

# PhD TÉZISEK

## **A ZAP-70 kináz tirozinjainak szerepe a T-sejtek aktivációjában és a nem-genomikus glükokortikoid hormon hatások kialakításában**

**Dr. Szabó Mariann**



PTE KK  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

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

**Programvezető:** Prof. Dr. Németh Péter

Pécs  
**2012.**

# 1. Bevezetés

## 1.1 A T-limfociták jellemzése

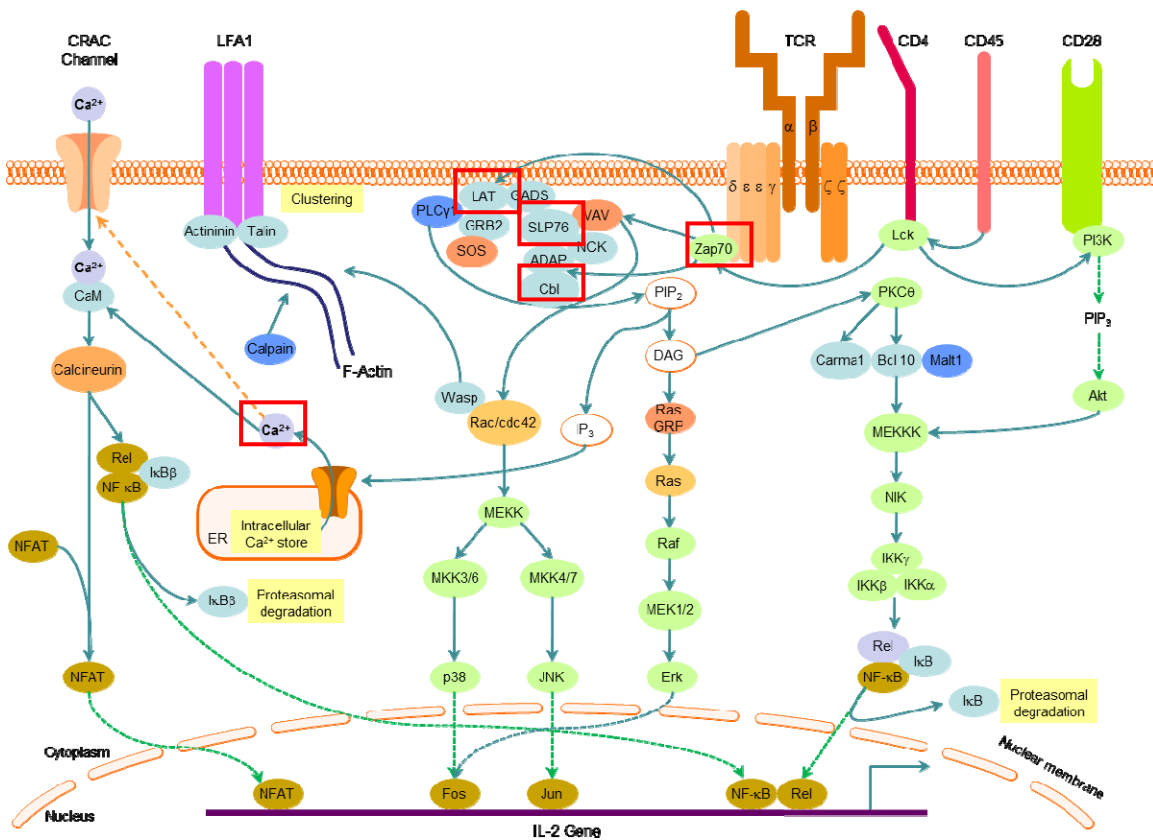
A T-limfociták az adaptív immunrendszer sejtes elemei, egészséges ember perifériás vérében a limfociták körülbelül 75-80%-át teszik ki. Alapvető szerepet töltenek be a szervezet számára idegen antigének (pl. baktériumok, vírusok, tumor sejtek) felismerésében, ezen antigének ellen irányuló védekező mechanizmusok kialakításában, valamint az immunválasz szabályozásában. Részt vesznek továbbá a saját struktúrák védelmét szolgáló tolerancia mechanizmusok kialakításában is.

### 1.1.1 A T-sejt aktiváció jelátviteli folyamatai

A megfelelő antigénnel történő találkozást követően a T-sejtekben számos jelátviteli folyamat megy végbe, ami a T-sejtek aktivációjához és másodlagos differenciálódásához vezet. A TcR csak MHC molekulák által bemutatott peptideket - az antigén proteolitikusan hasított darabjait - képes felismerni. A folyamat szigorúan szabályozott: az intracelluláris peptideket a sejttaggal rendelkező sejtek és a trombociták mutatják be MHCI-en keresztül a CD8+ Tc-sejteknek, míg az extracelluláris antigéneket a professzionális antigén prezentáló sejtek - B-sejtek, makrofágok, dendritikus sejtek - MHCII segítségével mutatják be a CD4+ Th-sejteknek. Ezt a jelenséget MHC restrikciónak nevezzük. A TcR MHC-peptid komplexhez való kötődése még nem elegendő a T-sejt aktiváció elindításához. Szükséges még, hogy a CD4/8 az MHC molekulák konstans részéhez kapcsolódjon, valamint, hogy a CD28 és CD80/86, a CD40-CD40L és további adhéziós molekulapárok között ko-stimuláció jöjjön létre. A TcR láncainak intracelluláris doménjei önmagukban nem képesek arra, hogy aktivációs jelet közvetítsenek a sejt belsejébe, a sejtben belüli jel elindításában a TcR-hoz asszociálódó CD3 komplex játszik nélkülözhetetlen szerepet. A CD3 komplex  $\gamma$ ,  $\delta$  és  $\epsilon$  láncokból áll, amikhez egy  $\zeta\zeta$  homodimer vagy  $\zeta\eta$  heterodimer kapcsolódik. A CD3 molekula komplex láncában ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) szekvenciák (YxxLx (6-8)YxxL) találhatóak, melyek tirozinjai a T-sejt aktiváció kezdeti lépései során foszforilálódnak és fontos szerepet töltenek be a jeltovábbításban.

A T-sejt aktiváció kezdeti lépései foszforilációs események sorozatából állnak. Elsőként, a valamennyi leukocitán expresszálandó CD45 molekula - egy foszfortirozin- foszfatáz - defoszforilálja az Lck 505-ös pozícióban található gátló tirozinját. Az Lck az Src nem-receptor tirozin kináz család tagja, ami a CD4/8 molekulákkal is asszociálódik. Az Src molekulacsalád másik tagja, a Fyn, szintén szerepet játszik a korai T-sejt aktivációs folyamatokban. Az Lck gátló foszfát csoportjának lehasítását követően, a TcR komplex aktivációjának hatására a 394-es tirozinon foszforilálódik és ezáltal aktiválódik. Az aktivált Lck ezt követően a CD3 komplex ITAM-jainak tirozinjait foszforilálja. A foszforilált CD3 $\zeta$  lánc dokkoló helyül szolgál a Syk családba tartozó ZAP-70 kináz számára. A ZAP-70 kinázt az Lck foszforilálja, a foszforilált ZAP-70 pedig a T-sejt aktiváció egyik központi molekulája. A kináz két fő célmolekulája a LAT és az SLP-76 adapter fehérjék. A ZAP-70 kapcsolódik (asszociál) a negatív regulátor Cbl-lel is, ami a kináz foszforilációját szabályozza. Az adapter molekulák foszforilációja egy multimolekuláris komplex kialakulásához vezet, melyben a GRB2, Ikk, GADS, Nck és Vav molekulák vesznek részt és együttesen aktiválják a PLC $\gamma$ 1-et. A PLC $\gamma$ 1 a PIP $_2$ -t hasítja, a hasítás során két másodlagos hírvivő molekula, az IP $_3$  és a DAG képződik. A DAG két fő jelátviteli út, a Ras és a PKC $\theta$  útvonalak aktivációjához vezet. A Ras a MAP-kináz kaszkád közvetítette

