

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

PhD Tézisek

Dr. Boldizsár Ferenc

PTE - ÁOK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Alprogramvezető: Dr. Németh Péter

Témavezető: Dr. Berki Timea

P é c s

2004

BEVEZETÉS

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

1. A T-sejt differenciálódás lépései

A T-lymphocytá előalakok a közös lymphoid őssejtől differenciálódnak a csontvelőben, ahonnan a thymusba vándorolnak. A T sejt progenitoroknak a nem hemopoetikus eredetű stróma sejtek (mesenchimalis fibroblastok illetve thymus epithel sejtek) biztosítanak megfelelő mikrokörnyezetet fejlődésükhöz. A T sejt előalakok thymusban történő vándorlásuk során különböző mikrokörnyezetbe kerülnek, amely megfelelő jeleket biztosít a differenciáció további lépéseihez. Thymus hiányában (emberben DiGeorge szindróma, egérben „nude” fenotípus) nem fejlődnek ki T-sejtek, ami a celluláris immunitásban okoz súlyos zavarokat.

A T-sejt érés jól definiált lépéseken keresztül történik, aminek eredményeképp az éretlen, TcR -, kettős negatív (DN - CD4-/CD8-) sejtekből szigorúan szabályozott folyamatok során érett, TcR-t expresszáló, egyszeresen pozitív (CD4 SP vagy CD8 SP) sejtek keletkeznek, melyek képesek a saját és nem saját antigének elkülönítésére. A thymocyták random szomatikus génátrendeződéssel alakítják ki az antigén kötésére alkalmas T sejt receptort (TcR). Ezek az ún. DP sejtek az $\alpha\beta$ TcR megjelenése mellett már CD3, CD4 és CD8 molekulákat is expresszálnak. A CD4 illetve CD8 SP irányú elköteleződést a TcR MHC specificitása határozza meg („instrukciós modell”), de ebben szerepet játszhat a Notch-1 receptor szignalizáció is.

2. Szelekciós folyamatok a thymusban

A köztes érési stádiumot képviselő kettős pozitív sejtek (DP - CD4+ és CD8+) szelekciós lépéseken esnek át. A thymus kérgi részében főleg epithel sejteken, a cortico-

medulláris határon pedig makrofágokon és dendritikus sejteken nagy sűrűségben expresszálódnak MHC-I és -II molekulák, melyek kulcsszerepet töltenek be a DP thymocyták szelekciójában. Érdekes, hogy a szelekciós folyamatokban a TcR-en keresztül érkező szignál egyes esetekben pozitív szelekciót okoz, azaz a sejt túlél, más esetekben viszont apoptosist indukál.

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

3. Humorális szabályozó tényezők a thymocyta differenciációban

Amellett, hogy a thymocyták érésük során folyamatosan sejt-sejt interakcióban vannak a thymus strómáját alkotó elemekkel, a helyileg termelődő különböző humorális tényezőknek is fontos szabályozó szerepük van. Vacchio és munkatársai 1994-ben közölték, hogy egérben a thymus epithel sejtek lokálisan glukokortikoidokat (GC) is termelnek és felvetették annak a lehetőségét, hogy a GC-k szerepet játszhatnak a thymocyta szelekció szabályozásában. A thymus epithel sejtek glukokortikoid termelő képességét később más munkacsoportok is kimutatták: 1999-ben Pazirandeh és munkatársai illetve 2000-ben Lechner és társai. Ez utóbbi munkacsoportnak később sikerült csirke thymusban és bursában kimutatni a steroid szintézishez szükséges enzimeket.

4. A glukokortikoid receptor (GCR)

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

A klasszikus genomikus szteroid hatás mellett az utóbbi időben három nem-genomikus hatásmechanizmus létezését is feltételezik, a citoplazmatikus GCR kölcsönhatása

más jelátviteli utakkal (pl. Src), nem specifikus membránhatások, például az iontranszport változásai a plazma membránon keresztül, illetve felmerült membrán receptor létezésének lehetősége is.

