

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A RETINOIDOK GLÜKOKORTIKOID HORMON ÁLTAL INDÍTOTT SEJTHALÁLT GYORSÍTÓ ÉS AZ ADENOZIN SEJTHALÁLT KIVÁLTÓ HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA EGÉR TIMOCITÁKON

Tóth Katalin Ágnes

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3. BEVEZETÉS

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Apoptózis

4.2. Az apoptózis szignalizációja

4.3. A T-limfociták fejlődése és az apoptózis

4.4. A glükokortikoid hormon

4.5. A glükokortikoid receptor

4.6. A glükokortikoid hormon különböző hatásmódjai

4.7. A retinsavak és retinoid receptorok

4.8. Adenozin és adenozin receptorok

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Anyagok

5.2. Kísérleti állatok

5.3. Módszerek

5.3.1. Timocita populációk karakterizálása

5.3.2. Timocita kultúrák, sejtvonalak és apoptózis detektálás

5.3.3. PI-PLC immunprecipitáció és Western blot

5.3.4. Nur77, FasL, NDG-1 és -2, Bim mRNS expressziójának detektálása RT-PCR technikával

5.3.5. GILZ, Nur77, FasL, NDG-1 és -2, Bim valamint TRAIL mRNS expresszió meghatározása Q-PCR technikával

5.3.6. Tranziens transzfekció

5.3.7. A tranziens transzfekciót követő Western blot analízis

5.3.8. Ko-immunprecipitáció

5.3.9. Emlős két-hibrid rendszer

5.3.10. Az intracelluláris cAMP koncentráció meghatározása

5.3.11. A citoszolikus Ca^{2+} koncentráció meghatározása timocitákban

5.3.12. Oligonukleotid-vég jelölés

5.3.13. Sejtmagi extraktum kinyerése timocitákból

5.3.14. Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay)

5.3.15. Statisztika analízis

6. EREDMÉNYEK

6.1. A retinsav receptor (RAR) és a retinoid X receptor RXR) ligációja fokozza az egér timociták dexametazon indukálta sejtelhalását

6.1.1. A dexametazon dóziszfüggő módon fokozza a timociták apoptózist in vitro

6.1.2. A dexametazon mellett adott $\text{RAR}\alpha$ illetve RXR specifikus retinoidok fokozzák az egér timociták dexametazon által kiváltott apoptózist in vitro és in vivo

6.1.3. A retinoidok nem emelik a glükokortikoid indukálta PI-PLC foszforilációt

6.2. A retinoidok, a timocita apoptózis során emelik a GILZ (Glükokortikoid által Indukálható Leucin Zippzár) glükokortikoid indukálta expresszióját

6.3. A retinoidok transzaktivációs hatása $\text{RAR}\alpha/\text{RXR}$ heterodimeren keresztül szabályozódik

6.4. Ligandkötést követően a glükokortikoid és a retinoid receptorok között kölcsönhatás lép fel

6.4.1. A glükokortikoid és az $\text{RAR}\alpha$ receptor kölcsönhat egymással

6.4.2. Ligandkötést követően a glükokortikoid és az RXR receptor szintén kölcsönhat egymással

6.5. A retinoidok nem befolyásolják a glükokortikoid receptor Ser211-es pozícióban elhelyezkedő aminosavján bekövetkező foszforilációját

6.6. A retinoidok daganatos T-sejt eredetű sejtvonalak glükokortikoid indukálta apoptózist is fokozták

6.7. Az adenosin *in vitro* adenosin A_{2A} receptor függő és független sejthalált is indukál egér timocitákban

6.8. Az *in vivo* adenosin indukálta sejtelhalás nagy része az adenosin A_{2A} receptorokon keresztül szabályozódik

6.9. Egér timocitákban az adenosin A_{2A} receptor az adenilát cikláz jelátviteli útvonalat aktiválja.

6.10. Egér timocitákban az adenosin a cAMP függő protein kinázok aktiválódásán keresztül indukál sejthalált

6.11. Vad típusú timociták esetén az adenosin az ic. cAMP szint szabályzásán keresztül stimulálja a Nur77 expresszióját és DNS-hez való kötődését, *in vitro*

6.12. NECA oltását követően a Nur77 és néhány Nur77 függő gén, valamint a Bim is indukálódik vad típusú timocitákban, míg az A_{2A}^{-/-} hiányosakban nem

6.13. A Bim, „csak” BH3 doménű fehérje” közvetíti az adenosin apoptózist kiváltó hatását egér timocitákban

7. MEGBESZÉLÉS

8. ÖSSZEFOGLALÁS

9. IRODALOMJEGYZÉK

10. TÁRGYSZAVAK

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

12. KÖZLEMÉNYEK

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADH: alkohol dehidrogenáz

ADP: adenzin difoszfát

AIRE: autoimmun regulátor

AMP: adenzin monofoszfát

ATP: adenzin trifoszfát

ATRA: transz retinsav

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

CSF: kolónia stimuláló faktor

dbcAMP: dibutiril ciklikus adenzin monofoszfát

DBD: DNS-kötő domén

DEX: dexametazon-acetát

DISC: Death Inducing Signalling Complex

DR5: halál receptor 5

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

FADD: Fas asszociált halál domén

FLICE: FADD-hoz hasonló interleukin-1 beta-átalakító enzim

GC: glükokortikoid

GILZ: glükokortikoid által indukálható leucin cippzár

GR: glükokortikoid receptor

GRE: glükokortikoid receptor válaszadó elem

IFR-8: interferon 8

IkB α : interferon kappa B alfa

IL-1: interleukin 1

IP: immunprecipitáció

IP3: inozitol-trifoszfát

LBD: ligand kötő domén

MAPK: Mitogen activated protein kinase; mitogén aktivált protein kináz

NBRE: Nur77 kötő válaszadó elem

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex

NDG-1,2: Nur77 függő gén 1,2

NLS: nukleáris lokalizációs szekvencia

ONPG: o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid

PARP: poli-ADP-ribóz polimeráz

PBS: foszfát puffer

PEI: polietilén-imin

PI-PLC: foszfatidil-inozitol foszfolipáz C

PLC: foszfolipáz C

PTPC: Permeability Transition Pore Complex

PVDF: polivinil-difluorid

Q-PCR: Quantitatív polimeráz láncreakció

9cRA: 9cisz retinsav

RAL: retinaldehid

RAR: retinsav receptor

RARE: retinsav receptor válaszadó elem

RXR: retinoid X receptor

RXRE: retinoid X receptor válaszadó elem

SDR: alkohol dehidrogenáz-reduktáz

TCR: T-sejt receptor

TNF: Tumor Nekrózis Faktor

TRAIL: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

3. BEVEZETÉS

A T limfociták érése a tímuszban történik meg. E sejtek fejlődésük során random generálják a minden T sejtre egyedileg jellemző T sejt receptort. A random képződés eredménye, hogy a sejtek 90%-a olyan T sejt receptort hordoz, ami nem is képes az MHC molekulákhoz hozzákapcsolódni. Ezen hibás sejtek még a tímuszban elhalnak. Egyre több adat támasztja alá, hogy a timociták környezetében keletkező molekulák azok, amelyek a gyors pusztulást kiváltják. E molekulák közé tartoznak a tímikus epiteliális sejtek által termelt glükokortikoid hormon és retinoidok, valamint az elhaló sejteket eltakarító makrofágok által kibocsájtott TGF- β és adenzin. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a glükokortikoidok a glükokortikoid receptoron keresztül új gének megjelenítésével indítják az elhalást, és ezt gyorsítani képesek az ugyancsak magreceptoron keresztül ható retinoidok, míg az adenzin az A_{2A} receptor aktiválásán keresztül vált ki apoptózist, de a mechanizmust még nem vizsgálták. Kísérleteimben bemutatom, hogy a retinoidok az RAR α /RXR heterodimer ligációján keresztül fokozzák a glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalást úgy, hogy a retinoid receptor közvetlenül hozzákötődik a glükokortikoid receptorhoz, és az interakció annak a transzkripció aktivitását fokozza. Az adenzin pedig az adenilát cikláz út aktiválásán keresztül vezet sejtelhaláshoz úgy, hogy a csak BH3 domént kifejező Bim fehérje kifejeződését fokozza. Bár egy korábban sejthalált kiváltó transzkripció faktor, a Nur77 kifejeződését is megfigyeltük adenzin hatására, úgy találtuk, e sejthalálúton, nincs meghatározó szerepe. Eredményeim további adatokat szolgáltatnak a tímuszban zajló szelekció folyamatok megértéséhez.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Apoptózis

A természetes sejthalál az élő szövetekben állandóan zajló fiziológiás folyamat. A soksejtű szervezeteknek szükségük van arra, hogy megszabaduljanak azoktól a sejtektől, melyek (a) életműködésük szempontjából fölöslegben képződnek; (b) élettani funkcióval nem rendelkeznek; (c) már betöltötték szerepüket; (d) fejlődésük nem megfelelően megy végbe; (e) az életfolyamatokra potenciálisan veszélyesek (**Ameisen, 1992; Kopper és Fesüs, 2002**). Ez a fiziológiás folyamat leggyakrabban „programozott sejthalál” révén valósul meg. E jelenség kutatásának kezdete 1972-re tehető, amikor Kerr, Wyllie és Currie a sejthalál e formáját elnevezték apoptózisnak, illetve meghatározták azokat a morfológiai bélyegeket, melyek egyértelműen megkülönböztetik a folyamatot az eukarióta sejtek másik sejthalál formájától, a nekrozistól (**Kopper és Fesüs, 2002; Elmore, 2007**).

A nekrozis során a sejtek különböző hirtelen sérülések hatására (hipertermia, fizikai, kémiai trauma) halnak el, mivel a sejtmembrán elveszíti szelektív ionpermeabilitását. A plazmamembrán megsérül, nem tudja szabályozni az ozmotikus nyomást, a sejt megduzzad és a membrán megreped, melynek eredményeként a sejt tartalma kijut az extracelluláris térbe. Hidrolázok, foszfolipázok, nukleázok aktiválódnak, melyek a membránalkotók, fehérjék, RNS, DNS degradációját eredményezik. A kiáramló sejttermékek gyulladásos reakciót vált ki az ép szövetekben (**Elmore, 2007**).

Ezzel szemben a programozott sejthalál, vagy másnéven apoptózis, aktív sejteliminációs folyamat, amelyben a károsodott vagy szükségtelenné vált sejtek elpusztulnak és tartalmuk a fagocitáló makrofágok által újrahasznosul. A programozott sejthalál genetikailag determinált folyamat, az elnevezés az embriogenezis során bekövetkező fiziológiás sejtpusztulást takarja. A posztembrionálisan lejátszódó természetes sejthalálformát pedig apoptózisnak nevezzük (**Kopper és Fesüs, 2002**).

Apoptózis során az elhaló sejtek elveszítik kapcsolatukat az extracelluláris mátrixszal, a sejtmaganyag kondenzálódik, majd fokozatosan feldarabolódik, a citoplazma zsugorodik, a sejtmembrán szabálytalan alakúvá válik, de a sejtalkotók többségénél nem következik be lényeges változás. A sejtek membránnal körülvett nukleáris és citoplazmatikus részeket tartalmazó apoptotikus testekre esnek szét, melyeket az apoptózis utolsó lépéseként makrofágok és más nem professzionális fagociták kebeleznek be. Ennek következtében az

apoptotikus sejtek nem jutnak ki az extracelluláris térbe, így nem alakul ki gyulladásos reakció, hegeképződés (**Kopper és Fésüs, 2002**).

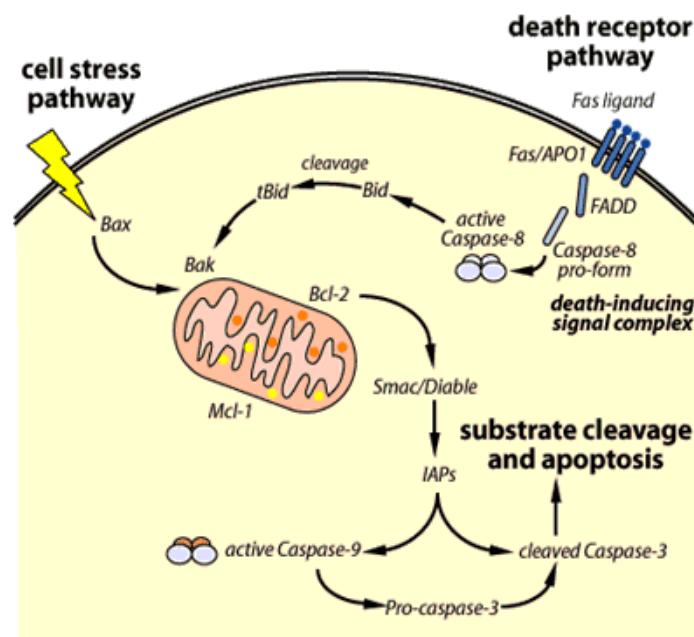
Az apoptózis meghatározó szerepet tölt be a megfelelően működő immunrendszer kialakításában, mind a sejtek számának, mind azok működésének szabályozása révén. A celluláris immunitást közvetítő T-limfociták érett populációjának kialakításában és fenntartásában központi szerepet töltenek be a programozott sejthalál mechanizmusai. A T-sejtek elhalási folyamataiban bekövetkező zavarok számos kórképet hozhatnak létre: a fokozott apoptózis leukopéniát vagy immundeficienciát okozhat, a csökkent mértékű sejtelhalás immunsejt eredetű daganatok kialakulásához vezet, míg a hibás szelekció autoimmun megbetegedések létrejöttéhez járulhat hozzá (**Kopper és Fésüs, 2002**).

Az apoptózist elindító tényezők, ún. apoptotikus faktorok, lehetnek sejtfelszíni receptorok ligandjai (pl.: TNF vagy Fas ligand) vagy magreceptorok ligandjai (pl.: glükokortikoid, vagy retinsavak), de apoptózist vált ki a túlélési faktorok (pl.: eritropoetin, IL-1, CSF) hiánya vagy koncentrációjának csökkenése, illetve nem fiziológiás hatások is (pl.: UV, toxinok, hipoxia).

4.2. Az apoptózis szignalizációja

Az apoptózis szignalizációjában három szakaszt különböztetünk meg, az induktor, az effektor és a degradációs fázist (**Penninger és mtsai, 1998**). Az apoptózist beindító jelátviteli útvonal a kaspáz proteázokhoz kötött. A kaspázok aktív centrumukban cisztein-hisztidin diádot tartalmazó, aszpartát mellett hasító proteázok. Aktiválódásuk során (amely auto- vagy transzkatalízissel történhet) a proformából kihasított kis és nagy alegységből épül fel az aktív enzim. A prokaspázok aggregációját adapter molekulák kaspáz prodoménekhez való kötődése indítja el, kialakítva a kaspáz aktivációjához szükséges apoptoszóma szerkezetet. A szignálokra és a jelátviteli mechanizmusokra nagy heterogenitás jellemző. Az induktoroknak két nagy csoportja van, a fiziológiás szignálok, illetve a citotoxikus anyagok. A citotoxikus vegyületek nem fiziológiás ágensek, géntoxikus, DNS károsodást okozó faktorok (ionizáló sugárzás, citotoxikus vegyületek, drogok) (**Hickman és Boyle, 1997**). Fiziológiásan programozott sejtelhalás indukálható receptor-mediált stimulusokkal, egyrészt sejthalál-szignálokkal (glükokortikoidok, tiroxin, retinoidok, Fas ligand, tumor nekrosis faktor), trófikus faktorok (IL-2, növekedési faktorok) hiányával, másrészt egymásnak ellentmondó szignálok kombinációjával (**Iwata és mtsai, 1996**). Ezen szignálok többsége a mitokondriumok két membránját áthidaló megacsatornákat (PTPC: Permeability Transition

Pore Complex) nyitják meg, mely a mitokondriális membrán potenciál elvesztéséhez (proton gradiens elvesztéséhez) és a különböző mitokondriális fehérjék citoplazmába jutásához vezet. Ezen fehérjék egyike a citokróm c, mely a citoszólban komplexet képez az Apaf 1 fehérjével és ez a komplex a prokaspáz 9-et képes aktiválni. A kaszpáz 9 ezt követően elindítja a kaszpáz kaszkádot (**Harvey és Kumar, 1998**), melynek eredményeként az apoptotikus folyamat átlép az effektor, majd a lebontó szakaszba. A folyamatot, mely során eldől, hogy a sejt életben marad vagy elpusztul számos protoonkogén és tumor szupresszor gén befolyásolja. Köztük a bcl-2 családnak kiemelkedő szerepe van. A család fehérjéi a mitokondriumban expresszálódnak, tagjai két csoportra oszlanak: apoptózis induktorok, mint a bax, vagy a bad (**Schorr és mtsai, 1999**), illetve sejtelhalás gátlók, mint a bcl-2 és a bcl-xl (**Itoh és mtsai, 1993; Boise és mtsai, 1995**). E fehérjék homo- és heterodimereket képesek egymással képezni attól függően, hogy milyen arányban és milyen foszforiláltsági állapotban vannak jelen egy adott pillanatban a sejtben. A homodimerek a funkcionálisan aktívak, hatásukat a mitokondrium szintjén fejtik ki. A bcl-2 dimer képes a mitokondriumok megacsatornáinak kinyílását megakadályozni, így a citokróm c felszabadulását megelőzni, míg a bax homodimerről bizonyított, hogy a mitokondriális membrán potenciál elvesztését idézi elő (**Green, 1998; Green és mtsai, 1998**). Számos, e csoportba tartozó szignálról bizonyított, hogy sejtelhalást indukáló hatásuk a bcl-2 család fehérjéinek expressziójának, illetve foszforiláltsági állapotának szabályozásán alapszik.



