

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A glukokortikoid hormon indukálta
jelátviteli mechanizmusok vizsgálata
T-sejt alcsoportokon**

Dr. Berki Timea



Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

2016

BEVEZETÉS

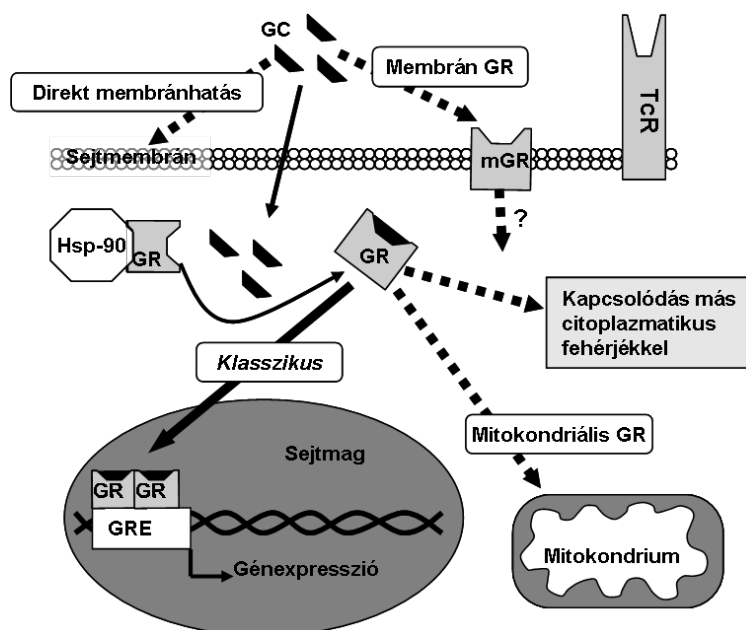
A mellékvese által termelt **glukokortikoid hormonok** (GC-ok) szerteágazó élettani hatásai révén szabályozzák többek között a metabolikus folyamatokat, különböző fejlődés- és neurobiológiai eseményeket, befolyásolják az immunrendszer működését valamint apoptózist okoznak bizonyos sejtípusokon. Az immunszabályozást számos ponton befolyásolják nemcsak a fiziológias GC-ok, hanem a terápiás céllal adott GC analógok is. Így többek között csökkentik a bazofil és neutrofil granulociták, valamint a hízósejtek számát, apoptózist indukálnak bizonyos T-sejt alcsoportokon. Gyulladáscsökkentő hatásuk kiterjed a monocyták/makrofágok, granulociták, T- és endothel sejtek citokin termelésére egyaránt. A T-sejt jelátvitel gátlása révén csökkentik a citokinek, különösen az IL-2 szintézisét, növelik viszont a regulatórikus T-sejtek (Treg) és a Th17-sejtek számát. Régóta ismert, hogy hosszantartó stresszhelyzetben az emelkedett GC szint hatására a tímusz nagymértékű involúcióval reagál és az immunfunkciók romlása figyelhető meg.

Mindezen megfigyelések alapján a szintetikus GC-analógokat (pl. Dexamethasone, Methylprednisolone, Triamcinolone) kiterjedten használják a klinikumban immunszuppresszív gyógyszerként allergia, asztma és autoimmun betegségek, bizonyos hematológiai malignitások kezelésére, valamint graft rejekció megelőzésére is. A szintetikus GC-ok erős gyulladásgátló és limfocita apoptózist kiváltó hatásuk miatt világszerte a leggyakrabban rendelt gyógyszerek közé tartoznak.

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-knak a klasszikustól eltérő **nem-genomikus** hatásai is vannak, amelyek akár percekben belül is létrejöhetnek nagy dózisu (30 mg-1g/nap) GC kezelés hatására. Ezt a dózist alkalmazzák asztmás roham és anafilaxiás reakciók kezelése során, transzplantációkor lökésterápiában, valamint autoimmun betegségek fellángolása esetén is. Ezek a következő mechanizmusok lehetnek:

- 1.) A GC-k lipofil molekulaként GR-kötődéstől függetlenül közvetlen membránhatások révén képesek a membrántranszport-folyamatok és a membrán permeabilitás befolyásolására.
- 2.) Egyes GC-indukálta apoptózisra rezisztens sejtekben, például idegsejteken és monocytákon és B-sejteken membrán-GR-t azonosítottak. Ezen utóbbi eredményeket az intézetünkben előállított anti-GR monoklonális antitest felhasználásával kollaborációban Frank Buttgerit és munkacsoportja írta le.

- 3.) A GR ligandkötés után képes más citoplazmatikus fehérjékhez kapcsolódni, így többek között az I κ B, Lck, Fyn kapcsolódás révén a T-sejt aktiváció korai eseményeit befolyásolhatja.
- 4.) A legújabb eredmények szerint a GR a GC-indukálta apoptózisra érzékeny sejtekben nemcsak a sejtmagba, hanem a mitokondriumba is transzlokálódik, és ezáltal képes egyelőre még ismeretlen mechanizmussal az apoptotikus kaszkádot 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.



A glukokortikoid hormon (GC) genomikus (folyamatos nyíl) és nem-genomikus (szaggatott nyíl) hatásmechanizmusai

(Boldizsár F., 2010)

A **T-sejtek** az adaptív immunrendszer fontos sejtjes elemei, melyek a B-sejtekkel ellentétben az antigént (amely általában fehérje), az antigénbemutató folyamatok során ismerik fel. A CD4⁺ T helper sejtek T-sejt receptorukkal (TcR) MHC-II-höz kapcsolódó extracelluláris térből származó, míg a CD8⁺ T citotoxikus sejtek MHC-I-en bemutatott intracelluláris peptid antigéneket ismernek fel az antigénbemutató sejt felszínén. A T-sejtek többlépcsős, érési folyamata a csontvelőben kezdődik, majd a tímuszban folytatódik, melynek végeredménye az a naív, antigénnel még nem találkozott T-sejt készlet („repertoire”), amely a perifériás nyirok-szervekbe vándorol, hogy effektorsejteké differenciálódjon.

A T-sejtek fejlődését a tímuszban **1.)** timociták és a strómasejtek közötti direkt sejt-sejt kapcsolatok és **2.)** a strómasejtek által szekretált szolubilis molekulák – citokinek (IL-7), kemokinek (CCL19, CCL25), és különféle hormonok (pl. GC-k) - befolyásolják. A fejlődési szakaszok feloszthatóak **korai** (az éretlen, CD4⁺CD8⁻ kettősen negatív (DN) sejtek

proliferaációja) 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 tímusz kéregállományban közvetlen kapcsolatba kerülnek a cortikális epitélisejtekkel (cTEC), amelyek MHC-n keresztül különböző peptidokat prezentálnak nekik. Ha a DP-sejtek a véletlenszerűen generálódó TcR specificitásuk révén nem tudnak az cTEC felszínén megjelenő MHC-peptid komplexhez 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 tímusból kikerülő érett sejtek, CD4⁺ vagy CD8⁺ egyszeresen pozitív (SP) fenotípusúak. A medulláris epitélisejtek (mTEC) és antigénbemutató sejtek a negatív szelekcióban szöveti antigéneket (TRA-tissue related antigens) expresszálnak bizonyos kombinációkban („promiscuous gene expression”) az AIRE (autoimmune regulatory element) transzkripciós faktor segítségével. Így az érett naív T-sejtek a perifériás szövetekben is meg tudják különböztetni a sajátot a nem sajáttól és így kialakul a centrális tolerancia.

A timociták szelekciója nagyban függ attól, hogy antigén receptoraikkal milyen erős kapcsolatot létesítenek a strómasejtekkel. Az affinitás modell szerint a kötődés erősségétől (a TcR antigén receptor affinitásától) függően a sejtek apoptózissal elpusztulnak, vagy túlélnek, azaz a TcR ligandhoz való affinitása dönti el a szelektálódó sejt későbbi sorsát.

A negatív szelekciós folyamat során FoxP3 transzkripciós faktort expresszáló, CD4⁺CD25^{high+} természetes regulatórikus T-sejtek (tTreg) is képződnek, amelyeknek nagy szerepe van a periférián az antigén specifikus immunszuppresszió (tolerancia) fenntartásában. Az azonban nem teljesen ismert, hogy a TcR kötődés mértéke hogyan befolyásolja a Treg sejtek fejlődését a tímuszban. Perifériás eredetű indukált regulatórikus T-sejtek (iTreg) naív CD4⁺ T-sejt előalakokból alakulnak ki a perifériás nyirokszervekben. Létrejöttük függ az antigén koncentrációjától, a ko-stimulációs mechanizmusoktól és a különböző citokinek koncentrációjától. Létejöttüknek kedvez a magas TGF- β és IL-2 koncentráció, a szuboptimális dendritikus sejt aktiváció, a ko-stimuláció hiánya, ill. alacsony dózisu antitest-peptid fúziós fehérje jelenléte.

A GC-k egyik régóta ismert hatása, hogy a tímusz involúcióját és a perifériás T-sejtek, illetve a timociták apoptózist okozzák. Érdekes ugyanakkor, hogy GC hormont lokálisan a tímuszban a strómaállományt alkotó cTEC-ek is szekretálják, sőt a legújabb kutatások szerint maguk a timociták is tudják termelni. Kimutatták, hogy a GC-k nemcsak a timociták apoptózist okozhatják, hanem bizonyos körülmények között a túlélésükhöz is hozzájárulhatnak („kölcsonös antagonizmus modell”), amely azt jelzi, hogy a GC hormon komplex a szelekciós szabályozási mechanizmusok szereplője lehet a tímuszban. A „kölcsonös antagonizmus” elmélet szerint, ha a T-sejt egyszerre kap szignált a GR-en és a TcR-en keresztül, akkor túlél, szemben azzal, amikor külön a GR, illetve a TcR aktiválódik, mert annak eredménye apoptózis lesz. Mindezen megfigyelések a TcR és GC indukálta jelátviteli útvonalak összekapcsolódását az ún. "receptor cross-talk" meglétét támasztják alá.

Ezek alapján felmerült, hogy alternatív GR-jelátviteli útvonalak (fehérje-fehérje kapcsolódások illetve más nem-genomikus hatások, pl. a mitokondriális membránpotenciál szabályozá-

sa) és a Bcl-2 fehérje érintettsége miatt a mitokondriális útvonal is aktívan részt vehet a DP-timociták GC-indukálta apoptózisában. Egy sejt GC érzékenységét számos faktor befolyásolja, többek között a sejt megfelelő szintű GR expressziója. Ha GC kezelés hatására a sejt GR expressziója változatlan, vagy inkább emelkedik, akkor az eredmény apoptózis. Ez a jelenség jellemző timocitákban és bizonyos T-sejtes limfomákban. Ezzel szemben, ha a GC hatásra a sejt a GR downregulációjával válaszol, akkor megmenekül az apoptotikus hatás alól.

Munkámban a T-sejtek differenciálódása és működése során létrejövő nem-klasszikus GC jelátviteli útvonalakat vizsgáltam.

CÉLKITŰZÉSEK

VIZSGÁLNI KÍVÁNTUK A TIMOCITA ALC SOPORTOK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGÉT ÉS GR EXPRESSZIÓJUKAT

1. *In vivo* GC kezelés és TcR aktiváció együttes hatását és időbeli lefutását egér modelleken vizsgáltuk.
2. GC antagonisták előkezelés és GC hormon szintézis gátló szerek hatásának tesztelése.
3. Az *in vivo* GC kezelés és a TcR aktiváció együttes hatásának vizsgálata a timociták apoptózisára (caspase 3 aktiváció, Bcl-2 expresszió) és a mitokondrium-funkcióra.
4. Az egyes timocita alc csoportok GR expresszióját és annak változását T-sejt aktiváció, GC hatás, illetve GC antagonisták kezelése után.

KUTATTUK A DP TIMOCITÁK ELTÉRŐ GC ÉRZÉKENYSÉGÉNEK OKÁT ÉS AZ APOPTÓZIS MECHANIZMUSÁT

1. Az *in vitro* nagydózisú GC kezelés mitokondriális funkcióra gyakorolt hatását.
2. A GR celluláris eloszlását/morfológiáját timocita alc csoportokon.
3. A ligand indukált GR mitokondriális transzlokációját DP timociták azok szubcelluláris frakcióiban.
4. A mitokondriális apoptózis útvonalat timocitákban *in vitro* GC kezelés hatására létrejövő caspase aktiváció, citokróm C felszabadulás nyomon követésével és a GR Bcl-2 család fehérjével történő asszociációját.