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

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

Ashwell és társai 1990-ben megjelent közleményükben T-sejt hibridómákban és Th sejt vonalakon leírták, hogy a glukokortikoszteroidok illetve a TcR-en keresztüli aktiváció által indukált apoptózis *in vitro* kölcsönösen antagonisztikusak, azaz a glukokortikoidok által kiváltott apoptózis a TcR-en keresztüli egyidejű aktivációval gátolható. Ugyancsak a fenti kutatócsoport 1994-ben közölte, hogy a thymus epithel sejtek lokálisan glukokortikoidokat termelnek és feltételezték, hogy ezek parakrin módon szabályozhatják a thymocyta érését. A kölcsönös antagonizmus modell szerint („mutual antagonism theory”) a GC-k módosíthatják a TcR-en keresztül érkező szignált, így megakadályozzák a DP sejtek apoptózisát és pozitív szelekciót indukálnak. Azok a sejtek, amelyek egy bizonyos határérték alatti „erősségű” („subthreshold”) TcR jelet kapnak elpusztulnak „death by neglect” (részben a steroidok által indukált apoptosissal), a nagy affinitású TcR-el rendelkező DP sejtekbe olyan „erős” TcR szignál érkezik, amit a GC-k nem tudnak antagonizálni, ez negatív szelekcióhoz vezet. Végül azok a DP sejtek élnek túl (pozitív szelekció), amelyek „közepes erősségű” TcR jelet kapnak GC-k jelenlétében. Tehát mind a TcR szignál, mind a GC szignál apoptosist okoz, ha azonban együtt érik a DP sejteket, túléléshez, pozitív szelekcióhoz vezetnek.

Más kísérletek ugyanakkor azt mutatták, hogy a glukokortikoid hormon nem vesz részt a pozitív szelekció szabályozásában. A Cole és munkatársai által előállított GCR-/- egerek thymusában normális thymocyta differenciáció zajlik (sem a pozitív sem a negatív szelekcióban nem találtak eltérést a normál vad típusú egerekhez képest) annak ellenére, hogy teljesen rezisztensek a GC-k által indukált apoptosissra. Ez az adat ugyan megkérdőjelezi a

glukokortikoidok thymocytá fejlődésben betöltött szerepét, de az eltéréseket magyarázhatják a kísérleti rendszerek közti különbségek.

CÉLKITŰZÉSEK

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

BALB/c egér modell:

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

TcR transzgenikus egér (AND) modell:

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- 1. Egerek kezelése:** Balb/c egerek ip. oltása magas (10mg / ttkg), illetve alacsony dózisu (1mg / ttkg) DX-al RU 486 (1 mg / ttkg) előkezeléssel vagy nélküle. Anti-CD3 antitest (145.2C11 - hörcsög anti-egér CD3 antitest) (5 vagy 50 µg / ttkg). Galamb citokrórn C (pigeon cytochrome C - PCC) specifikus Vβ3 TcR transzgénikus AND egerek oltása ip. antigénnel (PCC) 40 µg / egér 2 vagy 4 napig, nagy vagy kis dózisu DX-al ill. kombinált PCC és DX-al.
- 2. Áramlási citometria** a thymocyták sejtfelszíni ill. intracelluláris immunfluoreszcens jelölését követően. Felhasznált antitestek: anti-CD4-PE, anti-CD8-CyC, anti-CD8-FITC, anti-CD69-FITC, anti-GCR-FITC, anti-Vβ3 TcR-PE. Három ill. négszínű mérés és analízis Becton Dickinson FACS Calibur áramlási citométeren a Cell Quest program segítségével.
- 3. Korai apoptotikus sejtek** arányának vizsgálata Annexin V-FITC jelölést követően áramlási citométeren.
- 4. Thymocyta alcsoportok szeparálása** anti-CD4-PE és anti-CD8-CyC kettős jelölést követően az FL2-FL3 csatornákon mért fluoreszcencia alapján Becton Dickinson FACS Vantage SE készüléken a Cell Quest Pro programmal.
- 5. RNS szeparálás, reverz transzkripció, és real-time PCR.** Tri Reagenssel történő totál RNS szeparálást követően reverz transzkripciót végeztünk oligo dT primerrel. A cDNS-ből real-time PCR-t végeztünk Roche Light Cycler segítségével. Felhasznált primerek: *Egér GCR* forward: 5'- TGGTGTGCTCCGATGA – 3', reverse: 5' – AGGGTAGGGGTAAGCT – 3', (termék hossz: 328 bp, Tm: 60 °C), *Egér β-aktin* forward: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACAC-3', reverse: 5'-TCTGCGCAAGTTAGGTTTTGTC-3', (termék hossz: 825 bp, Tm: 57 °C).