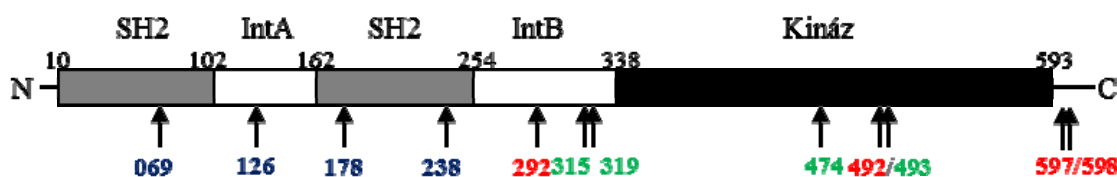
jelátviteli folyamatokat indítja el, ami végül az AP-1 transzkripciós faktor aktivációjához vezet. A PKC $\theta$  az NF $\kappa$ B út vonalat aktiválja, ami szintén transzkripciós folyamatokat szabályoz. Az IP $_3$  az endoplazmatikus retikulumban (ER) raktározódó (intracelluláris Ca $^{2+}$  raktár) Ca $^{2+}$  felszabadulását indukálja, amit a plazma membrán Ca $^{2+}$ -csatornáinak megnyílása követ (kapacitatív influx). A megnövekedett intracelluláris Ca $^{2+}$  szint a kalcineurint, a kalmoduleint, végül az NFAT transzkripciós faktort aktiválja. A T-sejt aktiváció jelátviteli útjai végül számos transzkripciós faktort pl. AP-1, NFAT, NF $\kappa$ B aktiválnak, ami komplex géneexpressziós változásokhoz vezet a T-sejtekben. Az immunválasz beindításában kiemelkedő fontosságú két géntermék: az IL-2 citokin, valamint az IL-2 receptor  $\alpha$  lánc. Az IL-2 az aktivált T-sejteken megjelenő  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  láncokból felépülő nagy affinitású receptorához kötődik, autokrin mechanizmusok révén szabályozza a T-sejt aktivációt, illetve indukálja a környező T-sejtek növekedését is.



1. ábra: A T-sejt aktiváció jelátviteli útjai. Részleteket lásd a szövegben. Átvéve: <http://www.cellsignal.com/pathways/lymphocyte.jsp>- Cell Signaling Technology. Bekeretezve azok a molekulák illetve a Ca $^{2+}$ , amikkel kísérleteink során részletesen foglalkoztunk.

## 1.1.2 A ZAP-70 kináz

A ZAP-70 kináz a Syk nem-receptor tirozin kináz család tagja, T-sejtekben, NK-sejtekben és bazofil granulocitákban expresszálódik. A molekula két N-terminális SH2 doménből és egy C-terminális kináz doménből épül fel, melyeket az interdomén A és B választanak el egymástól. A kinázt az Lck foszforilálja, de a molekulában autofoszforiláció is végbemegy. A ZAP-70 31 tirozin (Y) maradéka közül tömegspektrometriás mérések eredményei alapján 11-nek tulajdonítanak szerepet a T-sejt aktivációban. Ezek között található olyanok, melyek ismert aktivációs, vagy gátló helyek, illetve olyanok is, amelyek funkciója még ismeretlen. Keveset tudunk az SH2 doménben és az interdomén A-ban található Y069, Y126, Y178 és Y238-ról, bár a Y126 feltehetően szerepet játszik a kináz autofoszforilációjában. Az interdomén B-ben 3 tirozin található a 292, 315 és 319-es pozícióban. A Y292 gátló szerepet tölt be a T-sejt aktivációban és dokkoló helyként szolgál a Cbl számára. A Y315-höz a Vav és a CrkII kötődik, ez a tirozin maradék pozitív és negatív szabályozó szerepet is betölt a T-sejt aktivációban. A Y319 egy pozitív szabályozó tirozin és fontos szerepet játszik a PLC $\gamma$ 1 és a Ras közvetítette jelátviteli utakban, valamint asszociálódik az Lck-val. Az interdomén B-ben található tirozinok a tímuszban zajló pozitív és negatív szelekciót is befolyásolják. A kináz doménben 3 tirozin maradéknak tulajdonítanak szerepet a T-sejt aktivációban. A Y474-hez az Shc kötődik. A Y492 gátló, míg a Y493 aktivációs szerepet tölt be a T-sejt jelátviteli folyamatokban. A Y597 és a Y598 negatív szabályozó helyek.



**2. ábra: A ZAP-70 kináz szerkezete és a T-sejt aktivációban részt vevő tirozin maradékai.**  
In: Szabo M, Czompoló T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87.

A ZAP-70 kináz fontos szerepét bizonyítja az, hogy a molekula hiányában, emberben súlyos kombinált immundeficiencia, SCID alakul ki. A betegek Tc-sejtjei csaknem teljesen hiányoznak, míg a Th-sejtek száma normális, vagy emelkedett, de a jelátvitel bennük is zavart szenved.

A ZAP-70-et kódoló gén missense mutációja figyelhető meg az SKG egérben. Ezekben az egerekben spontán alakul ki autoimmun artritisz. A mutáció egy W163C csere a C-terminális SH2 doménben. Ez az egérmodell felhívja a figyelmet arra, hogy a ZAP-70 kináz mutációja autoimmun betegségek kialakulásában is szerepet játszhat.

A ZAP-70 megjelenik B-sejtes leukémiában is (normál B-sejtek a Syk molekulát expresszálják). A B-CLL-t a CD19+, CD5+, CD23+ B-sejtek klonális felszaporodása jellemzi. A betegség lefolyása heterogén, ezért számos kísérletsorozatot végeznek olyan faktorok felkutatására, amik a betegség lefolyását előre jelezhetik. A CD38 expresszió és az Ig nehéz lánc variábilis régiójának mutációs állapota mellett a sejtek ZAP-70 pozitivitása is a betegség rossz prognózisára utalhat.

## **1.2 A glükokortikoid hormonok (GC)**

### **1.2.1 A glükokortikoid hormonok szintézise és élettani hatásai**

A GC-ok a mellékvese szteroid hormonjai, a mellékvesekéreg zona fasciculátájában koleszterinből szintetizálódnak. Hatásaikat a glükokortikoid receptorokon (GR) keresztül fejtik ki, amik a sejtmagi receptorok családjába tartoznak. A GC-ok számos metabolikus folyamatot befolyásolnak, növelik a vércukor szintet, stimulálják a májban a glükoneogenezist, elősegítik az aminosavak és a zsírsavak metabolizmusát, valamint negatív „feedback” révén gátolják a CRH és az ACTH kibocsátását. A GC-ok nemcsak metabolikus folyamatokat szabályoznak, hanem összetetten befolyásolják az immunrendszer működését is. Csökkentik a bazofil és neutrofil granulociták, valamint a hízósejtek számát, apoptózist indukálnak a Th1-, Th2- és B-sejtekben, a neutrofil és az eozinofil granulocitákban. A T-sejt jelátvitel gátlása révén csökkentik a citokinek, különösen az IL-2 szintézisét. Növelik viszont a regulátoros T-sejtek és a Th17-sejtek számát.

### **1.2.2 A glükokortikoidok (GC) hatásmechanizmusai**

#### **1.2.2.1 Genomikus glükokortikoid hatások**

A klasszikus genomikus hatás során a GC-ok miután átdiffundálnak a sejtmembránon, citoplazmatikus receptorukhoz kötődnek. Ligand kötést követően a GR konformációváltozáson megy keresztül, disszociál a hősokk fehérjéről és dimerizálódik. A ligand kötött, dimerizálódott GR a sejtmagba transzlokálódik, ahol glükokortikoid válasz elemekhez (GRE) kötődik. A negatív GRE-hez való kötődés transzrepressziót, míg pozitív GRE-hez történő kötődés transzaktivációt eredményez és immunszuppresszív hatások kialakulásához vezet. A GR közvetlenül is képes pro-inflammatórikus transzkripció faktorokat gátolni. Ezen folyamatok kialakulásához órákra, napokra van szükség.