NAGYDÓZISÚ GC KEZELÉS GYORS, NEM GENOMIKUS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A TcR JELÁTVITELI ÚTVONALRA *IN VITRO* T-SEJT MODELLEN

1. A nagydózisú GC kezelés hogy befolyásolja a T-sejtek tirozin foszforilációs mintázatát és a ZAP-70 kináz foszforilációját?
2. A GR szerepének vizsgálata a ZAP-70 foszforilációban és közvetlen fizikai kapcsolatuk vizsgálata.
3. A ZAP-70 tirozin foszforilációs helyek szerepének vizsgálata a T-sejt aktivációban és a gyors GC hatásokban ZAP-70 tirozin pontmutáns T-sejt vonalakon.
4. A ZAP-70 azon tirozin maradékai, amelyek a nem-genomikus GC hatásokat közvetítik, befolyásolják-e a ZAP-70 szubsztrátjainak - SLP-76, LAT, Cbl - foszforilációját?

GC HORMON HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TREG ÉS ITREG SEJTEKRE ÉS AZOK CITOKIN TERMELÉSÉRE VALAMINT AZOK *IN VITRO* EXPANZIÓJA

1. A Treg sejtek előfordulási gyakoriságának és azok GC érzékenységének vizsgálata egér modellen.
2. Vizsgálni kívántuk a különböző Treg alcsoportok IL-10 és TGF β citokin expresszióját fehérje és mRNS szinten és az *in vivo* GC kezelés hatását.
3. Tímusz és lép eredetű CD4+ T-sejtekből *in vitro* különböző stimuláló körülmények között expandálni Treg sejteket és azok funkcióját követni időben.
4. Meghatározni a GR és FoxP3 transzkripciós faktor szinergizmus molekuláris alapjait.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Munkánk során 3-4 hetes BALB/c egereket B10.Cg-TgN (TcrAND53Hed) galamb cytochrome C specifikus (PCC peptid KAERADLIAYLKQATAK) I-E^k (MHC-II) restrikcióval működő V β 3/V α 11 TcR transzgenikus egereket használtunk. Az állatokat konvencionális körülmények között tenyésztettük a kísérletes munkák megfelelnek a PTE Állatetikai Bizottsága által megállapított szabályoknak (#BA 02/2000-2/2006).

SEJTVONALAK

A GR-TcR jelátviteli útvonalak vizsgálatához Jurkat (human akut T-sejt leukémia ATCC) sejteket és annak p56-lck és ZAP-70 deficiens szubklónjait (JCaM1.6 és P116) használtuk valamint a P116 sejtek lentivirális vektorral transzfektált variánsait, amelyek vad típusú (WT) ZAP-70-et vagy különböző aminosav pozíciókban Y-F pontmutációkat tartalmazó ZAP-70-et expresszáltak. Sp-2 egér myeloma és RBL2H3 patkány bazofil leukémia sejtvonalakat is használtunk munkánk során. A sejteket hagyományos 10% FCS / DMEM vagy RPMI-1640 (+PenStrep) médiumban tenyésztettük.

ÁLLATOK *IN VIVO* KEZELÉSE, SEJTPREPARÁLÁS

In vivo, a kísérleti egereknek 20 (nagy dózis) 2,0 (közepes) vagy 0,2 mg/kg (alacsony dózisú) GC-analóg Dexamethasone-t (DX) (Organon, Oradexon) adtunk i.p. 1-4 napon keresztül, a kontroll állatoknak pedig PBS-t. A GR antagonistá RU486 vagy RU43044 vegyületekből 1 mg/kg-ot 2 napig oltottuk i.p. T-sejt aktivációhoz i.v 5 vagy 50 μ g/állat anti-CD3 monoklonális antitestet használtunk önállóan vagy kombinációban DX-al. Az állatokat 24 órával a kezelése után áldoztuk fel, a tímuszokat, lépet, vagy nyirokcsomókat homogenizáltuk, a szuszpenziót átszűrtük majd az élő sejt számot Bürker kamrában meghatároztuk.

A SEJTEK KEZELÉSE

A DP-sejteket mágnesesen Easysep anti-PE (StemCell Technologies) szelekciós koktéllal, pozitív szelekcióval izoláltuk, a-CD4-FITC és a-CD8-PE antitest koktéllal történő kettős jelölés után. Western blot vizsgálatához 5×10^7 timocitát kezeltünk 37°C-on CO₂ termosztátban

tartva 10^{-6} M DX-al 30. ill. 60 percig, konfokális mikroszkópiához 30 percig és áramlási citometriához 30, 60, 120 és 180 percig.

Jurkat és P116 ZAP-70 variánsait expresszáló sejteket RPMI-ben a TcR/CD3 útvonal vizsgálatára anti-humán-CD3 (klón OKT-3) antitesttel kezeltük 2 percig, a nem-genomikus GC hatások kiváltására 10^{-5} M DX-al inkubáltuk 2-5 percig. Kombinált kezelés esetén 2 perces DX előkezelést további 2 perces anti-CD3 aktiváció követett. Az intracelluláris Ca^{2+} -jel vizsgálatakor a kombinált kezelés esetén a sejteket 10 percig 10^{-5} M DX-al kezeltük elő.

A Treg sejtek citokin termelésének meghatározására a lépéből és timuszból eltávolított limfocitákat stimuláltuk 24 órán keresztül *in vitro* RPMI+10% FCS-ben 25ng/ml PMA, 1µg/ml Ionomycin és/vagy 10µg/ml Brefeldin-A jelenlétében. A sejteket másnap 2x 2mL PBS-el mostuk, majd áramlási citometriás jelölést végeztünk.

ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

A sejt felszíni jelölésekhez 1 millió élő timocitából indultunk ki, melyeket 100µl jelölő pufferben (PBS 0,1% BSA/NaN₃) 30 percig inkubáltuk jégen 1µg/ml koncentrációjú anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr, anti-CD69-FITC fluoreszcens monoklonális antitestekkel. Az inkubáció után 2-szer mostuk a PBS pufferben, majd 500µl fixáló pufferben (0,1% PFA in PBS) vettük fel a sejteket (Current protocols in Immunology chapter 5.4)

Az **intracelluláris jelölésekhez** a sejt felszíni jelölések után fixáló oldatban (4% paraformaldehid (PFA) tartalmú PBS) 20 percig fixáltuk a sejteket, majd kétszeri mosás után PBS/0,1%NaN₃/0,1% Saponin tartalmú permeabilizáló pufferben végeztük az anti-Bcl-2-FITC, anti-aktivált Caspase-3-,8-,9-FITC, anti-GR-FITC, vagy anti-ZAP-70 fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel a jelöléseket.

Az **apoptózis** korai jeleinek meghatározásához 10^5 timocitát 100 µl Annexin-kötő pufferben 1µg/ml végkoncentrációjú FITC-el konjugált Annexin V-tel és 0,5 µg Propidium Jodiddal (PI) 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.

A **Treg sejtek és citokinjei** jelölésére 10^6 sejt/minta sejt felszíni jelölése után a mintákat mostuk 2ml jelölő pufferben. Az intracelluláris jelöléshez a FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience Cat. #00-5523-00)-et használtuk. Az intracelluláris jelöléshez anti-FoxP3-PE a citokinekhez anti-IL-10-APC, anti-IL-4-FITC, anti-IL17A-PerCP-Cyanine5.5 és anti-IFN γ -APC monoklonális antitesteket használtunk. Mintánként 10000 eseményt mértünk a limfocita kapuból, majd a CD4⁺ limfocitákon belül mértük a Treg alcsoportokat és azok anti-GR-FITC átlag fluoreszcencia intenzitását.

MITOKONDRIÁLIS CMX-ROS FELTÖLTÉS, SEJTFELSZÍNI ÉS INTRACELLULÁRIS JELÖLÉSEK

A mitokondriumok jelölésére és a mitokondriális funkció mérésére a CMX-Ros (chloromethyl-X-rosamine)(Invitrogen) mitokondriális indikátort használtuk. A feltöltést 37°C fokon végeztük, 30 percig a DX-kezeléssel párhuzamosan. A sejt felszíni a-CD4-Pacific blue és a-CD8-Alexa647 jelölést (ill. anti-CD4-PE, valamint anti-CD8-CyC fluorokrómokkal áram-

lási cytometriára) jégen, jelölő pufferben 30 percig végeztük. Ezután jelölő pufferrel mostuk a sejteket, majd 20 percig 4%-os PFA fixálás következett, mely után anti-GR antitesttel (5E4-B1 PTE IBI) vagy anti-Bak és Bax elsődleges antitestekkel és anti-nyúl IgG-FITC antitesttel jelöltük a sejteket intracellulárisan 0,1% szaponin tartalmú jelölő pufferben. A timocita alcsoportok CMX-Ros átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) áramlási citometriás méréssel hisztogramokon ábrázoltuk.

AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUM SZINT MÉRÉSE ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

Jurkat és P116 ZAP-70 variánsait expresszáló sejteket Fluo-3AM (Invitrogen) kalcium szelektív indikátor festékkel töltöttük föl. Minta és munkatársainak protokollja szerint (Minta A. 1989). Kezeletlen vagy DX előkezelt sejteken 50 másodpercig mértük az alap kalcium szintet, majd hozzáadtuk az anti-CD3-antitestet és így vizsgáltuk tovább az intracelluláris kalcium szint változását áramlási citometriával. Az FL1 intenzitásban észlelt változások arányosak az intracelluláris kalcium szintjével.

AZ ANTI-CD3 INDUKÁLTA FOSZFORILÁCIÓ VÁLTOZÁSOK MÉRÉSE FOSZFO-FLOW TECHNIKÁVAL

A nyugvó vagy anti-CD3 kezelt Jurkat és P116 sejteket 4% PFA-ban fixáltuk 37°C-on 10 percig, majd Phosflow Perm Buffer III-ban (BD Biosciences) 30 percig, jégen permeabilizáltuk. A mintákat PBS/0,1% BSA/0,1% NaN₃-ban mostuk, majd anti-SLP-76 pY128 vagy anti-LAT pY171 antitestekkel 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően ismét mostuk, majd PBS-ben vettük fel a sejteket.

A méréseket FACSCalibur vagy FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose CA) áramlási citométeren, az analízist pedig az FCS Express 4 Flow Research Edition programmal végeztük.

KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA

Az Olympus Fluoview 300 konfokális mikroszkópot és az Olympus Fluoview FV1000S-IX81 fotórendszert használtuk munkánkhoz. A jeleket 3-3 látótérben gyűjtöttünk és a CMX-Ros és a GR valamint a FoxP3-GR ill., ZAP-70-GR közötti morfológiai kapcsolatot (kolokalizáció) elemeztük. A GR és Bcl-2 család fehérjéinek közelségét hasonlóképpen vizsgáltuk, CD4 és CD8 jelet UV-ban, a GR jelét a FITC, a Bak, Bax, Bcl-x_L és Bim vagy a mitokondrium festést a piros csatornában detektáltuk, amikor a Bak és Bax jelét a FITC-nél. A jeleket 3-3 látótérben detektáltuk és a Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim-GR és CMX-Ros-Bak, -Bax morfológiai asszociációt analizáltuk. A képeket egymásra helyeztük és az ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) segítségével analizáltuk a kolokalizációt 100-DP sejtet analizálva mintánként.

A TIMOCITÁK SZUBCELLULÁRIS FRAKCIONÁLÁSA

A sejtfrakciók izolálásához Mitokondrium Izoláló kitet (Pierce) használtunk a gyári előírásokat követve. A mintákat 5x fagyasztottuk és olvasztottuk folyékony nitrogénben, majd inkubáltuk jégen 30 percig és centrifugáltuk 13,000 rpm-el 10 percig majd a supernatánst használtuk.

