

# **A timociták szelekciós lépéseit befolyásoló szolubilis molekulák és sejtes interakciók modell vizsgálata**

**Ph.D. ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Pálinkás László**

A-139 Az Immunológia alapjai  
Programvezető: Dr. Németh Péter  
Témavezető: Dr. Berki Timea

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar



**Pécs  
2009**



## BEVEZETÉS

A T-limfociták a B-sejtek mellett az adaptív (specifikus) immunrendszer meghatározó sejttípusai. Az immunválasz fontos szabályozói, de részt vesznek a vírussal vagy intracelluláris parazitákkal fertőzött sejtek felismerésében és eliminálásában, a tumor sejtek elpusztításában, továbbá alapvető szerepet játszanak a saját és nem-saját struktúrák megkülönböztetésében és az MHC (maior histocompatibility complex) inkompatibilis szervek kilökődésében. Két nagy sejtcsoportot tudunk elkülöníteni a T-sejteken belül: az  $\alpha\beta$  T-sejt receptorról (TCR) és a  $\gamma\delta$  TCR-rel rendelkező sejteket. T-sejt receptornak a T-limfociták felszínén megjelenő antigén felismerő molekulákat nevezzük, amelyek két doménes felépítésű polipeptid láncból állnak és a CD3 molekulakompleksszel kiegészülve alkotnak funkcionális egységet. A T-sejt érés eredményeként lényegesen több  $\alpha\beta$  TCR-t hordozó sejt jön létre, mint  $\gamma\delta$  TCR-t kifejező T-limfocita. Az érett  $\alpha\beta$  T-sejtek két alcsoportra oszthatók attól függően, hogy melyik koreceptor molekulát expresszálnak: a CD4<sup>+</sup> T helper sejtek az MHC II-vel együtt bemutatott extracelluláris antigéneket ismerik fel, míg az MHC I-el bemutatott, intracelluláris antigéneket felismerő sejtek a CD8-at hordozó a sejtpusztító (citotoxikus) T-limfociták.

A T-sejtek nevüket az érésük helye miatt a tímuszról (csecsemőmirigy) kapták. Ez az a szerv, ahol a csontvelői eredetű előalakokból egy bonyolult, szelekciós lépéseket is tartalmazó érési folyamat során naív, immunokompetens T-sejtekké érnek. A T-limfocita irányba való elköteleződés és az  $\alpha\beta$  illetve  $\gamma\delta$  irányú differenciálódás szétválása már a T-sejt érés korai stádiumában megtörténik. A TCR-gének átrendeződése után az  $\alpha\beta$  T-sejtek szelekciója, majd a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> irányba történő elköteleződés zajlik a tímuszban. A timociták érése celluláris és humorális faktorok által irányított bonyolult folyamat, melynek minden részlete még nem teljesen tisztázott.

A T-sejt fejlődés egy fontos ellenőrzési pontját jelenti a DP érési stádium, ahol a funkcióképtelen és az autoreaktív T-sejtek a pozitív és a negatív szelekció során apoptózissal elpusztulnak. A pozitív és a negatív szelekció modelljeiben a TCR ligand kötésének affinitása által meghatározott jelátviteli folyamatok határozzák meg a timociták sorsát. A kölcsönös antagonizmus modell szerint a glukokortikoid hormonok (GC) és TCR indukálta apoptotikus útvonalak közötti kölcsönhatások során dől el a sejt apoptózisa vagy életben maradása.

Az apoptózis egy olyan szigorúan szabályozott folyamat, amely proteolitikus folyamatok sorozatából áll, a sejtek jellegzetes morfológiai elváltozásai kísérik, és végső soron a sejt halálához vezet. A pozitív szelekció során mind a TCR/CD3-komplexen keresztül jövő, mind a GC hatására kialakuló szignál önmagában apoptózishoz vezet. A kölcsönös antagonizmus modell szerint mind a lokálisan termelődő GC hormon, mind az antigén prezentáló sejthez való kötődés során a TCR-on keresztül kapott jel, ha egyszerre éri a DP timocitát, a sejt túlélését eredményezi. Ugyanezzel a kölcsönös antagonizmus modellel írhatók le különböző citokinek és a glukokortikoid hormon együtthatását leíró megfigyelések is.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. BALB/c és AND TCR transzgenikus egértörzs tímuszában a timocita alcsoportok arányának nyomon követése *in vivo* glukokortikoid hormon és antigén, illetve anti-CD3 kezelések hatására. Egyszeri glukokortikoid kezelés hatásának vizsgálata tímusz sejtes összetételére, és annak időbeli nyomon követése.
2. Az egyes timocita alcsoportok glukokortikoid receptor (GCR) expressziós szintjének meghatározása BALB/c és AND TCR transzgenikus egértörzsben. A GCR expresszió változásának vizsgálata T-sejt aktiváció, GC hatás, illetve GC antagonisták kezelése után.
3. *In vivo* GC antagonisták előkezelés hatása GCR indukálta jelátviteli utakra és a tímusz sejtes összetételére.
4. *In vivo* TCR aktiváció és GC kezelés hatására kialakuló korai és késői apoptotikus sejtek arányának meghatározása, valamint a pro-apoptotikus mitokondrium-funkció változás, caspase-3 aktiváció illetve az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje expressziójának vizsgálata.
5. *In vitro* glukokortikoid hormon hatásának vizsgálata tímusz szövet és timocita sejtkultúrában GCR antagonisták és GC hormon szintézis gátló jelenlétében.
6. CD69<sup>+</sup> DP timociták arányának vizsgálata BALB/c és AND TCR transzgenikus egérmodellen TCR aktiváció, GC kezelés és GC antagonisták hatására.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

