

**ZAP-70: ÚJONNAN AZONOSÍTOTT KAPCSOLÓDÁSI PONT A  
T-SEJT RECEPTOR ÉS GLUKOKORTIKOID HORMON  
JELÁTVITELI UTAK KÖZÖTT**

**PHD ÉRTEKEZÉS**

**DR. BARTIS DOMOKOS**

**Immunológiai és Biotechnológiai Intézet  
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Témavezetők: Dr. Berki Tímea  
Dr. Boldizsár Ferenc**

**Alprogram vezető: Prof. Dr. Németh Péter**

**2007.  
Pécs**

## Összefoglalás

A glukokortikoidok (GC) fontos szerepet játszanak a T-sejtek érésében, különböző aktivációs és apoptotikus szignálok szabályzásában. A thymusban a GC hormon igen fontos regulációs szerepet játszik a thymociták szelekciója során. Az eddigi irodalmi adatok alapján valószínűsíthető cross-talk mechanizmus(ok) létezése a T-sejt receptor(TcR) –CD3 komplexből kiinduló jelátvitel és a glukokortikoid receptor (GR) között.

Munkánkban a GC rövid idejű, nem-genomikus úton kifejtett jelátviteli hatásait vizsgáltuk in vitro modellrendszerben, Jurkat T-sejtes leukémia sejtvonalon.

Eredményeink szerint a GR agonista Dexamethasone (DX) 5 percen belül tirozin foszforilációs változásokat okoz Jurkat sejteken. A DX kezelés megváltoztatta mind a nyugvó, mind az anti-CD3 keresztkötéssel aktivált Jurkat sejtek tirozin-foszforilációs mintázatát.

A ZAP-70 kináz központi szerepet tölt be a TcR-CD3 komplexből kiinduló jelátviteli folyamatokban. A ZAP-70 működésének defektusa esetén in vitro T-sejt aktivációs defektus, in vivo pedig súlyos kombinált immundeficiencia (SCID szindróma) figyelhető meg. Vizsgálatainkban a DX kezelés nyugvó és aktivált Jurkat sejtekben 5 percen belül ZAP-70 tirozin foszforiláció emelkedést okozott. A folyamatban a GR szerepére utal, hogy a foszforiláció GR antagonistá (RU486) előkezeléssel gátolható. DX indukálta ZAP-70 foszforiláció nem jött létre p56-lck kináz deficiens JCaM-1 sejtvonalban. A GR és ZAP-70 közeli fizikai kapcsolatát ko-immunprecipitációval és konfokális mikroszkópiával is vizsgáltuk. A GR ligandja jelenlétében asszociálódik a ZAP-70-hez mind Jurkat, mind transzgenikus, ZAP-70-et stabilan expresszó HeLa/trZAP-70 sejtekben.

A T-sejt aktiváció nélkülözhetetlen lépése, hogy a ZAP-70 asszociálódik a CD3 komplexen található foszforilált ITAM-tirozinokhoz. Eredményeink szerint a ZAP-70 asszociáció a CD3 komplex láncokhoz GR ligand jelenlétében gátlódott.

Eredményeink alapján a következő jelátviteli modellt javasoljuk: A GR ligandkötés után asszociálódik a ZAP-70-hez, ami foszforilációs változásokat indít el. A GR asszociációja egyben megakadályozza, hogy a ZAP-70 kötődjék a foszforilált ITAM szekvenciákhoz, így gátolva a TcR-CD3-hoz kapcsolódó jelátviteli komplex kialakulását.

A GC-k és származékaik széles körben használatosak a jelenlegi terápiás protokollokban, ám mellékhatásprofiljuk igen kiterjedt. Az általunk feltárt jelátviteli folyamatoknak fontos szerepe lehet a GC mediálta immunszupresszióban. Ennek a hatásmechanizmusnak a pontos megismerése lehetővé teheti új támadáspontú immunoszupresszív hatóanyagok kutatását, tervezését, amelyek esetleg kedvezőbb mellékhatásprofillal rendelkeznek, mint a jelenleg alkalmazott gyógyszerek.

## Bevezetés

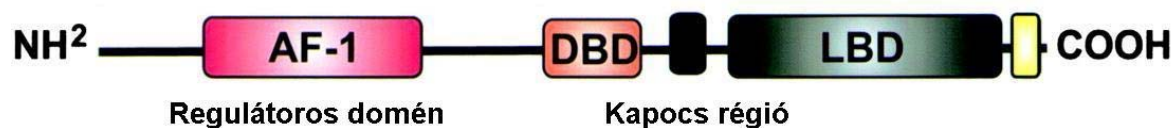
### 1.1 A glukokortikoidok gyógyászati alkalmazása

A glukokortikoid hormon származékai (GC) régóta igen széles körben használatosak gyógyászati célokra. Terápiás alkalmazási területük magában foglalja az akut és krónikus rheumatológiai gyulladásos betegségeket, autoimmun betegségeket, asztmás, allergiás megbetegedéseket, egyes malignus haematológiai kórképeket, de használatosak szerv- vagy szövettranszplantáció utáni immunszuppresszív terápiában is. Kiterjedt alkalmazásuk ellenére sok téren még tisztázatlan a glukokortikoidok molekuláris hatásmechanizmusa.