A GR-BCL-2 FEHÉRJE CSALÁD ASSZOCIÁCIÓ VIZSGÁLATA IMMUNPRECIPITÁCIÓVAL

Immunprecipitációhoz a mag, a citoszólikus és mitokondriális frakciókat a megfelelő precipitáló antitesttel inkubáltuk majd Protein-G-t (Santa Cruz Biotechnology) adtuk a mintákhoz és az immunkomplexeket SDS mintapufferben történő főzéssel távolítottuk, majd a sejtfrakciókat megfőztük és 7, 10 vagy 15%-os poliakrilamid gélen futtattuk, blottoltuk Bio-Rad Trans-Blot rendszer segítségével

TCR-GR JELÁTVITELI ÚT *IN VITRO* VIZSGÁLATA IMMUNPRECIPITÁCIÓVAL

A TcR/CD3 útvonal és a GC kezelés azonnali hatásának vizsgálatára a Jurkat vagy P116 mutáns kontroll vagy kezelt mintákat 2 perc DX kezelés után Triton X lízis pufferben lizáltuk, SDS gélben történő futtatás és blottolás után a megfelelő elsődleges antitestekkel inkubáltuk a blotokat, majd mosást követően HRPO konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk és Super Signal West Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) hívtuk elő. A kapott jeleket denzitometriás méréssel kvantifikáltuk, amit Scion Image software (Scion Corporation) segítségével végeztünk.

TREG SEJTEK *IN VITRO* EXPANZIÓJA

A CD4+ T-sejteket a frissen izolált lép és tímusz sejtekből negatív szelekcióval nyertük az EasySep Mouse CD4+ T Cell Enrichment Kit-et (Stemcell Technologies, Cat. #19752, #19772) használva. A 98% tisztaságú CD4+ T-sejteket *in vitro* RPMI/10% FCS (+Pen/Strep) médiumban tenyésztettük 2-14 napig anti-CD3/CD28 Dynabeads rekombináns IL-2 rekombináns TGF β és DX jelenlétében ismételt passzázsokkal. Az élő sejtszámot Bürker kamrában, a Treg arányt és citokin termelésüket áramlási citometriával követtük. A sejtekből RNS-t izoláltunk FoxP3, GR és citokin expressziójuk nyomon követésére.

TREG SEJT SZEPARÁLÁSA FACS MÓDSZERREL ÉS STIMULÁLÁSUK CITOKIN TERMELÉSHEZ

Kontrol és 2 napig *in vivo* 20mg/kg DX-al kezelt állatok tímuszából és lépéből sterilen 10⁸/ml sejtet jelöltünk RPMI/10% FCS-ben anti-CD4-FITC anti-CD25-PE-Cy7 antitestekkel, majd a CD4+/CD25^{high} sejteket kijelöltük és szeparáltuk FACS Aria (Becton Dickinson) sejt szeparáló készülékkel. A kapott sejtek 95%-nál nagyobb tisztaságúak voltak. Ezután a sejteket 4 órán keresztül aktiváltuk PMA/ionomycinnel.

REAL-TIME PCR

A sejtek kezelése vagy stimulálást követően 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 qRT-PCR reakciót az „Sybrgreen master mix“ vagy „Taqman master mix“ (mindkettő Applied Biosystems) segítségével végeztük.

STATISZTIKAI ANALÍZIS

Munkánk során a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai analízise SPSS 11.0 szoftver segítségével történt. Az adatok kiértékelésére

léséhez a Student-féle t-tesztet használtuk, és a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) és $P < 0,001$ (***) értéknél fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

TIMOCITÁK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGE ÉS GR EXPRESSZIÓJUK

BALB/C és AND egér tímuszának sejtes összetétele és azok GC érzékenysége

A tímuszt alkotó limfoid sejtek különböző fejlődési stádiumban lévő timociták, melyeket a CD4 és CD8 antigének sejt felszíni expressziójával négy csoportba tudunk sorolni. A háromhetes BALB/c egerek tímuszát jellemzően 1-3% DN, 70-80% DP, 10-15% CD4 SP és 5-8% CD8 SP timocita alkotja. Az AND TcR transzgenikus egerek tímuszában a TcR transzgen domináló hatása miatt a DP populáció kevesebb és dominálnak az érett CD4 SP sejtek.

A fiziológiás és farmakológias dózisú GC hatás vizsgálatához 3-4 hetes BALB/c egereket 4 napon keresztül 24 óránként 20,0, 2,0, illetve 0,2 mg/kg DX-al kezeltük *in vivo*. Az ismételt DX kezelések koncentráció dependens csökkenést okoztak a teljes timocita számban. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (120 millió sejt/tímusz) az ismételt 20,0 mg/kg DX kezelés több mint 100-szoros redukciót okozott a timocita számban (1 millió sejt/tímusz). A tímusz sejtes összetétele szintén megváltozott az *in vivo* DX kezelése hatására: a DP timociták a legérzékenyebbek a GC kezelésre. 4 napos ismételt nagy dózisú DX kezelés hatására 95%-uk elpusztul, míg az érett CD4 SP és CD8 SP, illetve éretlen DN populáció rezisztensebb. Az érett SP sejtek között a CD8 pozitívak ellenállóbbak voltak a glukokortikoid kezeléssel szemben, mivel a CD4/CD8 arány csökkent az emelkedő dózisú DX kezeléseknél.

Az egyszeri nagy dózisú DX hatását is vizsgáltuk, amelyben 15 napig követtük az egyes timocita populációk nagyságának alakulását. A legnagyobb sejtszám depléciót a 4. napon tapasztaltuk. Ezt követően kezdődött a tímusz repopulációja, mely a 15. napra szinte teljesen végbement és a kiindulási állapothoz képest már nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést egyik sejtcsoportban sem.

In vivo GR antagonisták hatása a tímusz sejtes összetételére

A GC-k hatása konvencionálisan a citoszolban található GR-on keresztül érvényesül. A receptor közvetítette GC hatást kísérleteinkben a nem specifikus RU486 és a GR specifikus RU43044 antagonistákkal blokkoltuk, amely megakadályozza a GR transzlokációját a sejt-magba. Az előzőekben leírt DX indukálta timocita depléció és sejtes összetétel változást nem befolyásolta az egyidejűleg adott glukokortikoid antagonisták kezelése (DX 20mg + RU43044: 7 millió timocita). Önmagában az *in vivo* RU43044 kezelésnek nem volt hatása sem az abszolút sejtszámban (RU43044: 106 millió timocita), sem az egyes timocita populációk arányára. Ezek alapján a GC-ok pro-apoptotikus hatása a DP sejtekben függetlennek tűnik az aktivált GR sejt-magba történő transzlokációjától.

GR antagonisták hatásának és a GC szintézis gátlásának *in vitro* vizsgálata

A továbbiakban kíváncsiak voltunk, hogy milyen szerepe van a cTEC által lokálisan termelt GC-nak a DP timociták túlélésében. A lokális GC szintézis gátlását 1-2 napos BALB/c egerek tímusz lebeny szövetkultúráján vizsgáltuk *in vitro*, melyeket 24 órán át kezeltünk 10^{-7} mol/l DX-al, RU43044 GR antagonistával, a kettő kombinációjával vagy a GC szintézis gátló Methyraponnal. Eredményeink szerint a DP sejtek esetében mind a DX kezelés, mind a lokális GC szintézis hiánya (Methyrapon) szignifikáns abszolút sejtszám csökkenést okozott a kontroll állapothoz viszonyítva (Ctrl: $27,3 \pm 5,2 \times 10^5$ DP sejt, Methyrapon: $5,1 \pm 2,3 \times 10^5$ DP sejt, DX: $6,0 \pm 2,7 \times 10^5$ DP sejt). A RU43044 GR antagonistának önmagában nem volt szignifikáns hatása a DP sejtszámra ($24,6 \pm 6,1 \times 10^5$ DP sejt), és kombinált kezelésnél nem gátolta a DX hatást ($5,8 \pm 2,4 \times 10^5$ DP sejt). Ezzel *in vitro* szövetkultúrán is bizonyítottuk, hogy a GC-ok DP timocitákra gyakorolt pro-apoptotikus hatása nem függeszthető fel a receptor sejtmagba történő transzlokáció gátlásával, vagyis a GC jelátvitel nem a klasszikus genomikus útvonalon zajlik, valamint azt is, hogy ugyanakkor az endogén GC hormon jelenléte szükséges a DP timociták pozitív szelekciója során a sejtek túléléséhez.

A kölcsönös antagonizmus modell vizsgálata: GC és TcR aktiváció együttes hatása a timocitákon

A továbbiakban azt szeretnénk vizsgálni, hogy a TcR aktiváció hogyan befolyásolja a GC kezelés timocita sejtpusztító hatását. A kettős antagonizmus modell szerint a tímusz kéregállományában a cTEC sejtek által termelt GC szükséges a DP timociták TcR indukálta apoptotikus hatásának megakadályozására. Önmagában mindkét jelátviteli útvonal aktivációja a sejtek apoptózist okozza, de a két jelátviteli útvonal összekapcsolódása a sejtek túlélését eredményezi.

A GC és TcR jelátviteli útvonal aktivációját *in vivo* DX és anti-CD3 kezeléssel modelleztük, majd vizsgáltuk az apoptotikus markerek megjelenését BALB/c egerek tímuszában, csak anti-CD3, csak DX és kombinált anti-CD3 + DX kezelés után 24 órával. Mindhárom kezelés hatására mind a korai, mind a késői apoptotikus sejtek aránya megnőtt a kontroll mintákhoz képest. A csak DX (28% korai, 22% késői) illetve csak anti-CD3 kezelés hatására megfigyelhető apoptotikus sejtarányokhoz (21% korai, 18% késői) viszonyítva a kombinált kezelés hatására kisebb mértékű apoptózist találtunk (7% korai, 17% késői apoptotikus sejt). Ugyanezt tapasztaltuk AND TcR transzgenikus egérben is, amikor az antigén (PCC) és DX együttes hatását vizsgáltuk, vagyis a sejtek nagyobb mértékű túlélése következett be a kombinált kezelésnél, mint a külön stimulációk hatására.

Tehát a kombinált kezelés együtt kivédte a DX, illetve az anti-CD3 antitest, ill. az antigén apoptózist indukáló hatását. Ez a két jelátviteli út összekapcsolódását jelzi, mely alátámasztja a kölcsönös antagonizmus modellt a timociták pozitív szelekciójában.

Antigén és DX együttes hatása gátolja a timociták apoptózist

Az AND TcR transzgenikus egértörzsben vizsgáltuk a DP és CD4 SP timociták mitokondriális funkcióját a kezeléseket után CMX-Ros festékkel inkubálva az állatok timocitáit. Azt találtuk, hogy a kontroll állatokban $21,18 \pm 5,2$ % DP timocita volt CMX-Ros pozitív (intakt mitokondriummal rendelkező). Ehhez viszonyítva minden kezelés szignifikán-

san ($p < 0,05$) csökkentette az intakt mitokondriális membrán potenciállal rendelkező sejtek arányát. A legkevesebb funkcionáló mitokondriummal rendelkező DP sejtet az anti-CD3 (1.11 ± 0.21 %) ill. önmagában alkalmazott 10,0 mg/kg dózisú DX kezelés (0.55 ± 0.11 %) után találtunk. Kombinált kezelések hatására (PCC+DX: 5.3 ± 0.2 ; a-CD3+DX: 5.0 ± 1.1 % DP sejt) növekedett az intakt mitokondriummal rendelkező DP sejtek aránya valamint gátlódott a Caspase-3 aktiváció.

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk továbbá, hogy a kombinált kezelés, vagyis a sejtek GC és TcR jelátviteli útvonalon történő aktivációja növeli a sejtek CD69 expresszióját és a Bcl-2 pozitív DP és CD4 SP sejtek arányát és abszolút számát is (Pálkás et al. 2008), vagyis a kettős szignál hatására aktiválódnak a sejtek és növekszik a túlélő sejtek aránya és azok Bcl-2 upreguláció révén kerülnek ki az apoptózist.

A GR szerepének vizsgálata a timocita apoptózisban

Az egyes timocita alcsoportok eltérő GC érzékenységének hátterét kutatva elsőként kíváncsiak voltunk az egyes timocita alcsoportokban található GR fehérje expresszió mértékére, mivel az összefüggésbe hozható a sejtek GC hormon érzékenységével.

Az anti-GR monoklonális antitestek jellemzése

GR jelölésekhez a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben kifejlesztett anti-GR monoklonális antitesteket használtunk, melyek a receptor regulátoros doménjében elhelyezkedő a GR-re jellemző és más szteroid receptorban nem szereplő 26 aminosav hosszúságú szekvenciában elhelyezkedő epitópokat ismerik fel (APTEK 26). A használt IgG1 izotípusú klónok (8E9 és 5E4) mind a ligand kötött, mind a szabad receptort képesek felismerni a citoplazmában és sejtmagban egyaránt.