1 ábra: A sejthalál mitokondriális és sejthalál receptor mediált útja, a kaszpáz kaszkád

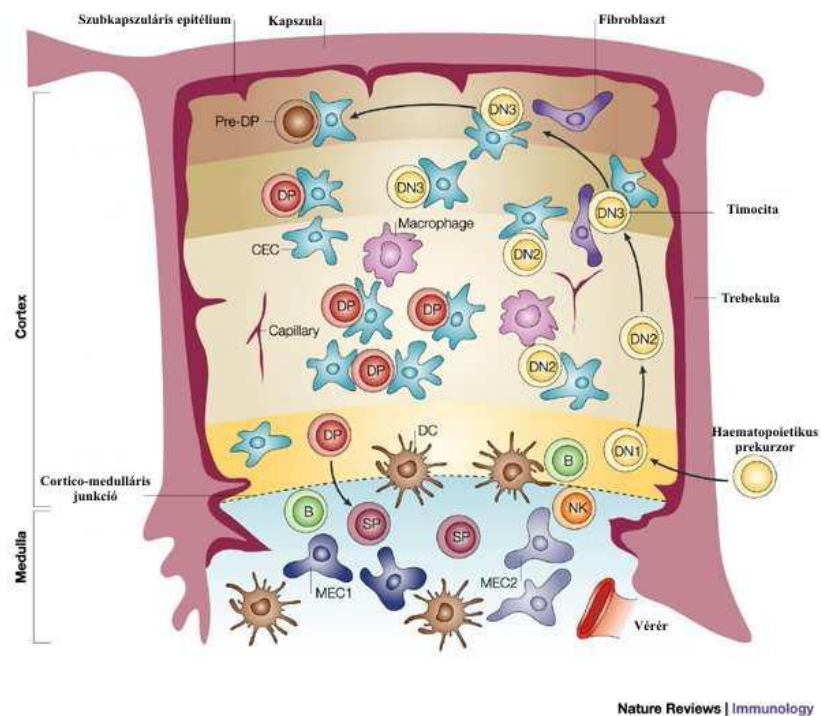
A Fas ligand (FasL) és a TNF (tumor nekrosis faktor) sejthalál receptorokon keresztül ható apoptotikus szignálok, és az előbbiekkal szemben hatásuk közvetlen kaspáz aktiváción alapszik, így a jelátvitelhez mitokondriális változások nem szükségesek. Ezek a ligandok mind membrán kötött, mind szekretált formában megtalálhatóak a szervezetben. A ligand-receptor kölcsönhatás egy fehérje komplex kialakulásához vezet (DISC: Death Inducing Signalling Complex) (**Nagata, 1997**). Ebben a komplexben a prokaspáz 8 (FLICE) cisztein proteáz kapcsolódik a receptorhoz a FADD (Fas Associated Death Domain) adaptor fehérje segítségével. A prokaspáz 8 önmagát hasítva aktiválódik és további kaspázok aktivációjához vezet. Közvetlen kaspáz aktivációt a Fas/TNF rendszeren kívül külső szignálok, mint a citotoxikus T-sejtek granzim enzime, is képesek kiváltani. A granzim egy szerin proteáz, a citotoxikus T-sejtek granulumaiban található. T-sejt aktiváció során a perforin fehérje segítségével képes a target sejtbe bejutni, ahol effektor kaspázokat hasítással aktiválva a target sejt apoptotikus útvonalát kapcsolja be (**Monte és mtsai, 1995**). A Fas vagy TNF aktiváció képes a mitokondriális folyamatokat is elindítani, amennyiben a kaspáz 8 a bid nevű fehérjét aktiválja, mely a mitokondriumok megacsatornáit kinyitva a mitokondriális potenciál elvesztését és a citokróm c felszabadulását eredményezi. Bármelyik útvonal indul is el, a létrejött kaspáz kaskád utolsó tagja a kaspáz 3, 6 vagy 7 (effektor kaspáz) lesz, melyek különböző target fehérjék hasításával indítják el az apoptózis degradációs fázisát. Az effektor szakaszt követő degradációs fázis során jelenik meg az apoptózisra jellemző fenotípus: a DNS kondenzáció, a zeiozis és végül az apoptotikus testek.

A effektor kaspázoknak igen sokféle szubsztrát fehérjéje ismert, melyek között túlélési faktorok (Bcl-2), endonukleáz inhibitorok (DFF45/ICAD), DNS javításáért felelős enzimek (PARP), strukturális fehérjék (aktin, lamin) és azokat bontó (gelsolin), szabályozó enzimek találhatóak (**Chan és Mattson, 1999**). Az ICAD hasítása endonukleázok aktiválódásához vezet, melyek kromatin fragmentációt idéznek elő (**Khodarev és mtsai, 1998**). A lamin hasítása szerepet játszhat a DNS kondenzációban és a sejtmag morfológiai változásaiban, a citoszkéletális fehérjék elbontása pedig a sejthalál megváltozásához, a szöveti kapcsolat elvesztéséhez vezet. A morfológiai változások mellett változások történnek a sejtmembránban is, a sejt felszínén új szignálmolekulák (foszfátidil szerin, szénhidrát láncok) jelennek meg, melyeket a makrofágok ismernek fel és az elhalt sejt fragmentumai fagocitózissal tűnnek el a szövetből (**Fadock és mtsai, 1992**).

4.3. A T-limfociták fejlődése és az apoptózis

A T-limfociták képződése csontvelői őssejtekből indul ki és a tímuszban megy végbe, ahol a tímusz epitheliális sejtjei, a dendritikus sejtek és a sztróma egyes elemei (pl. fibroblasztok) által biztosított mikrokörnyezet elengedhetetlenül szükséges a T-sejtek továbbiéréséhez (**Gergely és Erdei, 2000**). A T-limfocita fejlődés több különböző állomásra osztható a CD4 és CD8 koreceptor molekulák expressziója alapján. Az első fázisban az ún. tripla negatív T-sejt előalakok nem rendelkeznek sem CD4, sem CD8 recepttorral, valamint a CD3 receptort sem expresszálják. Sikeres T-sejt receptor- β (TCR- β) gén átrendeződést követően kialakul a korai T-sejt receptor (TCR), melynek CD3 alegységéhez az átrendezett β -gén és a még át nem rendezett α -alegység kapcsolódik (**Kopper és Fésüs, 2002; He, 2002**). Ez a folyamat az előfeltétele az éretlen CD4+/CD8+, dupla pozitív (DP) T-limfociták differenciálódásának. A timocitaérés fontos eseménye a DP fázisban a TCR- α gén átrendeződése, mely után a dupla pozitív tímuszsejtek egy szigorú szelekciós folyamattal néznek szembe. Az egyedi TCR-t hordozó limfociták szoros kölcsönhatásba lépnek a kérgi hámsejtek fő hisztokompatibilitási komplex I (MHCI) és II (MHCII) molekuláival. Azok a T-sejtek, amelyek túl alacsony affinitással kötődnek az MHC molekulákhoz, neglekció révén elpusztulnak (**Kopper és Fésüs, 2002; Gergely és Erdei, 2000; He, 2002; Falus, 1998**). A neglektált sejtek elhalását gyorsítja a timikus epithel sejtek által termelt glükokortikoid hormon (**Kopper és Fésüs, 2002**). Azok a timociták, amelyek a saját MHC molekulát felismerve elegendő stimulust kapnak a túléléshez, pozitívan szelektálódnak. A saját MHC és nem-saját fehérjéből származó peptidek kombinációjára specifikus TCR-t hordozó dupla pozitív timociták tovább differenciálódnak és vagy CD4+, vagy CD8+ érett T-sejtekké alakulnak, melyek elhagyva a tímuszt a perifériára jutnak ki. A negatív szelekció során apoptózissal elhalnak azok a T-limfociták, amelyek nagy affinitással képesek felismerni a saját MHC-saját fehérje peptidkomplexet (**Kopper és Fésüs, 2002; Gergely és Erdei, 2000; He, 2002; Falus, 1998**). Ezek az MHC-peptid kombinációk a csecsemőmirigy velőállományában lévő, medulláris epitheliális sejtek, valamint a csontvelőből a tímuszba bevándorló dendritikus sejtek és makrofágok felszínén találhatók. Ezek a sejtek teremtik meg a negatív szelekcióhoz szükséges mikrokörnyezetet egy speciális transzkripciós faktor (autoimmune regulator – AIRE) segítségével minden lényeges saját fehérjét expresszálva és az MHC molekulákkal bemutatva (**Pitkänen és mtsai, 2003**). A saját MHC-saját peptid kombinációkat erősen kötő DP sejtek aktiváció indukálta apoptózissal elhalnak, míg azok a korlátozott antigén felismerő képességgel rendelkező timociták, melyek nem jelentenek

veszélyt a saját szöveti struktúrákra, vagyis toleránsak: túlélnek (Starr és mtsai, 2003). A negatív szelekció, mely az ún. centrális tolerancia kialakulásáért felelős, nem eredményezi az összes autoreaktív T-limfocita klón eliminálását. Számos adat igazolja, hogy a perifériára kikerülnek olyan TCR-t hordozó érett T-limfociták is, melyek saját MHC molekulák saját peptidekkel alkotott komplexeit ismerik fel, de fiziológias körülmények között ezek jelenléte – a periférián is működő toleranciát fenntartó mechanizmusok miatt – nem vezet önpusztító folyamatok beindulásához.



2. ábra. A timociták érésének sematikus folyamata a tímuszban. CEC – kortikális epitheliális sejtek, MEC – medulláris epitheliális sejtek, DC – dendritikus sejtek (Blackburn CC et al. *Nat Rev Immunol.* 2004.)

Irodalmi adatok szerint ezek a saját antigéneket felismerő sejtek regulátor T-sejtekként (Treg) a saját antigéneket felismerő sejtek gátlásával előzik meg az autoimmun folyamatok kialakulását (Maggi és mtsai, 2005). A negatív szelekciót túlélő timociták vagy csak CD4 vagy csak CD8 ko-receptor molekulát hordozó, egyszeresen pozitív (Single Positive, SP), érett sejtekké alakulnak, és helper (CD4 SP) vagy citotoxikus (CD8 SP) T-limfocitákként funkcionálnak a periférián.

4.4. A glükokortikoid hormon

A szteroid hormonok közé tartozó glükokortikoid hormon számos létfontosságú biológiai folyamatot szabályoz és a T-sejtek differenciálódásában, aktivációjában, túlélésében és apoptózisában is fontos szerepet játszik (**Reichart, 2004**). A glükokortikoidok erős gyulladásgátló és immunszuppresszív (**Fauci és mtsai, 1976**), limfocita apoptózist kiváltó hatása miatt a leggyakrabban használt gyógyszerek közé tartoznak. A glükokortikoidokat rheumatoid arthritis kezelésében használták elsőként sikeresen az 1940-es években. Ekkortól lettek a glükokortikoidok a legfontosabb és leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek az akut- és krónikus gyulladásos betegségek, az allergiás és autoimmun betegségek, valamint a leukémia és limfómás megbetegedések kezelésében, illetve a transzplantációt gyakorta követő szervkilökődés megelőzésében. Gyógyító hatásának ellenére egyes esetekben, mint például az osteoporosis, bőratrófia kezelése során csak részben volt hatásos, sőt mivel számos élettani folyamatban is meghatározó szabályozó szerepet tölt be, nagyobb adagban, huzamosabb ideig tartó adása osteoporosist okoz (**Mazziotti és mtsai, 2007**).

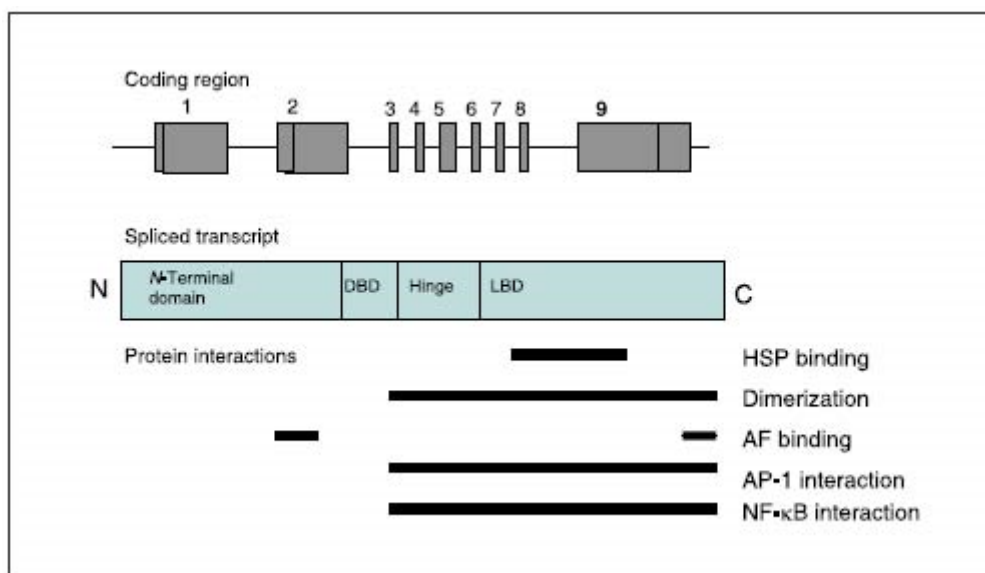
Nem csak a mellékvese kéreg, hanem a tímusz kortiko-epithelális sejtjei is képesek glükokortikoid hormon termelésére (**Pazirandeh és mtsai, 1999**), ezért a glükokortikoidok lokálisan is hathatnak a timocitákra és ezáltal fontos szerepük van a timociták érésének szabályozásában.

4.5. A glükokortikoid receptor (GR)

A szteroid receptorok a ligand által indukálható transzkripciós faktorok szupercsaládjába tartoznak. A glükokortikoid receptor mellett ide tartozik az ösztrogén receptor, az androgén receptor, a progeszteron receptor, D3 vitamin, a retinoid receptorok és számos árva receptor, mint például a Nur77 (**Evans, 1988**).

Ezek a receptorok egyforma szerkezeti egységekből épülnek fel: egy konzervált, centrális elhelyezkedésű cink-ujj DNS kötő doménből (DBD), egy kevésbé konzervált C terminális ligand kötő doménből (LBD), és egy kevésbé konzervált N-terminális doménből (NTD). A receptor N-terminális része hordozza a transzaktivációs domént, mely gazdag negatívan töltött aminosavakban. A receptor ezen részének, mely AF-1 (activation function 1) vagy tau-1 néven ismert, transzkripciót módosító hatása ligand független, szerepe a különböző transzkripciós enzimekkel történő kapcsolat létrehozásában van (**Hollenberg és mtsai, 1985**).

Az AF-1 régió után a DNS-kötő domén (DBD) következik, mely két cink-ujjat formálva, azok háromdimenziós szerkezete révén lehetővé teszi a glükokortikoid receptor DNS-hez történő kötődését. Az N-terminális cink ujj a megfelelő, DNS-hez való, kötődési hely kiválasztásában, a C-terminális pedig a receptor dimerizációjában fontos (Freedman és Luisi, 1985). A DNS-kötő domént követi az 1. nukleáris lokalizációs szekvencia (NLS1). A második transzaktivációs domén, a ligand kötő domén (LBD) és a 2. nukleáris lokalizációs szekvencia (NLS2) a C-terminálison található, a variábilis hinge régió (H) keresztül kapcsolódva DBD-hez. A hinge régió teszi lehetővé a receptor meghajlását, konformáció változását. A GR C-terminális végén található LBD egyrészt a hormon kötéséért felelős, másrészt tartalmazza a Hsp90 (hő sokk fehérje, 90 kDa) molekula kötését lehetővé tevő szekvenciát.



3. ábra: A glükokortikoid receptor szerkezete (Mc Master, A., Ray, D.W.; Drugs Fut. 2008)

Bár a szteroid receptorok többsége a magban található, hormon hiányában a GR a citoszolban tartózkodik különböző szabályozó fehérjékkel (hsp90, hsp70, hsp56) és immunofilinokkal (FKBP52, FKBP51, Cyp40 és PP5) komplexet alkotva. Néhány jelátvitelben szerepet játszó fehérje (src, Raf1) szintén kapcsolódik a citoplazmában található glükokortikoid receptorhoz. A GR-Hsp90 kapcsolódás a receptor megfelelő konformációjának a kialakításán túl ligand kötés hiányában megakadályozza a receptor DNS-hez történő kapcsolódását). Glükokortikoid hormon kötés hatására a GR disszociálódik a hő sokk fehérjéről, dimerizálódik, feltárul az NLS2 szignál szekvenciája, melynek hatására a

receptor a magba transzlokálódik (**Berki és mtsai, 2000**). Az FKBP52-nek szintén szerepe van a receptor ligandkötést követő nukleáris transzlokációjának szabályozásában. Az LBD-ben található második transzaktivációs domén (AF2) a ligand kötést követően konformációs változáson esik át és így lehetővé válik a különböző ko-aktivátorral vagy ko-represszorral történő interakciója. A sejtmagban a receptor homodimer formában felismeri különböző gének erősen konzervált palindrom szekvenciáit (GGRACAnnnTGTTCT, **Berg, 1989**) és ezekhez a specifikus DNS szakaszokhoz, másnéven glükokortikoid válaszadó elemekhez (glucocorticoid responsive elements, GRE), kötődik hozzá. A kötődés után fokozza, vagy gátolja az egyes gének transzkripcióját. Bár sok génről ismert, hogy glükokortikoidok hatására felregulálódik, beleértve azokat is, amelyek részt vesznek az immunsejtek aktiválásában, működésének szabályozásában, apoptózisukban, mint pl. a MAPK foszfatáz 1, Bcl-xL, I κ B α , GILZ, GITR és az IRF8, azonban ezek közvetlen Gre-n keresztüli szabályozása még nem teljesen bizonyított.

4.6. A glükokortikoid hormon különböző hatásmódjai

Noha régóta ismert a sokrétű hatása a glükokortikoid hormonnak, a hatásmechanizmusa még a mai napig nem tisztázott és kutatások előterében áll. Azon kívül, hogy ligand-szabályozott módon gének átíródását fokozza, ligand kötött állapotban DNS kötése nélkül is képes génexpresszió szabályozására azáltal, hogy más transzkripciós faktorokhoz kötődve azok működését gátolja vagy fokozza. Legismertebbek az AP1 transzkripciós faktorról létrejött kölcsönhatásai.