EREDMÉNYEK

BALB/c modell

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

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

Mivel az egyszeri kezelések csak kismértékű változásokat okoztak a thymocyták összetételében, megvizsgáltuk az ismételt DX kezelések hatását is. A DP sejtarány szignifikánsan csökkent ismételt alacsony illetve magas dózisú DX kezelésre (18 % illetve 3 %-ra) a kontrolhoz viszonyítva (79 %). Az érett CD4 SP és CD8 SP sejtek aránya viszont fokozódott mind alacsony, mind magas dózisú DX hatására (CD4 SP 53 % illetve 43 %; CD8 SP: 24 % illetve 48 %) a kontrolhoz képest (CD4 SP: 15 %; CD8 SP: 3 %) (10. ábra). A DN sejtek aránya nem változott a DX kezelések hatására.

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

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

2. A CD69 expresszió változásai

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

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

3. Anti-CD3 illetve DX kiváltotta apoptózis vizsgálata

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

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

4. A thymocyta alcsoportok GCR expressziója

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

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

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

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

5. A DX kezelés hatása a GCR expresszióra

A továbbiakban vizsgáltuk a GCR expresszió időbeni változásait egyszeri, nagy dózisú DX kezelést követően. 4-8 órával a DX beadását követően a GCR mRNS szint 4-5-szörös emelkedést mutatott, ezután viszont fokozatos csökkenés következett be 24 óráig, amikor a GCR mRNS szint a kezdeti érték 40-50 %-ra esett. Párhuzamosan vizsgáltuk a citoplazmatikus GCR szint változásait is áramlási citométeren. A GCR fehérje szint kb. 8 óras latenciával követte a GCR mRNS szint változásait. RU 486 (GC antagonist) előkezeléssel nem lehetett a GCR mRNS illetve fehérje szint változásait gátolni. Az RU 486 önmagában adva nem okozott szignifikáns változást a GCR expresszióban.

Ezután vizsgáltuk az egyes thymocyta alcsoportokban a GCR mRNS expresszió változását kis vagy nagy dózisú DX kezelés után egy nappal. A GCR mRNS szint DN sejtekben 73 % illetve 81 %-al, CD4 SP sejtekben 67 % illetve 74 %-al, míg CD8 SP sejtekben 88 % illetve 93 %-al csökkent, DP sejtekben viszont változatlan maradt. GCR

mRNS szinten nem találtunk különbséget a nagy illetve kis dózisú DX kezelések hatásai között.

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

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

AND TcR transzgenikus modell

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

1. Thymocyták szám változás antigén, DX illetve kombinált kezelés hatására.

A glukokortikoidok egyik jól ismert hatása, hogy a thymusban jelentősen csökkentik a sejtszámot. Kis illetve nagy dózisú DX, antigén (PCC) és kombinált kezelések hatására is thymocyták szám csökkenés következett be. Kontroll AND thymusokban 69.4 ± 27.6 millió sejt volt, amely antigén (PCC) kezelés hatására kismértékben (56.4 ± 22.6 millió sejt), kis vagy nagy dózisú DX kezelésre (12.9 ± 4.2 illetve 5.6 ± 5.1 millió sejt), illetve kombinált antigén és DX kezelésre (4.3 ± 3.5 millió sejt) jelentősen csökkent.

2. A thymocyták összetétel változásai

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

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

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

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

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

3. A V β 3 TcR expresszió változásai PCC, DX illetve kombinált kezelésre

Kontrol, kezeletlen AND egérben a V β 3 TcR transzgént expresszáló thymocyták aránya az érés során fokozatosan nő (DN: 76.8 ± 3.4 %, DP: 88.3 ± 2 %, CD4: 99.5 ± 0.3 %). PCC kezelés hatására a DN sejtek között csökkent (51.8 ± 13.5 %), a DP stádiumban viszont változatlan maradt (83.8 ± 4.4 %) a V β 3 pozitív sejt arány. Kis dózisu DX hatására mind a DN, mind a DP thymocyták között szignifikánsan csökkent a V β 3 arány (62.3 ± 9.1 % és 80.2 ± 1 %). Nagy dózisu DX szignifikánsan csökkentette a V β 3 pozitív DN thymocyta arányt (34.5 ± 8.6 %), míg kismértékben, de szignifikánsan növelte a V β 3 DP sejtek arányát (98.2 ± 3.1 %). A kombinált PCC és DX kezelés hatására szignifikáns esés következett be a V β 3 pozitív DP sejtek arányában (58.7 ± 9.1 %). Egyik kezelés sem befolyásolta a V β 3 pozitív CD4 SP sejtek arányát. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kombinált kezelés hatására az éretlen sejtek közül elsősorban a V β 3 transzgént expresszáló sejtek mutatnak fokozott kiérést.