EGÉRMODELLEK. Kísérleteinkhez 4 hetes Balb/C (Charles Rives) egereket és 4 hetes B10.Cg-TgN (TcrAND)53Hed (AND) galamb cytochrome C (PCC) specifikus I-E<sup>k</sup> (MHC-II) restrikcióval rendelkező V $\beta$ 3/V $\alpha$ 11 T-sejt receptor transzgenikus egereket (AND) használtunk. A kísérletes munkák megfelelnek a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által megállapított szabályoknak.

ÁLLATOK OLTÁSA ÉS TIMOCITA PREPARÁLÁS. Kísérleti állatainkat intraperitoneálisan oltottuk magas dózisu (20,0 illetve 10,0 mg/testtömeg kg), közepes dózisu (2,0 mg/kg), és alacsony dózisu (1,0 illetve 0,2 mg/kg) DX-al önmagában vagy az egyéb kezelésekkel kombinációban. A GCR kompetitív antagonistáinak tekintett RU486 vagy RU43044 vegyületeket 1 mg/testtömeg kg szezámolajban hígítva alkalmaztuk intraperitoneális oltásként. Az AND egereket 2 napig oltottuk naponta intraperitoneálisan 10 mg/testtömeg kg PBS-ben hígított PCC-vel. A Balb/c egerek intravénásan kaptak 5 vagy 50  $\mu$ g/állat (magas dózisu) aktiváló hatású anti-CD3 monoklonális antitestet önállóan vagy DX-al kombinációban.

A timocita preparálást Compton és Cidlowski módszere szerint végeztük röviden: az egerek gyors dekapitulása után a tímuszokat eltávolítottuk és hideg PBS oldatba helyeztük. A tímusz szövetét üveg-üveg homogenizátorral homogenizáltuk és a szuszpenziót nylon vattán átszűrtük. A sejteket megmostuk PBS-ben és az élő timocita számot Bürker kamrában meghatároztuk Trypán kék festékkizárásos teszt segítségével.

### TÍMUSZOK ÉS TIMOCITÁK IN VITRO TENYÉSZTÉSE

1-2 napos BALB/c egerek eltávolított tímuszainak egy-egy lebenyét 24 órán át inkubáltuk in vitro DMEM médiumban,  $10^{-7}$  mol/l DX-al, RU43044 GCR antagonistával, a kettő kombinációjával vagy szteroid szintézis gátló Methyraponnal, hogy vizsgáljuk a glukokortikoid hormon hatásának szerepét az egyes timocita alcsoportok túlélésében.

TIMOCITÁK CMX-Ros FESTÉSE. A mitokondriumok funkcionális aktivitásának mérését a Mito Tracker CMX-Ros festék segítségével végeztük. A CMX-Ros egy lipofil fluoreszcens festék, amely az aktív mitokondriumokban felhalmozódik azok negatív membránpotenciálja miatt. Az élő sejtek ezért CMX-Ros festékekkel intenzíven festődnek, s mivel az apoptotikus

sejtek elveszítik a mitokondriális membránpotenciáljukat, nem festődnek. A 10 millió sejtet 30 percen át inkubáltuk 0,1µg/ml CMX-Ros festék tartalmú RPMI médiumban, majd a sejteket mosás után összegyűjtöttük és sejtfelszíni jelölést követően áramlási citométerrel analizáltuk az eredményeket.