A klasszikus, lassú, genomikus hatásmódon túl egyre több adat áll már rendelkezésre a sokkal gyorsabb, percek alatt kifejlődő glükokortikoid hormonhatásokról is. Mivel ezek a nagyon sokrétű hatások sokkal gyorsabbak annál, minthogy gének aktivációján vagy elnyomásán alapulhatnának, nem-genomikus hatásoknak hívjuk őket, hogy megkülönböztessük a klasszikus hatásoktól. Bizonyították, hogy a glükokortikoidok nagyon rövid idő alatt (<30 perc) gátolják a fagocitózist és a szuperoxid-anion termelést rágszáló peritoneális makrofágjaiban (**Long és mtsai, 2005**). A glükokortikoidok szintén gyorsan hatnak a különböző jelátviteli utak aktivitására: in vitro GC kezelések hatására gyors biokémiai változásokat találtak, melyek az intracelluláris Ca⁺⁺ szintet, másodlagos messengerek szintjét, illetve különböző jelátviteli fehérjék foszforilációját (pl.: MAPK, annexin-1, foszfolipáz A2) érintették (**Solito és mtsai, 2003**). Preklinikai és klinikai megfigyelések szerint a GC hormon kardioprotektív hatását gyors, nem-genomikus

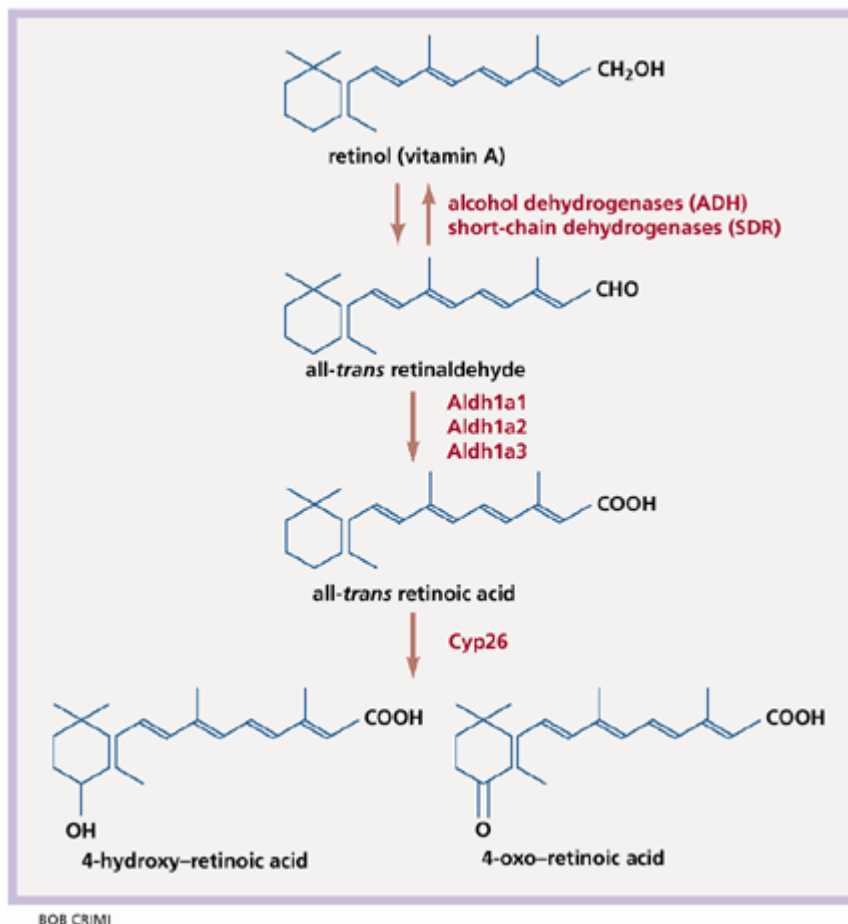
mechanizmussal váltja ki, mivel túl gyorsan alakul ki és nem lehet transzkripció gátlóval megakadályozni a kifejlődését (**Hafezi-Moghamed és mtsai, 2002**). Hasonló, nem-genomikus hatásmódú neuroprotektív hatásról számoltak be nagy dózisú GC kezelés után cerebrális ischaemiás modellben (**Buttgereit és mtsai, 2004**).

4.7. A retinsavak és retinoid receptorok

Az A-vitamin elengedhetetlen mikroelem az epitéliális szövetek megfelelő differenciálódásához, a látás folyamatához és a szaporodáshoz, valamint alapvető szerepe van a szerzett és veleszületett immunitás fenntartásában (**Reifen, 2002**). Régóta ismert, hogy az A-vitamin hiánya immundeficienciával jár együtt és számos fertőző betegség iránt érzékenyít (**Goodman, 1994**). A-vitamin hiányos állatokban határozott, erőteljes lép és tímusz atrófiát figyeltek meg. Az A-vitamin származékai, a retinoidok nagy dózisban toxikus hatásúak és a limfoid szervek, különösen a tímusz involúcióját, visszafejlődését okozzák, ugyanakkor mérsékelt, toxikus szint alatti dózisban a csecsemőmirigy súlyának, a timikus kis limfociták számának és a nyirokcsomók cellularitásának szignifikáns növekedését eredményezik (**Szondy, Reichert és Fésüs, 1998**). Az A-vitamin immunrendszerre gyakorolt hatását elsősorban annak aktív metabolitjai, a retinsavak – a transz és a 9-cisz-retinsav – közvetítik, mivel az A-vitamin hiány immunrendszerre vonatkozó tüneteit meg lehetett szüntetni retinsavak adásával (**Mendelsohn és mtsai, 1994**). A retinsavak a sejtmagban elhelyezkedő retinsav receptor család ligandjai (**Mangelsdorf, 1994**).

A retinsavak nagy affinitással kötődve receptoraikhoz, a biológiai folyamatok széles körében szabályozó szereppel rendelkeznek, ezért termelésük és katabolizmusuk nagyon szorosan szabályozott. A retinol retinsavvá történő oxidatív átalakításában számos különböző gén családba tartozó enzim vesz részt (**Ross, 2003**). Az enzimatis folyamat első lépése során az A-vitaminból retinaldehid keletkezik alkohol dehidrogenáz (ADH) izoenzimek segítségével (**Chen és mtsai, 2000**). A rövid szénláncú alkohol dehidrogenáz/reduktáz (SDR) enzim olyan reverzibilis reakciót katalizál, mely során a retinol retinaldehiddé (RAL) oxidálódik és a RAL a későbbiekben redukálódik retinollá. A második lépés a retinaldehid átalakítása retinsavvá. A folyamatban résztvevő enzimek a retinaldehid dehidrogenázok családjának tagjai (**Ziouzenkova és mtsai, 2000**). Meg kell említeni még két enzimet, melyek a retinoid homeosztázisában kulcsfontosságúak: az egyik a lecitin:retinol aciltranszferáz enzim, ami a retinol észterifikációját katalizálva elősegíti a retinsav bioszintézis down-

regulációját (**Ross, 2003**), a másik a CYP26, a citokróm p450 család retinsav által indukálható tagja, ami a retinsavak degradációjáért felelős enzim (**Vermot és mtsai, 2000; Kiss és mtsai, 2008**).

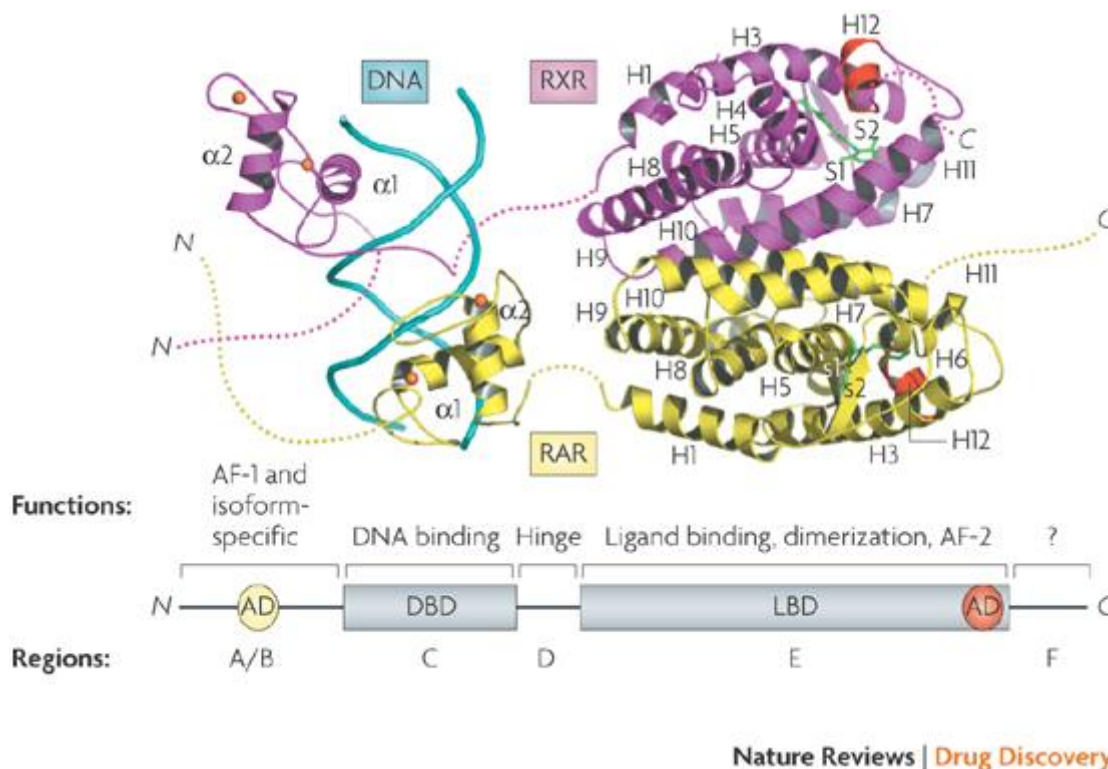


3. ábra: A-vitamin metabolizmusa

A transz-retinsav (ATRA) és a 9-cisz-retinsav (9cRA) számos szövetféleségben megtalálható, hatásuk specifikus receptoraik, a retinoid receptorok ligálásán alapul. A magi szteroid/tireoid/retinoid hormonreceptor szupercsaládba tartozó receptorok ligand-függő transzkripciós faktorok, melyek specifikus válaszadó elemeikhez kötődve (RARE, RXRE) szabályozzák bizonyos célgének expresszióját. Más transzkripciós faktorokkal is kölcsönhatásba léphetnek, ezáltal szabályozzák azok működését (**Szondy, Reichert és Fésüs, 1998**).

A magreceptorokra általánosan jellemző, 3 fő doménből álló szerkezet megfigyelhető a retinoid receptorok esetében is. A C-terminális ligandkötő domén (LBD), mely multifunkcionális, a ligandkötő hely mellett tartalmaz egy receptor dimerizációért és egy

receptor-függő transzaktivációs funkcióért felelős régiót (**Cao és mtsai, 2004**). A DNS kötő domén (DBD) a receptort specifikus DNS szekvenciákhoz, a válaszadó elemekhez irányítja. Két nagymértékben konzervált Zn-ujjat tartalmaz, melyek egyike a DNS-kötésért felelős régiót tartalmazza, a másik a dimerizációt biztosítja (**Ádám, Dux, Faragó, Fésüs, Machovich, Mandl és Sümegi, 2002**). A harmadik fő domén a variábilis hosszúságú N-terminális domén.



4. ábra: Retinoid receptorok szerkezete (Angle R. at al.; Nature Reviews, 2007)

A retinoid receptoroknak két típusa ismert: retinsav receptor (Retinoic Acid Receptor, RAR) és retinoid X receptor (RXR) (**Szondy, Reichert és Fésüs, 1998**). Az RXR specifikus agonistája a 9-cisz retinsav, míg az RAR ligálásában mindkét retinsav egyaránt, de különböző affinitással részt vesz. A transz-retinsav fiziológiai koncentrációban nem kötődik az RXR-hoz, így a nagyobb koncentrációnál megfigyelhető RXR aktiválás annak a valószínűsíthető következménye, hogy a transz-retinsav 9-cisz retinsavvá alakul (**Szondy, Reichert és Fésüs, 1998**). Az RAR-nak 3 altípusa van (RAR α , RAR β , RAR γ), mindegyik rendelkezik további izoformákkal, melyek az N-terminális A régióban térnek el egymástól. Az RAR-ok a retinoid X receptorokkal alkotott heterodimerekként funkcionálnak (**Germain, 2006**). Az RXR-nak szintén 3 altípusa van, melyek képesek homodimer kialakítására, ugyanakkor dimerizációs

partnerei között a szteroid/tireoid/retinoid magreceptor család más tagjai is megtalálhatóak, pl.: tireoid hormon receptor, D-vitamin receptor, peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor, máj X receptor, farnezoid receptor, pregnán X receptor, konstitutív androsztán receptor és néhány transzkripciósfaktorként működő „árva” receptor, mint pl. a Nur77 (**Germain, 2006**).

A retinsavak hatása az immunrendszer működésének szabályozására nézve szintén elég sokrétű. Fiziológiai koncentrációban gátolják a B-sejtek és B-sejt prekursorok proliferációját, mivel a G₀-fázisban lévő sejtek nem jutnak az osztódás S-fázisába (**Blomhoff, 2004**). Ezzel szemben azonban, a fiziológiai koncentrációjú retinsav fokozza a perifériás vérben lévő T-sejtek proliferációját, amit fokozott interleukin-2 termelés közvetít (**Blomhoff, 2004**). Ezek mellett a transz-retinsav indukálja naív FoxP3⁻ CD4⁺ T-sejtek átalakulását FoxP3⁺ regulatórikus T-sejtekké. Ezek a sejtek nagy mennyiségben expresszálnak ún. bél homing receptorokat, melyek a regulátor T-sejtek vékonybél mukózájához történő homingban töltenek be jelentős szerepet. A retinsavak pozitívan szabályozzák ezt a folyamatot. Az intézetünkben évek óta folyó kutatómunka kimutatta, hogy a retinsavak fontos szerepet töltenek be a csecsemőmirigyben lezajló T-limfocita fejlődés, timopoézis szabályozásában is (**Szondy és mtsai, 1998**).

4.8. Adenozin és adenozin receptorok

Az adenozin a szervezetben általánosan jelenlévő nukleozid, melyet a sejtek normál körülmények között is folyamatosan termelnek, azonban szöveti sérülés vagy hipoxia hatására a képződésük fokozódik. Az endogén adenozin szint növekedése citoprotektív, antiinflammatórikus és proinflammatórikus folyamatokban egyaránt megfigyelhető, de megfigyelték apoptotikus funkcióit is (**Blackburn, 2003**).

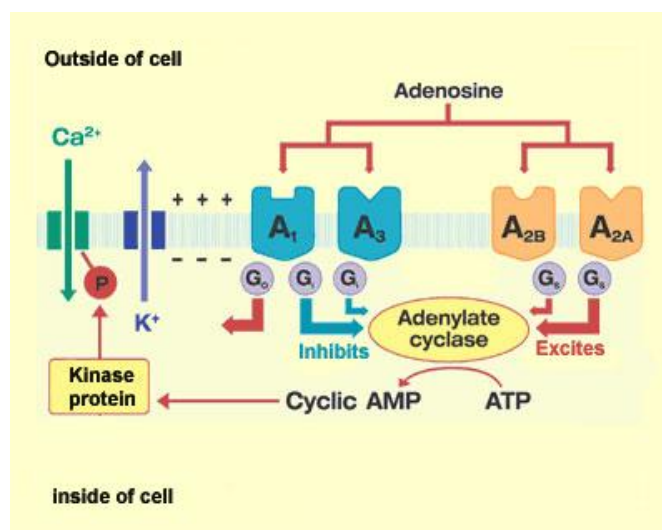
Az adenozin egy nukleozid, amely purinbázisból, adeninből és egy hozzá glikozidos kötéssel kapcsolódó cukorból, a ribózból áll. A legtöbb extracelluláris adenozin intracelluláris AMP-ből keletkezik a plazmamembránon elhelyezkedő enzim, az 5'-nukleotidáz hatására (**Polosa, 2002**). Az AMP a koncentráció gradiensének megfelelően szabadon vándorol a sejtek között, elérve a sejthártyát, az ott lévő 5'-nukleotidáz enzim adenozinná hasítja. Az intracelluláris AMP a sejtek energiafelhasználása során keletkezik ATP-ből. Normális esetben az AMP-t a szervezet visszalakítja ATP-vé, azonban fokozott energiaszükséglet, vagy hipoxia esetén az AMP defoszforilálódva adenozinná alakul. Az intracelluláris adenozint a sejtben lévő enzimrendszer alacsony szinten tartja, egyrészt az adenozin-kináz enzim révén, mely

AMP-vé alakítja az adenozint, másrészt ha az energiaigény nagy, akkor az adenozin-deamináz enzim lebontja inozinná és hipoxantinná, ami később tovább bomlik húgysavra. Az extracelluláris adenozin a koncentráció grádensnek megfelelően egy nukleozid transzporterén keresztül áramlik az extra- és intracelluláris tér között, de mivel az igen hatékony enzimrendszer folyamatosan alacsony szinten tartja az intracelluláris adenozin szintet, ezért az extracelluláris szint is alacsony (**Polosa, 2002**).

A timociták esetében az adenozin a normál körülmények között lezajló limfocita szelekció során folyamatosan termelődik, mert az elhaló sejteket fagocitáló makrofágok kibocsátják. A timocitákban a legtöbb adenozin hasítódik az adenozin-deamináz enzim által, folyamatos alacsony adenozin szintet tartva fent. Azonban az elhalt sejtek fagocitózisa folyamatosan eredményez olyan magas adenozin szintet, ami aktiválhatja az A_{2A} és A_3 receptorokat.

A normál immunfolyamatok szabályozása során az adenozin a sejtfelszíni purinerg receptorokhoz kötődik, aminek következtében mind egér, mind pedig humán timociták és aktivált T-sejtek apoptózisát is képes kiváltani (**Szondy, 1997**).