4. A DP és CD4 SP sejtek CD69 expressziója

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

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

5. Korai apoptózis vizsgálata

Hasonlóan a BALB/c modellhez, a korai apoptózis meghatározására a sejtek AnnexinV kötését vizsgáltuk. Kontrol AND egerekben a DP sejtek 8.1 ± 1.9 %-a mutatott AnnexinV pozitivitást. PCC kezelés nem okozott szignifikáns változást a korai apoptotikus DP sejtek arányában (9.5 ± 3.6 %). Kis dózisú DX és kombinált PCC + DX kezelés szignifikánsan növelte az AnnexinV pozitív DP sejtek arányát (36.5 ± 9.7 % illetve 48.9 ± 16.7 %-ra). A legjelentősebb korai apoptotikus DP sejt arány-növekedést nagy dózisú DX kezelés után tapasztaltuk (70 ± 12.45 %). A CD4 SP populációban kis dózisú DX és kombinált PCC + DX kezelés okozott szignifikáns AnnexinV pozitívitás növekedést (6.8 ± 3.2 % és 20.6 ± 16.6 %) a kontrolhoz viszonyítva (3.1 ± 1 %).

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

ÖSSZEFOGLALÁS, MEGBESZÉLÉS

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

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

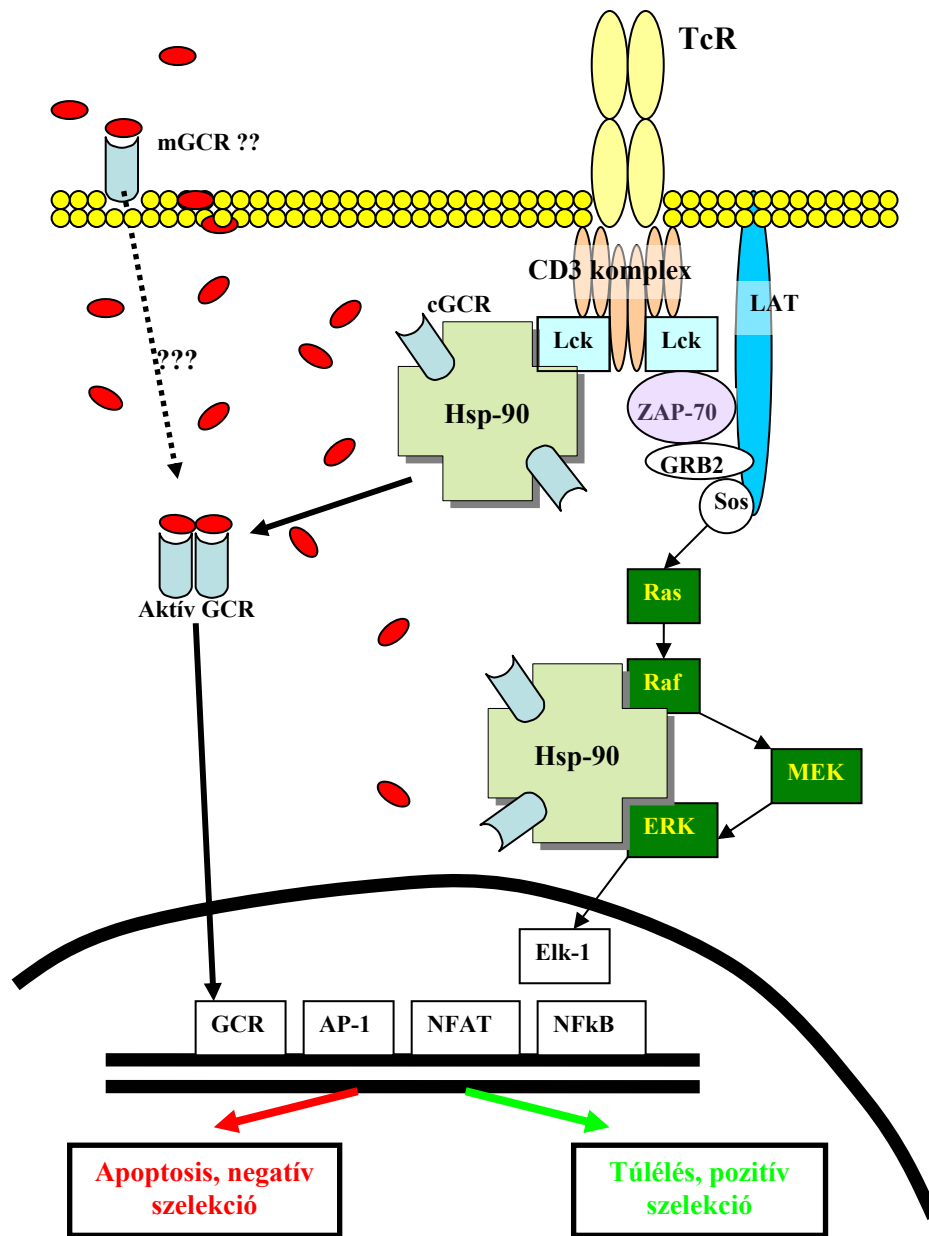
Legfontosabb eredményeink:

