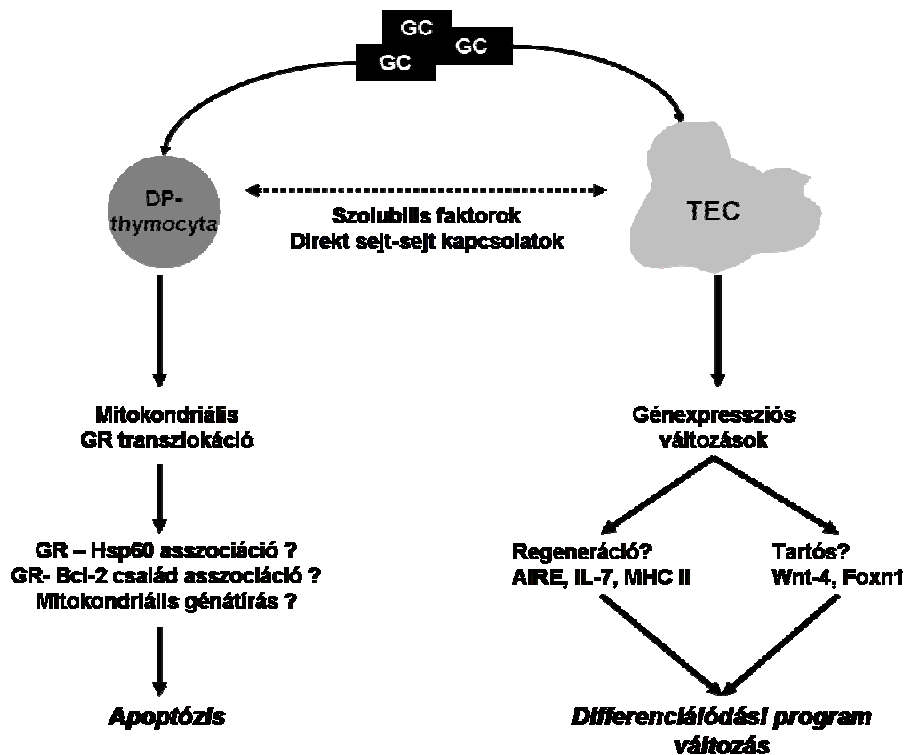
A Wnt-ok közül a legnagyobb mennyiségben a Wnt-4 termelődik a thymusban, ami fontos a thymus cellularitásának fenntartásában, ezért jelen munkánkban is ennek az expressziós szintjét vizsgáltuk immunfluoreszcenciával. Az MHC II-höz hasonlóan EpCAM-festés mellett a Wnt-4 csökkent szintjét találtuk a thymus epithelsejteken.

Ezen morfológiai eltérések mellett, tisztított epithelialis sejtekben csökkent Foxn1 expressziót találtunk real-time PCR analízissel 24 óra után, amely nem érte el a kontroll értékét 1 héttel a kezelés után sem. Továbbá csökkent keratin (K) 5, 8, 14 és 18 (a thymus epithelialis sejtek főbb markerei) mRNS-szinteket mértünk 24 órával a DX-kezelés után. Az előbbi markerek csökkent szintje is arra utal, hogy a DX-kezelés alapvetően megváltoztatja a thymus epithelialis sejtek fenotípusát és differenciálódási programját, mivel a Foxn1 és keratin molekulák expressziója a thymus epithelsejtek identitásának indikátora. A továbbiakban azon molekulák expresszióját vizsgáltuk a thymus epitheliumban, amelyeknek fontos szerepe lehet a T-sejtek fejlődése szempontjából. Az AIRE (autoimmune regulator), MHC I és CIITA (az MHC II expresszióját szabályozó transzaktivátor) molekuláknak fontos szerepük van abban, hogy autoreaktív T sejtek ne kerülhessenek ki a thymusból. Az AIRE, H2D1, CIITA, valamint az IL-7 expressziója (amely a thymusban a T-sejt előalakok proliferációját szabályozza) lecsökkent 24 órával a DX-kezelés után az epithelialis sejtekben, azonban 1 hét alatt mRNS szintjük megközelítik a kiindulási szintet.