Az, hogy az adenozin milyen típusú sejtműködést serkent vagy gátol az függ az aktivált adenozin receptor típusától. Gerincesekben az adenozin receptorok a purinerg (P) receptorok családjába tartoznak, amelynek endogén ligandjai az adenozin, az AMP, az ADP és az ATP. A purinerg receptorokat attól függően, hogy adenin-nukleozidra (adenozin) vagy nukleotidra (ATP) érzékenyek, P1 és P2 csoportba soroljuk. A P1 receptorok azonosak az adenozin-receptorokkal. Ez utóbbiak 4 félé alcsoportra oszthatóak: A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 (**Plaut, 1987**).



5. ábra: Adenozin receptorokon keresztül zajló jelátvitel

Ezek közül valamennyi G fehérje kapcsolt (**Ohta és Sitkovsky, 2001**).

Az A_1 receptorokat az adenosin már 10^{-7} M-os koncentrációban aktiválja. E receptor által szabályozott jelátvitel a G_i és G_o fehérjéken keresztül történik, mely során az adenilát-cikláz enzim aktivitása gátlódik, ami a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) szintjének csökkenéséhez vezet. Az A_{2A} és A_{2B} receptorokat magasabb koncentrációban, 5×10^{-7} M és 10^{-5} M-nál aktiválja az adenosin és ezek G_s fehérjék aktiválásán keresztül hatnak, így serkentik az adenilát-cikláz, ezáltal emelik a cAMP szintjét. Az adenosin receptorok harmadik csoportja, az A_3 receptorok esetében az adenosin 10^{-6} M-os koncentrációban stimuláló hatású és ezek szintén G_i -fehérje kapcsoltak, miáltal adenilát cikláz gátolnak és cAMP szintet csökkentenek (**Oláh és Stiles, 1995**).

A receptorok működése során létrejövő tényleges sejtválasz a PKA rendszer aktivációja és további fehérjék foszforilációja révén jön létre (**Kizaki és mtsai, 1990**). Emelett az adenosin receptorok G-fehérjéken keresztül a foszfolipáz C (PLC) enzim működését is befolyásolhatják, melynek megnövekedett aktivitása révén, az IP3 termelésén keresztül, az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} - felszabadulás figyelhető meg (**Szondy, 1994**).

Az adenosin dezamináz enzim hiányában megfigyelt adenosin koncentráció emelkedés és az azt követő T (és B) sejt immundeficiencia hívta fel a figyelmet arra, hogy az adenosinnak erős timocita ölő hatása van. Egér kísérletek bizonyították, hogy ez az ölő hatás az adenosin A_{2A} receptorokon keresztül közvetítődik. Az ölés mechanizmusát azonban korábban nem tisztázták.

Korábbi, a laborunkban folytatott vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy retinoidok termelődnek a tímikus környezetben is (**Kiss és mtsai, 2008**) és képesek a neglektált sejtek apoptózisát is kiváltani (**Szondy és mtsai, 1998**), valamint a glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalást fokozni (**Fésüs, Szondy és Uray, 1995**). Előzetes eredményeink azt is igazolták, hogy az apoptotikus sejteket eltávolító makrofágok adenosint bocsátanak ki, illetve, hogy az adenosin sejthalált is kiválthat. Más kutatócsoportok egér timocitákon végzett kísérletei azt bizonyították, hogy a hatást az adenosin az A_{2A} receptor közvetíti.

Ezen előzmények alapján, kísérleteimben két területet kívántam vizsgálni: 1. Milyen mechanizmussal fokozzák a retinoidok a glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalást 2. Milyen mechanizmussal váltja ki az adenosin az A_{2A} receptor stimulációján keresztül az egér timociták elhalását?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5. 1. Anyagok

Az összes retinoid, amit kísérleteinkben használtunk a Galderma Research & Development (Sophia Antipolis, Franciaország)-tól származik, az ATRA és 9cRA kivételével, amelyet a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) forgalmaz, az AM580 Tocris Bioscience (Ellisville, MO) terméke, az LG00268-at pedig R. Heyman (Ligand Pharmaceuticals)-tól kaptunk. A dexametazon-acetát szintén a Sigma-Aldrich terméke. A felhasznált plazmidok Ron Evans (San Diego, Kalifornia)-tól származtak. A proteináz K, a ribonukleáz A, a propidium jodid, az Rp-adenozin 3',5'-ciklikus monofoszfotioát trietilammónium só, a NECA, a DPMA, a forskolin, az 1,9-dideoxyforskolin, a dbcAMP, a kolera toxin, a Fas/Fc kiméra protein, a CGS21680 és a cAMP Enzyme Immunoassay Kit a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) terméke. A humán TRAIL R2/Fc kiméra fehérje (szolubilis DR5) molekula R&D Systems (Minneapolis, USA) származik. Minden egyéb általunk felhasznált reagens vagy vegyszer analitikai tisztaságú volt és kereskedelmi forrásból beszerezhető.

5. 2. Kísérleti állatok

A kísérletek során a következő egereket használtuk: 4 hetes NMRI egerek (LATI, Gödöllő, Magyarország), 4-5 hetes vad típusú, A2A^{-/-}, Nur77^{-/-}, Bim^{-/-}, FADD-domináns negatív transzgén, *vav-bcl-2-269*, *Eμ-bcl-2*. Az NMRI egereket kivéve minden egér C57/BL6 háttérű. Az *in vivo* timocita apoptózis indukció során 4 hetes egereket oltottunk intraperitoneálisan 0.5 mg dexametazon-acetáttal önmagában vagy 50μg AM580-al vagy 50μg LG268-al együtt 0.1ml etanol és 0.4ml fiziológias sóldatban oldva. Az adenzin *in vivo* hatásának teszteléséhez, a kísérleteknél feltüntetett módon és mennyiségben, NECA-t alkalmaztunk. A kontroll állatok az oldószerrel voltak oltva. Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Állatházának a jóváhagyásával történtek.

5. 3. Módszerek

5. 3. 1. Timocita populációk karakterizálása

24 órás különböző *in vivo* kezelések után izoláltuk a timocitákat a tímuszból, majd a sejteket két mosást követően 0.1% -os nátrium savat tartalmazó jéghideg PBS-ben vettük fel a PE jelölt anti-CD4 és FITC jelölt anti-CD8 festés előtt (BD Biosciences Pharmingen,

Erembodegen, Belgium). A sejteket 30 percig 4°C-on inkubáltuk a jelölő anyaggal, majd két, 1%-os BSA-t és 0.1%-os nátrium-savat tartalmazó jéghideg PBS-es mosást követően 0.1%-os nátrium-savat tartalmazó PBS-ben vettük fel. A jelöletlen timociták, mint autofluoreszcens kontrollok esetében az eljárás hasonló volt. A kétszeres fluoreszcencia 488nm-en, Becton Dickinson FACScan-nel (BD Biosciences) volt detektálva.

5. 3. 2. Timocita kultúrák, sejtvonalak és apoptózis detektálás

A timocita kultúrákat 4 hetes NMRI és RAR α knock out egerek tímuszából izoláltuk, majd RPMI 1640 médiumba (10% charcoal-treated FCS, 2mM glutamin, 100 IU penicillin/100 μ g streptomycin/ml) vettük fel. Ezt követően a timociták 3 egymást követő mosása után beállítottuk a végleges sejtszámot (5×10^6 sejt/ml), majd 37°C-on tartottuk őket, 5% CO₂/95% levegő atmoszférájú inkubátorban. Az izolálást követően a sejthalál detektálását a sejtek tripán-kék festékekkel történő jelölésével végeztük. A kinyert sejtek 95-98%-a nem jelölődött a festékekkel.

A kísérletek során használt sejtvonalak közül az IP-12-7 CD4⁺ T-sejt hibridómák BALB/c egerből származnak, melyet először preimmunizáltak az influenza vírus hemagglutinin HA317-341 peptidszakaszával, majd ezt követően A/PR/8/34 humán influenza vírus A-val oltottak (**Eicher és Waldmann, 1998**). A Kit225 IG3 sejtvonal egy IL-2 független humán leukémia T-sejt szubklón (**Rajnavölgyi és mtsai, 1994**). A CCRF-CEM sejtek limfoszarkóma és akut limfoblasztos leukémia tünetegyüttesében szenvedő gyermek perifériás véréből származnak, melyet Buzás Edit (Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Budapest) bocsátott a rendelkezésünkre.

Az apoptózis vizsgálatok során a timociták és a T-sejt vonalak dexametazonnal (1 μ M) és különböző retinoidokkal voltak kezelve 6 órán keresztül 10% delipidált FCS (Sigma-Aldrich, Budapest) jelenlétében. A dexametazon és a retinoidok beoldásához használt DMSO végső koncentrációja minden minta esetében 0.5% volt. A timociták esetében a kezelések hatására bekövetkező DNS degradáció mértékét difenil reagenssel határoztuk meg. A T-sejt vonalak esetében a degradált DNS-t tartalmazó sejtek (sub G₀-G₁ sejtek) %-os arányának meghatározása áramlási-citométerrel történt, miután a sejteket etanollal fixáltuk, majd Rnáz A kezelést követően propopidium jodiddal jelöltük. Az apoptózis indukció további igazolásához Annexin V jelölést alkalmazva, „FITC Annexin V Detection Kit” (BD Pharmingen, San Diego, CA) felhasználásával is meghatároztuk a kezelések hatására kiváltódott apoptózis mértékét. Ennek során a kezeléseket követően, a sejteket 2x mostuk PBS-ben, majd felvettük

mintánként 100µl 1x-es, annexin V „Binding” pufferben, amelyhez 5µl FITC Annexin V-öt és 5µl propidium jodidot adtunk. 15 perces, sötétben történt inkubáció után, 400 µl „Binding” puffert adtunk a mintákhoz, majd áramlási citométerrel meghatároztuk az apoptózis mértékét.

Az emlős-két hibrid rendszerrel végzett kísérletek során használt 293T sejtek, valamint a tranziens transzfekciós esszékben alkalmazott COS1 sejtek 10% delipidált FCS-ben voltak tartva antibiotikumok adása mellett.

5. 3. 3. PI-PLC immunprecipitáció és Western blot

A timocitákban lévő, glükokortikoid receptorhoz kapcsolódó fehérjék kimutatására immunprecipitációt alkalmaztunk. A sejteket dexametazonnal (1 µM) önmagában illetve 9-cis retinsavval (0.3 µM) kezeltük 30 percig. A kezelések után a sejteket összegyűjtöttük, majd RIPA lízis pufferben (50mM Tris-HCL, pH 8.0; 137mM NaCl; 10% glicerol; 1% Nonidet P-40 (NP-40); 1nM nátrium-vanadát; 10mM nátrium-pirofoszfát; 50mM nátrium-fluorid; 1mM fenilmetilszulfonil fluorid; 10 µg/ml leupeptin; 2 µg/ml aprotinin) lizáltuk. A foszfortirozin tartalmú peptideket agaróz-konjugált 4G10 antitesttel (Upstate Biotechnology, Waltham, MA) immunprecipitáltuk, majd Western blottal anti-PI-PLC antitest felhasználásával (Upstate Biotechnology, Waltham, MA) mutattuk ki a PI-PLC fehérjét. Az antigén-antitest komplex láthatóvá tétele kemilumineszcencián alapuló detektálással történt.

5. 3. 4. Nur77, FasL, NDG-1 és -2, Bim mRNS expressziójának detektálása RT-PCR technikával

A 4 órás kezeléseket követően a fenti gének mRNS expressziós mértékének meghatározása RT (reverz transzkriptáz)-PCR-al történt. Totál RNS Trizol-os izolálását követően, az mRNS-eket, amelyek poliA véget hordoznak, oligo dT primer és reverz transzkriptáz enzim segítségével egyszálú cDNS-sé írtuk át, majd adott paraméterek alapján (Long, 2005) PCR reakciót végeztünk. A kapott, adott hosszúságú termékeket agaróz-gélen megfuttattuk.

A kísérlet során használt primerek:

-Nur77: sense 5'-TTC ATC CTC CGC CTG GCA TAC C-3'; antisense 5'-GTC CGA AGC TCA GGC AGT TTG C-3' (353bp)

-FasL: sense 5'-CAG CAG TGC CAC TTC ATC TTG G-3'; antisense 5'-TTC ACT CCA GAG ATC AGA GCG G-3' (471bp)

-Bim: sense 5'-TCA ATG CCT TCT CCA TAC CAG-3'; antisense 5'-ATG GCC AAG CAA CCT TCT GAT G-3' (Bim_{EL}: 591bp; Bim_L: 423bp)

-NDG-1,2: sense 5'-GCA AGG CAG ATT CCA AGG TCT-3'; antisense 5'-TCC CCC TTT GTT AAG TGC ATA ATA A-3' (352bp)

- β -aktin: sense 5'-GGC TAC AGC TTC ACC ACC AC-3'; antisense 5'-GCG CTC AGG AGG AGC AAT G-3' (423bp)

5. 3. 5. GILZ, Nur77, FasL, NDG-1 és -2, Bim valamint TRAIL mRNS expresszió meghatározása Q-PCR technikával

A kezeléseket követően, az egyes gének expressziójának meghatározásához kvantitatív polimeráz láncreakció (Quantitative Polymerase Chainreaction, Q-PCR) technikát alkalmaztunk. A sejtekből a totál RNS-t RNeasy® Mini Kit (Quiagen, Hilden, Németország) felhasználásával izoláltuk. Ennek során a sejteket 1% β -merkaptóetanolt tartalmazó lízispufferben lizáltuk (RTL Buffer), majd 70%-os etanolt adtunk a mintákhoz. A mintákat az RNS kikötésére alkalmas membránt tartalmazó oszlopra vittük fel és a megadott feltételek alapján centrifugálásos és mosási lépéseket követően 50 μ l steril, Rnáz mentes desztillált vízbe visszaoldottuk az oszlopra kötődött RNS-eket. Ezt követően az RT lépésben, a cDNS szintéziséhez 100nM totál RNS-t használtunk mintánként. Az RT reakció 42°C-on 30 percig, majd 72°C-on 5 percig specifikus reverz primer és Superscript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) alkalmazásával történt. Az RT lépést követően ABI Prism 7900-as készüléket használva, 94°C-on 12 másodpercig, majd 60°C-on 1 percig tartó hőmérsékleti körülmények között lezajló 40 ciklust követően TaqMan próbák alkalmazásával meghatároztuk a keletkezett transzkriptek mennyiségét. A kapott eredményt a konstansan expresszáldó ciklofillin génre normalizáltuk.

A kísérlet során használt primerek:

-mGILZ: reverse 5'-CTT CAG TGG ACA GAT CAG GGA G-3'; forward 5'-AGA CCA GCC TCA CAA TGC G-3'

-Nur77: reverse 5'-GAG CCC GTG TCG ATC AGT G-3'; forward 5'-TGA TGT TCC CGC CTT TGC-3'

-FasL: reverse 5'-GCC ACC TTT CTT ATA CTT CAC TCC AG-3'; forward 5'-AAC CCC CAC TCA AGG TCC A-3'

-NDG-1: reverse 5'-AAA GAC TGC TCC CTG ATT CCG-3'; forward 5'-GCA GAT CCG GGA TCA TCC T-3'

-NDG-2: reverse 5'-GGG AGC TCA GAC CGT GAT TG-3'; forward 5'-GAG CGA CCT AAC CCT GTG TGA G-3'

-Bim: reverse 5'-TGA GAC TGT CGT ATG GAA GCC-3'; forward 5'-TCA ACA CAA ACC CCA AGT CCT-3'

-TRAIL: reverse 5'-TGG TTG AGA AAT GAA TGC CCT-3'; forward 5'-GGA TGG AAA GAC CTT AGG CCA-3'

-mCyc: reverse 5'-TCT GCT GTC TTT GGA ACT TTG TC-3'; forward 5'-CGA TGA CGA GCC CTT GG-3'

5. 3. 6. Tranziens transzfekció

COS1 sejteket a transzfekció előtt 24 órával 48 lyukú plate-re szélesztettük (10^5 sejt/lyuk). Másnap a sejtek tranziens transzfekcióját polietilén-imin (PEI) (Promega, Madison, Wisconsin) reagenssel végeztük. pCMX-GRE-luc plazmiddal önmagában vagy pCMX-FL-hRAR α és/vagy pCMX-FL-hRXR α plazmidokkal együttesen transzfektáltuk a sejteket 5 órán keresztül 10%-os delipidált FCS-t tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) jelenlétében (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary). A riporter plazmidból, pCMX- β -Gal, is az előzőkhöz hasonló mennyiséget juttattunk a sejtekbe. 5 óra transzfekciót követően friss médiumot adtunk a sejtekhez, majd ezt követően 48 órán keresztül kezeltük dexametazon és retinoidok meghatározott koncentrációival. A kezelés leteltét követően, a sejteket 2x mostuk 1%-os PBS (foszfát puffer)-sel, majd sejteltávolítást végeztünk lizispuffer jelenlétében 2 órán át szobahőmérsékleten és ezt követően 2 lépéses fagyasztásos eljárással. Az enzimaktivitás mérése a feltárást követően a felülúszóból történt. A luciferáz enzimaktivitását a Luciferase Assay System Kit (Promega, Madison, Wisconsin) segítségével határoztuk meg. A β -galaktozidáz enzimaktivitását spektrofotometriával mértük az ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) hasítási rátája alapján. A kapott luciferáz aktivitásokat a kontrollként használt β -galaktozidáz aktivitásokkal normalizáltuk.

5. 3. 7. A tranziens transzfekciót követő Western blot analízis

48 órás transzfekciót követően Western blot technikát alkalmazva vizsgáltuk, hogy a minták esetében a transzfekció során azonos mértékű plazmid bejuttatása történt-e meg. 48 óra után, a sejteket összegyűjtöttük, majd SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. Az elválasztott fehérjéket polivinil-difluorid (PVDF) membránra blottoltuk át. Az RAR α illetve RXR α fehérjéket specifikus anti-egér RAR α és RXR α antitesttel mutattuk ki. Másodlagos antitestként anti-egér IgG-t használtunk. Kontrollként β -aktin antitestet alkalmaztunk.