**TIMOCITÁK SEJTFELSZÍNI ÉS INTRACELLULÁRIS JELÖLÉSE.** A sejtfelszíni jelölésekhez mintánként  $10^6$  élő timocitát jelöltünk anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr, anti-CD69-FITC fluoreszcens monoklonális antitestekkel. Az intracelluláris jelölésekhez a sejtfelszíni jelölések után fixáló oldatban (4% paraformalehid (PFA) tartalmú PBS) 20 percig fixáltuk a sejteket. Ezután kétszer megmostuk a timocitákat PBS-ben majd 100µl permeabilizáló pufferben felvettük a sejteket és fénytől elzárva, jégen 30 percig végeztük az anti-Bcl-2-FITC, anit-aktivált Caspase-3-FITC, anti-GCR-FITC fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel a jelöléseket. Az inkubáció végén kétszer mostuk a sejteket permeabilizáló pufferben, majd egyszer kötő pufferben. A jelölés végén 500µl fixáló pufferben vettük fel a sejteket és a mérés kivitelezéséig abban tároltuk azokat (Current Protocols in Immunology chapter 5.6).

**INTRACELLULÁRIS SZABAD KÁLCIUMSZINT MEGHATÁROZÁSA.** Az intracelluláris szabad kalciumszint meghatározásához a sejteket Fluo-3 AM festékkel töltöttük fel „Minta et al.” módszere alapján:  $10^6$  timocitát 100µl 10µM Fluo-3 AM tartalmú szövettenyésztő médiumban inkubáltuk 30 percen át szobahőmérsékleten. Ezután a sejtszuspenziót 10ml RPMI + 10% FCS médiummal hígítottuk és további harminc percig inkubáltuk. Végül a mintákat háromszor mostuk RPMI + 10% FCS médiumban és sejtfelszíni anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr jelölés után áramlási citometriás mérést végeztünk. A Fluo-3 AM festék átlagos fluoreszcencia intenzitását 526 nm-en (FL1 csatorna) határoztuk meg a különböző mintákban.

**ANNEXIN V ÉS PI KOMBINÁLT JELÖLÉS.** Az apoptózis korai jeleinek meghatározásához  $10^5$  számú élő timocitát 100 µl Annexin-kötő pufferben 1mg/ml végkoncentrációjú FITC-el konjugált Annexin V-tel és 0,5 µg PI-al 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten, majd 400 µl Annexin-kötő puffert adtunk a sejtekhez. A sejteket a jelölés után maximum 1 órával áramlási citométer segítségével vizsgáltuk.

ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÉRÉS ÉS ANALÍZIS. A mintákat FACSCalibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose CA) mértük, az eredményeket a CellQuest program segítségével analizáltuk.

STATISZTIKAI ANALÍZIS. Az egyes kezelések hatásainak vizsgálatokor a különböző csoportok eredményeit Student féle t-próbával hasonlítottuk össze és a  $p < 0,05$  eltéréseket fogadtuk el szignifikánsan különbözőnek.

## **EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK**

A timociták pozitív és negatív szelekcióját szabályozó molekuláris mechanizmusok a régóta tartó kutatások ellenre még mindig nem teljesen tisztázottak. Az ismert tímusz citokinek, növekedési faktorok és azok jelátviteli útjainak vizsgálata sem oldott meg minden ellentmondást. A glukokortikoidok timociták érésében játszott egzakt szerepe, amelyet a kölcsönös antagonizmus modellel írnak le, még nem egyértelmű, különösen *in vivo* kísérleti eredmények érhetőek el korlátozott számban. A folyamatok további tisztázásához a sokat tanulmányozott BALB/c egérmodell mellett AND TCR transzgenikus egérmodellt is használtuk. A transzgenikus egérmodell szinte minden T-sejtje azonos specificitású TCR-t hordoz, mely a galamb citokróm c (Pigeon Cytochrome c, PCC) 88-104 fragmentumára (KAERADLIAYLKQATAK) specifikus. Az egérmodell segítségével a nem antigén specifikus (pl. aktiváló hatású anti-CD3 monoklonális antitesttel végzett) indirekt TCR aktiváció mellett a specifikus antigénnel történő, direkt TCR-on keresztüli T-sejt aktiváció hatásait is tanulmányoztuk.

BALB/C ÉS AND EGÉR TÍMUSZÁNAK SEJTÉS ÖSSZETÉTELE. Eredményeink szerint a kétféle egér csecsemőmirigyének sejtes összetétele nagyon eltér: a vad típusúban az intermedier fejlettségű DP sejtek dominálnak, míg a transzgenikus egérnél a CD4 pozitív érett sejtek vannak jelen legnagyobb arányban és szinte nem is lehet CD8 pozitív sejtet kimutatni. Ennek oka a transzgen működése, amely a T-sejt prekurzorokban a germ line TCR-ből egyetlen típusú átrendeződött V $\beta$ 3/V $\alpha$ 11 TCR kialakulását eredményezi, amely az adott MHCII segítségével a pozitív szelekció során csak CD4+ sejtek túlélését biztosítja a timocitáknak.