GR expresszió a különböző timocita alcsoportokban

Sejtfelszíni és intracelluláris jelöléssel előzetes szeparálás nélkül tudtuk a négy különböző érettségű timocita alcsoport (DN, DP, CD4 és CD8 SP) GR expresszióját vizsgálni áramlási citométerrel. A GR expresszió RT-PCR vizsgálatát FACSVantage készülékkel szeparált a CD4/CD8 jelöléssel elkülönített DN, DP és CD4 ill. CD8 SP 98%-nál nagyobb tisztaságú timocita alcsoportokban végeztük.

Eredményeink szerint fiatal (3-4 hetes) BALB/c egerek timocita alcsoportjaiban eltérő mértékben expresszálódik a GR. Az érett CD4 SP sejtek mérsékelten kevesebb GR-t találtunk, mint a CD8 SP sejtekben, melyet alátámasztanak humán perifériás vérmintán elvégzett vizsgálataink eredményei is. A CD4+CD8+ (DP) timociták a többi populációhoz képest szignifikánsan alacsonyabb mértékben expresszálják a GR-t. Azonos eredményeket kaptunk RT-PCR mérésekkel is a GR mRNS szintű expresszióját vizsgálva.

Egyszeri nagy dózisú DX kezelés hatása a GR expresszióra

Ugyancsak vizsgáltuk egyszeri nagydózisú (20 mg/kg) *in vivo* GC kezelés után 24 órával a timocita alcsoportokban a ligand indukálta GR expresszió változást mind fehérje, mind mRNS szinten. Jól megfigyelhető a DN és CD4/CD8 SP sejtekben a GR ligand indukálta homológ downregulációja, míg a DP sejtekben ez hiányzik.

Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a tímuszban található DP timociták a lokális GC termelő cTEC sejtek környezetében differenciálódnak. Feltételezhető, hogy ez az oka, hogy a többi timocita sejtcsoporthoz képest bennük a legalacsonyabb a GR expresszió, mégis ebben differenciálódási stádiumban érzékenyebbek a GC indukált apoptózisra. Ezt erősíti azon megfigyelésünk is, hogy ebben a sejtcsoportban magas a Dig2 (DX-indukált gén) és alacsony a Bcl-2 expressziója.

A DP TIMOCITÁK GR JELÁTVITELI ÚTVONALA ÉS APOPTÓZIS MECHANIZMUSA

DP timocitákban a GR granuláris eloszlást mutat és GC hatásra a mitokondriumba vándorol

A GR intracelluláris eloszlásának vizsgálatához a CD4/CD8 sejt felszíni jelöléssel elkülönített négy timocita alcsoportban elsőként a GR-FITC morfológiai jellemzését végeztük el és azt láttuk, hogy DP-sejtekben a legkevesebb a GR és eltérő festődési mintázatot is ad, eloszlása granuláris, míg a SP-sejtekben homogénebb. A DP-sejtek granulárisabb jellegű festődési mintázata utalhat arra, hogy a GR ezekben a sejtekben mitokondriális elhelyezkedésű lehet.

A CMX-Ros mitokondriális festék és a GR közötti átfedést mind a 4 timocita alcsoportban megvizsgáltuk és minden sejtcsoportban találtunk bizonyos szintű kolokalizációt. DP timocitákban *in vitro* 30 perces DX kezelés hatására a GR főleg a mitokondriumba, nem pedig a sejtmagba transzlokálódott.

Mivel a DP sejtek a legérzékenyebbek a GC kiváltott apoptózisra, ezért vizsgáltuk a mitokondriális funkciót a CMX-Ros MFI változásokat követve 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 timocitákból citoplazma, mitokondrium és sejtmag frakciót izoláltunk. Sikerült igazolnunk, hogy a DP sejtekben a GR valóban csak a mitokondriumba transzlokálódik, a sejtmagba nem.

A GR asszociációja a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival

A további munkánkban a GR mitokondriális transzlokációja során lehetséges mitokondriális fehérje célpontként a Bcl-2 fehérjecsald tagjai közül a Bak és Bax proapoptotikus fehérjéket, az anti-apoptotikus Bcl-x_L és a BH3-only fehérjék közül a Bim viszonyát vizsgáltuk a GR-hez.

Konfokális mikroszkópos képeken a DX kezelés nem okozott kolokalizáció változást a DP sejtekben GR-Bax és GR-Bak esetében. Ugyanakkor fokozódott a GR-Bim és csökkent a GR-Bcl-x_L kolokalizáció mértéke a DX kezelt mintákban. A GR valódi molekuláris interakciójáról a Bcl-2 család egyes fehérjéivel a továbbiakban immunprecipitációs kísérletekben ellenőriztük, mégpedig a timocitákból izolált citoplazma és mitokondriális sejtfrakciókban egyaránt a kontrol és 30 perces DX-al kezelt mintákban. Az anti-GR ellenanyaggal precipitált mintákban közvetlen molekuláris asszociációt találtunk a GR és Bak, Bim és Bcl-x_L molekulákkal mind a citoplazma, mind a mitokondriális frakcióban. A 30 perces DX kezelt mintákban a GR-Bak és GR-Bcl-x_L interakció a citoplazma frakcióban növekedett, a mitokondriumban csökkent, míg a GR-Bim molekuláris interakció a mitokondriális frakcióban emelkedett.

dett. Közvetlen GR-Bax molekuláris interakció nem volt megfigyelhető a timociták szubcelluláris frakcióiban. Ugyanakkor a 30 perces DX kezelés hatására a Bax mitokondriális akkumulációját figyeltük meg a szubcelluláris frakciók western blot analizisével és konfokális mikroszkóppal egyaránt, a Bax-CMX-Ros kolokalizáció emelkedésével.

A GC indukálta kaszpáz aktiváció útvonalának vizsgálata

Ezután megvizsgáltuk, hogy timocitákban nagydózisú *in vitro* DX kezelés után 1 órával mely kaszpázok aktiválódnak, ill. a mitokondriális útvonal aktivációját jelző Citokróm C felszabadulás kimutatható-e a sejtek citoplazma frakciójában. Meglepetésünkre azt találtuk, hogy a teljes timocita lizátumban a GC kezelés után 1 órával a kontrolhoz képest a hasított kaszpáz 9, és enyhébb mértékben, de a kaszpáz 8 hasított formája is emelkedést mutatott. Ez azt jelenti, hogy nem csak az intrinsic, mitokondriális útvonal aktiválódik GC kezelés hatására. Az apoptózis egy későbbi lépésének aktivációját jelzi a mitokondriumból kiszabaduló Citokróm C mennyiségének emelkedése és az effektor kaszpáz 3 hasítása is. Mindkettő emelkedett 1 órával a GC kezelés után.

A kaszpáz aktivációt áramlási citometriás módszerrel is ellenőriztük, ahol CD4/CD8 sejtfel-színi jelöléssel a DP sejtcsoportban tudtuk vizsgálni a hasított kaszpázok időbeni megjelenését. Hasonlóan a Western blotnál kapott eredményekhez a kaszpáz 9 és 8 aktiváció egyaránt kimutatható volt a DX kezelés után 1-3 órában vizsgálva. Az effektor kaszpáz 3 aktív formája szintén jelentősen emelkedett a DP timocitákban. Ezen eredmények azt jelzik, hogy 1 óra *in vitro* DX kezelés hatására aktiválódik az intrinsic apoptózis útvonal, de kismértékben kimutatható az extrinsic iniciátor kaszpáz 8 aktivációja is. Mindez jelentős citokróm C felszabadulást és az effektor kaszpáz aktivációját okozza.

A GC GYORS NEM-GENOMIKUS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A TCR JELÁTVITELI ÚTVONALRA

Timociták Ca⁺⁺ jele és tirozin-foszforilációja *in vitro* TcR aktiváció hatására DX jelenlétében

A GC és TcR jelátviteli út kapcsolatának további bizonyítására vizsgáltuk a timocita alcsoportok (DN, DP, CD4 és CD8 SP) TcR-en keresztül történő aktivációját rövid ideig tartó *in vitro* DX előkezeléssel és anélkül. Az intracelluláris szabad Ca⁺⁺ jel követésére áramlási citometriás időkinetika vizsgálatot végeztünk az anti-CD3 kezelést követő 360 másodpercen (6 perc) keresztül. Azt tapasztaltuk, hogy a DX előkezelt mintákban csökken a Ca⁺⁺ jel az érett sejtekben, míg a DN és DP éretlen sejtek szabad intracelluláris Ca⁺⁺ jele fokozódik.

Megvizsgáltuk DX kezelt és kontrol timocita mintákon az anti-CD3 kezelés hatását a sejtek tirozin-foszforilációjára is anti-foszfotirozin antitesttel történő jelölést követően áramlási citometriával a sejtek anti-PTY fluoreszcencia intenzitásainak detektálásával. Azt tapasztaltuk, hogy DX előkezelt timociták tirozin foszforilációja 10 perccel az anti-CD3 kezelés után magasabb volt a kontrol mintákhoz képest, vagyis a CD3 stimuláció és DX kezelés additív hatású a sejtek tirozin foszforilációjára.

A folyamat molekuláris mechanizmusának tisztázására a primer timociták kevésbé alkalmasak, ezért helyettük egy stabil T-sejt vonalat (Jurkat) választottunk, amelyen reprodukálható módon vizsgálható a TcR aktiváció molekuláris folyamata, valamint rendelkezésre állnak a TcR jelátviteli molekuláiban, mint a p56-lck és ZAP-70 deficiens szubklónjai (JCaM1.6 és P116). Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy a GC hormon hogyan befolyásolja a TcR jelátviteli útvonal korai eseményeit, és van-e a két jelátviteli útvonal molekulái között direkt kapcsolat? A gyors GC hatások vizsgálatához nagy dózisú rövid ideig tartó *in vitro* GC kezeléseket alkalmaztunk a TcR aktivációt pedig anti-CD3 kezelésekkel modelleztük.

A ZAP-70 kináz GR dependens foszforilációjának vizsgálata

A ZAP-70 központi szerepet játszik a TcR jelátviteli útvonalban, számos szubsztrátot foszforilálva és önmaga is számos tirozin molekulán foszforilálódik. Ezért vizsgáltuk a ZAP-70 tirozin-foszforilációját DX és/vagy anti-CD3 kezelés után. 5 perc 10 μ M DX kezelés önmagában is átlagosan 4-szeres (3.32 + 1.72) foszforiláció emelkedést okozott a ZAP-70 kinázon, anti-CD3 kezelés önmagában szintén 4-szeres (3.59 + 1.69) tirozin foszforiláció emelkedést okozott, míg kombinált DX + anti-CD3 kezelés hatására tovább emelkedett a ZAP-70 tirozin foszforilációja 5-szörösére. (4.98 + 2.83). A DX kezelés hatására bekövetkező ZAP-70 tirozin foszforiláció idő-kinetikáját vizsgálva a maximumát a 2. percben éri el, majd 5 perc után már csökkenés (defoszforiláció) figyelhető meg. Azt is bizonyítani tudtuk, hogy a folyamat lck dependens, mivel a folyamat a JCaM1.6 (lck deficiens) sejteken nem jött létre. Ugyancsak bizonyítottuk, hogy GR gátlás hatására sem történik meg a folyamat, tehát ezek alapján elmondhatjuk, hogy a DX indukálta ZAP-70 tirozin foszforiláció p56-lck és GR dependens folyamat.

A GR - ZAP-70 kináz asszociáció vizsgálata

Annak bizonyítására, hogy van-e fizikai kapcsolat a citoplazmatikus GR és ZAP-70 molekula között, immunprecipitációt végeztünk a DX-al vagy oldószerével kezelt Jurkat sejt lizátumain mind anti-ZAP-70 mind anti-GR antitestekkel. Megállapíthatjuk, hogy a DX kezelt Jurkat sejtekben a GR co-precipitálódott a ZAP-70 molekulával és *vice versa*. A két molekula kapcsolódása a DX kezelt mintákban fokozódott. Mindezt konfokális mikroszkópos vizsgálattal is megerősítettük.

DX kezelés gátolja a ZAP-70 - CD3 asszociációt és a Ca²⁺ jelet

A ZAP-70 központi szerepet játszik a TcR-CD3 komplexből kiinduló jelátviteli folyamatokban. Eredményeink azt bizonyítják, hogy nagy dózisú DX jelenlétében a ZAP-70 asszociációja a CD3 komplexhez gátlódik, miután a DX kezelt mintákban nem jött létre a két molekula koprecipitációja

Az intracelluláris Ca²⁺-jel kialakulása a T-sejt aktiváció további fontos eseménye. Kísérleteink során megvizsgáltuk azt is, hogy rövid idejű (10 perces) DX előkezelés hogyan befolyásolja az anti-CD3 kiváltotta Ca²⁺-jelet. 10⁻⁵M DX előkezelés az intracelluláris Ca²⁺ szint szignifikáns csökkenéséhez vezetett a csak anti-CD3-mal kezelt mintához viszonyítva.