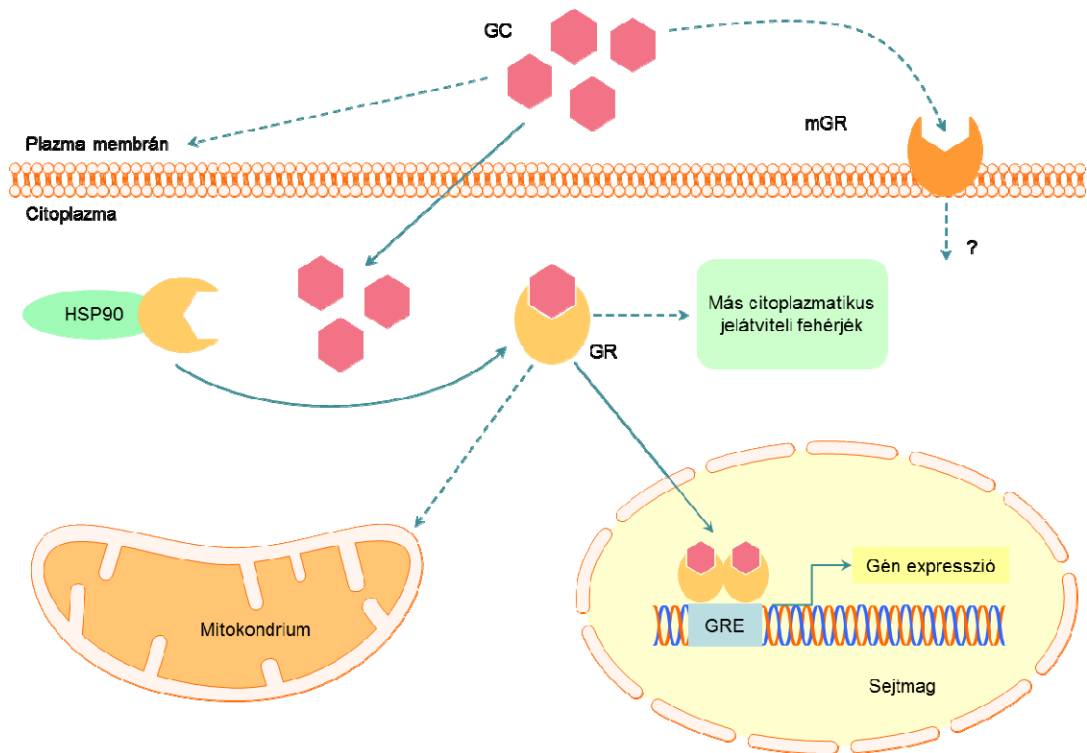
A GC-ok nem minden hatása magyarázható a genomikus folyamatokkal. Ezért az utóbbi időben intenzív kutatások tárgyát képezik a glükokortikoidok nem-genomikus hatásmechanizmusai.

#### **1.2.2.2 Nem-genomikus glükokortikoid hatások**

A GC-ok nem-genomikus hatásai rövid időn belül (percek alatt), nagy dózisú (30 mg–1g/nap) GC kezelés hatására alakulnak ki. Ezt a dózist alkalmazzák asztmás roham és anafilaxiás reakciók kezelése során, transzplantációkor lökésterápiában, valamint autoimmun betegségek fellángolása esetén.

A nem-genomikus GC hatások a következők lehetnek:

- i) membrán GR közvetítette hatások;
- ii) direkt hatások a plazmamembránon keresztül;
- iii) mitokondriális hatások;
- iv) a GR kölcsönhatása citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel.



**3. ábra: A GC genomikus (folytonos vonal) és nem-genomikus (szaggatott vonal) hatásmechanizmusai.** Átvéve: 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 Jul; 215:521-6.

### 1.2.3 A ZAP-70 kináz szerepe a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában

Intézetünkben végzett korábbi kísérletekben Jurkat T-sejtes leukémia sejtekben vizsgáltuk a GC-ok nem-genomikus hatásait. Rövid idejű, nagy dózisu dexamethasone (DX-glükokortikoid analóg) kezelés önmagában foszforiláció növekedéshez vezetett Jurkat sejtek lizátumában, a DX előkezelés pedig gátolja az anti-CD3 indukálta foszforiláció növekedést.

Kísérleteink során részletesen vizsgáltuk a ZAP-70 kinázt, a T-sejt aktiváció egyik központi molekuláját. Rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés a ZAP-70 foszforiláció növekedéséhez vezetett, ami anti-CD3 és DX kombinált kezelés hatására még további foszforilációt indukált. Tovább vizsgálva a ZAP-70 szerepét a nem-genomikus GC hatásokban, az alábbi modellt állítottuk fel. Ligand hiányában a GR, az Lck és a ZAP-70 multimolekuláris komplexet alkot a HSP-90-el a sejtmembrán közeli régióban. Néhány perces GC kezelést követően a GR disszociál a HSP-90-ről és asszociál az Lck által foszforilált ZAP-70 kinázzal.

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.

## 2. Célkitűzések

Kísérleteink célja az volt, hogy a ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak szerepét vizsgáljuk a T-sejtek aktivációjában és a GC-ok nem-genomikus hatásainak kialakításában.

1. Olyan rendszert kívántunk létrehozni, amiben a ZAP-70 tirozinjait külön-külön vizsgálhatjuk. Ehhez P116 sejteket (ZAP-70 deficiens Jurkat sejt vonal) transzfektáltunk lentivirális vektorral, mely vad típusú (kontroll) vagy pontmutáns ZAP-70-et kódol. A mutáns sejt vonalakban a 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492, 493 pozícióban található tirozinokat fenilalaninra cseréltük.

2. Ebben a rendszerben először jellemezni kívántuk a ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak szerepét a T-sejt aktivációban, különös tekintettel a még ismeretlen funkciójú Y069, Y126, Y178 és Y238 maradékokra.

- Vizsgálni kívántuk a ZAP-70 tirozinjainak szerepét az aktiváció indukálta intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában.

- Tisztázni szeretettük volna, hogy mi a funkciója a ZAP-70 egyes tirozinjainak a kináz autoregulációjában.

- Az SLP-76 és a LAT a ZAP-70 kináz szubsztrátjai és fontos szerepet játszanak az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában. Ezért tanulmányozni kívántuk, hogy a ZAP-70 tirozinjainak pontmutációi hogyan befolyásolják az anti-CD3 indukálta SLP-76 és LAT foszforilációt.

3. Intézetünkben végzett korábbi kísérletek szerint a ZAP-70 kináz szerepet játszhat a nem-genomikus GC hormon hatások kialakításában. Rövid idejű, nagy dózisu GC analóg kezelés a ZAP-70 foszforiláció növekedését és a ZAP-70-GR asszociációját indukálta. A ZAP-70 aktiváció indukálta foszforiláció növekedését a GC kezelés tovább fokozta.

- Jelen kísérleteinkben jellemezni kívántuk, hogy a ZAP-70 kináz mely tirozinjai vesznek részt a GC-ok nem-genomikus hatásmechanizmusainak kialakításában, valamint hogy a Y-F aminosav csere megváltoztatja-e a ZAP-70-GR asszociációt.

- Elemezni szeretettük volna a ZAP-70 szubsztrátjainak, az SLP-76, a LAT és a Cbl molekuláknak a szerepét a nem-genomikus GC hatások kialakításában.

- Tanulmányozni kívántuk, hogy ZAP-70 azon tirozin maradékai, amelyek a nem-genomikus GC hatásokat közvetítik, befolyásolják-e a ZAP-70 szubsztrátjainak - SLP-76, LAT, Cbl - GC indukálta foszforiláció változását.

- Vizsgáltuk, hogy GC előkezelés hogyan befolyásolja az anti-CD3 indukálta T-sejt aktiváció jelátviteli útvonalait: az SLP-76, LAT és Cbl molekulák foszforilációját, valamint az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1 Vegyszerek és pufferek**

A kísérletekhez a vegyszereket a Sigma Aldrich Kft-től rendeltük. A máshonnan rendelt termékeket jelezzük.

#### **3.2 A humán ZAP-70 klónozása és célzott mutagenezise**

A teljes hosszúságú humán ZAP-70 kódoló szekvencia (WT ZAP-70) amplifikálásához P1 (forw) és P2 (rev) primereket használtunk (olvadási hőmérséklet: 57°C; termék hossza: 1881bp), amelyek BamH1 és SalI restriktációs helyeket tartalmaztak. A klónozás során a PCR-hoz templátként humán perifériás T-sejtekből izolált totál RNS transzkripcióját követően létrehozott cDNS könyvtárt használtunk. A PCR termékeket tisztítottuk és TA vektorba klónoztuk, amihez az InsTAclone PCR klónozó kitet (Fermentas) használtuk a gyártó útmutatásának megfelelően, majd a plazmidot az inzerttel együtt szekvenáltuk.