### 1.2 A glukokortikoid receptor szerkezete

A GC hatások egy része a glukokortikoid receptor (GR) közvetítésével zajlik. A GR az intracelluláris receptorok családjába (nuclear receptor superfamily) tartozik. Több más kémiai steroid és más, nem steroid hormon rendelkezik hasonló receptorokkal, sőt vannak adatok olyan szerkezetileg a steroid receptorok családjába tartozó fehérjéről, amelynek nem ismert a ligandja (árva vagy orphan receptorok).

A GR evolúciósan igen konzervált szerkezetű transzkripciós faktor. A humán GR alternatív splicing-je két izoforma expresszióját eredményezi: a hGR $\alpha$  és a hGR $\beta$  izoformákét. A klasszikus, majdnem minden sejtben expresszálandó hGR $\alpha$  777 aminosavból álló fehérje. Inaktív állapotban ez a citoplazmában található, más fehérjékkel alkotott makromolekuláris komplexban. A hGR $\beta$  a 9. exon alternatív splicing-je révén jön létre. Csak a C-terminális régióban különbözik az hGR $\alpha$  izoformától és tartalmaz egy 15 aminosavas egyedi szekvenciát. A hGR $\beta$  fiziológias szerepe vitatott: ligandkötésre nem képes és kizárólag a magba lokalizálódik. Több esetben kimutatták a szerepét patológiás GC rezisztenciában. Valószínűleg részt vesz a GC által szabályozott génexpresszió finom szabályozásában.



1. ábra. A glukokortikoid receptor elsődleges szerkezete szalagdiagrammon

Funkcionálisan a GR-nek 4 szakasza különíthető el: az N-terminális részén a variábilis régió, amit regulátoros doménnek is neveznek. Ez a rész felelős a konstitutív transzkripciós aktivációs funkciókért. A DNS-kötő domén (DNA-binding domain, DBD) evolúciósan a legjobban konzervált része a molekulának, cink-ujj szerkezetű. A DBD rövid kapocs vagy hinge-régió keresztül kapcsolódik a ligandkötő doménhez (ligand binding domain, LBD). A LBD felelős a ligandkötésért, valamint a GR esetében a homodimer kialakításáért.

### **1.3 Genomikus GC jelátvitel**

A GC, mint lipidoldékony hormon, diffúzióval jut be a sejtbe a sejtmembránon keresztül és az intracellulárisan elhelyezkedő inaktív GR-hez köt. Az inaktív GR más fehérjékkel (pl. a Hsp-90) asszociálódva található a citoplazmában mint egy multimer fehérjekomplex tagja. A ligandkötést követő konformáció változások során a receptor disszociálódik a Hsp-90 komplexről és homodimer formájában a magba vándorol. A magban a ligandkötött GR fő funkciója szerint transzkripciós faktor: specifikus, palindróm DNS szekvenciákhoz, az ún. GRE-hez (Glucocorticoid Response Element) kötődve növeli egyes gének expressziójának mértékét. A GR transzkripciós faktorként negatív génregulációt is megvalósíthat: negatív regulátoros GRE szakaszokhoz (nGRE) is kapcsolódhat. Jelenleg ezek a DNS-szakaszok kevésbé karakterizáltak. A génexpresszió szabályozásának ez a két módja a DNS-függő szabályozás.

Vannak példák DNS-független szabályozásra is: ebben az esetben az intracelluláris receptor fizikai interakcióba lép egy másik transzkripciós faktoral, így változtatva meg annak aktivitását. A GR esetében mindegyik típusú szabályozási mechanizmusra ismerünk példákat. A DNS független transzkripció szabályozás során a GR közeli fizikai kontaktusba kerül a másik transzkripciós faktoral és befolyásolja azok aktivitását. Több transzkripciós faktorról ismert, hogy interakcióba lép a GR-el: az NF $\kappa$ B, AP-1, CREB, valamint a STAT- család több tagja. Az előbb említett genomikus jelátviteli út fő jellemezője, hogy végső soron a fehérjeszintézis változik meg a GC érzékeny sejtben vagy szövetben a hormon hatására. A genomikus hatások létrejöttéhez minden esetben megfelelő hosszúságú időre van szükség (általában több órára) ahhoz, hogy a génexpresszióban, fehérjeszintézisben lezajló változások manifesztálódjanak.

### **1.4 A GC hormon nem-genomikus hatásai**

A nem-genomikus hatások közös jellemezője, hogy nem szükséges hozzá de novo protein szintézis, inkább a különböző jelátviteli molekulák poszttranszlációs módosulásai jellemezők. Jelenleg a nem-genomikus GC hatásokat 3 csoportba sorolják: (1.) A klasszikus citoplazmatikus GR-en (cGR) keresztül létrejövő specifikus hatások, melyeket a GR más jelátviteli fehérjékkel történő citoplazmatikus interakciókon keresztül közvetít. (2.) nem specifikus fiziko-kémiai membrán-interakció (ez csak igen magas steroidkoncentrációnál lép fel) és (3.) a feltételezett membrán-rezidens GR-en keresztül közvetített specifikus hormonhatások.