5. 3. 8. Ko-immunprecipitáció

Annak bizonyítására, hogy a GR és RAR α receptorok között közvetlen interakció alakul ki, egyrészt ko-immunprecipitációs technikát alkalmaztunk. Ennek során a timocitákat (4×10^7) dexametazonnal ($1 \mu\text{M}$) és különböző ligandokkal kezeltük önmagukban vagy együttesen 1 órán keresztül 10% delipidált FCS-t tartalmazó RPMI médium jelenlétében. A kezelést követően a timocitákat lizáltuk és a GR-ot immunprecipitáltuk agaróz-kapcsolt anti-egér GR antitest (SantaCruz, California) hozzáadásával a cég által megadott instrukciók követésével. SDS poliakrilamid gél-elektroforézist követően Western blot technikával anti-egér GR és anti-egér RAR α alkalmazásával azonosítottuk az immunprecipitált GR-t és a vele ko-immunprecipitálódott RAR α receptort.

Egy ettől független kísérletben, de ugyanilyen módon vizsgáltuk a GR Ser211-en történő lehetséges foszforilálódásának változását retinoid kezeléseket követően. Ebben az esetben specifikus, a foszforilált Ser211 ellenes antitestet használtunk.

5. 3. 9. Emlős két-hibrid rendszer

Az ko-immunprecipitációs kísérlet mellett, annak bizonyítására, hogy a glükokortikoid receptor és a retinoid receptorok között direkt interakció jön létre, emlős két-hibrid esszét alkalmaztunk. 293T fibroblaszt sejteket transzfektáltunk pCMX-Gal-L-hGR és pMH100-TK-luc plazmidokkal önmagukban, vagy VP-hRAR α -LBD illetve VP-hRXR α -LBD-t kifejező plazmidokkal együttesen. A normalizáló kontrollként pCMX- β -galaktozidáz-t kifejező plazmidot alkalmaztunk. A kísérlet menete és a luciferáz aktivitás meghatározása a tranziens transzfekciós kísérletekhez hasonlóan volt végezve és normalizálva.

5. 3. 10. Intracelluláris cAMP koncentráció meghatározása

Mintánként 10^6 sejtől kiindulva, a különböző kezeléseket követően az intracelluláris cAMP koncentrációjának meghatározása cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) használatával történt, a kit által megadott instrukciók alapján.

5. 3. 11. A citoszolikus Ca^{2+} koncentráció meghatározása timocitákban

A timocitákat (1×10^7 sejt/ml) 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten $5 \mu\text{M}$ Fura-2AM-t (Fura-2-acetoximetil-észter) tartalmazó RPMI 1640 médiumban (0.2 mM L-Glutamin, 5% FCS) tartva kezeltük. A kezelést követően lemostuk a sejtekről a Fura-2AM-t és friss médiumba vettük fel őket. Quartz küvettában $340/380 \text{ nm}$ -en spektrofotométerrel határoztuk meg a Ca^{2+} koncentrációjában beállt változás mértékét.

5. 3. 12. Oligonukleotid-vég jelölés

A Nur77 adenzin hatására bekövetkező DNS-kötő képességének vizsgálatához szükséges jelölt oligonukleotidok előállítására szolgáló technika. A kísérlet során a mintákat NBRE (Nur77 binding response element) –re specifikus elülső (sense) és hátulsó (antisense) oligonukleotidokat hőkezeltük 68°C -on 15 percig, majd fokozatosan lehűtöttük őket 4°C -ra. A kapott duplaszálú oligonukleotidot (100ng) 2 MBq [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP-vel jelöltük 25 U T₄- kináz segítségével 70mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.6$), 10mM MgCl_2 és 5mM DTT mellett 37°C -on 1 órán keresztül. Ezt követően 6% -os nem-denaturáló poliakrilamid gélen megfuttatva az elegyet, majd a kapott sávoknak megfelelően kivágtuk a gélből és Tris-EDTA pufferben (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) kidiffundáltatva gélzemcsék közül, tisztítottuk meg a jelölt DNS darabokat a nem jelölődött daraboktól.

Az NBRE elülső (sense) oligonukleotid szekvenciája: $5'$ -GAT CCT CGT AAA AGG TCA AGC GCT A- $3'$.

5. 3. 13. Sejtmagi extraktum kinyerése timocitákból

A kezeléseket követően a timocitákat $2 \times$ mostuk PBS-ben, majd felvettük őket $400 \mu\text{l}$ A pufferben (10mM Hepes $\text{pH } 7.9$; 1.5 mM MgCl_2 ; 10mM KCl; 10mM β -merkaptotanol, 1mM dithiotreitol/DTT; 1mM Na_3VO_4 és proteáz inhibitorok: $5 \mu\text{g/mL}$ leupeptin, antipain, chymostatin, 0.3mM PMSF, 1mM 6-amino-hexanoid sav). A sejtmagot tartalmazó pelletet 5 percig 4°C -on centrifugáltuk 5000rpm -en, majd 5 percig jégen tartottuk. A sejtmagi kivonatot

tartalmazó pelletet C pufferben (20mM Hepes pH 7.9; 25% glicerol; 420mM NaCl; 1.5mM MgCl₂; 10mM β-merkaptoetanol; 1mM DTT; 1mM Na₃VO₄ és proteáz inhibitorok) oldottuk vissza és jégen inkubáltuk 15 percig. A sejtmagi törmelékét 15 perces 14000 x g-vel történt centrifugálással távolítottuk el, a kapott felülúszót -70°C-on tároltuk.

5. 3. 14. Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay)

Az EMSA fehérjék DNS kötő képességének vizsgálatára alkalmazott módszer. A fehérje-DNS komplex kevésbé képes mozogni a natív agaróz gélelektroforézis során, ezért ezek a komplexek a nem kötő DNS-kontrollhoz és mintákhoz képest, nagyobb molekula tömeg felé eltolódva jelennek meg a gélben. A kísérlet során 10μg-nyi sejtmagi fehérjét 15 percig jégen tartva előinkubáltunk „binding” pufferben (5mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 0.75mM DTT; 7.5% glicerol; 0.05% Nonidet P-40) 0.25 μg/ml BSA és 0.08 U poli(dIdC) jelenlétében. Összehasonlításként az egyik esetben 1.5 μg anti-Nur77 antitestet, egy másik esetben pedig 100x-os feleslegben radioaktívan nem jeleölt („hideg”) nukleotidot is adtunk az előinkubálás alatt egy-egy mintához. 15 perc után 50000 cpm jelölt oligonukleotidot adtunk hozzájuk és további 15 percig jégen inkubáltuk az elegyeket. A kialakult komplexet 6%-os nem denaturáló poliakrilamid (akrilamid:bisakrilamid; 30:0.8) gélelektroforézissel futtattuk meg, 0.25x-ös Tris-Borate-EDTA pufferes közegben. A futtatás után a gél 80 °C-on szárítottuk 2 órán keresztül, majd autoradiográfiával értékeltük ki az eredményt.

5.3.15. Statisztikai analízis

Az egyes kezelések hatásainak vizsgálatakor a különböző kísérletek eredményeit Student félé t-próbával hasonlítottuk össze és a p<0.05 eltéréseket fogadtuk el szignifikánsan különbözőnek.

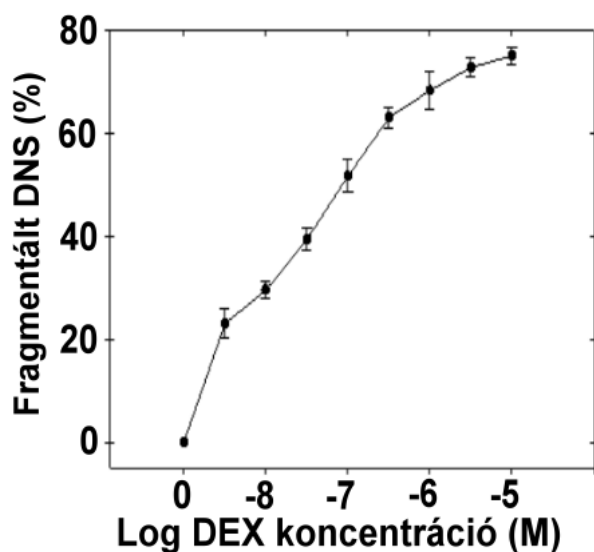
6. EREDMÉNYEK:

6. 1. A retinsav receptor (RAR) és a retinoid X receptor (RXR) ligációja fokozza az egér timociták dexametazon által indukált sejtelhalását

Előzetes kutatási eredményekből már ismert volt, hogy a glükokortikoidok képesek a T- és B-sejtek mellett a timociták apoptózisának kiváltására is (Tuckermann és mtsai, 2005; Reinhardt és mtsai, 1995). Előzetes vizsgálatok kimutatták, hogy az ATRA és a 9cRA képesek a glükokortikoid által kiváltott sejtelhalást gyorsítani. Azonban az, hogy milyen retinoid receptorokon keresztül és milyen mechanizmussal váltják ki az előzetesen megfigyelt fokozó hatást, eddig még nem volt tisztázott.

6. 1. 1. A dexametazon dózisfüggő módon fokozza a timociták apoptózisát in vitro

Kísérleteink során először a dexametazon dózisfüggő hatását vizsgáltuk egér timociták apoptózisára. Ennek során a 6 órás kezelés során a sejteket a dexametazon emelkedő koncentrációival kezeltük, majd meghatároztuk a degradálódott DNS százalékos arányát. Ahogy az 1. ábrán is látszik, a dexametazon dózisfüggő módon váltotta ki a timociták sejtelhalását 6 órás kezelést követően. A további kísérletekhez a dexametazon 0.1 μ M-os koncentrációját választottuk, hogy a retinoidok növelő vagy esetlegesen csökkentő hatását egy kísérletes rendszerben tesztelhesük.

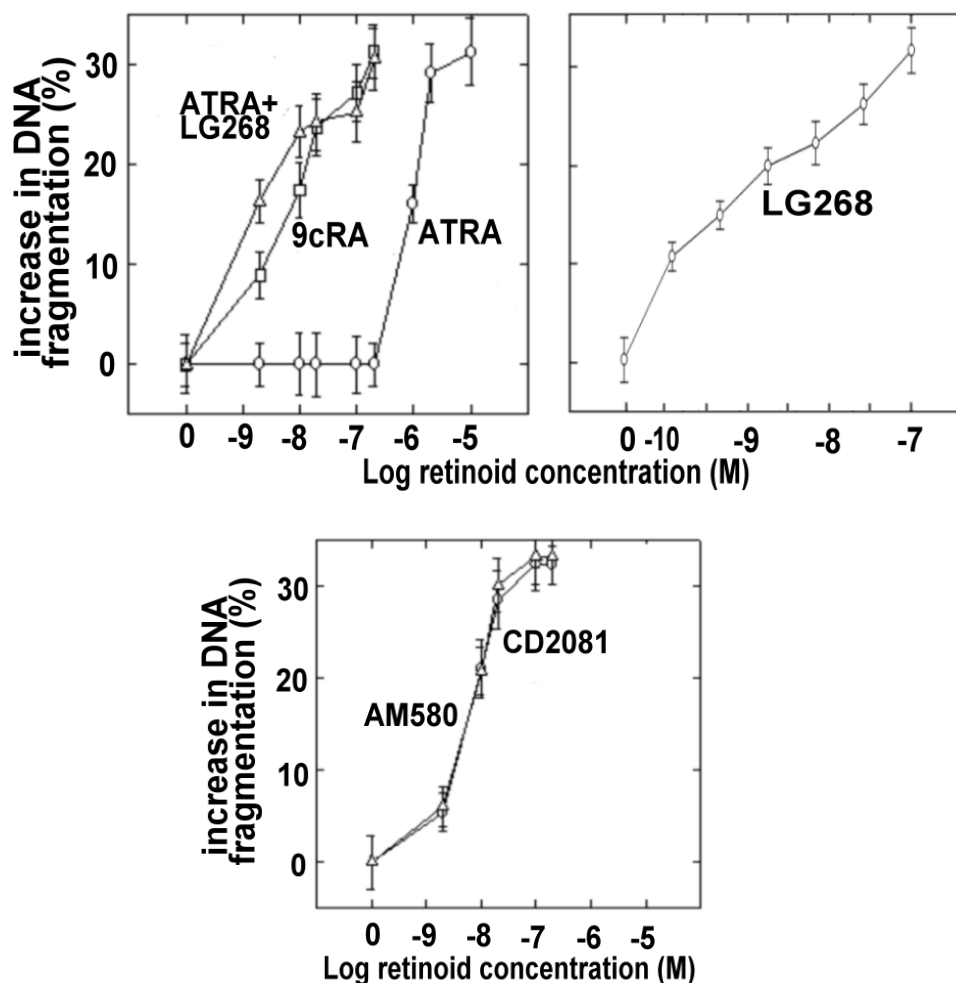


1. ábra: 6 órát követően a dexametazon dózis-függő módon indukálja a timociták DNS-fragmentációját

A kísérletekben 24 lyukú tenyésztő edényben 10^7 /ml timocitát kezeltünk dexametazon-acetát jelzett koncentrációival. Hat órával később a módszerekben leírt módon meghatároztuk a fragmentálódott DNS%-os arányát. Az adatok 3 független mérés átlagát és szórását mutatják be.

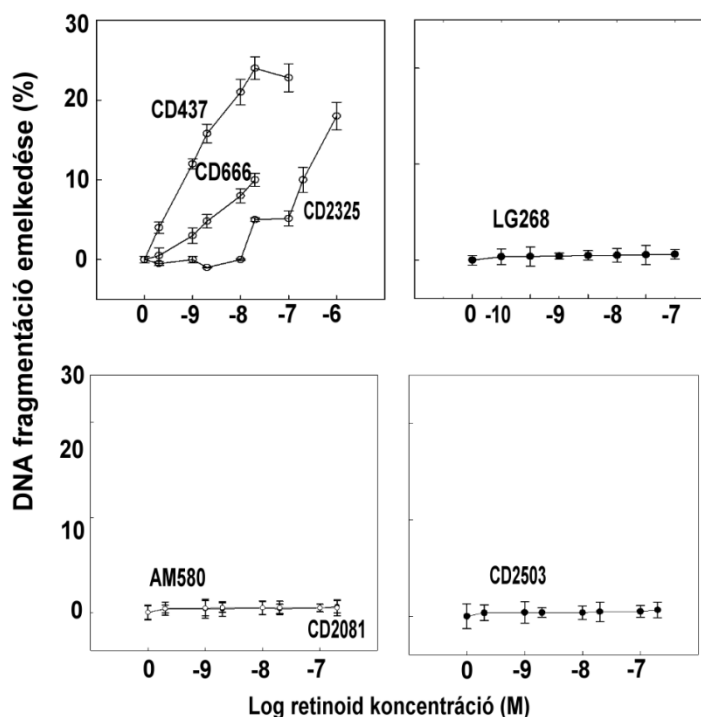
6. 1. 2. A dexametazon mellett adott RAR α illetve RXR specifikus retinoidok fokozzák az egér timociták dexametazon által kiváltott apoptózist in vitro és in vivo

A továbbiakban 0.1 μ M dexametazon (a sejtek 45%-ának elhalását kiváltó koncentráció 6 órás kezelést követően) mellett természetes retinsavak és különböző retinoid receptorokra specifikus retinoidok emelkedő koncentrációival kezeltük az egér timocitákat, majd 6 órás kezelést követően meghatároztuk a fragmentálódott DNS arányát (2. ábra).



2. ábra: A glükokortikoidok kiváltotta apoptózis fokozása az RAR α és RXR receptorok együttes ligálása révén valósul meg. Az RAR α agonista ATRA, 9cRA és CD2081, az RXR agonista LG268, valamint az ATRA/LG268 (0.1nM) kombinációja fokozza az egér timociták dexametazon (0.1 μ M) indukálta DNS fragmentációját. A DNS degradáció mennyisége csak dexametazon jelenlétében 45 $\pm$ 4% volt. Az adatok 3 független kísérlet átlagát és szórását mutatják be.

A timociták csak RAR α és RAR γ , valamint RXR receptorokat fejeznek ki (Szondy és mtsai, 1997). Az alkalmazott retinsavak és retinoidok közül az ATRA minden RAR receptort aktivál, az AM580 és CD2081 az RAR α receptor, a CD437, CD666 és a CD2325 az RAR γ , az LG268 pedig az RXR receptor agonistája. A 9cRA viszont mind az RAR, mind az RXR receptorok hatásos aktivátora. Ahogy a 2. ábra mutatja, az ATRA kivételével az összes RAR α és RXR specifikus ligand hatásosan, kb 30%-kal fokozta a timociták dexametazon kiváltotta apoptózisát. Ezek a vegyületek önmagukban nem fokozták az apoptózist (3. ábra). Másrészt az RAR γ -n keresztül ható ligandok, melyekről előzőleg már kimutatták, hogy fokozzák az egér timociták apoptózisát (Szondy és mtsai, 1997), a glükokortikoidok által indukált egér timocita apoptózis fokozásában hatástalannak bizonyultak (3. ábra). Az ATRA fiziológias koncentrációban ugyan dexametazonnal együtt adva szintén hatástalan volt, viszont abban az esetben, amikor mellette LG268-at is adtunk, fokozta glükokortikoid indukálta apoptózist. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az RAR α és RXR receptor együttes ligálása szükséges ahhoz, hogy a fokozó hatást tapasztaljuk.

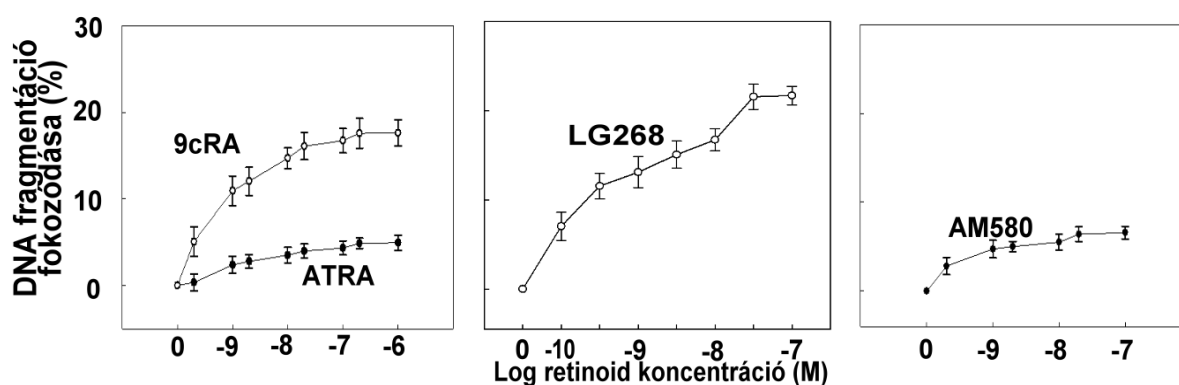


3. ábra: A vizsgált retinoidok hatása a timociták spontán apoptózisára.