A ZAP-70 tirozin foszforilációs helyek szerepe a nem-genomikus GC hatásokban

A kísérleteink szerint a ZAP-70 kináz mind anti-CD3, mind DX kezelés hatására foszforilálódik. Mivel a ZAP-70 aktivációs és gátló tirozin maradékokat is tartalmaz, így felmerül, hogy a különböző kezelések során más-más funkciójú tirozinok foszforilálódnak és közvetítenek eltérő jeleket a downstream molekuláknak. A ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak vizsgálatára olyan transzgenikus Jurkat sejteket hoztunk létre, amelyek stabilan expresszálnak tirozin-fenilalanin (Y-F) pontmutáns ZAP-70-et. Ehhez P116 sejteket transzfektáltunk lentivirális vektorral, ami WT vagy Y-F pontmutáns ZAP-70-et kódol a 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 és 493 pozícióban.

A WT DX kezelt mintához viszonyítva, szignifikáns foszforiláció csökkenést kaptunk azokban a sejtvonalakban, amelyekben az aminosav csere a 315 és 492 pozíciókban történt, így feltételezzük, hogy a nem-genomikus GC hatások közvetítésében a ZAP-70 ezen két tirozin maradéka vesz részt. Az F315 és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a 2 perces DX kezeléskor kapott csökkent tirozin foszforiláció ellenére nem változott meg a ZAP-70-GR asszociáció, ami arra utal, hogy a Y maradékok nem vesznek részt direkt módon a 2 molekula fizikai kapcsolatának szabályozásában

A ZAP-70 Y-F pontmutációja a 315 és 492 pozíciókban megátolja a rövid idejű, nagy dóziszú DX kezelés indukálta SLP-76 és Cbl foszforilációt

A Jurkat sejtek lizátumából készített Western blotokon látható, hogy a ZAP-70 kináz mellett további molekulák foszforilációja is megváltozik rövid idejű, nagy dóziszú DX kezelés hatására. A T-sejt aktiváció során a ZAP-70 szubsztrátjai az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulák. Megvizsgáltuk, hogy ezen molekulák foszforilációja megváltozik-e 2 perces DX kezelés hatására és azt tapasztaltuk, hogy növekedett mind az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációja is. Kombinált DX + anti-CD3 kezelésnél a DX részben gátolta az SLP-76 és Cbl anti-CD3 indukálta foszforiláció növekedését. A LAT esetében a kombinált kezelés nagyobb mértékű tirozin foszforilációt eredményezett, mint akár a DX vagy az anti-CD3 kezelések önmagában.

Annak megerősítésére, hogy a ZAP-70 315 és 492 tirozinjai valóban részt vesznek a nem-genomikus GC hatások továbbításában, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, LAT és Cbl foszforilációját 2 perces DX kezelést követően. Az Y-F aminosavcsere a ZAP-70 315 és 492 pozíciójában gátolta az SLP-76 és a Cbl DX indukálta foszforilációját. A LAT esetében egyik pontmutáció sem befolyásolta a DX indukálta foszforiláció növekedést. Ez arra utal, hogy a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik. A LAT-ot a ZAP-70-en kívül az Itk és az Lck is foszforilálja, így feltehetően a LAT-on megfigyelt nem-genomikus GC hatásokat ezek a molekulák idézik elő.

GC HORMON HATÁSA A REGULATÓRIKUS T-SEJTEK *IN VIVO* ÉS *IN VITRO* DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRA ÉS FUNKCIÓIRA

A természetes és indukált regulatórikus T-sejtek eloszlása és GC érzékenysége

A regulatórikus T-sejtek (Treg) kulcsfontosságú tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Ezért alapvető kérdés, hogy az immunszuppresszív hatásáért széles körben alkalmazott GC hormon analógok hogyan hatnak a szintén szuppresszor hatású Treg sejtek előfordulására és funkcióira.

Megvizsgáltuk a nagy dózisu (20 mg/kg) *in vivo* DX kezelések hatását a különböző nyirok-szervekben előforduló Treg-ek arányára és abszolút sejtszámra is. 4 napos ismételt DX kezelés után 24 órával a tímuszban a Treg-ek aránya szignifikánsan emelkedett. Ez a változás a DP, GC érzékeny, éretlen timociták jelentős pusztulásának a következtében kialakuló relatív sejtarány emelkedésnek köszönhető. Az abszolút Treg sejtszámban enyhe, de nem szignifikáns növekedést látunk, ami azt bizonyítja, hogy a tímuszban a Treg-ek rezisztensek a DX indukálta apoptózisra.

A perifériás nyirokszervek közül a lépben tapasztaltunk enyhe, de szignifikáns Treg arány csökkenést a GC kezelt állatokban, ugyanakkor sem a nyirokcsomóban sem a PP-ben a Treg arány nem változott. Ugyanakkor a perifériás nyirokszervekben GC kezelés hatására az összlimfocita szám és ezzel együtt a Treg sejtszám is szignifikánsan lecsökkent, ami a szervek méretének látványos kisebbedésével is járt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a perifériás nyirok-szervekben az érett T-sejtek és a Treg-ek hasonló GC érzékenységet mutatnak.

In vivo GC kezelés hatása a Treg sejtek citokin termelésére

Megvizsgáltuk a Treg sejtek jellemző szuppresszor hatású citokinjeinek az IL-10 és TGF β valamint az utóbbi időben leírt IL-35 citokin termelésének változását 2 napos *in vivo* DX kezelést követően. Miután előző kísérleteink alapján a perifériás nyirokszervekben található Treg sejtek hasonló összetételt és változásokat mutattak DX kezelés hatására, a továbbiakban csak a lép és tímusz limfoid sejtjeit vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a DX kezelt egerekben szignifikánsan emelkedett mindkét citokin termelő tTreg és iTreg sejtek aránya is. Mindkét szervben az IL-10 termelő Treg sejtek aránya emelkedett nagyobb mértékben. Megvizsgáltuk a tímusz és lép eredetű Treg sejtek citokin termelését mRNA szinten is szeparált CD4+CD25^{high} sejteken. Ez a sejtcsoport elfogadott, mint szeparált Treg sejt. A tímuszban az IL-10 és a TGF β expresszió is emelkedett (RQ>2) a DX kezelt mintákban, de az IL-10 mRNA mennyisége a kezeletlen mintákban is magasabb volt és a DX hatásra bekövetkező emelkedés is sokkal látványosabb volt, mint a TGF β -é. Az IL-35 Ebi3 lánc nem mutatott változást, míg az IL-12 α lánc expresszió inkább csökkent a DX kezelt mintákban. A lépben található Treg sejtekben ellenkezőleg a TGF β mRNA szint volt magasabb és annak DX indukált emelkedése volt jelentős, míg az IL-10 és IL-35 láncai inkább kissé csökkent expressziót mutattak a DX kezelés hatására.

A GR és FoxP3 expresszió Treg sejtekben 2 napos DX kezelés után

Egy sejt GC érzékenységét jelentősen meghatározza, hogy milyen mértékben expresszálják a GR-t. Ezért a továbbiakban a Treg-re jellemző viszonylagos szteroid-rezisztencia, valamint a

GR expresszió közötti összefüggést kerestük. Ehhez az intézetünkben már korábban is alkalmazott intracelluláris áramlási citometriás GR jelölést használtuk, amely korrelál a sejtek GR tartalmával mind fehérje, mind RNS szinten (Berki T., 2002). Eredményeink szerint a kezeletlen állatok tímuszában a tTreg sejtekben alacsonyabb a GR fehérje szintje (MFI), mint a perifériás nyirokszervekben (lép) található Treg-ek GR szintje. Kétszeri, nagy dóziszú, *in vivo* DX kezelés után a tímuszban túlélő (GC rezisztens) Treg-ek GR expressziója a kontrollhoz képest kissé növekedett. Ezzel szemben a perifériás nyirokszervekben a korábbi humán vizsgálatainkban is tapasztalt GR MFI csökkenés volt megfigyelhető a DX kezelést követően. Ez a változás csak a lépben volt szignifikáns. Ezek alapján úgy tűnik, hogy DX kezelés hatására a tímuszban a túlélő GC rezisztens Treg-ekben az eredetileg alacsony GR szint emelkedik (az érett SP sejteket megközelítő szintre), a lépben található Treg sejtekben pedig az érett T-sejtekre jellemző GR downreguláció figyelhető meg.

Megvizsgáltuk ugyanezen áramlási citometriás jelöléssel a tímusz és lép Treg sejtekben a FoxP3 expressziót is a FoxP3 fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékeket összehasonlítva, de fehérje szinten nem tudtunk szignifikáns expresszió változást kimutatni DX kezelés hatására. Ugyanakkor a szeparált tímusz és lép Treg sejtekből (CD4/CD25^{high+} expresszió alapján) izolált relatív mRNS génexpresszió qRT-PCR-al történő meghatározásakor a lépben a DX kezelt mintákban emelkedett a FoxP3 relatív expressziója (RQ>2), míg a tímuszban nem változott. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a tímuszban stabil a tTreg sejtek FoxP3 expressziója, míg a lépben DX kezelés hatására indukálható a CD4+CD25^{high+} sejtekben a FoxP3 expresszió, ami a perifériás Treg sejtek nagyobb plaszticitását jelzi.

A GR és FoxP3 fehérjék lokalizációjának vizsgálata Treg sejtekben

Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy a tTreg sejtek rezisztensek a GC kezelésre, vagyis nem indul el bennük a mitokondriális apoptózis útvonal, ugyanakkor fokozódik a sejtek szuppresszor hatása, amelyet a citokin termelésük fokozódása és a lépben a FoxP3 expresszió növekedése is jelez. Ez alapján feltételezzük, hogy a Treg sejtekben a GC elsősorban a genomikus jelátviteli útvonalon fejt ki hatását.

Ennek bizonyítására megvizsgáltuk a Treg sejtekben a GR és FoxP3 celluláris lokalizációját konfokális mikroszkóppal. A CD4/CD25/FoxP3+ sejtekben vizsgáltuk a GR és FoxP3 jelölődés mintázatát és a két molekula közelségét, amit a két fluoreszcens jel átfedő pixeljeinek (sárga) a mérésével követtünk. Azt láttuk, hogy a kezeletlen mintákban a tímusz és lép Treg sejtekben is a GR és FoxP3 nagyon hasonló foltos, sejtmagi lokalizációjú jelölődést mutat. Az *in vitro* GC kezelés (+DX) hatására mindkét molekula magbéli csomós elhelyezkedése megváltozott és koszorú alakot öltött. Már a kezeletlen Treg sejtekben is magas arányú, 50% körüli GR - FoxP3 kolokalizációt figyeltünk meg a lép és tímusz mintákban egyaránt. *In vivo* GC kezelés nem okozott változást a GR és FoxP3 kolokalizációban, de 30 perces *in vitro* DX kezelés fokozta a GR - FoxP3 kolokalizációt a tímuszban és lépben egyaránt. Ez alapján úgy tűnik, hogy a FoxP3+ sejtekben a GR ligand nélkül is nagyrészt a sejtmagban lokalizálódik (GR β ?), amely hasonló eloszlást mutat, mint a FoxP3 fehérjéé. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a ligand-kötött GR és a FoxP3 két transzkripciós faktorként egymás közelségében helyezkednek el a sejtmagban és feltételezhetően szinergista hatásúak. Ennek bizonyítására további kísérleteket tervezünk.

Az *in vitro* Treg expansió mikrokörnyezetének optimalizálása

Először lépből és tímuszból izolált CD4+ T-sejtek *in vitro* aktivációs körülményeit optimalizáltuk. A kezeletlen vagy 4 napig DX-al előkezelt állatok lépből és tímuszból CD4+ T-sejtet izoláltunk negatív szelekcióval EasySep mágneses kit segítségével. A sejtek tisztaságát CD4 jelöléssel ellenőriztük és 98%-nál magasabb tisztaságú mintából indultunk ki. Mintánként 5×10^5 sejtet stimuláltunk *in vitro* 1ml RPMI-FCS médiumban 2-4 napig anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (bead) (2:1, gyöngy:sejtarányban) segítségével, rekombináns IL-2 \pm TGF β \pm 10^{-6} mol/l DX jelenlétében. Különböző időpontokban vizsgáltuk a sejtek életképességét és a CD4/CD25/FoxP3+ Treg sejtek %-os megoszlását valamint azok citokin termelését.