GCR EXPRESSZIÓ A KÜLÖNBÖZŐ TIMOCITA ALCSOPORTOKBAN. Régóta ismert, hogy a glukokortikoid hormon analóg DX kezelés jelentősen csökkenti a timusz méretét. A glukokortikoidok érett és éretlen timocitáknál is apoptózis váltanak ki. Az egyes timocita alcsoportok eltérő glukokortikoid érzékenységének pontos oka azonban nem magyarázott.

Az egyes populációk különböző GCR expressziós szintje lehetne az egyik kézenfekvő magyarázat a különböző glukokortikoid érzékenységre. A szabad citoplazmáris és ligand kötött receptort egyaránt felismerő monoklonális antitesttel végzett vizsgálataink szerint a GCR szint jelentősen eltérő az egyes timocita alcsoportokban: a DP sejtek tartalmazzák a receptort a legkisebb mennyiségben, melynél több található a CD4 SP, a CD8 SP populációkban, és legtöbb a DN sejtekben. Az AND transzgenikus egérmodellben az alacsonyabb DP GCR expressziót mind a glukokortikoid kezelés, mind TCR aktiváció tovább csökkentette. A TCR aktivációt követő GCR expresszió csökkenés magyarázatához még további kísérletek szükségesek, noha a jelátvitel során bekövetkező AP-1, NFAT, NF $\kappa$ B és Elk aktiváció már ismert, melynek szerepe lehet a GCR downregulációjában. A DP sejtek reagálnak a legintenzívebben a glukokortikoidok indukálta apoptózissal, amely arra utal, hogy a GCR szint önmagában nem meghatározó a glukokortikoidok iránti érzékenység szempontjából. Más jelátviteli mechanizmusok is befolyásolhatják a sejtek glukokortikoid érzékenységét.

A DP timociták alacsonyabb GCR expressziójának egyik lehetséges magyarázata a DP timociták környezetében található, lokálisan magasabb koncentrációjú, a kortikális epitheliális sejtek által termelt glukokortikoid hormon hatására bekövetkező homológ downregulációs folyamat lehet. Nagy dózisu glukokortikoid hormon in vivo alkalmazásakor egyedül a DP populációban találtunk GCR expresszió növekedést, majd ez egy hét múlva visszaállt az eredeti értékre. Az érett SP populációkban a szteroid hatásra még nyolc nappal a nagy dózisu DX kezelés után is alacsonyabb GCR expressziót találtunk, ami feltételezéseink szerint a túlélő és tovább érő (DP) sejtek hormon indukálta GCR downregulációjának a következménye. A glukokortikoid-GCR komplex 30 percen belül a magba transzlokálódik, ahol különböző gének (GRE) transzkripciós faktoraként hat. A GCR génje szintén tartalmaz GRE-t, amely szerepet játszhat a GCR expresszió glukokortikoidok által történő regulációjában. A glukokortikoidok bizonyítottan szerepet játszanak a timociták mellett más sejtvonalak GCR expressziós szintjének meghatározásában is.



A DP sejtek alacsony GCR expressziója és glukokortikoidok iránti nagyfokú érzékenysége között fennálló éles ellentmondás felveti nem genomikus GCR jelátviteli mechanizmusok jelenlétét is. A nem genomikus jelátviteli folyamatok egyik lehetséges módja, hogy a GCR más jelátviteli folyamatokban résztvevő faktorokkal lép kölcsönhatásba a citoplazmában. A Hsp-90 lehet az egyik ilyen faktor, amelyről kiderült, hogy Lck, Raf és ERK kötésen keresztül szerepet játszik a TCR jelátvitelében is, és szerepet játszik a timociták pozitív szelekciójában. Ismert, hogy az inaktív (ligandot nem kötő) GCR szintén a Hsp-90-hez kötve található a citoplazmában, így ez a molekula fontos érintkezési pont lehet a TCR és GCR jelátvitel kapcsolatában, molekuláris magyarázatot adva a kölcsönös antagonizmus modellhez. Intézetünkben folytatott kutatások során Jurkat T sejtekben a ZAP-70 molekulát egy másik lehetséges kapcsolódási pontnak találtuk a GCR és TCR jel között.

Ezen nem genomikus mechanizmusok jelenlétét magyarázhatja az a megfigyelésünk is, hogy a glukokortikoid antagonisták nem tudták meggátolni a DP sejtek DX indukálta deplécióját és nem tudták kiküszöbölni a korai apoptotikus markerek megjelenését 4 órával DX adagolást követően. A glukokortikoid-GCR komplex számos más transzkripciós faktoriall bizonyított interakciója, mint például az NF $\kappa$ B, AP-1, CREB és STAT-5, felelős lehet egyes DX hatásokért.