A humán ZAP-70 célzott mutagenezisét 2 lépésben végeztük és ehhez a TA klónozott WT szekvenciát használtuk templátként. Először a PCR reakciókhoz olyan primereket használtunk, amik a Y-F pontmutációkat tartalmazták a különböző aminosav pozíciókban. Az alábbi forward és reverse primer kombinációkat használtuk: P1-P069, P1-P126, P1-P178, P1-P238, P1-292, P315-P2, P492-P2, P493-P2. A PCR termékeket tisztítást követően megaprimerként használtuk a második PCR-hoz P1-el vagy P2-vel párban, hogy a végül Y-F pontmutációt tartalmazó teljes hosszú ZAP-70 konstrukciót létrehozzuk. Az így kapott termékeket TA klónoztuk és a mutációk ellenőrzésére szekvenáltuk. Valamennyi PCR reakcióhoz a Proof Start DNA Polymerase (Qiagen) kitet használtuk a gyártó útmutatása szerint.

#### **3.3 A ZAP-70 konstrukciók lentivirális transzfekciója ZAP-70 deficiens P116 sejtekbe**

A P116 sejteket transzfektáltuk lentivirális vektorral, ami pontmutáns vagy teljes hosszúságú, vad típusú (WT) ZAP-70-et kódoló cDNS-t tartalmazott. A pontmutáns vagy WT ZAP-70 cDNS-t inzertáltunk a pWPST lentivirális transzfer plazmidba, az EF1 promóter mögé. Ez a második generációs lentivirális konstrukció cPPT és WPRE elemeket tartalmaz, melyek a transzgén integrációját és expresszióját növelik. A lentivírus termeléshez egy envelope konstrukciót (pMD.G), egy csomagoló plazmidot (R8.91) és a transzfer plazmidot (pWPTS-EF1-ZAP-70) ko-transzfektáltunk kalcium-foszfát módszert használva kloroquinnal (1mM végső koncentráció) előkezelt 293T sejtekbe. 24 óras inkubációt követően a vírustermelő sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, lecentrifugáltuk (2000 rpm, 10 min, 4°C) és átszűrtük (0.45µm pórusméretű PVDF filter), hogy a sejtmarmadványoktól megszabaduljunk. A P116 sejteket spinokulációval transzfektáltuk, MOI=10 arányban (MOI: transzfektáló vírus/sejt arány).



### 3.4 Sejtvonalak

A Jurkat, a P116 (ZAP-70 deficiens Jurkat szubklón (Prof. Monostori Éva (SZBK) bocsátotta rendelkezésünkre) és a WT vagy pontmutáns ZAP-70-el transzfektált P116 sejteket szokásos körülmények között (37°C, megfelelő páratartalom, 5% CO<sub>2</sub>) tenyésztettük. A tenyésztéshez 10% FCS (Gibco) tartalmú médiumot használtunk, amit nátrium-piruváttal (1mM), glükózzal (4,5g/l), penicillinnel és sztreptomocinnal egészítettünk ki.

### 3.5 Antitestek

A Western blotok előhívását az alábbi antitestekkel végeztük: egér monoklonális anti-foszfotirozin (klón PY20, 1:5000, BD Pharmingen); anti-ZAP-70 (klón 29 / ZAP-70 kináz, 1:5000, BD Pharmingen); egér monoklonális anti-β-aktin (klón AC-74, 1:50000, Sigma); nyúl poliklonális anti-SLP76 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti-LAT (1:500, Santa Cruz Biotechnology); anti-Cbl (1:500, Santa Cruz Biotechnology) és egér monoklonális anti-GR (klón 5E4, Intézetünkben készített hibridómából). Másodlagos antitestként HRPO konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000, Hunnavix) vagy anti-nyúl IgG (1:1000, Pierce) antitesteket használtunk.

Az immunprecipitációkat egér monoklonális anti-SLP76 (klón F-7, 2 µg / minta, Santa Cruz Biotechnology); anti-LAT (klón 11B.12, 2 µg / minta, Santa Cruz Biotechnology); anti-Cbl (klón A-9, 2 µg / minta, Santa Cruz Biotechnology) és nyúl poliklonális anti-ZAP-70 (Prof. Monostori Éva (SZBK) bocsátotta rendelkezésünkre) antitestekkel végeztük.

Az áramlási citometriás méréseknél alkalmazott anti-ZAP-70 antitestek a kináz 2 különböző epitópját ismerik fel: az egér anti-ZAP-70-FITC (klón 2F3.2, Upstate Biotechnology) az 1-254 AA közötti epitóphoz, míg az egér anti-ZAP-70-PE (klón 1E7.2, eBioscience) a 282-307AA közötti epitóphoz kötődik.

A Foszfó-Flow módszerrel végzett mérésekhez foszfospecifikus PE-konjugált egér anti-SLP-76 pY128 (klón J141-668.36.58, BD Biosciences) és egér anti-LAT pY171 (klón I58-1169, BD Biosciences) antitesteket használtunk.

### 3.6 Intracelluláris jelölés és áramlási citometria a ZAP-70 expresszió mérésére

Mintánként 10<sup>6</sup> sejtet fixáltunk és szaponin pufferben permeabilizáltunk (PBS/0,1% NaN<sub>3</sub>/0,1% BSA/0,1% szaponin). A sejteket permeabilizáló pufferben vettük fel és a különböző anti-ZAP-70 antitestekkel 45 percen keresztül inkubáltuk jégen. Ezt követően a mintákat kétszer mostuk szaponin pufferben és egyszer PBS/0,1% BSA/0,1% NaN<sub>3</sub>-ban. Az áramlási citometriás mérést és analízist a FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük. A sejteket az FSC/SSC paramétereik alapján azonosítottuk és mintánként 10000 eseményt mértünk. Az átlag fluoreszcencia intenzitás értékeket (MFI) a hisztogramok alapján kalkuláltuk. Jelöletlen, valamint a megfelelő izotípus kontroll antitesttel inkubált mintákat használtunk negatív kontrollként.

### 3.7 A sejtek kezelése

Kezelés előtt a sejteket RPMI médiumban vettük fel. A TcR/CD3 útvonal vizsgálatára a sejteket anti-humán-CD3 (klón OKT-3; ATCC CRL-8001, 1 mg/ml törzsoldat) antitesttel

inkubáltuk  $5\mu\text{l}/10^6$  sejt koncentrációban 2 percig. A nem-genomikus glükokortikoid hatások kiváltására a sejteket  $10^{-5}\text{M}$  dexametazonnal (DX- szintetikus glükokortikoid analóg, DMSO-ban oldva) inkubáltuk 2 percig. Ez a koncentráció megfelel a klinikumban alkalmazott nagy dózisú szteroid kezelésnek. Kombinált kezelés esetén 2 perces DX előkezelést további 2 perces anti-CD3 aktiváció követett. A kezeléseket  $37^\circ\text{C}$ -on, állandó keverés mellett Thermo Mixer (Eppendorf) készüléken végeztük. A Western blothoz a reakciót folyékony nitrogénben, a Foszfó-Flow mérésekhez 4% PFA-ban állítottuk le. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel vizsgálatokhoz a kombinált kezelés esetén a sejteket 10 percig  $10^{-5}\text{M}$  DX-al kezeltük elő.

### 3.8 Immunprecipitáció, Western blot

A kontroll vagy kezelt mintákat Triton X lízis pufferben (50mM HEPES, 10mM nátrium-pirofoszfát, 10mM EDTA, 100mM nátrium-fluorid, 10% glicerol és 1% Triton X-100, pH 7,3 frissen kiegészítve proteáz gátlóval és Na-ortovanadáttal) lizáltuk 30 percig jégen, majd 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. A felülúszót SDS mintapufferben (125mM Tris, 4% SDS, 10 % glicerol, 0,006% Bromo-fenol-kék és 10% merkaptotanol) főztük 10 percig, vagy immunprecipitációhoz használtuk tovább.

Immunprecipitáció során a sejtek lizátumát, a blokkoló puffert (TBS, 10% BSA és 0,1%  $\text{NaN}_3$ ) és a megfelelő mennyiségű antitestet (ld. 3.5 fejezet) éjszakán át, majd Protein-G-vel (GE Healthcare) további 2 órán keresztül inkubáltuk. A mintákat 5-ször mostuk WB-mosóval (10mM Tris, 100mM nátrium-klorid és 0,1% Tween-20, pH 7.4), majd az immunkomplexeket SDS mintapufferben 10 perces forralás során választottuk le a Protein-G-ről.