A Foxn1 transzkripció faktor alapvető fontosságú a thymus fejlődése szempontjából és minden thymus epithelsejt expresszálja. A Wnt-4 szintje, a Foxn1 expressziós mintázatához és az immunfluoreszcenciával kapott eredményekhez hasonlóan csökkent 24 órával a DX-kezelés után és 1 hét után sem mutatott növekedést.

Miután megvizsgáltuk a T-sejt fejlődés egyes molekuláris összetevőit, kíváncsiak voltunk arra, hogy a thymus epithelsejtek funkciója miként változik DX-kezelés hatására, azaz hogyan képesek érett T-sejteket generálni. Erre a reaggregált thymus szerv kultúra (RTOC) módszerét alkalmaztuk, amely során 200 ezer epithelsejtet és 50 ezer DN thymocytát centrifugáltunk össze és 1 hétig inkubáltuk őket *in vitro*. Egy hét után a kultúrákból thymocytákat izoláltunk és sejtfelszíni CD4/CD8 jelölést végeztünk, hogy a thymocyta alcsoportok összetételét vizsgáljuk áramlási citrométerrel. A DX-kezelt egerekből izolált epithelsejtek nem voltak képesek arra, hogy érett SP sejteket generáljanak, a kísérlet végén is csak DN sejtek voltak kimutathatók, míg a kontroll kultúrákban a thymocyta differenciáció a normál thymushoz hasonlóan zajlott. Ahhoz, hogy az RTOC-kból izolált thymocyta alcsoportokat ábrázoló dot-plotokat megfelelően értékelni tudjuk, párhuzamosan fiatal egérből thymocytákat izoláltunk és CD4/CD8 kettős jelölést végeztünk.

Összefoglalva, munkánk során megállapítottuk, hogy a nagy dózisu GC kezelés hatása több szinten érvényesülhet a thymusban: a DP-thymocytákban masszív apoptózist vált ki (valószínűleg a nem-genomikus mitokondriális GR jelátvitelen keresztül); és a TEC-ek funkcióját károsítja (valószínűleg a Wnt-4 – FoxN1 szabályozási tengelyen keresztül). A thymusban zajló, DP-thymocytákat és TEC-et is érintő, nagydózisú GC-expozíció következményeiként fellépő molekuláris szintű folyamatokat az alábbi **ábrán** foglaljuk össze. Ezek alapján tovább szövődik a thymus epithelsejtek és a thymocyták közötti komplex molekuláris kölcsönhatások és finom jelátviteli útvonalak hálózata, hiszen a GC-indukálta változásoknak mind a thymus epithelsejtekben, mind a T-sejt prekurzorokban mélyreható térbeli és időbeli következményei vannak.



Az új eredmények összefoglalása:

1. Morfológiailag jellemeztük a GR eloszlását a thymocyta populációkban amivel egyrészt alátámasztottuk eddigi áramlási cytometriával és real-time PCR-analízissel kapott adatainkat, másrészt megismertük a GR sejteken belüli pontosabb elhelyezkedését.
2. Kimutattuk, hogy a DP thymocytákban a GR ligandkötés hatására a mitokondriumba nem pedig a sejtmagba transzlokálódik, ezt a jelenséget konfokális mikroszkópiával és sejtfractionálás után Western-blottal is igazolni tudtuk.
3. Kontrol DP-sejtek mitokondriumában is megfigyelhető alap GR expresszió.
4. Megállapítottuk, hogy a DP-sejtekben a legalacsonyabb az alap mitokondriális membránpotenciál az összes thymocyta alcsoport közül.
5. Eredményeink szerint nagy dózisu, rövid idejű GC-kezelés DP-sejtekben a mitokondriális funkció romlásához vezet.
6. Igazoltuk mRNS- és fehérje szinten, hogy a thymus epithelsejtek GR-t expresszálnak.
7. *In vivo* nagy dózisu GC-kezelés negatívan befolyásolja a thymus epithelsejtek funkcióját, valamint a thymusban a kéreg-velő organizációt tönkreteszi.
8. *In vivo* nagy dózisu GC-kezelés hatására csökkent FoxN1 és keratin expressziót találtuk thymus epithelsejtekben, amely arra utal, hogy a thymus epithelsejtek differenciálódási programja a magas dózisu szteroid hatására megváltozik.
9. Továbbá, az epithel sejtekben a T-sejt fejlődéssel szoros kapcsolatban álló gének (AIRE, CIITA, MHC I, IL-7) expresszióját vizsgálva csökkent expressziós szinteket találtunk.
10. *In vitro* T-sejt fejlődés modellben, azaz RTOC-ban kimutattuk, hogy az előzőleg *in vivo* DX-kezelésnek kitett TEC nem tudta teljes egészében támogatni a T-sejtek fejlődését.