Autoregulációhoz hasonlóan a glukokortikoidok szerepet játszanak a GCR expresszió szabályozásában. Munkánk egyik eredménye a glukokortikoid indukálta GCR expressziós változások és apoptotikus markerek (Annexin V / PI) időbeli lefolyásának vizsgálata egér timocitákban. Érdekes mintázatot találtunk a GCR szintek változásában: egyszeri nagy dózisú DX adagolást követően BALB/c egerekben 16 óráig nőtt a receptor expressziója, majd azt követően folyamatosan csökkent a vizsgált 24 óra időtartamban. Hasonló változásokról számoltak be patkány hepatoma sejtekben. A 24 óra után talált GCR expresszió mértéke szintén hasonló az irodalomban jegyzett hasonló vizsgálatok eredményeihez.

Úgy tűnik, hogy a DP sejtekben nem működött a többi sejtre jellemző GCR homológ downreguláció, amely jelentős szerepet játszik a glukokortikoid rezisztenciában. A GCR expresszió GC indukálta csökkenése közös mechanizmus minden timocita alcsoportban, kivéve a DP populációt. A módosult GCR szint csökkenési hajlam magyarázhatja a DP sejtek fokozott glukokortikoid érzékenységét a változatlan GCR szint miatt.

TIMOCITA ALCSOPORTOK TCR INDUKÁLTA AKTIVÁCIÓJA. A TCR-n elinduló jelátviteli folyamatok egyik eredménye a  $Ca^{++}$  szignál. Annak tisztázására, hogy van-e szerepe a különböző timocita alcsoportok eltérő TCR-n keresztüli aktivációjában az intracelluláris szabad  $Ca^{++}$  koncentrációnak, meghatároztuk annak szintjét mind a négy populációban. Az eltérő nyugalmi szabad intracelluláris  $Ca^{++}$  szinttel jellemezhető egyes timocita alcsoportok a TCR direkt stimulálásának következtében eltérő kinetikájú és amplitúdójú  $Ca^{++}$  szint növekedéssel reagálnak. A legnagyobb arányú és leggyorsabb  $Ca^{++}$  szint növekedést az érett CD4 SP populáció sejtjeinél találtuk. Ezt az eredményünket alátámasztja az az irodalmi adat is, hogy a DP sejtek érett CD4 SP illetve CD8 SP elköteleződésében szerepet játszik az intracelluláris  $Ca^{++}$  szint mégpedig oly módon, hogy a magasabb  $Ca^{++}$  szint a CD4 SP irányú elköteleződést segíti elő.

GLUKOKORTIKOID HORMON ÉS TCR AKTIVÁCIÓ HATÁSA A TIMOCITA ALCSOPORTOK APOPTÓZISÁRA. A timociták apoptózisa számos faktor által szabályozott bonyolult folyamat melynek tanulmányozása során két érzékeny, az apoptózis korai szakaszára specifikus detektáló módszeren kívül a Bcl-2 expressziót és Caspase-3 aktivációt vizsgáltuk részletesebben.

4 órával a DX kezelést követő növekedést figyeltünk meg a korai apoptotikus sejtek arányában, amit késői apoptotikus markereket mutató sejtek arányának megnövekedése követett 16-20 órával a kezelés után. Nagyon hasonló apoptózis kinetikát találtak C57BL/6 egerekben is. A GCR expresszió és az apoptotikus sejtek arányának változása együtt járt a tímusz DP sejtjeinek depléciójával.

A tímuszt alkotó limfoid sejtek abszolút száma az exogén szteroid adás hatására koncentráció dependens módon drámai mértékben csökkent. Ez volt a helyzet az anti-CD3 vagy TCR stimuláló PCC kezelés hatására is.

A DP sejtekben a GCR vagy a TCR aktiváció önmagában és együttesen is fokozott foszfatidil-szerin externalizálódáshoz és csökkent mitokondrium membránpotenciálhoz vezet. Bár relatíve kevesebb korai apoptotikus DP sejtet találtunk, amikor a két aktivációt együtt váltottuk ki, az egyszeres kezelésekhez viszonyítva, hasonlóan a munkánkat megelőző in vitro eredményekhez. Ezen eredmények világosan mutatják, hogy a szimultán GCR és TCR stimuláció során tapasztalható magasabb arányú DP timocita túlélés a korai apoptotikus

folyamatok gátlásának köszönhető, ami a két jelátviteli út összekapcsolódását jelzi és a kölcsönös antagonizmus modellt támasztja alá.