A lizátumokat és a precipitátumokat 7,5% vagy 10%-os SDS-poliakrilamid gélben választottuk el a MiniProtean rendszerben (Bio-Rad), majd éjszakán át nitrocellulóz membránra blottoltuk a Trans-Blot (Bio-Rad) készülékben. Blottolást követően a membránokat blokkoló pufferben (2% BSA vagy 5% NFD (Bio-Rad), 10mM Tris, 100mM nátrium-klorid, 0,1% Tween-20, pH 7,4) telítettük egy órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően a megfelelően hígított elsődleges antitestekkel (ld. 3.5 fejezet) inkubáltuk a blotokat 2 órán át szintén szobahőmérsékleten. A membránokat WB-mosóval mostuk, majd mosást követően HRPO konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Újabb mosást követően a blotokat Super Signal West Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) hívtuk elő. A jeleket a Fuji LAS4000 készülékkel detektáltuk. Az elsődleges és másodlagos antitesteket Restore Western Blot Stripping pufferrel (Pierce) távolítottuk el a membránról és blokkolást követően további antitestekkel hívtuk elő őket. A kapott jeleket denzitometriás méréssel kvantifikáltuk, amit Scion Image software (Scion Corporation) segítségével végeztünk.

### 3.9 Az intracelluláris kalcium szint mérése áramlási citometriával

A szabad intracelluláris kalcium szint méréséhez a sejteket Fluo-3AM (Invitrogen) kalcium szelektív indikátor festékkel töltöttük föl. Az áramlási citometriás méréseket és az eredmények analízisét a FACSCalibur áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük. 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. Az FL1 intenzitásban észlelt változások arányosak az intracelluláris kalcium szintjével.

### **3.10 Az anti-CD3 indukálta foszforiláció változások mérése Foszfo-Flow technikával**

A nyugvó vagy anti-CD3 kezelt 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% NaN<sub>3</sub>-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. Az áramlási citometriás mérést és analízist a FACS Calibur (Becton Dickinson) áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük

### **3.11 Statisztika**

Munkánk során a diagramokon az adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk. A Student-féle t-tesztet használtunk a különböző csoportok eredményeinek összehasonlítására és a  $P < 0,05$  eltérést fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1 Tirozin (Y)-fenilalanin (F) pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expressziójának vizsgálata

A ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak vizsgálatára olyan transzgénikus Jurkat sejteket hoztunk létre, amelyek stabilan expresszálnak Y-F pontmutáns ZAP-70-et. Ehhez P116 sejteket transzfektáltunk lentivirális vektorral, ami WT vagy Y-F pontmutáns ZAP-70-et kódol. A pontmutáns sejtekben a 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 és 493 pozícióban lévő Y maradékokat cseréltük F-ra. Az egyes pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expresszióját Western bloton és intracelluláris jelölést követően áramlási citometriás mérésekkel ellenőriztük. Áramlási citometriás mérések során 2 antitestet használtunk, melyek a ZAP-70 kináz 2 különböző epitópját ismerik fel, míg a Western blothoz használt antitest a ZAP-70 egy további epitópjához kötődik.

A ZAP-70 kináz valamennyi transzgénikus sejtvonalonban hasonló mértékben expresszálódik. Kivételt képez ez alól az F238-ZAP-70 sejtvonala. A P116 sejteket háromszor próbáltuk transzfektálni az F238-ZAP-70 konstrukciót kódoló vektorral, de egyszer sem sikerült az F238-at expresszáló sejtvonalat létrehozni, bár a szekvencia és a restriktációs elemzések szerint a konstrukciónk teljes volt. A Y238 vizsgálata azért lett volna különösen érdekes munkánk során, mert az előzetes szekvencia elemzések alapján ez a Y maradék egy potenciális ITIM motívum ( $^{236}\text{VEYLKL}^{241}$ ) része lehet. Nincs direkt bizonyítékunk arra, hogy az F238-ZAP-70 expresszió miért nem volt sikeres, de feltételezzük, hogy a mutáció olyan posztranszlációs módosulásokat befolyásol, amik a molekula inkomplett vagy károsodott foldingjához és ennek következtében lebomlásához vezethetnek.

A F292-ZAP-70 sejtvonala nem jelölődött az anti-ZAP-70-PE antitesttel (1E7.2 klón), ami azzal magyarázható, hogy az antitest a kináz 284-307 aminosavak közötti szakaszát ismeri fel és az F292-ZAP-70 sejtvonala esetében a pontmutáció éppen ebben az epitópban található.

### 4.2 A T-sejt aktiváció vizsgálata a Y-F ZAP-70 pontmutáns sejtekben

#### 4.2.1 Az anti-CD3 indukálta intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -jel változása ZAP-70 pontmutáns sejtekben

Következő kísérleteinkben az vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 különböző pozícióiban létrehozott pontmutációk hogyan befolyásolják az aktiváció indukálta intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását. ZAP-70 hiányában a T-sejt aktiváció korai fázisban gátlódik, így intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedés sem alakul ki. Ahogy azt korábbi kísérleteink során már megfigyeltük, a WT-ZAP-70-el transzfektált P116 sejtekben a Jurkat sejtekhez hasonló  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet lehetett detektálni, azaz a ZAP-70 expresszió helyreállította a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet.

A ZAP-70 Y-F pontmutációi különbözőképpen befolyásolták az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását. A gátló funkciójú Y292 és Y492 aminosavak cseréje F-ra – a vártak megfelelően – a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtvonallalhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet eredményezett anti-CD3 kezelést követően. A Y-F

aminosav csere az aktivációs 493-as pozícióban teljes mértékben gátolta az anti-CD3 indukálta intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását. A szomszédos Y492 és Y493 ellentétes funkcióját a  $Ca^{2+}$  méréseink is igazolták. A szabályozó/aktivációs Y315 mutációja részleges  $Ca^{2+}$ -jel csökkenéshez vezetett.

Az F069-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalban szignifikánsan nagyobb  $Ca^{2+}$ -jelet kaptunk, mint a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekben. A Y126 mutációja a Y315 mutációjához hasonló részleges  $Ca^{2+}$ -jel csökkenéshez vezetett.

#### **4.2.2 A ZAP-70 kináz Y aminosav maradékainak pontmutációi megváltoztatják az anti-CD3 indukálta tirozin foszforiláció mintázatát és a ZAP-70 autoregulációját**

Western bloton először azt vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 pontmutációi hogyan befolyásolják a sejtvonalak anti-CD3 indukálta tirozin foszforiláció mintázatát. A 35, 55, 70 (feltehetően a ZAP-70) és a 115 kDa molekulásúlynak megfelelő fehérjékben jelentős foszforiláció különbségeket találtunk. A F292-ZAP-70-et expresszáló sejtvonal lizátuma hiperfoszforilációt mutatott a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekhez viszonyítva. Ahogy vártuk, a ZAP-70 deficiens P116 sejtek nem aktiválódtak anti-CD3 kezelés hatására. Az F493-ZAP-70-et expresszáló sejtvonal 70 kDa-os csíkja (feltehetően a ZAP-70 kináz) anti-CD3 kezelés hatására fokozottan foszforilálódott.

Annak megerősítésére, hogy a lizátumon látott 70kDa molekulásúlyú csík valóban a ZAP-70-nek felel meg, immunprecipitációt végeztünk anti-ZAP-70 antitesttel. Anti-CD3 kezelést követően az F292 és F493-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalak mutattak növekedett ZAP-70 foszforilációt a WT-ZAP-70-et expresszáló mintákhoz viszonyítva. A Y-F aminosav csere a 315-ös pozícióban a kináz csökkent foszforilációját eredményezte. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a ZAP-70 specifikus Y maradékainak mutációi befolyásolják a kináz autofoszforilációját (autoregulációját) is.

#### **4.2.3 Az SLP-76 és a LAT foszforilációját a ZAP-70 specifikus Y aminosav maradékai szabályozzák**

Az SLP-76 és a LAT a ZAP-70 szubsztrátjai, amik fontos szerepet játszanak a  $PLC\gamma$  aktivációjában és így az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel szabályozásában. Ezért immunprecipitációt követően Western bloton vizsgáltuk ezen két fehérje foszforilációját.

Aktivációt követően az SLP-76 hiperfoszforilációját találtuk a F069-, F178-, F292, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben WT-ZAP-70-et expresszáló mintákhoz viszonyítva. A Y-F aminosav csere a ZAP-70 493-as pozíciójában gátolta az SLP-76 foszforilációját.