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

CD4 SP sejtek aránya a DP sejtekhez képest ill. fokozódott a CD69 expresszió a DP és CD4 SP sejtek felszínén), a kombinált kezelés jóval hatékonyabbnak bizonyult ebben.

6. A pozitív szelekció mellett a negatív szelekció jeleként jelentősen csökkent thymus össz sejt számot mértünk mind antigén, mind DX mind pedig a kombinált kezelések után.
7. Fokozott apoptosist tapasztaltunk főleg nagy dózisú DX, a kombinált antigén és DX kezelést követően.

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



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

PUBLIKÁCIÓK

A tézisek alapját képező publikációk

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

Egyéb publikációk

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

Idézhető absztraktok:

1. **Boldizsar F.**, Czömpöly T., Berki T., Pálincás L., Bartis D., Németh P.: *Real-time PCR analysis of murine thymocyte glucocorticoid receptor (GCR) mRNA expression* (Immunology Letters, Special issue: Abstracts of the 15th European Immunology Congress EFIS 2003, June 8-12 2003, Vol. 87 (1-3), W01.10)
2. **Boldizsar F.**, Berki T., Pálincás L., Bartis D., Németh P.: *Antigen and glucocorticoid hormone induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model* (Immunology Letters, Special issue: Abstracts of the 15th European Immunology Congress EFIS 2003, June 8-12, 2003, Vol. 87 (1-3), W11.09)
3. L. Pálincás, **F. Boldizsár**, T. Berki, P. Németh.: *Glucocorticoid hormone influence T-cell receptor signaling in developing thymocytes in vitro.* (Immunology Letters, Special issue: Abstracts of the 15th European Immunology Congress EFIS 2003, June 8-12, 2003, Vol. 87 (1-3), W11.02)
4. Berki T., **Boldizsár F.**, Pálincás L., Németh P.: *Glucocorticoid hormone and anti-CD3 induced thymocyte apoptosis: genomic or membrane effect?* (Scand. J. Immunology, Vol. 54, Suppl. 1, 2001)
5. **Boldizsár F.**, Berki T., Miseta A., Kvell K., Németh P.: *Effects of in vitro hyperglycemia on Jurkat cells* (Scand. J. Immunology, Vol. 54, Suppl. 1, 2001)
6. **Ferenc Boldizsar**, Tímea Berki, Istvan Wittman: *Glucose and insuline dependent changes in free cytoplasmic Ca⁺⁺ following activation of human lymphocytes: an in vitro diabetes model.* (Cytometry Suppl. 10. 99., 2000)

Előadások:

1. **Ferenc Boldizsar**, Tamas Czompoly, Laszlo Palinkas, Domokos Bartis, Peter Nemeth, Tímea Berki: *Different glucocorticoid receptor (GCR) expression of BALB/C thymocyte subpopulations* (XXII ISAC International Congress, Montpellier, Franciaország, 2004. máj. 22-27)
2. **Boldizsár F.**, Czömpöly T., Pálincás L., Bartis D., Németh P., Berki T.: *Multiparametric analysis of glucocorticoid receptor expression in thymocyte subpopulations* (7th International Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, 2003. szept. 21-24)