10^7 /ml timocitát 6 óráig kezeltünk a retinoidok jelzett koncentrációival. A fragmentálódott DNS %-os arányát a kezelés 6. órájában határoztuk meg. A spontán DNS fragmentálódás mértéke $8 \pm 3\%$ volt. Az adatok 3 független mérés átlagát és szórását mutatják be.

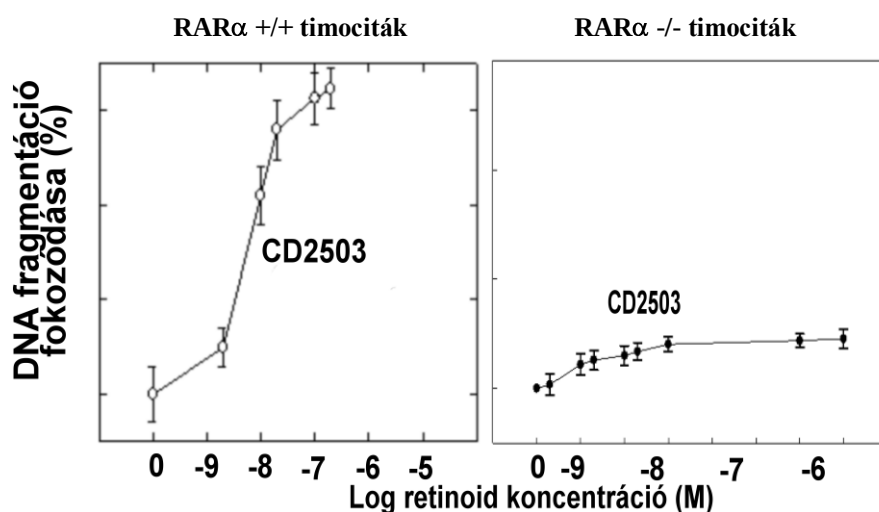
Annak megfelelően, hogy az egér timociták RAR β receptort nem expresszálnak, az erre specifikus liganddal (CD2314) történő kezelést követően fokozó hatást szintén nem tapasztaltunk.

Látva, hogy az RAR receptorok közül, egyedül az RAR α -án keresztül ható retinoidok bizonyultak hatásosnak, annak további bizonyítására, hogy valóban az RAR α receptor vesz részt a folyamatban, RAR α knock out egerekből (Chapellier és mtsai, 2002) izolált timocitákon is teszteltük a retinoidok hatását. Ahogy az 4. ábra mutatja, az RAR α receptor hiányában csak az RXR receptort aktiváló LG268 és 9cRA volt képes a glükokortikoid által kiváltott sejtelhalás fokozására. Adataink azt mutatják, hogy az AM580 és az ATRA nagy koncentrációnál megfigyelt fokozó hatása az RAR α receptoron keresztül valósul meg, de az RXR önmagában történő ligációja is hatásos lehet.



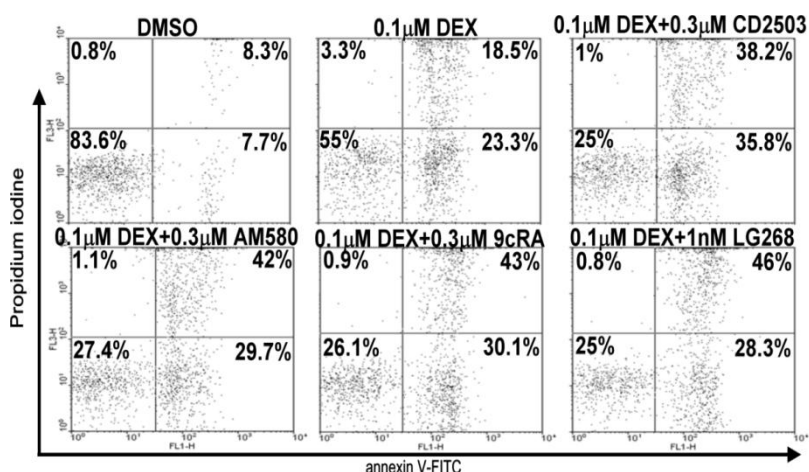
4. ábra: Az RXR specifikus retinoidok az RAR α null timociták esetében is fokozzák, míg a RAR α agonisták hatástalanok a dexametazon indukált timocita apoptózisban. 10^7 /ml timocitát 6 óráig kezeltünk a retinoidok jelzett koncentrációival. A fragmentálódott DNS %-os arányát a kezelés 6. órájában határoztuk meg. A spontán DNS fragmentálódás mértéke $8 \pm 3\%$ volt. Az adatok 3 független mérés átlagát és szórását mutatják be.

Az RAR α szerepének további bizonyításához egy RAR α antagonistának (CD2503) a hatását is teszteltük, melynek eredményét az 5. ábra mutatja be. Meglepetésünkre a vad típusú, dexametazon kezelt sejtek esetében a CD2503 önmagában adva dexametazon jelenlétében szintén apoptózis fokozódást hozott létre. A CD2503 is biztosan az RAR α -n keresztül hatott, mert az RAR α null timocitákban nem volt hasonló hatása (5. ábra). Mivel az antagonisták nem fokozza az RAR α receptor transzkripció hatását, ez a megfigyelés arra utal, hogy ahhoz, hogy a retinoidok hatásosan fokozzák a GR indukálta timocita sejtelhalást, nem szükséges a retinoid receptorok transzkripció hatása.



5. ábra: Az *RARα* antagonistá ahasonló módon fokozta a glükokortikoidok által kiváltott apoptózist. 10^7 /ml timocitát 6 óráig kezeltünk a retinoidok jelzett koncentrációival. A fragmentálódott DNS %-os arányát a kezelés 6. órájában határoztuk meg. A spontán DNS fragmentálódás mértéke $8 \pm 3\%$ volt. Az adatok 3 független mérés átlagát és szórását mutatják be.

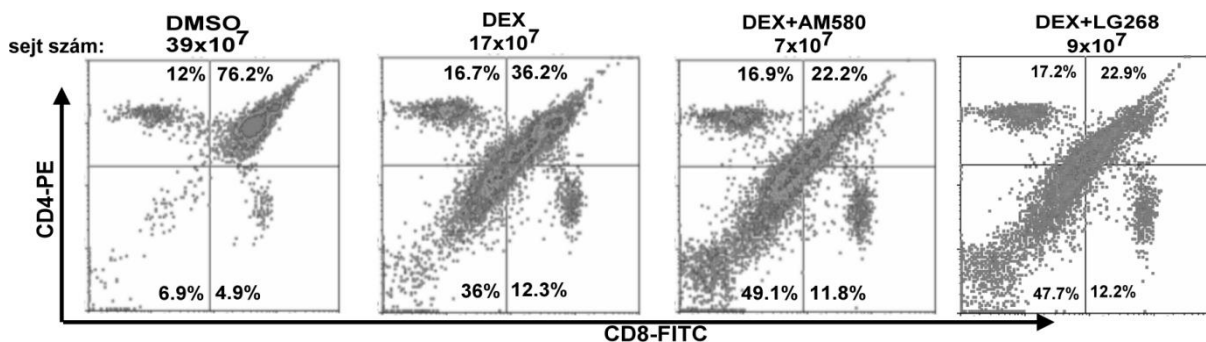
Bár a DNS fragmentáció a sejthalál apoptotikus formájának jellemzője, a timocita differenciáció során bekövetkező lehetséges DNS átrendeződés beleszólhat a fragmentált DNS apoptózisból fakadó eredetébe. Ezért annak bizonyítására, hogy a retinoidok fokozzák a glükokortikoidok hatására apoptózissal elhalt sejtek számát, együttes PI és annexin V-FITC jelölést alkalmazva, áramlási citométerrel is meghatároztuk az elhalt sejtek arányát. Ahogy a 6. ábra is mutatja, a 9cRA, AM580, CD2503 valamint az LG268 is emelte a dexametazon indukálta apoptózist éretlen timocitákban, melyek köztudottan érzékenyek a glükokortikoidokra (Cohen, 1992).



6. ábra: A timocitákban a DNS hasítás mértékével jellemzett sejtelhalás valóban apoptózis.

10^7 /ml timocitát 6 óráig kezeltünk a retinoidok jelzett koncentrációival. Az apoptotikus sejtek %-os arányát a kezelés propidium jodid/annexin V/FITC jelöléssel határoztuk meg.

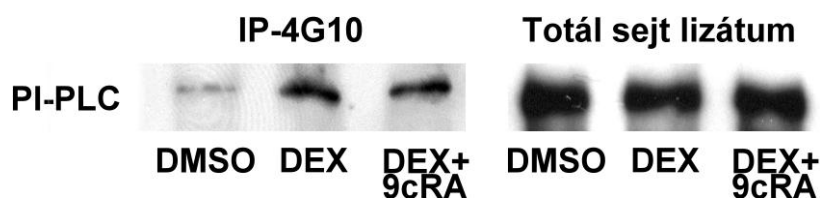
Az *in vitro* kísérletek mellett dexametazonnal (0.2 mg) és retinoiddal (50 μ g) injektálva az egereket, 24 órás *in vivo* kezelés után meghatároztuk a túlélő sejtek számát és a túlélő timociták típusát. A 7. ábrán látható módon mind az RAR α , mind az RXR ligálása fokozta a timociták glükokortikoiddal kiváltott sejtelhalását, ami leginkább a CD4+CD8+ dupla pozitív populációt érintette.



7. ábra: Retinoidok oltását követően a CD4+/CD8+ duplapozitív timociták dexametazon által kiváltott sejtelhalása fokozódott *in vivo*. Dexametazonnal (0.2mg) együttesen alkalmazva, mind az AM580 (50 μ g), mind pedig az LG268 (50 μ g) oltását követően megfigyelhető a retinoidok *in vivo* apoptózist fokozó hatása CD4+/CD8+ duplapozitív timociták esetén, 24 óra elteltével.

6. 1. 3. A retinoidok nem emelik a glükokortikoid hormon által indukált PI-PLC foszforilációt

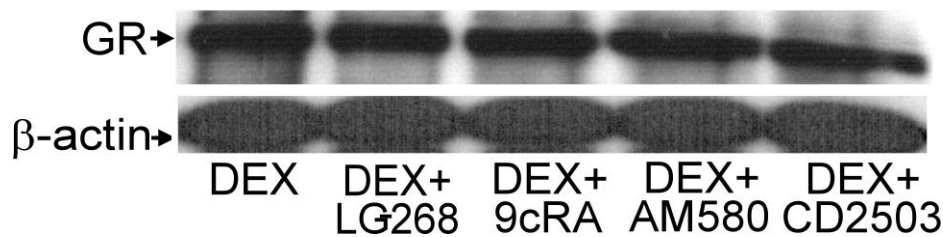
Korábbi tanulmányokban azt találtuk, hogy a PI-PLC foszforilálással történő aktivációja példa a dexametazon indukálta timocita sejtelhalás „nem genomikus” hatására (Cifone és mtsai, 1999). Mivel a CD2503-al folytatott kísérleteink arra utaltak, hogy a retinoid receptorok nem transzkripció hatásuk révén vesznek részt a folyamatban, vizsgáltuk, hogy vajon a retinoidok kiváltják-, illetve fokozzák-e a PI-PLC glükokortikoidok által indukált foszforilációját. A kísérlet során a (tirozin oldalláncon foszforilált) fehérjét agaróz-konjugált 4G-10 antitesttel immunprecipitációs technikát alkalmazva nyertük ki a sejtekből, majd az immunprecipitált PI-PLC-t anti-PI-PLC antitesttel mutattuk ki Western blot-tal. Ahogy a 8. ábra mutatja, a 9cRA, amely a természetes retinsavak közül a leghatékonyabbnak bizonyult a dexametazon indukálta timocita sejtelhalás fokozásában, a PI-PLC glükokortikoid kiváltotta foszforilációját nem fokozta, bizonyítva, hogy nem a PI-PLC foszforiláció a legfontosabb targetje a retinoid hatásnak.



8. ábra: A glükokortikoidok által indukált PI-PLC foszforiláció nem emelkedett retinoid kezelés hatására. A foszforilált fehérjéket agaróz-konjugált 4G-10 antitesttel immunprecipitáltuk a timociták sejtizátumából retinoid (0.3 μ M) és dexametazon (0.1 μ M) kezelést követően, majd Western blot-tal mutattuk ki az immunprecipitátumban megjelenő foszforilált fehérjék (PI-PLC) jelenlétét PI-PLC ellenes antitest használatával, 3 egymást követő, független kísérletben.

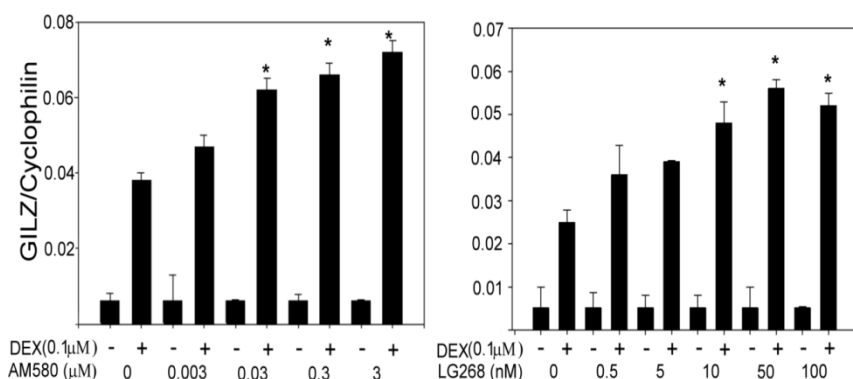
6. 2. A retinoidok, a timocita apoptózis során, emelik a GILZ (Glükokortikoid által Indukálható Leucin Zippzár) glükokortikoid hormon által indukált expresszióját

Egyre több kísérletes eredmény támasztja alá, hogy a sejtmagi receptorok mellett, hogy saját cél génjeik expresszióját szabályozzák transzaktivációs tulajdonságaik révén, ezen kívül képesek más transzkripciós faktorhoz kapcsolódni és ezáltal szabályozni annak transzkripciós működését is. Az első megfigyelés ezzel kapcsolatban 1990-ből származik, amikor is megfigyelték, hogy a glükokortikoid receptor képes gátolni az AP1 transzkripciós faktor transzkripciós aktivitását (**Yang-Yen és mtsai, 1990**). A megfigyelt transzrepresszió kölcsönös és olyan, jelenleg ismeretlen állapotát igényli a receptornak, mely aktiválható mind agonistákkal, mind pedig egyes esetekben, a vizsgált magreceptor antagonistáival is. Szintén megfigyelték, hogy a kölcsönhatás önmagában nem feltétlen vezet csak negatív szabályozáshoz, több tanulmány is leírta, hogy a kapcsolat két transzkripciós faktor között sok esetben pozitív transzkripciós hatást vált ki (**Shemshedini és mtsai, 1991**). Ezek alapján, illetve abból kiindulva, hogy előzetesen már szintén leírták a glükokortikoid indukálta apoptózis a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitásától függő folyamat, vizsgáltuk, hogy az általunk megfigyelt retinoid hatások a dexametazon kiváltotta sejtelhalásban, befolyásolják-e a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását. Ennek eldöntéséhez először megvizsgáltuk, vajon a retinoidok változtatják-e a GR mennyiségét, amelynek során tímusból izolált timocitákat kezeltünk 0.1 μ M dexametazonnal önmagában illetve 0.3 μ M ATRA, 9cRA, AM580 és CD2503 adásával együttesen. 2 órás kezelést követően immunoblot technikával határoztuk meg a GR mennyiségét. Ahogy a 9. ábrán látható, a retinoidok nem emelték a GR szintjét, tehát jelen esetben nem a GR mennyiségének megváltozása miatt látunk változást a retinoid indukálta folyamatokban.



9. ábra: A retinoidok nem emelik az alap, dexametazon kezelés hatására kialakult glükokortikoid-receptor szintet. 10^7 sejt/ml timocitát $0.1\mu\text{M}$ dexametazonnal kezeltünk önmagában, illetve $0.3\mu\text{M}$ 9cRA, AM580, CD2503 és 0.1nM LG268 jelenlétében együttesen. 2 órás kezelést követően immunoblot analízissel mutattuk ki a kezelések hatására bekövetkező GR mennyiségének változását. A felvitt minták azonos fehérje mennyiségének igazolására kontrollként β -aktint használtunk.

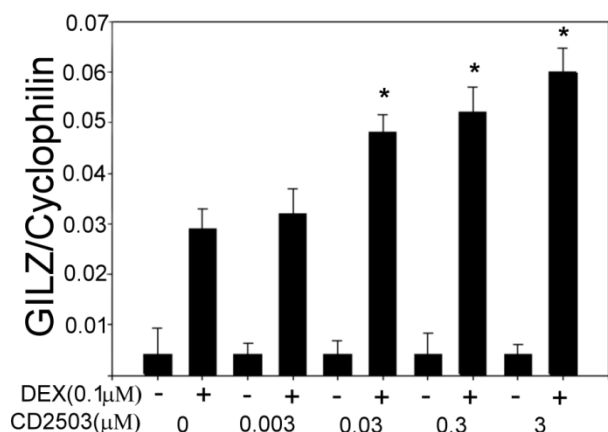
Ezt követően vizsgáltuk a retinoidok hatását a GR transzkripció aktivitásában, megfelelő célgént választva. Több génről korábban már leírták, hogy kifejeződésük fokozódik a timociták dexametazon indukálta sejtelhalása során (Woodward és mtsai, 2010). Ezen gének közül a közvetlenül glükokortikoidra aktiválódó gént, a GILZ-t választottuk, mert már a glükokortikoid indukálta timocita elhalás kezdeti fázisában aktiválódik (Delfino és mtsai, 2004), valamint promotere hordoz számos glükokortikoid válaszadó elemet (Muzikar és mtsai, 2009). Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogyan változik ennek a génnek az expressziós szintje dexametazon és retinoid kezelést követően. Az izolált timocitákat az előzőekhez hasonló koncentrációban használt dexametazonnal és különböző retinoidokkal kezeltük és 2 órás kezelést követően a sejtekből izolált RNS-ből qPCR technikát alkalmazva meghatároztuk az aktiválódott GILZ mRNS-ének mennyiségét. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy míg a retinoidok önmagukban nem változtatták meg a GILZ expressziójának szintjét, addig dexametazonnal történt együttes kezelés során mind az alkalmazott $\text{RAR}\alpha$ agonista és antagonistá, valamint az RXR receptor agonista is dózis függő módon fokozta a GILZ glükokortikoid indukálta génexpressziós szintjét (10. ábra).