PUBLIKÁCIÓK:

A tézis alapját képező közlemények (összesített impakt faktoruk: 10,453):

1. **Gergely Talabér**, Ferenc Boldizsár, Domokos Bartis, László Pálincás, Mariann Szabó, Gergely Berta, György Sétáló jr., Péter Németh, Timea Berki: *Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis*. Int Immunol. 2009 Nov 21 (11): 1269-1276. [IF: 3,403]
2. Ferenc Boldizsár, **Gergely Talabér**, Mariann Szabó, Domokos Bartis, László Pálincás, Péter Németh, Timea Berki: *Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells*. Immunobiology 2010 Jul; 215(7):521-6. [IF: 3,586*]
3. László Pálincás, **Gergely Talabér**, Ferenc Boldizsár, Domokos Bartis, Péter Németh, Timea Berki: *Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis*. Immunobiology 2008; 213 (1): 39-50. [IF: 3,464]
4. **Gergely Talabér**, Krisztián Kvell, Zoltán Varecza, Eric J. Jenkinson, Graham Anderson, Ferenc Boldizsár, Péter Németh, Timea Berki, Judit E. Pongrácz: *Wnt-4 down-regulation is a characteristic feature of Dexamethasone (DX) induced reversible thymic epithelial depletion*. (Publikációra előkészítve, Mol. Immunol)

*A legutóbbi (2009) elérhető impakt faktor adatok alapján.

Idézhető absztraktok (első szerzős): 4 (1)

Előadások nemzetközi konferenciákon (első szerzős): 3 (2)

Előadások hazai konferenciákon (első szerzős): 3 (1)

Poszterek nemzetközi konferenciákon (első szerzős): 9 (7)

Poszterek hazai konferenciákon (első szerzős): 10 (5)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Boldizsár Ferencnek** és **Dr. Berki Timeának**, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódjak ebbe a kutatómunkába és végig támogatták megvalósítását.

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

Köszönet **Dr. Pálkás László** útmutatásainak, aki mellett TDK-hallgatóként dolgoztam. **Dr. Bartis Domokos** és **Dr. Szabó Mariann** munkatársaimnak az értékes szakmai segítségéért. **Csőngei Veronika** és **Dr. Simon Diána** kolléganőmnek a kézirat kritikus átolvasásáért

Dr. Balogh Péternek az a-CD45 és az a-MHC II antitestekért és a hasznos szakmai tanácsokért.

Köszönet illeti **Dr. Pongrácz Juditot**, aki nagy fokban hozzájárult, hogy a PhD-munka thymus epithelialis sejtekkel foglalkozó része megvalósításra kerüljön. Köszönöm **Dr. Kvell Krisztián** és **Varecza Zoltán** munkatársaimnak a real-time PCR mérésekben nyújtott segítséget.

Köszönet **Dr. Berta Gergelynek** és **ifj. Dr. Sétáló Györgynek** (PTE, Orvosi Biológiai Intézet) a konfokális mikroszkópia során nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet** minden munkatársát, akik valamilyen formában mindig támogattak a munka során.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm **családom** támogatását.