### **1.5 A GC és TcR jelátviteli útvonalak közötti kommunikáció jelentősége**

A GC hormonnak különösen fontos szabályozó szerepe van T-sejtekben mind a thymusban lezajló érési folyamatok, mind az érett sejtek periférián betöltött funkciója során. A thymus epithel sejtek által lokálisan termelt GC parakrin módon szabályozza a thymociták érését. A kölcsönös antagonizmus modell („mutual antagonism theory”) szerint a GC a T-sejt receptoron (TcR) keresztül érkező szignállal együtt pozitív szelekciót indukál a DP sejtekben, és a nem-reszponzív TcR-t expresszáló thymocita

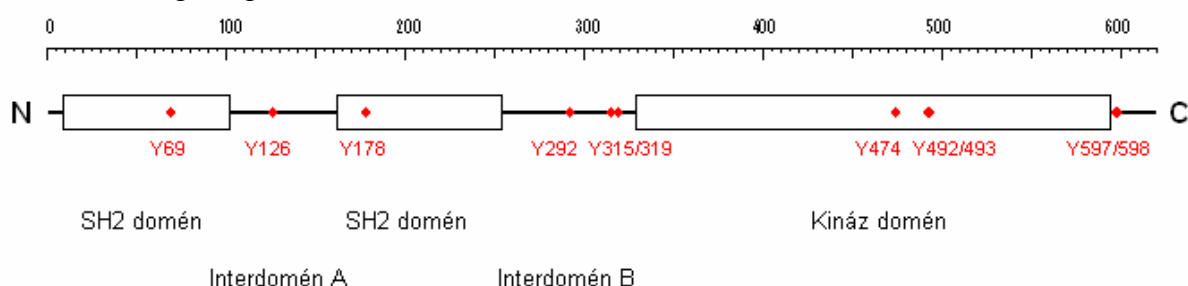
klónok apoptózisában is fő szerepe van a GC hatásnak. A perifériás, érett T-sejtek citokinszekrécióját a GC Th2 irányba tolja el, és többfajta mechanizmus útján fejt ki erőteljes gátló hatást a különböző proinflammatorikus citokinek (pl. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ ) szintézisére. Figyelembe véve az anti-inflammatorikus hatást valamint a kölcsönös antagonizmus modellt, valószínűsíthető valamilyen kommunikáció a GC hormon és a TcR jelátviteli utak között.

## 1.6 A TcR-ből kiinduló jelátvitel

A TcR és az MHC-kötött antigén kapcsolódása után másodperceken belül megindul a tirozin-foszforiláció. Ez az aktivációs szignál olyan biokémiai változások kaszkádját indítja el, ami több órán át fennállva jelentős változást okoz a T-sejtek anyagcseréjében. 2 órán belül elindul a citokinreceptorok expressziója (a legjellegzetesebb az IL-2R), 2-6 órán belül a citokin szekréció. 24 órán belül elkezdődik a DNS replikáció, majd 48 órán belül sejtosztódás következik. Az optimális jelátvitel a koreceptorok (CD4 ill. CD8) részvételét is igényli. Ezek egyrészt stabilizálják a TcR-MHC kapcsolatot, másrészt citoplazmatikus részükhöz nem-receptor PTK-k kapcsolódnak, így résztvesznek a szignalizációban is. Ezek a nem-receptor PTK-k a src családba tartozó fehérjék. A TcR antigénkötése és a koreceptorok MHC-kötése után főként a CD3 $\zeta$  láncok foszforilálódnak tirozinon, melyért elsősorban a p56-lck felelős. A foszforilált  $\zeta$ -láncok dokkolási helyként szolgálnak a ZAP-70 kináz számára (zéta-lánc asszociált protein).

## 1.7 A ZAP-70 kináz szerepe a TcR-ből kiinduló jelátviteli folyamatokban

A ZAP-70 a syk-családba tartozó nem-receptor PTK, molekulásúlya 70 kDa. T- és NK sejtekben expresszálódik, szerepét B-sejtekben, neutrofilekben, eozinofilekben és hízósejtekben a Syk kináz tölti be, mellyel jelentős szerkezeti és funkcionális homológiát mutat. Elsődleges szerkezetét tekintve C-terminális kinázdoménre, két SH2 doménre és az ezeket elválasztó Interdomén A-nak és B-nek nevezett régiókra osztható a molekula. A ZAP-70 kináz nagy affinitással kötődik a CD3 komplexen levő ITAM-motívumok foszforilált tirozin maradékaihoz a tandem elhelyezkedésű SH2 domének segítségével.



### 2. ábra A ZAP-70 kináz szerkezeti diagramja a jelenleg ismert tirozin-foszforilációs helyek feltűntetésével

A ZAP-70 fő feledata, hogy továbbítsa és felerősítse a TcR-ből kiinduló jelet. A ZAP-70 kulcsszerepet játszik a TcR-CD3 jelátvitelben: ZAP-70 deficiens sejtekben T-sejt

receptor aktiváció vagy CD3 keresztkötés után nem mutatható ki  $Ca^{++}$  -jel. A ZAP-70 veleszületett funkcióvesztő mutációja emberben SCID szindrómát (súlyos kombinált immundeficiencia) okoz, amire a Tc sejtek teljes hiánya és a Th sejtek immunológiai válaszképtelensége jellemző.

A nem-receptor PTK-k kinázaktivitás-szabályozásának egyik fő mechanizmusa a foszforiláció. A ZAP-70 maga is számos tirozin-maradékot tartalmaz, amelyek közül számos foszforilációs helyet írtak le. Egyes tirozinok foszforilációja közvetlenül befolyásolja a kinázaktivitást (pozitív vagy negatív irányban is) mások regulátoros jelátviteli molekulák számára szolgálnak dokkolóhelyül, melyek szintén modulálhatják a ZAP-70 kinázaktivitását.