A LAT esetében a ZAP-70 Y292 és Y315 mutációja emelkedett, míg a Y493-é csökkent foszforilációt eredményezett anti-CD3 kezelést követően a WT aktivált mintához viszonyítva.

A Foszfo-Flow módszer segítségével a foszforilációs események még pontosabban, Y specifikus módon vizsgálhatók. Foszfo-specifikus antitestek segítségével elemeztük az SLP-76 Y128 és a LAT Y171 foszforilációját mind nyugvó, mind anti-CD3 aktivált pontmutáns sejtekben. Szignifikánsan csökkent SLP-76 Y128 foszforilációt mértünk az anti-CD3 stimulált F493-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalban a WT-ZAP-70-transzfektált

P116 sejtekhez viszonyítva. Ez összhangban volt az immunprecipitációs kísérletek eredményével és arra utal, hogy az SLP-76 Y128 tirozinjának foszforilációja a ZAP-70 Y493 foszforilációjától függ. Jelentős SLP-76 Y128 foszforiláció csökkenést kaptunk anti-CD3 kezelést követően az F126-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben (MFI változás:  $2.1 \pm 0.1$ ,  $2.5 \pm 0.6$  és  $1.3 \pm 0.1$ ) a WT-ZAP-70 transzfektált sejtekhez viszonyítva (MFI változás:  $4.5 \pm 1.31$ ).

A Y-F aminosavcsere az SLP-76 Y128 nyugalmi hiperfoszforilációjához vezetett az F126, F178- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ami arra utalhat, hogy a ZAP-70 ezen tirozin maradékai gátló szerepet tölthetnek be a kináz foszforilációs állapotának szabályozásában.

A Y-F aminosavcsere a kináz 492-es pozíciójában a LAT-Y171 hiperfoszforilációjához vezetett nyugvó sejtekben. Az immunprecipitációs eredményekhez hasonlóan a LAT Y171 anti-CD3 indukálta foszforilációját a ZAP-70 Y493 pontmutációja gátolta.

### **4.3 A nem-genomikus glükokortikoid (GC) hatások vizsgálata a Y-F pontmutáns ZAP-70-et expresszáló sejtvonalakban**

#### **4.3.1 A ZAP-70 kináz tirozinjainak pontmutációja megváltoztatja a DX indukálta foszforiláció mintázatot**

Korábbi eredményeink szerint rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés hatására számos jelátviteli molekula mutat emelkedett foszforilációt Jurkat sejtekben. Jelen kísérleteinkben Western bloton vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 kinázban létrehozott Y-F aminosavcsere hogyan változtatja meg 2 perces DX kezelést követően az egyes sejtvonalak foszforiláció mintázatát. Az F069-, F126-, F178- és F238-ZAP-70-et expresszáló sejtek csak mérsékelt foszforiláció emelkedést mutattak DX kezelés hatására és a foszforiláció mintázat molekulaszúly szerinti eloszlása is eltérő volt az egyes sejtvonalakban. A 315 és 492 pozíciókban létrehozott aminosavcsere általános hiperfoszforilációt eredményezett a WT-ZAP-70-et expresszáló DX kezelt sejtekhez viszonyítva. A 20, 36, 48, 56 és 70 kDa (feltehetően a ZAP-70) molekulaszúlynak megfelelő fehérjék jelentős foszforiláció különbségeket mutattak.

#### **4.3.2 A ZAP-70 kináz Y315 és Y492 maradékai vesznek részt a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában**

Korábbi eredményeink szerint 2 perces, nagy dózisu DX kezelés a ZAP-70 kináz foszforilációjához és GR asszociációjához vezet. Jelen kísérleteinkben anti-ZAP-70 antitesttel végzett immunprecipitációt követően azt vizsgáltuk, hogy a kináz egyes tirozinjainak pontmutációja befolyásolja-e a GC-analóg kiváltotta foszforilációt és a ZAP-70-GR asszociációt. A WT DX kezelt mintához viszonyítva, szignifikáns foszforiláció csökkenést kaptunk azokban a sejtvonalakban, amelyekben az aminosavcsere a 315 és 492 pozíciókban történt, így feltételezzük, hogy a nem-genomikus glükokortikoid hatások közvetítésében a ZAP-70 ezen két tirozin maradéka vesz részt. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a fent leírt foszforiláció változások megváltoztatják-e a ZAP-70-GR ko-precipitációt. Rövid idejű, nagy dózisu DX kezelés a WT és valamennyi pontmutáns sejtvonalon növekedett ZAP-70-GR asszociációt eredményezett. Az F315 és F492-ZAP-70-et

expresszálo 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.

### **4.3.3 Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatásai a TcR/CD3 jelátviteli utakra**

A sejtek lizátumából készített Western blotokon látható, hogy a ZAP-70 kináz mellett további molekulák foszforilációja is megváltozik rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatására. A T-sejt aktiváció során a ZAP-70 szubsztrátjai az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulák, ezért WT-ZAP-70-et expresszálo P116 sejtekben tovább vizsgáltuk, hogy ezen molekulák foszforilációja megváltozik-e 2 perces DX kezelés hatására. A DX kezelés önmagában megnövelte az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációját is.

Klinikai szempontból a TcR/CD3 és a nem-genomikus GC hatások által kiváltott jelátviteli utak kapcsolódási pontjai különösen fontosak, mivel feltételezhetően ezen mechanizmusok állnak az immunszuppresszív hatások kialakításának hátterében. Ennek modellezésére kombinált kezelést (DX+anti-CD3) alkalmaztunk. A kísérleteink során használt DX koncentráció megfelel a klinikumban alkalmazott nagy dózisú szteroid kezelésnek. Korábbi eredményeink szerint ez a kombinált kezelés a ZAP-70 hiperfoszforilációjához vezetett, akár a csak DX-al vagy a csak anti-CD3-mal kezelt mintákhoz viszonyítottuk a foszforilációt.

Jelen eredményeink szerint a DX kezelés részben gátolta az SLP-76 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. A Cbl anti-CD3 és kombinált kezelések hatására is foszforilálódott, de ennek mértéke nem érte el azt a tirozin foszforiláció növekedést, amit a DX önmagában okozott.

Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -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  $Ca^{2+}$ -jelet.  $10^{-5}M$  DX kezelés az intaracelluláris  $Ca^{2+}$  szint szignifikáns csökkenéséhez vezetett a csak anti-CD3-mal kezelt mintához viszonyítva.

### **4.3.4 A ZAP-70 Y-F pontmutációja a 315 és 492 pozíciókban meggátolja a rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés indukálta SLP-76 és Cbl foszforilációt**

Ahogy az 4.3.2 fejezetben bemutattuk, a ZAP-70 315 és 492 tirozinjai vesznek részt a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában. Megállapítottuk továbbá, hogy az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulák a ZAP-70 célmolekulái lehetnek a nem-genomikus glükokortikoid jelátvitelben. Annak megerősítésére, hogy a ZAP-70 315 és 492 tirozinjai valóban részt vesznek a nem-genomikus glükokortikoid hatások továbbításában, F315- és F492-ZAP-70-et expresszálo sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, LAT és Cbl foszforilációját 2 perces DX kezelést követően. A WT kontroll, valamint DX kezelt WT-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszálo sejtek lizátumából immunprecipitációt végeztünk, majd a foszforiláció változásokat Western bloton vizsgáltuk. A 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.

## 5. Az új eredmények összefoglalása

1. Létrehoztunk folyamatos, humán T-sejtes leukémia alapú, stabil transzgénikus sejtvonalakat, melyekben a ZAP-70 nyolc (069, 126, 178, 238, 292, 315, 492, 493) tirozinjának funkcióját külön-külön vizsgálhattuk, különös tekintettel a még ismeretlen funkciójú (069,126, 178 és 238) tirozinokra.
2. A ZAP-70 Y069 gátló, a Y126 aktivációs, míg a Y178 részben gátló szerepet tölt be a T-sejt aktivációs folyamatokban.
3. Eredményeink szerint a ZAP-70 Y292 és Y492 a kináz negatív autoregulációjában vesz részt, míg a Y315 pozitív autoregulációs hely.
4. A Y-F aminosavcsere a ZAP-70 Y126 és Y178 pozíciókban az SLP-76 Y128; a Y492 pozícióban pedig mind az SLP-76 Y128, mind a LAT Y171 nyugalmi hiperfoszforilációjához vezetett.
5. Kísérleteink alapján a ZAP-70 az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását elsősorban az SLP-76-on, nem a LAT-on keresztül szabályozza.
6. A ZAP-70 Y315 és Y492 vesznek részt a nem-genomikus GC hatások közvetítésében.
7. Mind a LAT, az SLP-76 és a Cbl részt vesznek a nem-genomikus GC jelátviteli folyamatokban, de a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik, nem a LAT.
8. A DX az anti-CD3 indukálta T-sejt aktivációban, a ZAP-70 kinázban megfigyelt változásokhoz hasonlóan, a LAT és a Cbl tirozin foszforilációját tovább növelte. Az SLP-76 aktiváció indukálta foszforilációját és az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását a DX részben gátolta.