Az *in vitro* stimulációs körülményeket összehasonlítva a CD3/CD28 bead és IL-2 jelenlétében 3 napos tenyésztés után a tímusz CD4+ sejteinek 8%-a tTreg, a lépből 24% iTreg differenciálódott. Mindkét szervből nagyobb arányban differenciálódtak Treg sejtek, ha TGF β is jelen volt (20% tTreg 45% iTreg). Ugyanakkor az *in vitro* DX jelenléte a tápfolyadékban csak a lépből differenciálódó iTreg arányt növelte (55% iTreg), a tímusz CD4+ sejtekből a tTreg differenciálódásra hatástalan volt. Megvizsgáltuk azt is, hogy az *in vivo* DX előkezelt lépből és tímuszból milyen hatékonysággal lehet *in vitro* Treg sejtet differenciáltatni. A tTreg differenciálódás az *in vivo* DX-al előkezelt tímuszból hatékonyabb volt (38% tTreg), mint az kezeletlen tímuszközből, de itt is a TGF β jelenléte szükséges volt. Ennek egyik magyarázata, hogy a 4 napos DX oltás eleve emelte a CD4+ sejteken belüli Treg sejt arányt a tímuszban (3%-ról 8%-ra), így a kiindulási Treg arány magasabb volt. Ezzel szemben a 4 napos DX előkezelés a lépben a CD4+ T-sejtek és Treg sejtek számát is csökkentti, ezért hatékonyabb a kezeletlen lépből az *in vitro* Treg differenciálódás.

Ezek alapján a Treg expansió a perifériás nyirokszervből izolált CD4+ sejtekből hatékonyabbnak bizonyult, ami az iTreg expansió nagyobb plaszticitását bizonyítja. A 4 napos DX kezelés olyan nagymérvű tímusz involúciót okoz, hogy nehézségeket okozott több állat tímuszból kinyerni a szükséges mennyiségű CD4+ T-sejtet. Ezért a továbbiakban 4 napos *in vivo* DX előkezelés után csak a lépét vizsgáltuk.

***In vitro* differenciáltatott Treg sejtek citokin termelése**

A Treg sejtek szuppresszor funkcióját az általuk termelt IL-10 és TGF β citokinek biztosítják. Ezért megvizsgáltuk a tenyésztett sejtek citokin termelését a 3. napon. Mind a tímusz, mind a lép eredetű Treg sejtek legnagyobb arányban a CD3/C28 microbead, IL-2 és TGF β jelenlétében termeltek szuppresszor hatású citokint. A tímusz eredetű TGF β termelő Treg-ek megoszlása tovább emelkedett *in vitro* DX hozzáadása esetén.

Megvizsgáltuk a lép eredetű perifériás CD4+ T-sejtekből differenciáltatott iTreg-sejtek citokin mintázatát is, az IL-10, TGF β mellett az IL-4, IFN γ és IL-17 termelő sejtek megoszlását detektálva. Azt tapasztaltuk, hogy 4 nap Treg expansió hatására tovább fokozódik az IL-10 (18%) és TGF β (36%) termelő Treg sejtek aránya, a többi citokin 0-1%-ban mutatható ki a sejtekben.

Érdekes megfigyelésünk, hogy a 4 napos DX előkezelt lépből differenciáltatott Treg sejtek 27%-a IL-10-et, 41%-a TGF β -t termel, de a sejtek 2,7%-ban kimutatható IFN γ és 8%-ban IL-

4 is. Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy a lép CD4+ T-sejtjeiből nagyobb mennyiségben differenciálható szuppresszor funkciójú CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg sejt. *In vivo* 4 napig DX előkezelt lépből differenciáltott Treg sejtekben az *in vitro* DX hatás nemcsak a szuppresszor hatású citokinek szekrécióját emelte, de megfigyelhetővé vált IL-4 és IFN γ citokin termelés is, ami további vizsgálatokat igényel. Ezek alapján a kezeletlen lépből kiindulva az általunk optimalizált *in vitro* mikrokörnyezetben egyértelműen szuppresszor hatású citokinek termelő iTreg sejtek differenciálhatóak.

ÖSSZEFOGLALÁS, MEGBESZÉLÉS

Ugyan a fiziológiás GC hormontermelés és a stresszhelyzetben megemelkedett GC hormonszint valamint a terápiás GC adagolás is számos szerv és sejttípus működését befolyásolja célunk a specifikus immunválaszt szabályozó T limfociták jelátviteli útvonalaiiban bekövetkezett változások vizsgálata volt.

Ehhez eszközként szolgált az intézetünkben a világon elsőként előállított GR specifikus monoklonális ellenanyag család (anti-GR), amelyek alkalmasak áramlási citometriás módszerrel a GR expresszió fehérje szintű vizsgálatára, valamint mikroszkópos és Western blot eljárással is a receptor sejtszintű lokalizációjának nyomon követésére. (Berki T., 1998). Klinikai vizsgálatokkal párhuzamosan, ahol a hosszantartó GC kezelés genomikus hatásaira kaptunk információt a perifériás vérben található limfocita alcsoportokban, továbbra is kérdésként merült fel a GC kezelés T-sejt jelátvitelre gyakorolt hatása. Kíváncsiak voltunk, hogy a tímuszban zajló elsődleges T-sejt differenciálódás kezdeti lépéseitől a perifériás effektor sejté érést tartó folyamatban hogy változik a sejtek GC érzékenysége, milyen jelátviteli útvonalak indulnak el a GC hatásra önmagában és a TcR stimulációval egyidőben. Ezen folyamatok vizsgálata humán primer sejteken nagyon nehéz, ezért modell állatokat és *in vitro* tenyésztett folyamatos T limfocita eredetű sejtvonalatokat használtunk.

Elsőként a GC hormon primer T-sejt differenciálódásában játszott szerepét vizsgáltuk a tímuszban a 4 timocita alcsoport összetételének és abszolút sejtszámának mérésével. Ismert, hogy hosszantartó stressz, vagy GC adagolás a tímusz atrófiáját eredményezi. Eredményeink szerint a hosszantartó GC kezelés a kettős pozitív (DP) timociták dózis-függő deplécióját okozza (Berki et al. 2002) mind Balb/c mind az AND TcR transzgenikus egértörzsben vizsgálva (Pálinkás et al. 2008). A többi timocita alcsoport GC érzékenységében a következő sorrendet állíthatjuk föl: DP > DN > CD4 SP > CD8 SP. Vagyis több napos GC kezelés után a DP timociták pusztulása miatt a SP sejtek dominanciája áll elő és tímuszra jellemző SP sejt arány CD4:CD8=3:1 megfordul és a CD8+ sejtek kerülnek többségbe (CD4: 43% : CD8: 48% = 1:1), ami az jelzi, hogy a CD8+ citotoxikus T-sejtek a legrezisztensebbek a GC indukált apoptózisra. Humán vizsgálati adataink szerint is a perifériás vérben található CD8+ T-sejtek és B limfocitákban jelentkezik a legerőteljesebb GC indukálta homológ GR downreguláció, ami a sejtek GC rezisztenciájával mutat összefüggést (Berki et al. 2002).

Kísérleteinkkel bizonyítani tudtuk, hogy a TcR stimuláció (anti-CD3 kezeléssel vagy PCC antigén adagolással) és egyidejű GC kezelés mind *in vivo*, mint *in vitro* szövetkultúrában a DP sejtek túlélését eredményezi, vagyis a két jelátviteli útvonal összekapcsolódik a DP sejtekben. Ezt jelzi a túlélő DP és CD4 SP sejtek fokozott CD69 expressziója valamint a DP

sejtek emelkedett Bcl-2 expressziója és megtartott mitokondriális funkciója is (Boldizsár et al. 2006). Eredményeink szerint a DP sejtek pozitív szelekciója során szükség van a TcR jel mellett a lokális GC hormon jelenlétére, vagyis a DP timocita akkor tud a tímuszban tovább differenciálódni, ha mind a TcR mind a GC indukálta jelátviteli útvonal aktiválódik.

Megvizsgáltuk a különböző timocita alcsoportokban a GR expressziót és meglepetésünkre, a GC-ra legérzékenyebb DP sejtekben a legalacsonyabb a GR expresszió mind fehérje, mind mRNS szinten (Berki et al. 2002.). Áramlási citometriával, 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 GR eltérő működését jelzi a DP timocitákban az a megfigyelésünk is, hogy GC kezelés ezekben a sejtekben nem okoz GR downregulációt szemben az összes többi, GC-ra kevésbé érzékeny DN és SP sejtcsoporttal, ahol a GR downregulációja figyelhető (Boldizsár et al. 2006). Ugyanakkor a GC ligand indukált GR funkciót, vagyis az apoptózist nem tudtuk felfüggeszteni a GR magi transzlokációját blokkoló kezelésekkel (RU48044, RU 486). Ez azt jelenti, hogy a timocita apoptózis nem a klasszikus genomikus GR jelátviteli útvonalon, hanem valamelyik nem-genomikus mechanizmussal történik. A DP timocitákban a mitokondriális funkció romlása és a Bcl-2 upreguláció számunkra azt jelezte, hogy a sejtekben a mitokondriális apoptózis útvonal aktiválódott GC kezelés hatására (Pálinkás L., 2008).

Eredményeink szerint a DP-timocitákban rövid idejű, nagydózisú *in vitro* GC kezelés hatására a GR főleg a mitokondriumba transzlokálódik (Talabér G. 2009). A GR pontosabb elhelyezkedését vizsgálva, már kezeltlen DP-sejtekben is megfigyelhető volt alacsony szintű GR-mitokondrium kolokalizáció, melyet már a DP-sejtek granuláris GR-festődési mintázata is felvetett. Ezek alapján a GR akár ligand-independens módon is jelen lehet a mitokondriumban. Mivel a DP sejtek a tímuszban GC-gazdag mikrokörnyezetben helyezkednek el, ez szintén hozzájárulhat a GR downregulációjához és a mitokondriális lokalizációhoz.

GC ligandkötést követően 30 perc alatt a GR transzlokálódott a mitokondriumba DP-sejtekben és ennek következményeként nem-genomikus úton lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált. Feltételeztük, hogy a Bcl-2 fehérjecsald tagjaival való kapcsolódáson keresztül okoz apoptózist timocitákban a mitokondriális GR is. Azt találtuk, hogy timociták mitokondriumban és citoplazmájában a GR közvetlen fizikai kapcsolatban van a Bak, Bim és Bcl-xL fehérjékkel. GC kezelés hatására a mitokondriális GR - Bcl-xL asszociáció csökkent, a GR - Bim interakció fokozódott, amelyet a Bax mitokondriális akkumulációja kísért. A GR és Bax között nem tudunk direkt fizikai kapcsolódást kimutatni (Prenek L., 2016.). Azt azonban sikerült kimutatnunk, hogy DP timocitákban a ligand-kötött GR a mitokondriális membrán-potenciál csökkenését majd citokróm C felszabadulást és kaszpáz 9 aktivációt, majd kaszpáz 3 aktivációt okoz. Arra nézve kevés információnk van, hogy mi lehet az oka, hogy a DX kezelt mintákban emelkedik a kaszpáz 8 aktív forma is, ami az intrinsic és extrinsic apoptózis útvonal aktiváció közti átkapcsolást jelezheti.

Munkánk első részének eredményeit összefoglalva, adataink új információt nyújtanak az éretlen DP-timociták fokozott GC-érzékenységről, melynek háttérében az egyik tényező a GR mitokondriális transzlokációja, amely egy új alternatív GR-jelátviteli útként különösen fontos a GC-indukálta apoptózis mechanizmusának részletesebb megismerése és így a DP timociták szelekciós folyamatainak megértése terén.