## 2 Célkitűzések

1. A rövid idejű nem-genomikus GC hatások vizsgálata T-sejteken in vitro modell sejtvonalon (Jurkat). Nagy dózisú Dexamethasone (DX, GC analóg) kezelés után bekövetkező általános változások vizsgálata Jurkat sejtek tirozin-foszforilációs mintázatában.
2. A ZAP-70 kináz rövid idejű DX-kezelés hatására bekövetkező foszforilációs változásainak a karakterizálása.
3. A foszforilációs események GR-függésének, illetve upsteram-kináz függésének tisztázása.
4. A DX indukálta ZAP-70 foszforiláció időbeli kinetikájának a tanulmányozása.
5. A GR és a ZAP-70 térbeli viszonyának tanulmányozása ko-immunprecipitációval és konfokális mikroszkóppal. GR agonista hatására bekövetkező változások megfigyelése a két molekula egymáshoz való viszonyában.
6. A ZAP-70, a GR és a Hsp-90 chaperon egymáshoz való viszonyának tisztázása Jurkat sejtekben.
7. A ZAP-70, a GR és a Hsp-90 egymáshoz való viszonyának vizsgálata nem-T-sejtes környezetben, transzgénikus ZAP-70-et expresszáló HeLa sejteket használva modellként.
8. A CD3 komplexhez kötött és a GR jelátviteli útvonalai közötti kommunikáció lehetséges összefüggésének vizsgálata.

## **3 Anyagok és módszerek**

### **3.1 Sejtvonalak**

A GC hormon T-sejt jelátvitelre gyakorolt azonnali hatásait in vitro modellrendszerben Jurkat sejteken (humán T-sejtes leukémia sejtvonala) és az előbbi sejtvonala p56-lck deficiens szubklónján (JCaM1) vizsgáltuk. Egyes kísérleteinkhez HeLa sejteket transzfektáltunk teljes-hosszú ZAP-70-et hordozó lentivirális vektorral.

### **3.2 Lentivirális transzfekció**

A ZAP-70 kináz viselkedésének T-sejt független celluláris környezetben történő vizsgálatához HeLa sejteket transzfektáltunk teljes hosszú ZAP-70 cDNS-t tartalmazó lentivirális vektort alkalmazva. A pWPTS lentivirális transzfer plazmidba klónoztuk a humán vad típusú ZAP-70 cDNS-t, a konstrukcióban EF-1 promóter kontrollt alkalmazva. A transzfer-plazmidot ezután az envelope-proteinek kódoló és a csomagoló-plazmidokkal együtt 293T sejtekbe vittük be kalcium-foszfátos transziens transzfekciót alkalmazva. A vírusokat szekretáló csomagoló-sejtvonala felülűszojával ezután spinokulációval HeLa sejteket fertőztünk. A transzgénikus HeLa sejtek ZAP-70 expresszióját Western-blottal és áramlási citometriával kontrolláltuk.

### **3.3 Geldanamycin, GR agonista és antagonisták kezelése**

A sejteket 37°C-on inkubáltuk 4 órát szérumentes RPMI médiumban, 10µM Mifepristone (RU486, GR antagonisták) illetve a kontrollknál oldószer (DMSO) jelenlétében. Egyes kísérleteinkben 1,78mM Geldanamycint (GA, Hsp-90 gátlószer) használtunk. Ezután a sejteket 10<sup>8</sup>sejt/ml koncentrációban inkomplett RPMI-ben vettük fel és a jelzett ideig 37°C-on inkubáltuk 10µM Dexamethasone (DX, GR agonista) vagy a kontrollknál megfelelő mennyiségű oldószer (DMSO) jelenlétében.

### **3.4 Anti-CD3 aktiváció**

A DX kezelt vagy kezeletlen sejteket 37°C-on inkubáltuk 10<sup>8</sup>sejt/ml koncentrációban inkomplett RPMI-ben. A sejtekhez hozzáadtunk az anti-CD3 antitestet 100 µg/ml végkoncentrációban. 2 perces 37°C-os inkubáció után a kezelést folyékony nitrogénes fagyasztással állítottuk le, a mintákat vizsgálatukig -80°C-on tároltuk.

### **3.5 Immunprecipitáció, Western blot**

A minták lízisét TX-100 tartalmú lízis pufferben illetve a ko-immunprecipitációs kísérletek esetében TEGM pufferben végeztük. A pufferekhez közvetlenül felhasználás előtt 2mM Na-ortho-vanadátot és proteázgátlókat adtunk. TEGM puffer alkalmazása esetén a puffer hozzáadását követően a mintákat szonikáltuk 5 x 5sec-es impulzusokkal. 400µl citoplazma-frakción „pre-clearing”-et végeztünk fél óráig Protein G-Sepharose-zal, majd az előtisztított lizátumot 2 órán át 4°C-on inkubáltunk a



precipitáló antitesttel. Az immunkomplexeket ProteinG-Sepharose-on fixáltuk, majd alapos mosás után mintapufferben eluáltuk. A mintákkal SDS-poliakrylamid gélen Laemmli szerint elektroforézist végeztünk, és standard módszerek szerint indirekt Western blottokat készítettünk. A blotok vizualizálását ECL reagenssel végeztük, a kemiluminescens jelet röntgenfilmre (Fujifilm) rögzítve. Egyes esetekben ún. „stripping-reprobing” módszert alkalmaztunk: Ekkor a blotokon ECL-es előhívás után „stripping-bufferes” kezelést alkalmaztunk az antitestek eltávolítására. Ezután ugyanazt a blottot másik antitettel is elő tudtuk hívni, anélkül, hogy az előző előhíváshoz használt antitest zavart volna.