3. **Boldizsár, F.**, Czömpöly, T., Berki, T., Pálinkás, L., Bartis, D., Németh, P., University of Pécs, Medical Faculty, Department of Immunology and Biotechnology, Pécs, Hungary: *Real-time PCR analysis of murine thymocyte glucocorticoid receptor (GCR) mRNA expression.* (15th European Immunology Congress, EFIS 2003, Rodosz, 2003. jún. 8- 12)
4. **Boldizsár, F.**, Berki, T., Pálinkás, L., Bartis, D., Németh, P., University of Pécs, Medical Faculty, Department of Immunology and Biotechnology, Pécs, Hungary: *Antigen and glucocorticoid hormone (GCs) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model.* (15th European Immunology Congress, EFIS 2003, Rodosz, 2003. jún. 8- 12)

Poszterek:

1. Tímea Berki, **Ferenc Boldizsár**, László Pálinkás, Péter Németh, University of Pécs, Medical Faculty, Department of Immunology and Biotechnology, Pécs, Hungary: *Glucocorticoid hormone and anti-CD3 induced thymocyte apoptosis: genomic or membrane effect?* (11th International Congress of Immunology, Stockholm, 2001. júl. 22-27.)
2. **Boldizsár Ferenc**, Berki Tímea, Pálinkás László, Németh Péter, PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs: *Egér thymocyták jelátvitelének vizsgálata* (MIT XXXI. Kongresszusa, Eger, 2001. okt. 17-19.)
3. **Boldizsár Ferenc**, Berki Tímea, Bartis Domokos, Németh Péter, PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet: *A glukokortikoid (GC) hormon hatásának vizsgálata T-sejtek jelátvitelére* (A Magyar Biokémiai Társaság Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete, Keszthely, 2002. máj. 14-17.)
4. **Boldizsár Ferenc**, Berki Tímea, Bartis Domokos, Németh Péter, PTE-ÁOK, immunológiai és Biotechnológiai Intézet: *Thymocytaérés vizsgálata TcR transzgenikus egerben in vivo és in vitro* (MIT XXXII. Kongresszusa, Kaposvár, 2002. szept. 30.- okt. 2.)
5. Bartis Domokos, **Boldizsár Ferenc**, Berki Tímea, Németh Péter, PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet: *Glukokortikoid hormon (GC) hatása T-sejtek jelátvitelére* (MIT XXXII. Kongresszusa, Kaposvár, 2002. szept. 30.- okt. 2.)

6. **Boldizsár Ferenc**, Czömpöly Tamás, Berki Tímea, Pálinkás László, Bartis Domokos, Németh Péter, PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet: *Egér thymocyták glukokortikoid receptor (GCR) expressziójának real-time PCR vizsgálata* (A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. 05. 12.-15.)
7. **Boldizsár Ferenc**, Pálinkás László, Bartis Domokos, Németh Péter és Berki Tímea, PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet: *Pozitív szelekció vizsgálata TcR transzgenikus egértörzsben* (XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. 05. 20.-23.)
8. Bartis Domokos, **Boldizsár Ferenc**, Berki Tímea, Németh Péter, PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet: *Rövid idejű dexamethasone kezelés koncentrációfüggő módon befolyásolja a T-sejtek Ca^{2+} jelét* (XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. 05. 20.-23.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dr. Berki Tímeának, témavezetőmnek, **Dr. Németh Péter** intézevezetőnek, **Dr. Balogh Péternek** a kéziratok kritikus átolvasásáért és a hasznos tanácsokért, **Dr. Czömpöly Tamásnak** (molekuláris biológiai vizsgálatok), **Dr. Pálinkás Lászlónak** (áramlási citometria, állatkísérletek), **Dr. Bartis Domokosnak**, **Pápa Lászlónénak** és **Dr. Melczer Attilánénak** a technikai segítségért valamint az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet** minden dolgozójának.

Dr. Szondi Zsuzsannának (DE-OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) az TcR transzgenikus egerekért.

Munkánkhoz az **NKFP 1/48/2001**, **NKFP 1/26/2001** illetve az **ETT – 593/2003** pályázati támogatásokat használtuk fel.