## 6. Összefoglalás, megbeszélés

### 6.1 A ZAP-70 kináz tirozinjainak funkcionális jellemzése a TcR/CD3 jelátviteli út szabályozásában

A TcR/CD3 jelátviteli útvonal részleteinek felderítésére intenzív kutatások folytak az elmúlt 20 évben. Miután sikerült a legfontosabb jelátviteli molekulákat azonosítani, egyre több olyan mutáns - általában Jurkat sejtek mutagenéziséből származó - T-sejt vonal vált elérhetővé, amelyekben valamelyik molekula hiányzik. A ZAP-70 kináz szükséges a teljes TcR/CD3 jelátviteli kaszkád kialakításához. A ZAP-70 deficiens P116 sejtekben a T-sejt jelátvitel, a ZAP-70 deficiens egerekben a T-sejt jelátvitel és a T-sejt fejlődés is súlyos zavart szenved. Emberben a ZAP-70 hiánya vagy defektusa SCID fenotípushoz vezet. A kinázok funkcióját foszforilációs események szabályozzák, így az egyes foszforilációs helyek vizsgálata, pl. pontmutáns sejtvonalakban, különösen értékes információt nyújthat a jelátviteli folyamatok finom szabályozásának megértéséhez.

Kísérleteink során a létrehozott 8 pontmutáns sejtvonalon vizsgáltuk a ZAP-70 egyes tirozinjainak szerepét a T-sejt aktivációban és a nem-genomikus glükokortikoid hatások kialakításában, különös tekintettel a még ismeretlen funkciójú tirozinokra.

A Y-F aminosavcsere a 069 és 126 pozícióban ellentétes hatást eredményezett az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában, az előző növelte, míg az utóbbi csökkentette a  $Ca^{2+}$  szintet a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtekhez viszonyítva. A Y-F pontmutáció a 178-as pozícióban nem befolyásolta jelentősen az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását. A Y069 maradék a ZAP-70 N-terminális SH2 doménjében található, így a TcR/CD3 jelátvitel során szerepet játszhat az aktivált ZAP-70 kináz és a CD3 molekula  $\zeta$  lánci közötti kapcsolat kialakításában (szerkezeti magyarázat), vagy befolyásolhatja a molekula kináz aktivitását (funkcionális magyarázat). Ennek pontos megismeréséhez még további vizsgálatok szükségesek. A Y126 mutációja az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel csökkenéséhez vezetett, hasonlóan, mint ahogy azt a Y315 mutációjának esetében tapasztaltuk. Ezen analógia alapján feltételezzük, hogy a Y126 az interdomén A-ban hasonló pozitív szabályozó szerepet tölthet be, mint a Y315 az interdomén B-ben. A ZAP-70 Y126 mutációja az SLP-76 Y128 nyugalmi hiperfoszforilációját eredményezte, tehát szerepet játszhat az anti-CD3 indukálta csökkent  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában.

Munkánk során vizsgáltuk azt is, hogy a ZAP-70 egyes Y maradékai milyen szerepet töltenek be az SLP-76 és a LAT adapter molekulák közvetítette  $Ca^{2+}$ -jel szabályozásában a TcR/CD3 jelátvitelben. T-sejtekben az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakításához nélkülözhetetlen a PLC $\gamma$  aktivációja. Az SLP-76 és LAT adapter fehérjék a PLC $\gamma$  fő aktiválói, kapcsolatot képeznek a ZAP-70 és a PLC $\gamma$  között. Korábbi adatok azt mutatták, hogy a PLC $\gamma$  aktivációja a LAT és az SLP-76 aktivációjától függ.

Mivel a ZAP-70 pontmutáns sejtek a LAT foszforilációját kevésbé befolyásolták, így feltételezzük, hogy a ZAP-70 az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jel kialakulását elsősorban az SLP-76-on keresztül szabályozza.

A ZAP-70 493-as pozíciójában végrehajtott Y-F aminosavcsere a korai jelátviteli folyamatok súlyos defektusához vezet, hasonlóan ahhoz, mint amit P116 sejtekben megfigyeltek. Ezért a Y493 foszforilációja különösen fontos szerepet játszik a T-sejt aktiváció downstream lépéseinek beindításában. A 493-as tirozin maradék hiánya, vagy defektusa a T-sejt aktiváció funkcionális blokkjához vezet, ahogy azt korábbi kísérletek is igazolták. Az F493-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a kináz hiperfoszforilációját figyeltük

meg, feltehetően más tirozin maradék(ok) hiperfoszforilációjának következtében, ami azt mutatja, hogy a ZAP-70 Y493-nak fontos negatív autoregulációs szerepe is lehet.

Eredményeink szerint nem a Y493 az egyetlen tirozin maradék, ami részt vehet a ZAP-70 autoregulációjában. A ZAP-70 Y493 mellett a Y292 is negatív autoregulációs funkcióval rendelkezik, mivel mutációjakor a ZAP-70 hiperfoszforilálódik. A ZAP-70 csökkent foszforilációját találtuk a F315-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ami ezen tirozin maradék pozitív autoregulációs szerepére utal.

**1. táblázat: A ZAP-70 pontmutáns sejteken végzet kísérletek eredményeinek összefoglalása nyugvó és aktivált sejtekben**

Y-F pozíció	Ca <sup>2+</sup>	ZAP-70*	SLP-76*	SLP-76 <sup>Y128</sup>	LAT*	LAT <sup>Y171</sup>	Funkció	
a-CD3	+	+	+	- +	+	- +	TcR/CD3	Autoreguláció
069	↑	-	↑	- -	-	- -	gátló	-
126	↓	-	-	↑ ↓	-	- -	aktivációs	-
178	-	-	↑	↑ -	-	- -	részben gátló	-
238	NE	NE	NE	NE NE	NE	NE NE	?	?
292	↑	↑	↑	- -	↑	- -	gátló	negatív
315	↓	↓	↑	- ↓	↑	- -	aktivációs	pozitív
492	↑	-	↑	↑ ↓	-	↑ -	gátló	-
493	↓	↑	↓	- ↓	↓	- ↓	aktivációs	negatív

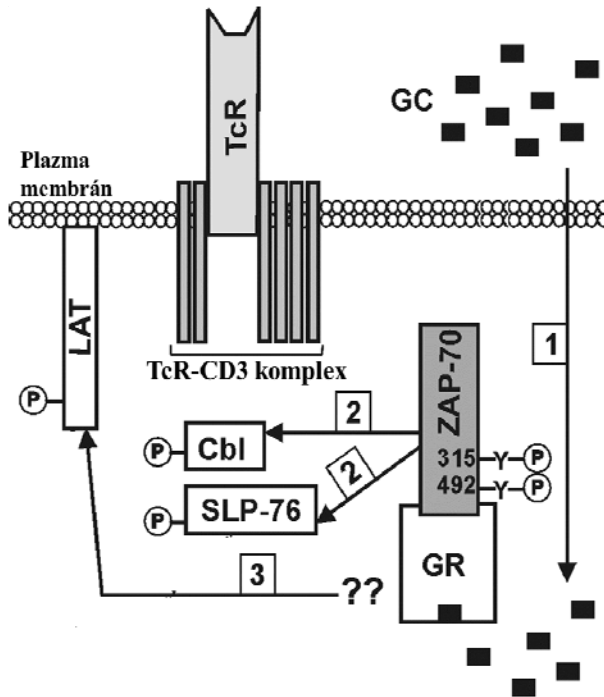
Valamennyi változást a WT-ZAP-70-et expresszáló sejtvonalban kapott eredményekhez viszonyítottunk. A kapott változásokat nyilakkal jelöltük: ↑ növekedés, ↓ csökkenés, - nincs változás. NE nem vizsgáltuk, \*immunprecipitáció.