### **3.6 Konfokális mikroszkópia**

A sejteket  $10^7$ /ml koncentrációban FCS-mentes RPMI médiumban reszuszpendáltuk, és  $10\mu\text{M}$  Dexamethasone vagy oldószere (DMSO) jelenlétében 5 percig  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Ezután 10x-es térfogatú jéghideg 0,1% Na-azidot tartalmazó PBS-t a sejkehez adva állítottuk le a reakciót. A sejteket lecentrifugáltuk, majd fixálást és permeabilizálást követően jégen inkubáltunk a megfelelő fluorescensen jelölt antitest-koktéllal. Alapos mosást követően a sejteket tárgylemezre csöppentettünk, majd ülepedés után a felesleges folyadékot óvatosan leszívtuk. 50%-os glicerolos lefedést követően a mintákat Olympus Fluoview 300 vagy későbbi minták esetében Olympus FV1000S-IX81 konfokális mikroszkóp rendszerrel vizsgáltuk.

## **4 Eredmények**

### **4.1 A rövid idejű Dexamethasone kezelés megváltoztatja a Jurkat sejtek tirozin-foszforilációs mintázatát**

Kezdeti kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy DX kezelés okoz-e valamilyen tirozin-foszforilációs változást. Jurkat teljes sejtlizátumokat vizsgálva, 5 perces kezelés 10 $\mu$ M DX-al tirozin-foszforiláció növekedést okozott több foszoproteinben az oldószer-kezelt kontroll mintához viszonyítva. Monoklonális anti-CD3 antitesttel történő aktiváció határozott tirozin-foszforiláció emelkedést okozott, azonban 5 perces DX előkezelés utáni anti-CD3 aktiváció ehhez képest gátolta a foszforilációt.

### **4.2 Nagy dózisú Dexamethasone gyors ZAP-70 tirozin-foszforilációt okoz**

Megvizsgálva a ZAP-70 foszfortirozin-tartalmának változását rövididejű DX kezelés hatására, azt találtuk, hogy 5 perces 10 $\mu$ M koncentrációjú DX kezelés 4-szeresére növelte a ZAP-70 foszfortirozin-tartalmát. Hasonló mértékű növekedést okozott az anti-CD3 aktiváció is. A tirozin foszforiláció a kombinált DX+anti-CD3 kezelés hatására további növekedést mutatott. A ZAP-70 foszfoszforiláció-növekedése szignifikánsnak bizonyult DX vagy anti-CD3 aktiváció, valamint DX+anti-CD3 kombinált kezelésnél is a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A kombinált kezelésnél tapasztalható nagyobb foszforiláció-növekedés az egyedüli DX vagy anti-CD3 kezeléshez viszonyítva a 3 független kísérletnél következetesnek bizonyult, ám a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. (Student-féle t-teszt,  $p > 0,05$ )

### **4.3 A DX hatására bekövetkező ZAP-70 tirozin-foszforiláció p56-lck és GR függő folyamat**

A src-családba tartozó T-és NK sejt specifikus kinázoknak, a p56-lck-nak a ZAP-70 az egyik fő szubsztrátja. Amikor kísérleteinkben JCaM-1 sejteket, a Jurkat sejtek egy p56-lck deficiens szubklónját kezeltük 10 $\mu$ M DX-el 5 percig, a ZAP-70 semmilyen tirozin-foszforiláció emelkedést nem mutatott.

Ekvimoláris RU486 (Mifepristone, GR antagonist) előkezelést alkalmazva vizsgáltuk, hogy a DX indukálta ZAP-foszforiláció gátolható-e GR antagonistával. Eredményeink szerint 4 órás RU486 kezelés hatékonyan gátolta a DX által indukált ZAP-70 foszforilációt, míg előkezelés nélkül a DX kezelés jelentős foszfortirozin-szint növekedést okozott a ZAP-70-ben.

### **4.4 A ZAP-70 kináz foszforilációs kinetikája nagy dózisú DX-kezelést követően**

Mivel a jelátviteli molekulák tirozin-foszforilációjának kinetikája fontos adat a sejtekben zajló jelátviteli folyamatok megértése során, megvizsgáltuk a ZAP-70 foszfortirozin-szintjének változását a nagy dózisú DX kezelés során. A ZAP-70 tirozin-

foszforilációja 1 percen belül növekszik a DX hozzáadását követően, a csúcstól 2 percen belül eléri. 5 perc után defoszforiláció következik be és a foszfortirozin-szint visszatér az alapra.