10. ábra: A retinoidok emelik a glükokortikoid-indukálta GILZ expressziót.

Izolált egér timocitákat $0.1\mu\text{M}$ dexametazonnal és a retinoidok emelkedő koncentrációival külön és együttesen is kezeltünk. A GILZ mRNS szintjének meghatározása a kezeléseket követő 2 h múlva történt. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagából adódnak. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

Ezen adatok alapján elmondhatjuk, hogy a retinoidok fokozzák a GR transzkripció aktivitását, mely hatásukat mind az RAR α mind pedig az RXR receptor ligációja révén kifejthetik, valamint az RAR α transzkripció aktivitása nem szükséges a megfigyelt hatás kiváltásához, mivel az RAR α antagonistá az agonistához hasonló módon befolyásolta a GILZ génexpressziós szintjét (11. ábra).

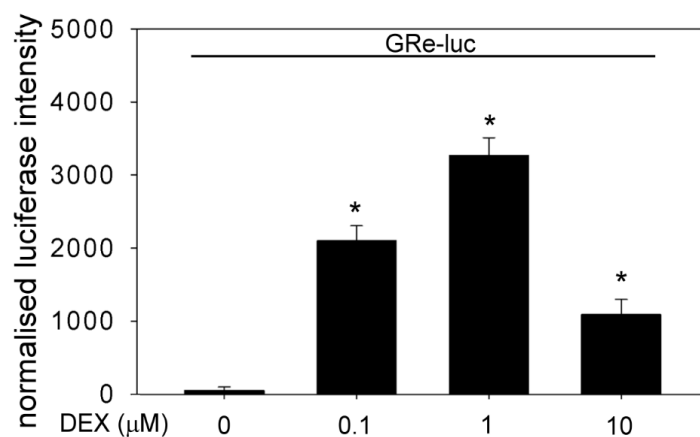


11. ábra: Az RAR α antagonistá szintén fokozza a glükokortikoid függő GILZ expressziót.

Az RAR α antagonistá CD2503 (0.3 μM) kezelést követően fokozódik a glükokortikoid függő gén, a GILZ expressziója, 2 órás kezelést követően. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérést Student t-tesztel határoztuk meg ($p < 0.05$).

6. 3. A retinoidok transzaktivációs hatása RAR α /RXR heterodimeren keresztül szabályozódik

Az előbbieken bemutatott transzaktivációs hatás további vizsgálatában a retinoidok hatását in vitro glükokortikoid luciferáz riporter esszével vizsgáltuk, mely során COS1 sejteket transzfektáltunk tranziens transzfekcióban pCMX-GRE-luc riporter konstrukcióval, illetve pCMX-FL-hRAR α , és /vagy pCMX-FL-hRXR α receptorral önmagában vagy együttesen polietilénimin (PEI) jelenlétében. 48 órás transzfekciót követően a kapott luciferáz aktivitásokat a mért β -galaktozidáz aktivitáshoz viszonyítva normalizáltuk. A használt COS1 sejtek a GRE-luc konstrukció transzaktiválásához elegendő mennyiségű glükokortikoid receptort expresszálnak, viszont RAR receptorok csak minimálisan expresszálódnak bennük (Crettaz és mtsai, 1990).

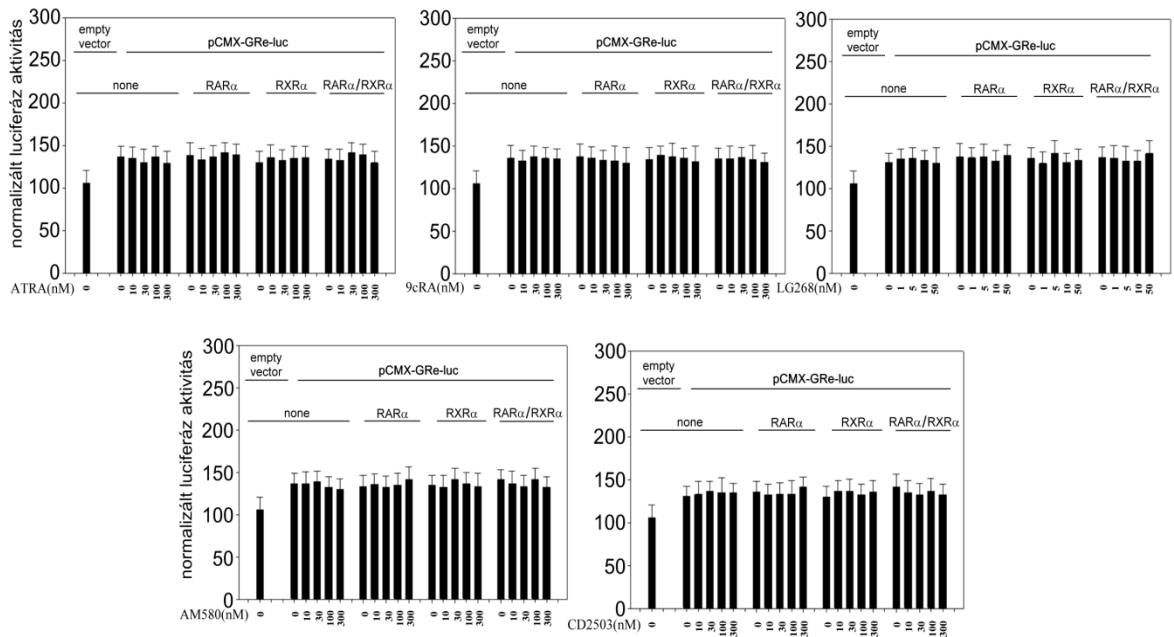


12. ábra: A dexametazon dózis-függő módon indukálja a pCMX-GRE-luc konstrukció expresszióját. A tranziensen transzfektált COS1 sejtek 5 órás transzfekcióját és dexametazon emelkedő koncentrációinak jelenlétében történő 48 órás kezelését követően a dexametazon dózisfüggő módon indukálja a luciferáz konstrukció expresszióját. A statisztikai hibaszázalék 3 egymástól független kísérletből fakad ($p < 0.05$).

Ahogy a 12. ábrán is látható, a GRE-luc riporter plazmid tranziens transzfekcióját követően a riporter enzim dózisfüggő módon indukálódott, azonban a dexametazon 10µM-os koncentrációja már toxikusnak bizonyult.

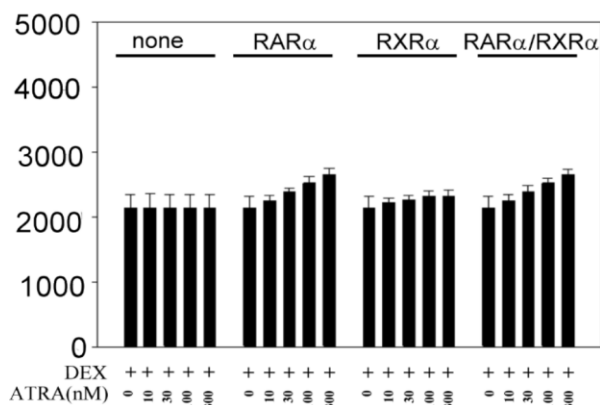
Az ebben a kísérletben kapott eredmények alapján a további vizsgálatokra szintén a dexametazon 0.1µM-os koncentrációját választottuk ki, a retinoidok glükokortikoid indukálta transzkripció szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatára.

Először azt teszteltük, hogy a retinoidok önmagukban, glükokortikoid adása nélkül hogyan befolyásolják a GR transzkripció aktivitását. A kapott eredmények azt mutatták, hogy egyik vizsgált retinoid sem növelte meg a glükokortikoid indukálta transzaktivációt, amely megegyezik azzal a megfigyeléssel, hogy ezek a COS1 sejtek kis mennyiségben expresszálják az RAR receptort (13. ábra).



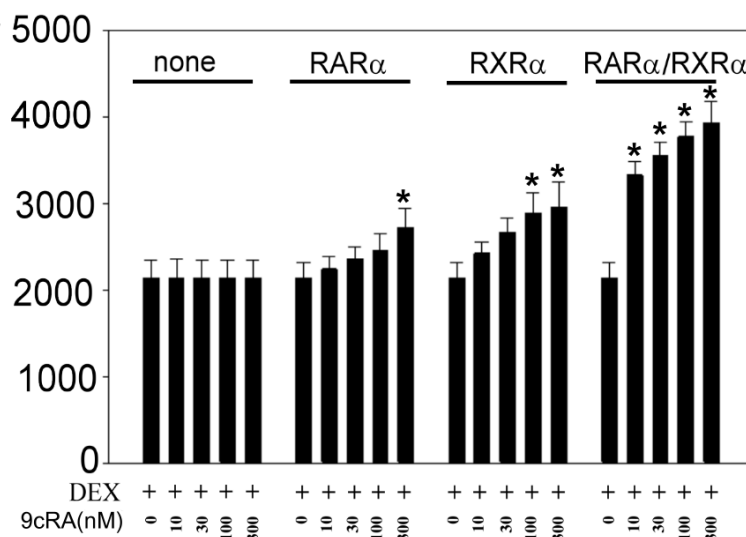
13. ábra: A 6 órás transzekciót követően a retinoidok dexametazon hiányában nem befolyásolják a pCMX-Gre-luc konstrukció expresszióját. A COS1 sejteket a jelzett plazmidokkal transzekciáltuk 5 órán keresztül, majd a feltüntetett dózisú retinoidokkal kezeltük 48 órán keresztül. Az adatok 3 független mérés átlagát és szórását mutatják be ($p < 0.05$).

Ezt követően már az önmagukban, illetve együttesen transzekciált RAR α és RXR α receptorok szerepét, valamint az emelkedő koncentrációban alkalmazott retinoidok hatását vizsgáltuk a dexametazon indukálta luciferáz expresszióban. A 14-17. ábrák mutatják, hogy a különböző retinoid receptorok transzekciójára, retinoid kezelés hiányában nem változtatták meg a dexametazon indukálta luciferáz expresszióját, azonban retinoidok jelenlétében eltérő transzkripciós hatékonyság volt megfigyelhető. Az ATRA, ami egy természetes RAR agonista, csak RXR jelenlétében nem befolyásolta a GR indukálta transzkripciót, azonban RAR α illetve RAR α /RXR jelenlétében is csak nagyon alacsony expresszió fokozást mutatott (14. ábra).



14. ábra: Az ATRA növekvő koncentrációinak hatása a dexametazonnal kiváltott transzkripcióra RAR α , RXR és RAR α /RXR együttes jelenléte esetén. Az ATRA emelkedő koncentrációival kezeltük a sejteket 48 órán keresztül 0.1 μ M dexametazon jelenlétében. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

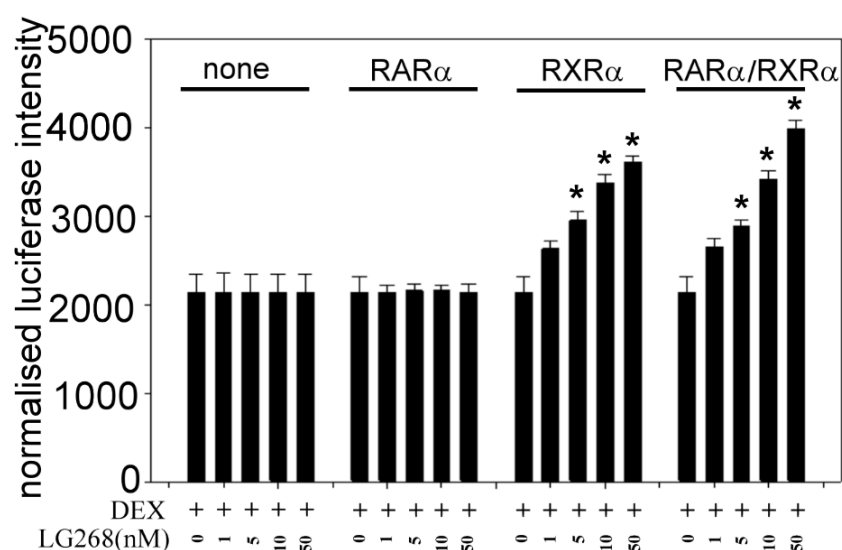
A másik természetes RAR/RXR agonista, a 9cRA szignifikánsan emelte a GR indukálta transzkripciót mind RXR mind pedig RAR α jelenlétében. A hatás azonban sokkal kifejezettebb volt, amikor az RAR/RXR receptorok együttesen voltak jelen a sejtekben (15. ábra).



15. ábra: A 9cRA növekvő koncentrációinak hatása a dexametazonnal kiváltott transzkripcióra RAR α , RXR és RAR α /RXR receptorok együttes jelenléte esetén. A 9cRA emelkedő koncentrációival kezeltük a sejteket 48 órán keresztül 0.1 μ M dexametazon jelenlétében. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

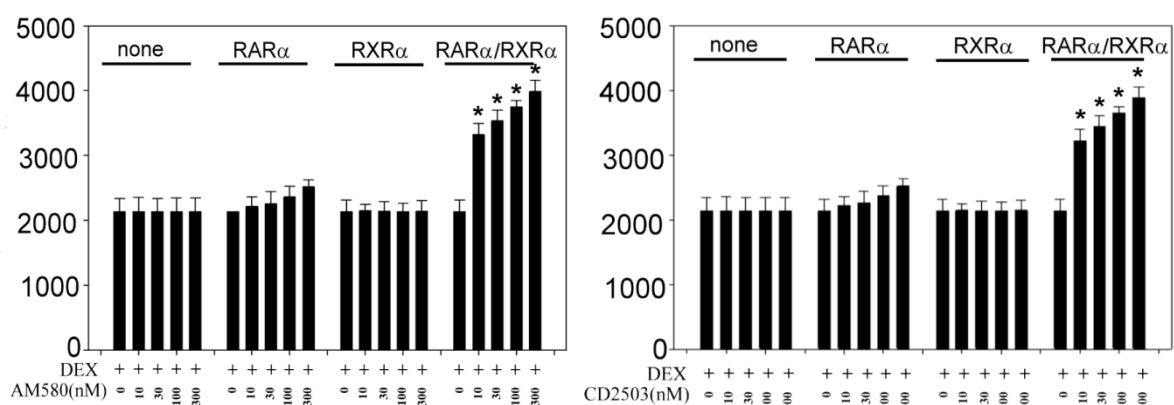
Ezek az adatok azt mutatják, hogy ugyan az RXR ligálása önmagában is képes hatékonyan emelni a GR indukálta transzkripciót, azonban a maximális emelkedés csak abban az esetben volt látható, amikor mindkét receptor jelen volt és ligálva volt 9cRA által.

Tovább vizsgálva ezt a jelenséget, szintetikus retinoidokat is alkalmaztunk, mely során azt tapasztaltuk, hogy az RXR receptor agonista LG268 szintén szignifikánsan emelte a transzkripciót RXR jelenlétében és ehhez hasonlóan RAR α /RXR heterodimer jelenlétében is (16. ábra).



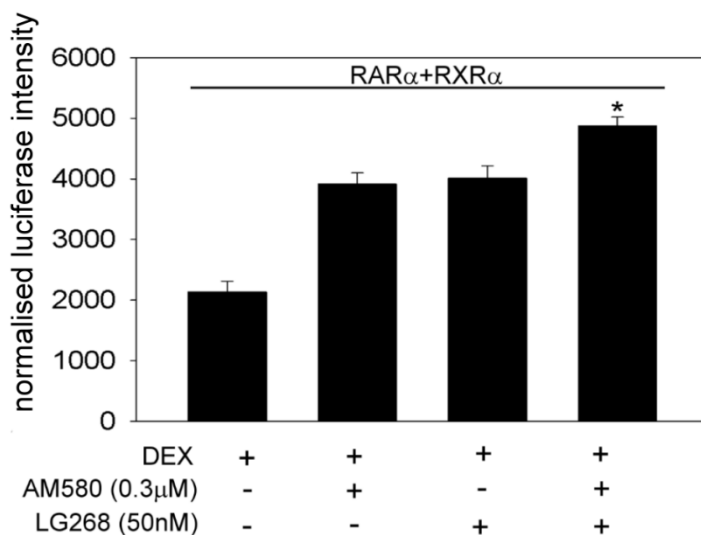
16. ábra: Az RXR receptor agonista LG268 növekvő növekvő koncentrációinak hatása a dexametazonnal kiváltott transzkripcióra RARα, RXR és RARα/RXR receptorok együttes jelenléte esetén. Az LG268 emelkedő koncentrációival kezeltük a sejteket 48 órán keresztül 0.1 μM dexametazon jelenlétében. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

A szintetikus RARα agonista AM580 és az antagonistája CD2503 az ATRA-hoz hasonlóan szintén hatástalannak bizonyult abban az esetben, amikor RXR receptor volt jelen és szintén csak kis mértékben hatott RARα jelenlétében, azonban amikor mindkét receptor expresszáva volt, mindkét vegyület szignifikánsan emelte a glükokortikoid indukálta transzkripciót (17. ábra).