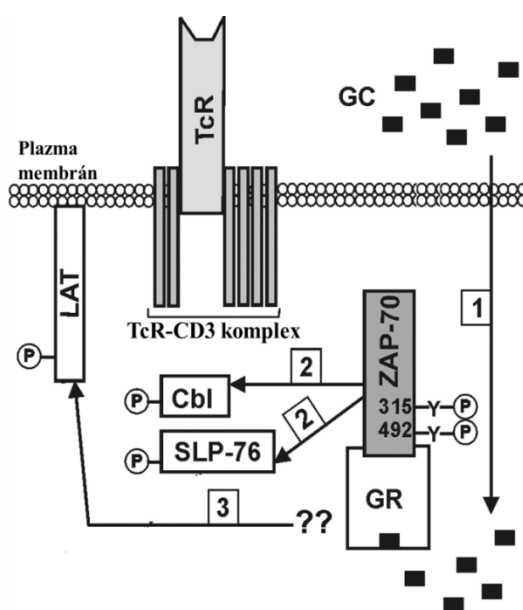
Munkánk további szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy a timociták túlélését jelentő TcR és GR jelátviteli útvonalak milyen pontokon találkoznak. A tímuszban elhelyezkedő sejtek különböző érési stádiumban vannak, így azokon nehéz a jelátviteli útvonalak molekuláris szintű vizsgálata. Ezért a továbbiakban Jurkat T-sejteket használtunk, amely elfogadott *in vitro* modellje a T-sejt aktiváció vizsgálatának. További segítséget jelentett, hogy több olyan Jurkat sejt mutáns T-sejt vonal is rendelkezésre áll, amelyekben valamelyik molekula hiányzik, például az Lck deficiens JCaM1A vagy a ZAP-70 deficiens P116. Az általunk vizsgált GC hatások 10 μ M DX kezelés perceként belüli eseményeit rögzítik, melyek kétséget kizáróan nem-genomikus mechanizmust jelentenek. Azt találtuk, hogy DX kezelés önmagában perceként belül foszforilációs eseményeket indít el Jurkat sejtekben, míg a DX előkezelés felüggesztette számos fehérje anti-CD3 kezelés hatására bekövetkező foszforilációját.

A ZAP-70 kináz központi szerepet játszik a TcR-CD3 komplexből elinduló jelátviteli folyamatban, ahol a ZAP-70 molekula autofoszforilációja és src-kinázok általi foszforilációja után további adapter fehérjéket foszforilál pl. a LAT, SLP-76, Cbl. Megvizsgáltuk, hogy a DX kezelés hogy befolyásolja a ZAP-70 foszforilációját és azt találtuk, hogy önmagában is növeli a foszfortirozin tartalmat hasonlóképpen, mint az anti-CD3 kezelés önmagában. Ugyanakkor a kombinált DX + anti-CD3 antitest hatására tovább emelkedik a ZAP-70 tirozin foszforiláció, ami arra utal, hogy a kétféle kezelésre más tirozin maradékok foszforilálódnak. A humán ZAP-70 619 aminosavból áll és 30 tirozint tartalmaz, amelyből eddig 11-et azonosítottak, mint foszforilációs helyet. Ezek közül bizonyos tirozinok foszforilációja aktiváló, míg mások gátló hatással vannak a molekula kináz aktivitására

A ZAP-70 tirozinjainak szerepét a továbbiakban Boldizsár és mtsai. által intézetünkben előállított Y-F pontmutáns ZAP-70 variánsokat stabilan expresszáló sejtvonalakon vizsgáltuk. A sejtvonalak jellemzése után vizsgáltuk az egyes tirozin maradékok szerepét a nagy dóziséű GC-ok direkt ZAP-70 foszforilációt előidéző hatásában és a T-sejt jelátviteli útvonalat módosító hatásában (Szabó M., 2012). Elemeztük, hogy a ZAP-70 kináz mely tirozin maradékai vesznek részt a nem-genomikus GC hatások kialakításában, valamint azt, hogy a kialakult jelet mely downstream célmolekulák közvetíthetik. Rövid idejű, nagy dóziséű DX kezelés csökkent ZAP-70 foszforilációhoz vezetett az F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ami azt mutatja, hogy a ZAP-70 ezen 2 tirozin maradéka vehet részt a nem-genomikus GC jelátvitelben. Érdeemes megjegyezni, hogy ezen két tirozin ellentétes szerepet tölt be a T-sejt aktivációban, az Y315 aktivációs, míg a Y492 gátló funkciójú tirozin. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy finom különbségek figyelhetők meg a ZAP-70 foszforilációs mintázatában a nem-genomikus GC és a TcR/CD3 jelátvitel során. Korábbi kísérleteink során GC indukálta ZAP-70-GR asszociációt figyeltünk meg, így a fenti foszforiláció csökkenés magyarázatául szolgált volna, ha a Y-F aminosavcsere hatására a ZAP-70-GR asszociáció is megváltozik (Bartis D., 2007). Nem találtunk azonban különbséget a pontmutáns sejtek ZAP-70-GR asszociációjában, ami további alternatív mechanizmusokra pl.: a ZAP-70 kináz aktivitá-

sának lehetséges csökkenésére, vagy a T-sejt jelátviteli kaszkád során a ZAP-70-től proximálisan elhelyezkedő molekulák (pl.: Lck) szerepére hívja fel a figyelmet.

Vizsgáltuk továbbá a ZAP-70 kináz közvetlen szubsztrátjainak szerepét a nem-genomikus GC jelátvitelben. A LAT és az SLP-76 adaptereken kívül különös figyelmet fordítottunk a Cbl molekulára, mivel negatív regulátorként fontos szerepet játszhat az immunszuppresszív folyamatok szabályozásában. Mindhárom molekula foszforilációja emelkedett rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés hatására, tehát valamennyien szerepet játszhatnak a nem-genomikus GC hatások közvetítésében. Megvizsgáltuk azt is, hogy a F315 és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a mutáció hogyan befolyásolja a LAT, SLP-76 és Cbl foszforiláció növekedését. A Cbl és SLP-76 esetében a mutációk meggátolták a DX indukálta foszforiláció növekedést, míg a LAT foszforilációját nem befolyásolták. Ez arra utal, hogy a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik



Nem-genomikus GC hatások feltételezett mechanizmusai a TcR jelátvitel általunk vizsgált molekuláira.

(Szabó M., 2012)

Megvizsgálva a ZAP-70 foszforiláció idő-kinetikáját azt találtuk, hogy az általunk alkalmazott nagydózisú DX gyors, tranziens ZAP-70 foszforiláció emelkedést okozott, ami 5 perc után már csökken. Az azonnali foszforilációs jelenségek membrán-közeli molekulák részvételére utalnak. Az a megfigyelésünk, hogy a DX indukált ZAP-70 foszforiláció hiányzik a p56-lck deficiens JCaM1.6 sejtekben egyértelműen alátámasztja a p56-lck szerepét a folyamatban. Ezzel ellentétben a ZAP-70 foszforiláció zavartalan a CD3 keresztötés után JCaM1.6 sejtekben. Ez az anti-CD3 aktivációkor belépő más src-kinázok, így a p59-lck kompenzatórikus hatásának tudható be és megerősíti azt a feltételezésünket, hogy az anti-CD3 és DX kezelés hatására a ZAP-70-en más tirozin molekulák foszforilációja történik.

A foszforiláció változások mellett az intracelluláris Ca^{2+} -jel is a T-sejt aktiváció kulcseseményei közé tartozik. Az anti-CD3 indukálta Ca^{2+} -jel részben gátolható rövid idejű, nagy dózi-

sú DX előkezeléssel, hasonlóan az SLP-76 foszforilációjához. Ez az adat összhangban lehet azzal a megfigyelésünkkel, miszerint a Ca^{2+} -jel kialakulását Jurkat sejtekben inkább az SLP-76 szabályozza. A DX kezelés más módon is befolyásolhatja a Ca^{2+} -jelet, például a membránok ioncsatornáira kifejtett hatáson keresztül. Az intracelluláris Ca^{2+} -jel csökkenésének a kalcineurin-NFAT tengely gátlása lehet a következménye.

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

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a TcR/CD3 jelátvitelt a T-sejt aktiváció molekuláinak finom összehangolt működése szabályozza. Az aktiváció kezdeti folyamatainak szabályozásában a ZAP-70 tirozin maradékai kiemelkedő szerepet játszanak, valamint a kináz szubsztrátjai kulcsfontosságúak a nem-genomikus GC hatások kialakításában is. A GC vagy kombinált (anti-CD3+DX) hatások a proximális jelátviteli molekulák finom kölcsönhatásának, komplex szabályozásának köszönhetően, részben eltérő módon továbbítódnak.

Gyulladásos betegségek, autoimmun és transzplantált betegek kezelésének egyik legfontosabb eszközei a GC analógok, mégis keveset tudunk a Treg sejtekre kifejtett hatásairól. Munkánk során a GC kezelés centrális és perifériás nyirokszervekben előforduló tTreg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$) és iTreg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$) sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. Nagy dózisu DX kezelés hatására a tímusz és a lép szerkezete is megváltozott, a tTreg sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, a kezelés hosszával párhuzamosan pedig tovább nőtt, miközben a timociták száma drámaian csökkent – ami a DP, GC érzékeny timociták pusztulásával magyarázható. Eközben a Treg abszolút sejtszám nem változott, így a tapasztalt arány növekedése kizárólag azok túléléséből adódik. Ez arra enged következtetni, hogy a tímuszban többségben jelenlevő tTreg sejtek rezisztensek a GC indukálta apoptotikus hatásra.

A perifériás nyirokszervekben sokkal magasabb a Treg-ek aránya, de 45-60%-uk iTreg. Ismételt DX kezelés hatására a lépben és a mLN-ben kismérvű Treg sejtarány csökkenés volt megfigyelhető miközben az össz-sejtszámok is csökkentek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a periférián előforduló iTreg-ek és tTreg-ek másképp reagálnak GC expozícióra. Eredményeink inkább azt a megállapítást támasztják alá, hogy a periférián a Helios transzkripciós faktos megjelenése T-sejt aktivációs marker, és bár kétségtelen, hogy a tímuszban magasabb a Helios pozitivitás a Treg-eken belül, expressziója mégsem kizárólag a tTreg-re jellemző.

Egy adott sejt GC érzékenysége függ annak GR expressziós szintje mellett a sejtet érő egyéb jelátviteli útvonalak párbeszédétől is. A tímuszban a DP timociták reagálnak legérzékenyebben a GC indukálta apoptózisra, bennük találtuk a legalacsonyabb GR expressziót, amely GC kezelés hatására nem változik. Az érett SP T-sejtekben és a perifériás limfocitákban magasabb a GR fehérje szint, de rezisztensebbek GC analóg adására és bennük a GR szignifikáns down-regulációját figyelhetjük meg (Boldizsár F., 2007). Kísérleteinkben a kezeletlen állatok tímuszában található tTreg sejtek GR expressziója alacsonyabb, mint a lépben, ami a lokális mikrokörnyezeti hatások (lokális GC termelés) következménye lehet. GC kezelés hatására a GR expresszió a tímuszban található tTreg sejtekben kissé növekszik, míg a lépben

down-reguláció figyelhető meg. Ez összefügghet a tímuszban és perifériás szervekben található Treg sejtek eltérő GC érzékenységgel.

A Treg sejtek stabilitását a FoxP3 transzkripciós faktor jelenléte jelzi, amely epigenetikai szabályozás alatt áll, amit tTreg sejtekben a FOXP3 gén enhancer régiójának metilációja jelez (Morkawa H., 2014). Kísérleteink szerint egér centrális (tímusz) és perifériás (lép) Treg sejtjeiben 2 napos nagy dózisú *in vivo* DX kezelés hatására a FoxP3 mRNS expresszió a tTreg sejtekben nem változik, míg a lépben található Treg sejtekben emelkedik. Ez azt sugallja, hogy a tTreg sejtekben a FoxP3 expresszió stabil, míg a perifériás nyirokszervekben a CD4⁺CD25^{high+} sejtekben GC hatásra indukálható. További FoxP3 mRNS génexpresszió emelkedést okoz 4 órás *in vitro* PMA/ionomycin stimuláció is mind a tímusz, mind a lép eredetű Treg sejtekben, de ezt nem befolyásolja az előzetes *in vivo* GC hatás. Vagyis a Treg sejtekben *in vitro* aktiváció hatására emelkedik a FoxP3 mRNS expresszió.