#### **4.5 Ligandkötés után a GR asszociálódik a ZAP-70 kinázzal**

Miután tisztáztuk, hogy a DX hatására bekövetkező ZAP-70 foszforilációban a GR nélkülözhetetlen szerepet játszik, ko-immunprecipitációval és konfokális mikroszkópiával megvizsgáltuk, vajon lehetséges-e hogy a két molekula közeli fizikai kölcsönhatásban van egymással. A ko-immunprecipitációt anti-GR és anti-ZAP-70 antitesttel is elvégezve, mindkét típusú kísérletben hasonló eredményre jutottunk: a ZAP-70 és a GR kölcsönösen ko-precipitálódott Jurkat sejtek lizátumát vizsgálva. A DX kezelt mintákban nagyobb mértékű ko-precipitációt tapasztaltunk mindkét esetben. A két molekula GC hormon hatására bekövetkező ko-lokalizációt konfokális mikroszkópiával is megerősítettük: a DX kezelt Jurkat sejtekben a két molekula membrán-közeli ko-lokalizációja látszik, míg a kontroll mintában csak minimális ko-lokalizáció látszik.

#### **4.6 A ZAP-70 asszociálódik a Hsp-90 chaperonnal**

A Hsp-90 chaperon makromolekuláris komplexet alkot az inaktív GR-el és fontos szerepet játszik abban, hogy a p56-lck kináz aktív konformációban legyen. Mivel eredményeink szerint a ZAP-70 asszociálódik a ligandkötésben levő, aktív GR-el és a szubsztrátja a p56-lck-nak ezért tisztázni szerettük volna a ZAP-70 viszonyát a Hsp-90-hez. Ko-immunprecipitációs kísérleteink szerint a ZAP-70 asszociálódik Jurkat sejtekben a Hsp-90-nel Jurkat sejtekben. Az asszociáció nem változott meg DX kezelés hatására. Geldanamycinnel (GA, Hsp-90 specifikus inhibitor) kezelt Jurkat sejtekben a ZAP-70-Hsp-90 kapcsolat megszűnt, míg a ZAP-70-GR asszociációt ugyanúgy kimutatható volt a GA kezelt mintákban is.

#### **4.7 A ZAP-70, a GR és a Hsp-90 egymáshoz való viszonyának vizsgálata transzgénikus ZAP-70-et expresszáló HeLa sejtekben**

Fontosnak tartottuk tisztázni a p56-lck szerepét a ZAP-70, a GR és a Hsp-90 Jurkat sejtekben feltárt egymáshoz való viszonyában. A ZAP-70 T-és NK sejt specifikus molekula, így nem expresszálódik epitheliális eredetű sejtekben, mint a HeLa sejtvonal. A GR és a Hsp-90 ubikviter, HeLa sejtekben is expresszálódnak. Kísérleteinkhez lentivirális vektorral transzfektált, transzgénikus ZAP-70-et stabilan expresszáló HeLa sejteket (HeLa-trZAP-70) készítettünk. Ko-immunprecipitációs kísérleteink eredménye szerint ligandkötés hatására a GR asszociálódik a ZAP-70-nel HeLa-trZAP-70 sejtekben, hasonlóképpen a Jurkat sejtekben tapasztaltakhoz. A két molekula ko-lokalizációját is sikerült kimutatni konfokális mikroszkóppal a DX kezelt mintákban. Érdekes, hogy a HeLa-trZAP-70 sejtekben a GR és a ZAP-70 ko-lokalizációja perinukleáris mintázatot mutatott, ellentétben a Jurkat sejtekben tapasztalt membrán-közeli mintázattal. HeLa-trZAP-70 sejtekben is ki tudtunk mutatni Hsp-90-hez asszociált ZAP-70 frakciót, melynek mennyisége nem változott a DX kezeléssel.

#### **4.8 A nagy dózisú DX kezelés gátolja a ZAP-70 asszociációját a CD3-komplexhez Jurkat T-sejtekben.**

A T-sejt receptorból kiinduló jelátviteli folyamatokban a ZAP-70 igen fontos szerepet játszik. Tandem SH2 doménjeivel asszociálódik a CD3 komplex láncain található foszforilált ITAM-motívumokhoz. A ZAP-70 asszociáció a CD3 komplex láncaihoz kulcsfontosságú lépése a T-sejt aktivációnak. Eredményeink szerint a DX kezelés gátolja a CD3-aktiváció során a ZAP-70 asszociációját a CD3-komplexhez. Az anti-CD3 antitesttel aktivált mintákban a ZAP-70 ko-precipitálható volt a CD3-komplexel. Ezzel ellentétben a DX kezelt mintában az asszociáció gátlódott.

## 5 Megbeszélés

A fent röviden leírt eredményeinket irodalmi adatokkal összevetve úgy gondoljuk, hogy a p56-lck – ZAP-70 rendszer egy új, eddig ismeretlen szabályozási pont lehet a TcR és a GR jelátviteli utak között. Mások által még nem közölt adat, hogy a GC kezelés gyors (perceken belüli) tirozin-foszforilációs változásokat okoz T-sejteken. A TcR-ből antigén kötés hatására kiinduló jel fejlődésük különböző szakaszaiban különböző hatással van a T-sejtek sorsára. A nem-reszponzív TcR-t hordozó sejtek apoptózis útján való eliminálásában a GC hormon elsődleges szerepét feltételezik, míg a saját antigénekkal nagy affinitással reagáló, potenciálisan autoreaktív thymociták aktiváció indukálta apoptózis útján pusztulnak el. A „kölsönös antagonizmus elmélet” („mutual antagonism theory”) alapja az, hogyha GC és TcR eredetű szignálok egyaránt érik a thymocitát, akkor ezek a jelek kölcsönösen anatonizálják egymás apoptózist indukáló hatását, és a thymocita túlél.