Mivel az AND TCR transzgenikus egerek tímuszában a DP és CD4 SP sejtek alkotják az összes sejt több mint 90%-át, kísérleteink során főleg erre a két sejtcsoportra koncentráltunk. Mind a GCR, mind a TCR stimulus az éretlen DP sejtek számában okozott nagy csökkenést, míg a CD4 SP érett populáció csökkenése kevésbé volt szembetűnő. Mind a BALB/c, mind az AND TCR transzgenikus egereknél szignifikánsan több DP timocita menekült meg az apoptózistól, ha GCR stimulációt együtt alkalmaztuk a TCR stimulációval, ami nem volt megfigyelhető a CD4 SP populációban.

Az antigén *in vivo* jelenléte szignifikáns DP sejtarány csökkenést okozott, míg a glukokortikoid és a kombinált kezelés szinte teljesen eltűntette a DP populációt. Ezek a változások a CD4 SP alcsoport arányának egyidejű növekedésével jártak, amely arra utal, hogy a DP sejtek egy része a kezelések hatására valószínűleg differenciálódott és átjutott ebbe az érettebb stádiumba.

A Bcl-2 egy anti-apoptotikus tagja a Bcl-2 protein családnak, amelybe mind pro-, mind anti-apoptotikus hatású molekulák tartoznak. Más közleményekhez hasonlóan mi is eltérő Bcl-2 expressziót mutattunk ki az egyes timocita alcsoportokban. Egy T-sejt hibridómákkal végzett *in vitro* kísérlet bizonyította, hogy a Bcl-2 és a Bcl-xL molekulák szelektíven antagonizálják a glukokortikoidok által indukált apoptózist. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a TCR stimulus GCR agonistával együtt alkalmazva megnöveli a Bcl-2 pozitív DP sejtek arányát, jelezve azok szelekciós előnyét. Más közlemények leírták azt is, hogy a pozitív szelekció az anti-apoptotikus Bcl-2 expressziójának növekedésével jár, amely összefüggésben van a DP timociták túlélésével.

Az aktivált Caspase-3 az apoptózis effektor szakaszában szerepet játszó fehérje. Eredményeink szerint a DX indukálta DP timocita apoptózisban aktiválódott a Caspase-3 enzim, míg az anti-CD3 antitesttel kiváltott TCR aktiváció hatására kialakuló apoptózisban nem. Amennyiben a két jel együtt érte a sejtet, akkor csak részleges aktivációt figyeltünk meg. Irodalmi adatok alapján a Caspase-3 aktiváció mértéke timocitákban arányos az apoptózis mértékével, a DNS töredezettségével és a FAS és Bax expresszió szintjével.

A DX adagolást 4 órával követő GCR expresszió változásának és a foszfatidil-szerin molekulák külső membránba történő transzlokációjának egyidejűségéből arra következtettünk, hogy a GCR szerepet játszik az apoptózis korai lépéseinek szabályozásában. Mivel ezeket a korai (4 órán belüli) hatásokat nem befolyásolta a glukokortikoid antagonistá kezelés, felmerül a glukokortikoidok nem genomikus hatásmechanizmusának lehetősége. Az egyszeri nagy dózisú DX kezelés után 12-24 órával detektálható apoptózist gátolta a glukokortikoid antagonistá előkezelés, amely jelenségről már más kutatócsoport is közölt adatokat.

**GCR ANTAGONISTÁK HATÁSA.** A konvencionális GC hatás megakadályozására BALB/c egereket 2 napon át 12 óránként oltottunk RU43044 vagy RU 486 glukokortikoid receptor antagonistával önmagában, illetve kombinációban 20 mg/kg DX-al. Önmagában sem az *in vivo* RU486 kezelésnek, sem az RU43044 kezelésnek nem volt hatása a tímuszok abszolút sejtszámára, vagy a sejtes összetételre. A glukokortikoid receptor antagonistával együtt adott DX hatására a korai apoptotikus jelek ugyanúgy megjelentek a timocitákon, míg a késő apoptotikus jelek elmaradtak, amely arra utal, hogy az apoptózis korai fázisának kiváltásához nem szükséges a receptor ligand kötése, míg későbbi apoptózis stádiumban már igen.

**GLUKOKORTIKOID HORMON HATÁSÁNAK *IN VITRO* VIZSGÁLATA.** Az *in vivo* kísérleteinkkel párhuzamosan *in vitro* is vizsgáltuk a glukokortikoidok hiányát a timociták apoptózisában és túlélésében. A tímusz szövet kultúrában, ahol megtartott volt az eredeti mikrokörnyezet, a lokális szteroid szintézist teljesen le tudtuk gátolni és szteroid mentes médium használatával minimálisra tudtuk csökkenteni a glukokortikoid hatást. A DP sejtek mind a glukokortikoidok megvonására, mind a magasabb glukokortikoid szintre érzékenyek mutatkoztak. A GC hatás hiányában a szelekción áteső DP sejteket csak a TCR-en keresztül érte aktiváló jel, mely önmagában a sejtek apoptózisát okozhatta a kölcsönös antagonizmus modell szerint. A GC hatás pontos mechanizmusa azonban nem ismert, mivel a GCR antagonistá kezelésünk önmagában nem befolyásolta a sejtszámokat és a DX adás hatását sem tudta kivédeni. Ezért felmerül a DX GCR independens hatásmódja.