## 6.2 A nem-genomikus glükokortikoid hatások molekuláris célpontjai Jurkat sejtekben

A ZAP-70 kináz nem csak a T-sejt aktiváció egyik kulcsmolekulája, hanem fontos szerepet játszik a nem-genomikus GC jelátviteli útvonal közvetítésében is. Jelen kísérleteink során az általunk létrehozott ZAP-70 pontmutáns sejtvonalakban vizsgáltuk a rövid idejű, nagy dózisú GC hatások további részleteit. Rövid idejű, nagy dózisú 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. Érdemes megjegyezni, hogy ezen két tirozin ellentétes szerepet tölt be a T-sejt aktivációban, a 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. Nem találtunk azonban különbséget a pontmutáns sejtek ZAP-70-GR asszociációjában, ami további alternatív mechanizmusok 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 negatív regulátor Cbl molekulára. Mindhárom molekula foszforilációja emelkedett rövid idejű, nagy dózisú 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. 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.



**4. ábra: Nem-genomikus GC hatások feltételezett mechanizmusai a TcR jelátvitel általunk vizsgált molekuláira.** A GC-ok a plazma membránon történő diffúziót követően kötődnek citoplazmatikus receptorukhoz (1. nyíl). A ligand aktivált GR asszociál a ZAP-70 kinázzal, miközben annak Y315 és Y492 maradékai foszforilálódnak. Az SLP-76 és a Cbl tirozinjait a ZAP-70 foszforilálja (2. nyíl), míg a LAT a ZAP-70-től függetlenül (eddig ismeretlen módon, feltehetően upstream szabályozó molekulák révén) foszforilálódik (3. nyíl).

### 6.3 A nem-genomikus glükokortikoid hatások T-sejt aktivációra gyakorolt hatásai: cross-talk a TcR/CD3- és glükokortikoid receptor jelpályák között

Következő kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a DX kezelés hogyan befolyásolja a T-sejt aktivációt és ezáltal hogyan járulhat hozzá az immunszuppresszív hatásokhoz. Ezért GC analóggal előkezelt sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációját, valamint az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -jelet anti-CD3 aktivációt követően. A ZAP-70 kinázban megfigyelt változásokhoz hasonlóan kombinált kezeléskor a LAT és a Cbl tirozin foszforilációja tovább nőtt a csak anti-CD3 kezelt mintákhoz képest, míg az SLP-76 aktiváció indukálta foszforilációját a DX kezelés részben gátolta. 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 dóziszú 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.

**2. táblázat: A DX, valamint az anti-CD3+DX kezelés hatására bekövetkező változások összefoglalása Jurkat és ZAP-70 pontmutáns sejtekben**

**A**

	ZAP-70	LAT	LAT*	SLP-76	SLP-76*	Cbl	Cbl*	Ca <sup>2+</sup>
<b>DX</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>a-CD3</b>	-	-	+	-	+	-	+	+
<b>Jurkat/WT</b>	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓

**B**

Y-F pozíció	ZAP-70	LAT	SLP-76	Cbl
<b>DX</b>	+	+	+	+
<b>315</b>	↓	-	↓	↓
<b>492</b>	↓	-	↓	↓

**A:** Jurkat/WT sejteken végzett kísérletek eredményei DX, valamint kombinált (anti-CD3+DX) kezelést követően. A változásokat a Jurkat/WT kezeletlen mintákhoz, vagy a Jurkat/WT anti-CD3 kezelt mintákhoz viszonyítottuk (\*). **B:** F315- vagy F492-ZAP-70-et expresszáló pontmutáns sejtek foszforiláció változása DX kezelés hatására. A foszforiláció változásokat a WT DX kezelt mintákhoz viszonyítottuk.

A változásokat nyilakkal jeleltük: ↑ növekedés, ↓ csökkenés, -: nincs változás.

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, emellett fontos szerepet töltenek be a kináz (auto)regulációjában is.

A ZAP-70 tirozinjai, 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.

A ZAP-70 kinázban található tirozinok szerepének pontos megismerése a T-sejt aktivációban és a nem-genomikus GC hatásokban közelebb vihet minket leukémiák, autoimmun betegségek patomechanizmusának felderítéséhez, az immunszuppresszió mechanizmusának pontosabb megértéséhez, valamint esetleges későbbi terápiás célpontok kifejlesztéséhez. Távol vagyunk azonban még attól, hogy a T-sejt aktiváció és a nem-genomikus glükokortikoid hatások komplex szabályozásának pontos részleteit maradéktalanul ismerjük.

## 7. Publikációk (össz IF: 21,217)

### A tézis alapját képező közlemények (IF: 12,989)

1. **M. Szabo**, T. Czompoly, K. Kvell, G. Talaber, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki, F. Boldizsar: *Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells*.  
International Immunology 2012, 24(2):79-87.  
IF:3,301\*
2. Boldizsar F.<sup>1</sup>, **Szabo M.**<sup>1</sup>, 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*  
Molecular Immunology (közlésre beküldve)
3. F. Boldizsár, G. Talabér, **M. Szabó**, D. Bartis L. Pálinkás, P. Németh and T. Berki: *Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid signaling in T cells*  
Immunobiology 2010, 215(7):521-6.  
IF: 4,114
4. D. Bartis, F. Boldizsar, K. Kvell, **M. Szabó**, L. Pálinkás, P. Németh, É. Monostori, T. Berki: *Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90*.  
Biochemical Biophysical Research Communications 2007, 354(1): 253-8  
IF:2,749
5. D. Bartis, F. Boldizsár, **M. Szabó**, L. Pálinkás, P. Németh and T. Berki: *Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells*.  
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2006, 98: 147-154  
IF:2,825

### Egyéb közlemények (IF: 8,228)

6. **Szabó M.**: *Sokoldalú hormonterápia, Hatóanyag a mellékvesekéregből*  
Élet és Tudomány 2011, LXVI. évfolyam, 47. szám 1491-1493. oldal IF: -
7. G. Talabér, F. Boldizsár, D. Bartis, L. Pálinkás, **M. Szabó**, G. Berta, G. Sétáló Jr, P. Németh and T. Berki: *Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis*.  
International Immunology 2009, 21(11):1269-76  
IF: 3,403
8. Y. Hayashi, P. Engelmann, R. Foldbjerg, **M. Szabó**, I. Somogyi, E. Pollák, L. Molnár, H. Autrup, D. S. Sutherland, J. Scott-Fordsmand, L.-H. Heckmann: *Earthworms and Humans in Vitro: Characterizing Evolutionarily Conserved Stress and Immune Responses to Silver Nanoparticles*.  
Environmental Science & Technology 2012, 46(7): 4166-4173.  
IF:4,825\*

\*legutolsó (2010-es IF adat alapján)

<sup>1</sup>megosztott első szerzők

**Idézhető absztraktok (első szerzős): 4 (1)**

**Előadások nemzetközi konferenciákon (első szerzős): 4 (1)**

**Előadások hazai konferenciákon (első szerzős): 11 (4)**

**Poszterek nemzetközi konferenciákon (első szerzős): 15 (6)**

**Poszterek hazai konferenciákon (első szerzős): 16 (5)**

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Boldizsár Ferencnek** és **Prof. Dr. Berki Tímeának**, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódjak a kutatómunkába és végig támogatták annak megvalósítását.

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

Köszönet **Dr. Bartis Domokosnak** útmutatásaiért, **Dr. Kvell Krisztiánnak** és **Dr. Czömpöly Tamásnak** a ZAP-70 pontmutáns sejtek létrehozásában nyújtott segítségért.

Hálával tartozom **Dr. Talabér Gergely** és **Dr. Lábadi Árpád** munkatársaimnak az értékes szakmai segítségükért és barátságukért.

Köszönet illeti **Dr. Engelmann Pétert** a dolgozat kritikus átolvasásáért és a sok támogatásért az élet minden terén.

Hálával tartozom **Pápa Lászlónénak** a sejttenyésztésben nyújtott rengeteg segítségért.

Köszönöm **Pálné Katona Anikónak** a szervezésekben, logisztikában és a mindennapokban nyújtott segítségért.

Köszönet illeti az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet** minden munkatársát, akik mindig támogattak munkám során.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni **családomnak** a sok türelmet, biztatást és támogatást.