Az érett, perifériás T-sejtek esetében a TcR-en keresztül érkező szignál a megfelelő kostimulációs jelekkel együtt végső soron T-sejt aktivációt okoz, ami IL-2 szekréciót és klonális proliferációt eredményez. A GC-k gátolják a T-sejtek aktivációját, ezt a hatást használják ki immunuszuppresszív therapiás alkalmazásuk során. A GC és a TcR jelátviteli utakon több kommunikációs pontot írtak le mások, ám azok a genomikus jelátviteli úton helyezkedtek el, mely hatások létrejöttéhez minimálisan több óra szükséges. Az általunk leírt, további jellemzés alatt álló szabályozó ponton a GC hormon poszttranszlációs módosulások útján (tirozin-foszforiláció), percek alatt fejti ki a hatását. Eredményünk, miszerint a GC kezelés a ZAP-70 tirozin-foszforilációját indukálja, felveti, hogy a GC hormon ezen a szinten is szabályozza a TcR-ből kiinduló jelet. A tirozin-foszforiláció a kinázok aktivitásának szabályozásában fontos szerepet játszik. Jelenleg 11 tirozin-foszforilációs hely ismert a ZAP-70 kinázon, lehetővé téve az igazán sokrétű funkcionális szabályozást. Egyes foszforilációs helyek közvetlenül befolyásolják a kinázaktivitást (akár pozitív, akár negatív irányban), mások jelátviteli fehérjék kötődését teszik lehetővé, melyek szintén befolyásolják a ZAP-70 aktivitását. Több foszforilációs hely funkciója jelenleg ismeretlen.

Kísérleteink során a ZAP-70 GC indukálta foszforilációja GR függő folyamatnak bizonyult, így megvizsgáltuk, hogy van-e fizikai kapcsolat a 2 molekula között. A GR és a ZAP-70 fizikai kapcsolatára utaló ko-immunprecipitációs és konfokális mikroszkópiás eredményeink, miszerint a ligandkötés hatására a GR asszociálódik a ZAP-70-el, megerősítik azt a feltételezést, hogy a ZAP-70 fontos szabályozó pont lehet a TcR és a GC hormon jelátviteli utak között.

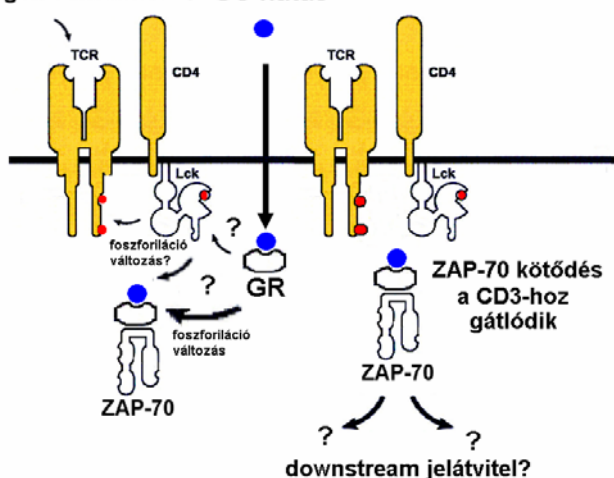
Korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy mind az inaktív GR, mind a p56-lck kapcsolódik a Hsp-90 hőszokkfehérjéhez. Ezért tisztázni kívántuk a molekulák egymáshoz való viszonyát. Ko-immunprecipitációs kísérleteink eredménye szerint a GR ligandkötés után kapcsolódik a ZAP-70-hez. A ZAP-70-et Jurkat és HeLa/ZAP-70 sejtekben is Hsp-90 asszociált molekulának találtuk, ám a kapcsolódás független volt a GC hormon jelenlététől. Mivel a p56-lck kapcsolódik a Hsp-90-hez és a ZAP-70-hez is, ezért megvizsgáltuk, hogy a GR-ZAP-70 kapcsolat függ-e a p56-lck vagy más T-sejt specifikus fehérje jelenlététől. A HeLa epitheliális karcinóma sejtekben transzgénikusan expresszált ZAP-70 hasonlóképpen asszociálódott ligand jelenlétében GR-el, mint Jurkat sejtekben. Ez az adat arra utal, hogy a p56-lck nak nincsen szerepe a GR-ZAP-70 kapcsolódásban. A Geldanamycin (GA) gátolja a Hsp-90 ATPáz aktivitását, ezáltal a fehérje elveszti chaperon funkcióját. Mivel a GA

kezelt Jurkat sejtekben is sikerült a ligand indukált GR-ZAP-70 asszociációt kimutatnunk, ezért nagy valószínűséggel kijelenthetjük, hogy a két molekula közvetlenül kapcsolódik egymással.

Az az eredményünk, hogy a DX kezelés gátolta a ZAP-70 asszociációját a CD3-komplexxel, felveti a lehetőségét annak, hogy ez a nem-genomikus GC hatás közvetlenül részt vesz a GC hormon és származékainak T-sejt aktivációt gátló, immunszuppresszív hatásában. Jelen tudásunk szerint a jelátviteli molekulák pontos térbeli és időbeli elrendeződésének kritikus szerepe van a megfelelő jelátviteli folyamatok lezajlásában. Ha a ZAP-70 dokkolása a CD3 láncok foszforilált tirozinjain gátolt, akkor a T-sejt aktiváció defektív vagy anergiához vezet.