Az 1-2 napos BALB/c eger tímusz szövetkultúránkban és sejt kultúránkban is nagy arányú spontán apoptózist találtunk, mely valószínűleg Caspase dependens folyamat, mivel Caspase

inhibitorral csökkent a mértéke. Az érési és szelekciós folyamatok további in vitro kísérletezéséhez azonban a reaggregált tímusz kultúra használatára lesz szükség.

**TIMOCITÁK POZITÍV SZELEKCIÓJÁNAK MODELLEZÉSE.** A sikeres pozitív szelekciót követően a DP és SP sejtek felszínükön a CD69 antigént expresszálják. Ezt a jelenséget felhasználtunk a TCR + GCR aktiváció indukálta pozitív szelekció detektálására a DP és CD4 SP sejtpopulációkban. Mindkét egértörzsben az antigén/CD3 indukálta TCR aktiváció, illetve a DX kezelések önállóan is növelte a CD69 pozitív DP sejtek arányát, de a kombinált PCC és DX kezelés volt a leghatásosabb. Ugyanakkor a CD4 SP sejtek között csak az antigén, az alacsony dózisu DX és a kombinált kezelések hatására nőtt meg a pozitívan szelektálódott sejtek aránya, míg a jelenség nem volt megfigyelhető magas dózisu DX kezelés után. Valószínű, hogy a magas dózisu DX hatása csak átmeneti CD69 pozitív sejtarány növekedés, amelyet a sejtek apoptózisa követ. Ez a jelenséget támasztja alá az egyes sejtvonalaknál megfigyelhető CD69 és CD25 pozitívitas megjelenése spontán vagy szteroid indukálta apoptózis során. Ezzel szemben az alacsony dózisu DX és/vagy antigén kezelés hatására végbemenő pozitív szelekció következménye a CD69 pozitív, túlélő CD4 SP sejtek nagyobb aránya.

Mindkét egértörzsben talált eredményeink azt a megfigyelést támasztják alá, hogy a glukokortikoidok alacsony dózisban elősegítik a pozitív szelekciót és a sejtek túlélését. Eredményeinkből továbbá arra következtetünk, hogy az antigén és alacsony dózisu glukokortikoidok együtt képesek pozitív szelekció serkentésére a DP timocitákban.

Eredményeink szerint a kölcsönös antagonizmus modellben szereplő GCR és TCR aktiváció hatására kialakuló apoptózis korai lépései (membrán foszfolipid aszimmetria eltűnése, mitokondriumok működésének gátlása) mindenképpen lezajlanak a két jel szimultán jelenlétekor is. A programozott sejthalál effektor szakasza azonban legátlődik, ha a két jel együttesen van jelen, valószínűleg a Ras aktiválásán keresztül.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy eredményeink szerint a DP érési stádiumban lévő timocitákon az amúgy apoptózist kiváltó stimulusok együttesen az éretlen sejtek túléléséhez vezetnek, ellentétben az érett sejtekkel. Feltételezzük, hogy ennek a mechanizmusnak az egyik kulcs eleme a Bcl-2 molekula, amelyet a TCR és GCR szimultán jelének hatására a pozitív szelekción átesett timociták nagyobb arányban expresszálnak.

## **Az értekezés új eredményei**

1. Leírtuk, hogy a BALB/C és a transzgenikus TCR AND egértörzs timocita alcsoportjaiban a GCR expressziója eltérő: a glukokortikoid hormonra legérzékenyebb DP populáció fejezte ki a legkisebb mennyiségű receptort.
2. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy az egyes timocita alcsoportok intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  szintje és a TCR aktivációt követő  $Ca^{2+}$  szint változás kinetikája eltér.
3. Bebizonyítottuk, hogy a timociták spontán, ill. DX indukálta apoptózisa kaszpáz-függő, míg a glukokortikoid hatásra és a TCR aktiváció hatására kialakuló apoptózisban kaszpáz-független tényezők is szerepet játszanak.
4. Eredményeink szerint a szimultán GCR és TCR stimuláció során tapasztalható magasabb arányú DP timocita túlélés a korai apoptotikus folyamatok gátlásának köszönhető, ami a két jelátviteli út összekapcsolódását jelzi.
5. GCR antagonisták segítségével leírtuk, hogy az apoptózis korai fázisának kiváltásához nem szükséges a glukokortikoid receptor ligand kötése, míg későbbi apoptózis stádiumban már igen.
6. Leírtuk, hogy a kombinált alacsony dózisu glukokortikoid hatás és antigén stimulus együttes hatása a DP sejtek érett CD4 pozitív sejtekké történő kiérését segítette elő a transzgenikus AND egértörzsben.
7. Kísérleteinkkel sikeresen alátámasztottuk a kölcsönös antagonizmus modellt.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Németh Péter professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy intézetében végezhessem Ph.D. tanulmányaimat. Hálásan köszönöm Dr. Berki Timea témavezetőmnek a munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatást. Köszönöm az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársainak hasznos tanácsaikat és segítségüket. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak türelmüket, megértésüket és támogató szeretetüket.