Megvizsgáltuk a FoxP3 lokalizációját a Treg sejtekben és annak viszonyát a ligand-aktivált GR-hez, ami szintén transzkripciós faktorként viselkedik a klasszikus genomikus hatás során. Mindkét molekula klasszikus nukleáris mintázatot ad konfokális mikroszkópos felvételeken. Érdekes megfigyelésünk, hogy ligand nélkül is a GR a Treg sejtekben nagyrészt a sejtmagban lokalizálódik igen szoros asszociációt mutatva a FoxP3-al. Ez felveti a magi lokalizációjú, inaktív GR β szerepét és asszociációját a FoxP3-al GC mentes közegben a Treg sejtekben. A GR-FoxP3 asszociáció még tovább fokozódik rövid idejű *in vitro* GC hormon kezelést követően, ami a ligand-kötött GR magi transzlokációját támasztja alá. A konfokális mikroszkópban látott szoros ko-lokalizáció nem ad információt a két molekula fizikai kapcsolatára, ezért ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Miután a Treg sejtek és a GC hormon immunszuppresszív hatását egyaránt a citokin termelés és a sejtaktiváció befolyásolásán keresztül fejtik ki, felmerült a kettő szinergizmusának vizsgálata. A Treg sejtek egyrészt szekretált citokinjei révén, másrészt direkt sejt-sejt kapcsolódás útján fejtik ki az immunválaszt gátló hatásaikat. Vizsgálataink alátámasztják, hogy 2-4 napos GC kezelés mind a tímuszban, mind a lépben növeli az IL-10 és TGF β szekretáló Treg sejtek arányát. Ezt fehérje szinten mindkét citokin esetében egyértelműen ki tudtuk mutatni, míg szeparált CD4⁺CD25^{high+} sejtekben qRT-PCR-al a tímuszban erőteljes IL-10, enyhe fokú TGF β , míg a lépben csak TGF β emelkedés jellemző. A lépben az IL-10 mRNS inkább csökkenést mutatott a GC kezelt mintákban, ami felveti az IL-10 szerepét egér FoxP3⁺ perifériás Treg sejtekben. Az utóbbi időben leírták az IL-35 citokint is, mint a Treg sejtek immunszuppresszív hatású termékét. Vizsgálataink alapján a két polipeptid láncból felépülő citokin inkább csökkent termelődést mutatott a GC kezelés hatására. Miután a molekula egyik lánc az IL-12 α , egy gyulladásos citokin komponense is, így nem meglepő, hogy GC anti-inflammatórikus hatására ezen molekula inkább csökkent expressziót mutat.

A perifériás nyirokszervekben a naív CD4⁺ T-sejtek elköteleződése iTreg irányba függ az antigén koncentrációjától, a citokin környezettől, különösen a magas IL-2 és TGF β koncentráció és szuboptimális dendritikus sejt aktiváció és a kostimuláció hiánya kedvez kialakulásuknak. A sajáttal szembeni immunológiai tolerancia és az immunválasz egyensúlyának helyreállítása az autoimmun betegségek kezelésnek a stratégiája. Ennek egyik lehetősége a Treg transzfer, amely citokinjei révén alkalmas lehet az immunológiai egyensúly helyreállítására. Ehhez összehasonlítottuk tímusz és lép eredetű CD4⁺ T-sejtek *in vitro* expanziójával

nyert Treg-ek funkcionális aktivitását. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét szervből mágneses negatív szelekcióval szeparált CD4+ T-sejtek anti-CD3/CD28 stimuláció valamint IL-2 és TGF β jelenlétében szaporodtak a leginkább. A DX jelenléte a tápfolyadékban csak a lépéből differenciálódó Treg sejtek arányát emelte, valamint azok TGF β szekrécióját. 4 napos *in vivo* DX előkezelés a tímusz eredetű tTreg sejtek *in vitro* expanszióját és differenciálódását segítette, de ez azzal is magyarázható, hogy a 4 napos DX kezelés hatására a tímusz CD4+ sejtjeinek sokkal nagyobb hányada Treg sejt, mint a kezeletlen tímuszban. Ez a sejt *in vivo* GC rezisztenciájával magyarázható, ugyanakkor újabb bizonyíték a GC jelenlétének fontosságára a Treg elköteleződésben. A sejtek citokin termelését megvizsgálva is azt láttuk, hogy az *in vitro* DX jelenléte a lépben fokozza mind az IL-10+ mind a TGF β + Treg sejtek arányát. Ebben a mikrokozmoszban a sejtek sem Th1 sem Th2 sem Th17 irányú elköteleződést nem mutatnak. Az *in vivo* GC előkezelt CD4+ lépsejtekből differenciáltatott Treg sejtekben a legmagasabb a szuppresszor hatású IL-10 és TGF β termelő sejtek aránya, de megjelentek alacsony %-ban Th1 és Th2 citokin termelő FoxP3+ sejtek. Ez feltételezésünk szerint az *in vivo* már elkötelezett CD4+ T-sejtekből kialakuló az *in vitro* aktiváló mikrokozmoszban megvalósuló Treg irányú elköteleződés eredménye. Miután ez a jelenség a kezeletlen lépéből nem volt kimutatható, *in vivo* Treg transzfert ezekkel a Treg sejtekkel tervezünk proteoglycan indukált reumatoid arthritises egér modellen.

ÚJ EREDMÉNYEK

1. Leírtuk, BALB/C és AND-TCR transzgenikus egértörzs timocita alcsoportjainak összetételét és azok eltérő GC érzékenységét.
2. Azt találtuk, hogy a timocita alcsoportokban a GR expresszió nem egyforma: a glukokortikoid hormonra legérzékenyebb DP populációban a legalacsonyabb a GR expresszió.
3. GR antagonisták segítségével leírtuk, hogy a DP timocita apoptózis korai fázisának kiváltásához nem szükséges a GR nukleáris transzlokációja, míg későbbi apoptózis stádiumban már igen.
4. Morfológiailag jellemeztük a GR eloszlását a timocita populációkban és kimutattuk, hogy a DP timocitákban a GR ligandkötés hatására a mitokondriumba nem pedig a sejtmagba transzlokálódik.
5. Kimutattuk a GR asszociációját és direkt kapcsolódását a Bcl-2 család tagjaival, úgy mint a Bim, Bcl_{-XL} és Bax molekulákkal és ennek szerepét a GC indukált mitokondriális apoptózis útvonal aktivációjában DP timociták.
6. Eredményeink szerint a GR és TcR stimuláció együtt magasabb arányú DP timocita túlélést okoz, ami a korai apoptotikus folyamatok gátlásának köszönhető és a két jelátviteli út összekapcsolódását és a kölcsönös antagonizmus modellt támasztja alá a timocita szelekció során.

7. Leírtuk a GR-ZAP-70 asszociációt T-sejtekben rövid idejű nagy dózisú GC kezelés hatására, valamint bizonyítottuk, hogy eközben gátlódik a ZAP-70 CD3 kapcsolódás.
8. Bizonyítottuk, hogy a ZAP-70 Y315 és Y492 vesznek részt a nem-genomikus GC hatások közvetítésében, amelyet az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítenek, nem a LAT.
9. Bizonyítottuk a tTreg sejtek GC rezisztenciáját és GC hatásra fokozódó IL-10 és TGF β citokin termelését.
10. Leírtuk, hogy a perifériás Treg sejtek érzékenyek a GC indukálta apoptózisra, de a túlélő sejtekben indukálható a FoxP3 expresszió és citokin termelés, ami a sejtek nagyobb plaszticitását jelzi.
11. Megfigyeltük a GR és FoxP3 nagyfokú kolokalizációját a tímusz és lép Treg sejtek magjában, ami a ligandkötés után tovább fokozódik. Ez a két transzkripciós faktor funkcionális hasonlóságára hívja fel a figyelmet Treg sejtekben.

A DOLGOZAT ALAPJÁT ADÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P.: Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunological Methods*. 1998; 214: 19-27. IF: 1,855
2. Berki T, Pálincás 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
3. Boldizsár F, Pálincás L, Bartis D, Nemeth P, Berki T.: Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunology Letters*. 2003; 90: 97-102. IF: 2,114
4. Boldizsár F, Pálincás 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
5. Bartis D, Boldizsár F, Szabo M, Pálincás L, Nemeth P, Berki T.: Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2006; 98: 147-154. IF: 2,825
6. Bartis D, Boldizsár F, Kvell K, Szabo M, Pálincás L, Nemeth P, Monostori E, Berki T.: Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 354: 253-258. IF: 2,749
7. Pálincás 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

8. Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálincás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int. Immunol.* 2009; 21: 1269-1276. IF: 3,403
9. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 2010;215: 521-526. IF: 3,586
10. Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal TcR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells. *Int Immunol.* 2012;24(2):79-87. IF: 3,403
11. Boldizsar F, Szabo M, Kvell K, Czompoly T, Talaber G, Bjorkan J, Bartis D, Nemeth P, Berki T: ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in Jurkat cells. *Mol Immunol.* 2013;53(1-2):111-7. IF: 3,375
12. Prenek L, Ugor E, Papp R, Boldizsár F, Berki T. A glukokortikoid hormon nem-genomikus hatásai T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára. *Immunológiai Szemle* 2014. VI(3): 4-8.
13. Ugor E, Simon D, Pap R, Kraljik N, Németh P, Boldizsár F, Berki T., Regulatórikus T-sejtek glukokortikoid hormon érzékenységeinek vizsgálata. *Immunológiai Szemle* 2014. VI(3): 8-12.
14. Prenek L, Boldizsár F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, NémethP, Berki T. The regulation of mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. *Apoptosis* 2016. (közlésre elfogadva). IF: 3,592

A TÉMÁBAN MEGJELENT TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

15. Berki T, Tavakoli A, Kalmar Nagy K, Nagy G, Nemeth P.: Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients. *Transplant International* 15: 132-138, 2002. IF: 2,520
16. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatic S, Berki T, Dekaris D.: Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD). *Clin. Exp. Immunol.* 131: 335-339, 2003. IF: 2,347
17. Hajto T, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nagy G, Nemeth P.: Galactoside-specific mistletoe lectin modulate the dexamethasone-induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes. *In vivo* 17: 163-167, 2003. IF: 0,753
18. Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L.: Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14(+)CD16(+) monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 74: 33-39, 2003. IF: 4,180

19. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuhmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 18: 70-80, 2004. IF: 6,820
20. Spies CM, Schaumann DH, Berki T, Mayer K, Jakstadt M, Huscher D, Wunder C, Burmester GR, Radbruch A, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are down-regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1 independent expression pathway. *Ann. Rheum. Dis.* 65: 1139-1146, 2006. IF: 5,767
21. Tryc AB, Spies CM, Schneider U, Kunkel D, Berki T, Sieper J, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgerit F.: Membrane Glucocorticoid Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis. *J. Rheumatol.* 33: 2249-2253, 2006. IF: 2,940
22. Hajto T, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P.: Effects of mistletoe extract on murine thymocytes *in vivo* and on glucocorticoid-induced cell count reduction. *Forsch. Komplementarmed. (Klas. Naturheilk.)* 13: 22-27, 2006. IF: 1,417
23. Spies CM, Bartholome B, Berki T, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgerit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) on monocytes are up-regulated after vaccination. *Rheumatology (Oxford)* 46: 364-365, 2007. IF: 4,045
24. Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G, Berki T, Pongracz JE.: Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells Against Dexamethasone-Induced Senescence. *Rejuvenation Res.* 14(3): 241-48, 2011 IF: 4,138

A témában megjelent közlemények összesített impakt faktora: 70,177

TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Tudományos folyóiratcikkek száma: 82

Összesített impakt faktor: 175,7

Utolsó 10 év teljes lektorált közleményeinek száma: 47

Impakt faktora: 120,2

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 41,8

Összes hivatkozások száma: 1374

Független hivatkozások száma: 1056

Hirsch index: 21

Támogatás: A munka az OTKA K105962 és a CABCOS II. HUHR/1001/2.1.3/0007 pályázat támogatásával készült

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönöm minden támogatását és biztatását férjemnek és munkatársamnak dr. Németh Péternek, aki megszerettette és megtanította játszva élvezni az immunológiai kutatást és oktatást. Köszönöm, hogy hagyott önállóan új utakon járni, és biztosította az anyagi hátteret az egyre növekvő immunológia munkacsoportunk és a létrehozott infrastruktúra számára. Nagy kihívás számomra most ezt működtetni.

Köszönöm munkatársaimnak Melczer Attiláné, Jucinak és Pápa Lászlóné Marikának az alapvető laboratóriumi módszertanok megtanítását, a kitartásukat és lelkesedésüket. Köszönöm minden régi és új munkatársamnak a segítségét, támogatását! Köszönöm tanítványaimnak, elsősorban dr. Boldizsár Ferencnek hogy kitartottak mellettem és az intézet mellett!

Köszönöm családomnak, szüleimnek és főleg gyermekeimnek, hogy sokszor elnézték, amikor nem velük foglalkoztam!