Bár a ZAP-70 GC hatására bekövetkező foszforilációs változásai, és ezek pontos jelátviteli szerepének jellemzése még további kísérleteket igényel, eredményeink hozzájárulhatnak a GC hormon nem-genomikus hatásainak mélyebb megértéséhez.

#### Antigén stimuláció + GC hatás



#### 3. ábra.

A T-sejt jelátvitel általunk feltételezett módosulásai GC hormon jelenlétében. Feltételezzük, hogy a ZAP-70-en kívül más molekulák foszforilációja is megváltozik a GC hormon hatására, erre utalhatnak teljes sejt lizátumokban látott foszforilációs változások. A GC hormon kezelés rövid idő alatt p56-lck által mediált foszforilációs változásokat okozott a ZAP-70 kinázban. A GC kötés után a GR asszociálódik a ZAP-70-el és a ZAP-70 asszociációja gátlódik a CD3 komplexhez. Elképzelhető, hogy ez a mechanizmus is felelős a GC hormon T-sejt aktivációt gátló hatásáért. Valószínűnek tartjuk, hogy további downsteram jelátviteli folyamatok is lejártszódnak a GC hormon hatására, ezeknek a pontos tisztázásához további kísérletek szükségesek.

## **Köszönetnyilvánítás:**

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Berki Tímeának és Dr. Boldizsár Ferencnek, akik lehetővé tették, hogy részt vegyek ebben a kutatásban, és akik végig segítettek a munkámat és bíztak, amikor szükség volt rá.

Köszönöm Prof. Dr. Németh Péternek, az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy PhD hallgatóként az intézetében dolgozzam.

Köszönöm Dr. Monostori Éva (Szegedi Biológiai Kutató Központ) segítségét: mind értékes tanácsait, mind pedig a „materiális” segítséget: antitesteket, sejtvonalakat, stb.

Köszönöm a konfokális mikroszkópiában nyújtott segítséget Dr. Matkó Jánosnak, Dr. Gombos Imrének és Dr. Kiss Endrének (ELTE-TTK Immunológia Tanszék) valamint Dr. Ifj. Sétáló Györgynek és Dr. Berta Gergelynek (PTE-ÁOK Orvosi Biológiai Intézet)

Végül szeretnék köszönetet mondani minden kollegámnak az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben az érdekes tudományos vitákért, tanácsokért és a kitűnő társaságért.

**A PhD értekezés alapját képező publikációk:**

**Domokos Bartis**, Ferenc Boldizsár, Krisztián Kvell, Mariann Szabó, László Pálincás, Péter Németh, Éva Monostori and Tímea Berki: *Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 and Hsp-90* (Biochem Biophys Res Commun 354 (2007) 253-258) IF: 3,000

**Domokos Bartis**, Ferenc Boldizsár, Mariann Szabó, László Pálincás, Péter Németh and Tímea Berki: *Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells* (J Steroid Biochem Mol Biol 98. (2006) 147-154) IF: 2,715

**Egyéb publikációk:**

Ferenc Boldizsár, László Pálincás, Tamás Czömpöly, **Domokos Bartis**, Peter Németh, Tímea Berki: 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, 211 (2006), 785-796) IF: 1,812

Ferenc Boldizsár, László Pálincás, **Domokos Bartis**, Péter Németh, Tímea Berki: *Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse.* (Immunol Lett. (2003) 90. (2-3):97-102.) IF: 1,714

László Pálincás, Gergely Talabér, Ferenc Boldizsár, **Domokos Bartis**, Péter Németh, Tímea Berki: *Developmental shift in TcR mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis.* (Immunobiology, (2007) publikációra elküldve.

**Idézhető absztraktok:**

Boldizsár, F, Berki, T., Pálincás, L., **Bartis, D.**, Németh, P: *Antigen and glucocorticoid hormone (GCs) induce positive selection of DP thymocytes in a TCR transgenic mouse model.* Immunol Lett. Special Issue: Abstracts of the 15<sup>th</sup> European Immunology Congress, EFIS 2003, June 8-12, 2003, Vol. 87.(1-3) W11.09

Boldizsár, F, Czömpöly, T., Berki, T., Pálincás, L., **Bartis, D.**, Németh, P: *Real time PCR analysis of murine thymocyte glucocorticoid receptor (GCR) mRNA expression.* Immunol Lett. Special Issue: Abstracts of the 15<sup>th</sup> European Immunology Congress, EFIS 2003, June 8-12, 2003, Vol. 87.(1-3) W01.10

**D. Bartis**, F. Boldizsár, M. Szabó, L. Pálincás, P. Németh and T. Berki: *Glucocorticoid hormone elicited tyrosine-phosphorylation events involving T-cell specific kinases .* The FEBS Journal, July 2005. 272(Suppl.1): 482 Abstracts of the 30<sup>th</sup> FEBS-Congress 9<sup>th</sup> IUBMB Conference

**Előadások száma (elsőszerzős): 13 (6)**

**Poszterek száma (elsőszerzős): 17 (8)**