## A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

(Összesített impakt faktor: 10,058)

1. **Pálinkás L**, Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Németh P, Berki T. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*. 2008; 213(1):39-50 **IF: 2.886 (2007-ben)**
2. Boldizsár F, **Pálinkás L**, Czömpöly T, Bartis D, Németh P, Berki T. Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology*. 2006; 211(10):785-96. **IF: 1,867**
3. Boldizsár F, **Pálinkás L**, Bartis D, Németh P, Berki T. Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunol Lett*. 2003; 90(2-3):97-102. **IF: 1,710**
4. Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *International Immunology*. 2002; 14(5):463-9. **IF: 3,595**

## A TÉZISEKTŐL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK

(Összesített impakt faktor: 27,537)

1. Molnár T, Jakab L, **Pálinkás L**, Molnár TF, Bogár L, Illés Z. Increased levels of baseline biomarkers reflecting platelet and endothelial activation predict early cognitive dysfunction after lung surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2009; publikálás alatt
2. Kumánovics G, Minier T, Radics J, **Pálinkás L**, Berki T, Czirják L. Comprehensive investigation of novel serum markers of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and dermato/polymyositis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(3):414-20. **IF: 2.270 (2007-ben)**
3. Aradi D, Kónyi A, **Pálinkás L**, Berki T, Pintér T, Tahin T, Horváth I, Papp L, Komócsi A. Thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Angiology*. 2008; 59(2):172-8. **IF: 0.625 (2007-ben)**
4. Bartis D, Boldizsár F, Kvell K, Szabó M, **Pálinkás L**, Németh P, Monostori E, Berki T. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354(1):253-8. **IF: 2.749**
5. Hajtó T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56(6A):441-6. **IF: 0,596**
6. Pár G, Berki T, Pálinkás L, Balogh P, Szereday L, Halász M, Szekeres-Barthó J, Miseta A, Hegedus G, Mózsik G, Hunyady B, Pár A. [Immunology of HCV infection: the causes

- of impaired cellular immune response and the effect of antiviral treatment] *Orv Hetil.* 2006; 147(13):591-600. **IF: -**
7. Hajtó T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Effects of mistletoe extract on murine thymocytes in vivo and on glucocorticoid-induced cell count reduction. *Forsch Komplement Med* 2006; 13(1):22-7. **IF: 1,417**
  8. Bartis D, Boldizsár F, Szabó M, **Pálinkás L**, Németh P, Berki T. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* No. 2006; 98(2-3):147-154. **IF: 2,866**
  9. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Nyárády Z, **Pálinkás L**, Czirják L, Berki T, Németh P. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol. Immunol.* 2006; 43(11):1761-8. **IF: 4.768**
  10. Pál J, **Pálinkás L**, Nyárády Z, Czömpöly T, Marczinovits I, Lustyik G, Saleh Ali Y, Berencsi G, Chen R, Varró R, Pár A, Németh P. Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of hepatitis B virus X antigen level in human sera. *J. Immunol. Methods.* 2005; 306(1-2):183-192. **IF: 2,572**
  11. Bánvölgyi A, **Pálinkás L**, Berki T, Clark N, Grant AD, Helyes Z, Pozsgai G, Szolcsányi J, Brain SD, Pintér E. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J. Neuroimmunol.* 2006; 169(1-2):86-96. **IF: 2,824**
  12. Hajtó T, Hostanska K, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (viscum albumin agglutinin-I): Overview of recent results from in vitro experiments and in vivo animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2005; 2(1):59-67. **IF: -**
  13. Engelmann P, **Pálinkás L**, Cooper EL, Németh P. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Developmental and Comparative Immunology* 2005; 29:599-614. **IF: 3,261**
  14. Engelmann P, Molnár L, **Pálinkás L**, Cooper EL, Németh P. Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell. Tissue Res.* 2004; 316:391-401. **IF: 2,670**
  15. Hajtó T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Nagy G, Németh P. Galactoside-specific mistletoe lectin modulate the dexamethasone-induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes. *In Vivo.* 2003; 17(2):163-168. **IF: 0,753**