17. ábra: Az RARα agonista AM580 és antagonistája CD2503 növekvő koncentrációinak hatása a dexametazonnal kiváltott transzkripcióra RARα, RXR és RARα/RXR receptorok együttes jelenléte esetén. Az retinoidok emelkedő koncentrációival kezeltük a sejteket 48 órán keresztül 0.1 μM dexametazon jelenlétében. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

Abban az esetben, ha az RAR α /RXR heterodimert expresszáló sejteket együttesen kezeltük AM580-al és LG268-al a dexametazon mellett, az előbbiekhöz képest sokkal hatékonyabb transzkripciót detektáltunk (18. ábra), melyből arra következtettünk, hogy a heterodimer mindkét tagjának együttes ligálása szükséges ahhoz, hogy a glükokortikoid receptor magas hatékonyságú transzkripciós aktivitását váltsuk ki.

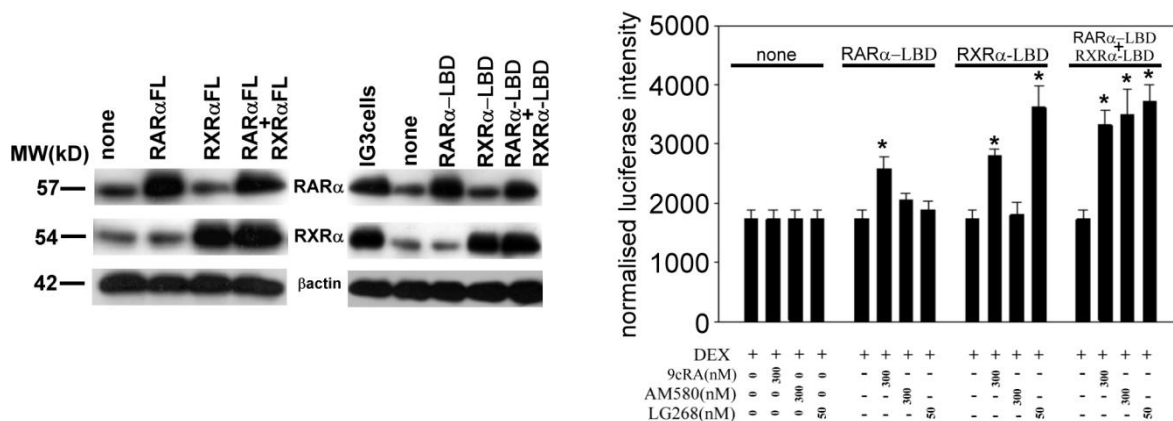


18. ábra: Az RAR α és RXR α receptor együttes ligálása fokozza a leghatásosabban a GR transzkripciós aktivitását. A retinoidok ábrán feltüntetett koncentrációival kezeltük a sejteket 48 órán keresztül 0.1 μ M dexametazon jelenlétében. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy az RAR α /RXR heterodimer szükséges ahhoz, hogy a retinoidok a hatékonyan fokozzák a glükokortikoidok által indukált transzkripciót, a fokozás mindkét receptor ligálása esetén a leghatékonyabb, megemlítve, hogy az RXR/RXR heterodimerek is közvetíthetik a hatást.

Mivel a CD2503 ugyan nem transzaktiválja az RAR α receptort, viszont jelen tanulmányban megfigyelt hatása megegyezett a receptor agonistáinak hatásával, ezért annak a lehetőségét, hogy a mi esetünkben a retinoid receptoroknak nem szükséges a DNS-hez kötődniük ahhoz, hogy a GR transzkripciós aktivitását fokozzák, a retinoid receptorok DNS-kötő mutánsainak vizsgálataival teszteltük. A sejteket a fentiekhez hasonló körülmények között transzfektáltuk, annyi különbséggel, hogy a fent leírt retinoid receptorok helyett ebben a kísérletben RAR α -LBD és RXR α -LBD receptorokat használtunk, amelyek a receptorok DNS-t kötni nem tudó mutánsai. Ahogy a 19. ábrán látható, ebben az esetben is

megfigyelhető volt az alkalmazott retinoidoknak a GR transzkripciós aktivitását fokozó hatása a vad típusú receptorokkal végzett kísérleti eredményekhez hasonlóan, ami igazolja, hogy a retinoid receptorok DNS-hez történő kötődése nem szükséges a megfigyelt hatás eléréséhez.



19. ábra: A retinoidok receptorok DNS-hez történő kötődése nem szükséges a glükokortikoid indukálta sejtelhalás fokozásának kiváltásához. A Western blot analízis a COS1 sejtekben lévő transzfekció előtti és a transzfekciót követő receptorok mennyiségét mutatja. Kontrollként IG3 sejt vonalat használtunk. A másik ábra a vad típusú retinoid receptorok DNS-hez kötődni nem tudó mutánsaival (RARα-LBD, RXRα-LBD) történt transzfekcióeredményét mutatja, mely során a COS1 sejteket a transzfekciót követően 0.1 μM dexametazon mellett 9cRA, AM580 és LG268 ábrán feltüntetett koncentrációival kezeltük. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórást mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérést Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

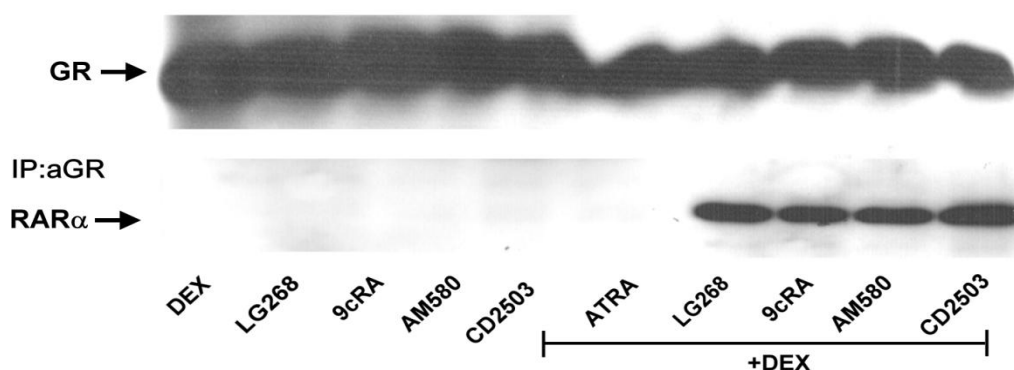
6. 4. Ligandkötést követően a glükokortikoid és a retinoid receptorok között kölcsönhatás lép fel

Ismert, hogy a transzkripciós faktorok liganddal történő aktiválás után kölcsönhatnak egymással és ez a létrejövő kapcsolat különböző transzkripciós faktorok között gyakran közvetlen kölcsönhatáson keresztül szabályozódik, amelynek létrejötte nem feltétlenül igényli a kölcsönható partner DNS- hez való kötődését.

6. 4. 1. A glükokortikoid és az RARα receptor kölcsönhat egymással

Eddigi eredményeink alapján, mi is vizsgáltuk egy lehetséges kölcsönhatás létrejöttét az RARα és a GR között. Kísérleteink első részében a lehetséges kölcsönhatás kimutatására a két receptor között, immunprecipitációs technikát alkalmaztunk, mely során a timociták dexametazonnal és különböző retinoidokkal történt kezelését követően a glükokortikoid receptort agaróz-kapcsolt GR ellenes antitesttel kivontuk a sejtekből, majd Western blottal

mutattuk ki a glükokortikoid receptorral kölcsönható retinoid receptort. A 20. ábrán látható, hogy a különböző retinoidokkal történt kezelés hatására ugyan egyforma mennyiségű GR fehérjét mutattunk ki, azonban amikor a co-immunoprecipitált fehérjéket vizsgáltuk dexametazon kezelés hiányában, co-immunoprecipitált RAR α receptor nem volt kimutatható, de együttes dexametazon és retinoid kezelést követően a glükokortikoid receptor mellett kimutatható volt a co-immunoprecipitált RAR α receptor is.



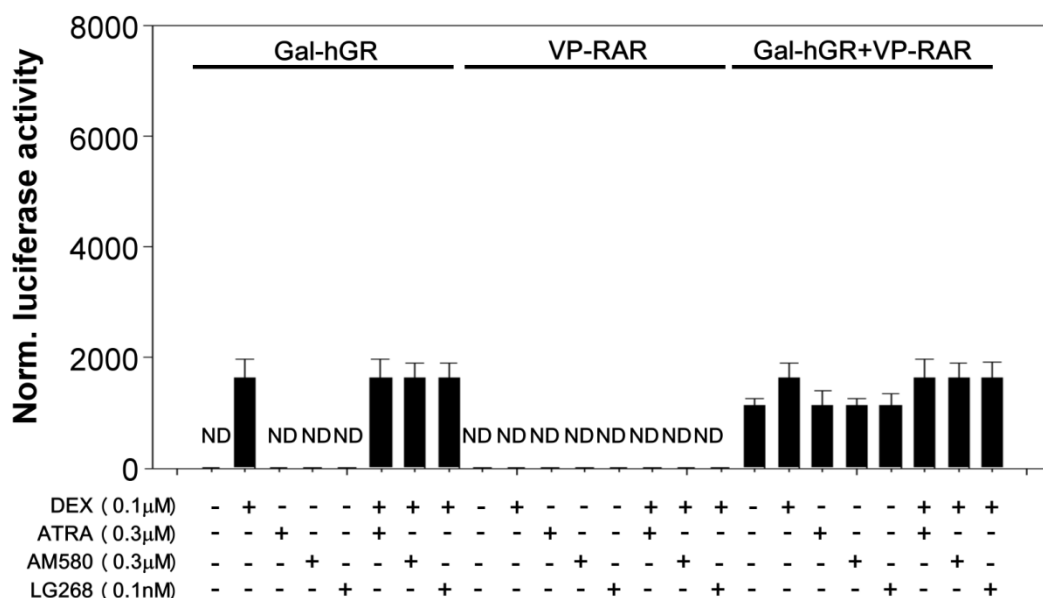
20. ábra: Az RAR α koimmunoprecipitálható volt a GR-ral abban az esetben, ha mindkét receptor ligandja együttesen jelen volt. Az ábrán a GR-ral koimmunoprecipitált RAR α látható. Mindkét receptor együttes ligálása volt szükséges a komplex létrejöttéhez. A kísérlet során 0.1 μ M dexametazon mellett 0.3 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk a retinoidokat, kivéve az LG268-at, melyet 100nM koncentrációban használtunk.

Azt a feltételezést, hogy a glükokortikoid indukálta sejtelhalás RAR α /RXR heterodimeren keresztül szabályozódik a retinoidok hatására, az immunprecipitációs kísérlet is igazolta, mivel az RXR agonista LG268 liganddal történő kezelés hatására a co-immunoprecipitált RAR α receptor szintén kimutatható volt.

Annak vizsgálatát, hogy a receptorok között létrejött kölcsönhatás közvetlenül történik- e és nem valamilyen egyéb fehérjén keresztül alakul ki, emlős két-hibrid technikával végeztük. A kísérletben 293T fibroblaszt sejteket transzfektáltunk pCMX-Gal-L-hGR és pMH100-TK-luc plazmidokkal önmagában vagy VP-hRAR α -LBD plazmiddal együtt. A transzfekciós hatékonyság normalizálásához pCMX-b-galaktozidáz plazmidot használtunk. Ebben az esszében csak abban az esetben indukálódik a luciferáz enzim, ha egyrészt a glükokortikoidok hatnak a pMH100-TK-luc és pCMX-Gal-L-hGR plazmidokkal transzfektált sejteken, mivel ekkor a ligandkötést követően a transzfektált GR hozzákötődik, Gal fúziós DNS kötő doménjén keresztül, a luciferáz promóteréhez, mely transzaktivációhoz vezet. A másik lehetőség, amely során a luciferáz enzim indukálódik, hogy glükokortikoid hiányában a VP-hRAR α -LBD plazmiddal kódolt RAR α fúziós fehérje, ami egy Herpes simplex vírusból

származó transzaktivációs domént (VP) hordoz és nem rendelkezik DNS kötési képességgel, kölcsönhat a pCMX-Gal-L-hGR kódolt GR fúziós fehérjével, szintén transzaktivációhoz vezetve.

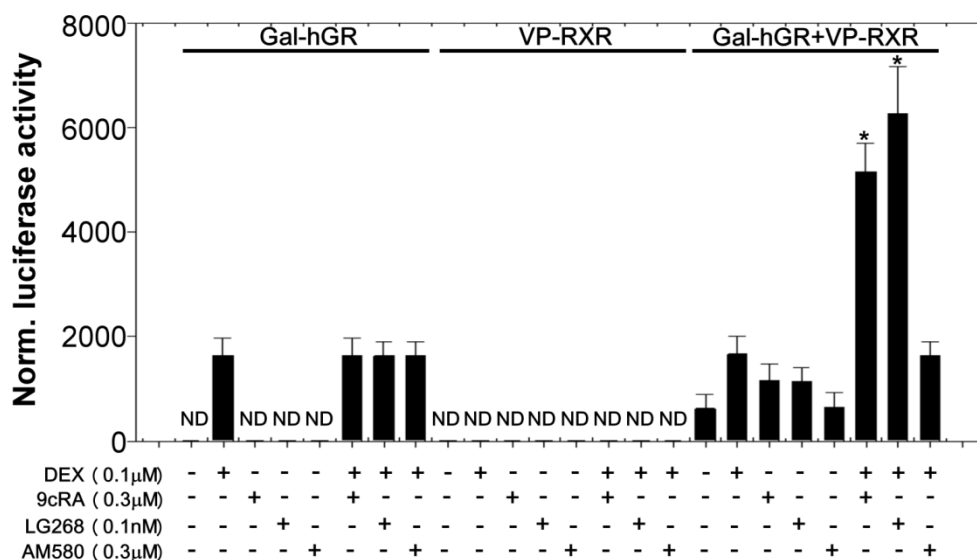
Amint a 21. ábra mutatja, azokban a sejtekben, amelyek pMH100-TK-luc plazmiddal önmagában vagy pCMX-Gal-L-hGR illetve VP-hRAR α -LBD plazmidokkal együttesen voltak transzfektálva szignifikáns luciferáz aktivitás nem volt detektálható. Viszont azokban az esetekben, amikor a pMH100-TK-luc/pCMX-Gal-L-hGR transzfektált sejtekben a VP-hRAR α -LBD is jelen volt egyidejűleg, ahhoz hasonló luciferáz aktivitás volt detektálható, amelyet dexametazon kezelés mellett, de VP-hRAR α -LBD plazmid hiányában mértünk. Ezek az adatok szintén alátámasztják, hogy a két receptor között interakció jön létre, valamint igazolják, hogy a létrejött kölcsönhatás közvetlenül történik.



21. ábra: Az emlős-két hibrid rendszer közvetlen interakciót valószínűsít az RAR α és a GR között, amelyet nem befolyásol a retinoidok kötődése. 293T sejteket Gal-hGR és VP-RXR plazmidokkal transzfektáltunk 5 órán keresztül, majd 48 órán át kezeltük a sejteket 0.1 μ M dexametazonnal és 0.3 μ M 9cRA és AM580-al, valamint 100nM LG268-al. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatja. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

6. 4. 2. Ligandkötést követően a glükokortikoid és az RXR receptor szintén kölcsönhat egymással

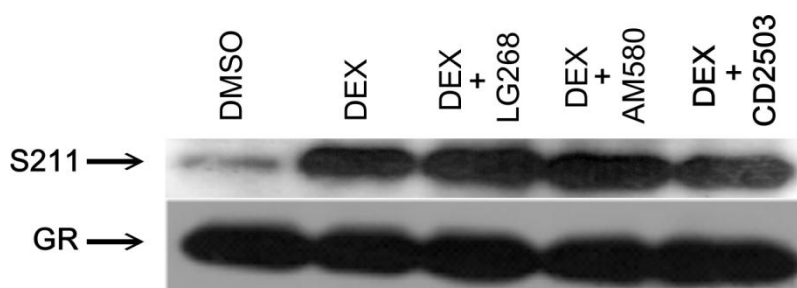
A tranziens transzfekciós kísérletekben láttuk, hogy az RXR α receptor ligációja önmagában is képes volt fokozni a dexametazon indukálta transzkripciót, ezért szintén emlős két-hibrid technikát alkalmazva vizsgáltuk, hogy a GR és az RXR receptor között is kialakul-e hasonló kölcsönhatás, mint a GR és RAR α esetében. A kísérleteket az előzővel azonos módon és körülmények között végeztük, kivéve, hogy ebben az esetben a sejteket a pCMX-Gal-L-hGR mellett VP-hRXR α -LBD kódolt plazmiddal transzfektáltuk. A 22. ábra mutatja, hogy a pMH100-TK-luc plazmiddal önmagában illetve a pCMX-Gal-L-hGR vagy a VP-hRXR α -LBD plazmiddal együttesen transzfektált sejtekben szignifikáns luciferáz aktivitás szintén nem volt kimutatható. Azonban, amikor a pMH100-TK-luc/pCMX-Gal-L-hGR transzfektált sejtekben a VP-hRXR α -LBD is jelen volt egyidejűleg, szintén ahhoz hasonló luciferáz aktivitás volt detektálható, amelyet dexametazon kezelés mellett, de VP-hRXR α -LBD plazmid hiányában mértünk, amely ebben az esetben is azt igazolja, hogy a két receptor között direkt interakció jön létre. Azonban a GR/RAR α közötti interakció vizsgálata során tapasztaltakkal ellentétben ebben az esetben mind az RXR receptor ligálása, mind pedig a GR ligálása fokozta az interakció létrejöttének hatékonyságát.



22. ábra: Az emlős-két hibrid rendszer közvetlen interakciót valószínűsít az RXR és a GR között, melyet erősen befolyásol a ligandok jelenléte. 293T sejteket Gal-hGR és VP-RXR plazmidokkal transzfektáltunk 5 órán keresztül, majd 48 órán át kezeltük a sejteket 0.1 μ M dexametazonnal és 0.3 μ M 9cRA és AM580-al, valamint 100nM LG268-al. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatja. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

6. 5. A retinoidok nem befolyásolják a glükokortikoid receptor 232-es pozícióban elhelyezkedő szerin oldalláncán bekövetkező foszforilációt

Bár a ligandkötés alapvető a GR transzkripció aktivitásának az elindításához, a receptor foszforiláció révén bekövetkező poszttranszlációs módosítását szintén megfigyelték (**Bodwell és mtsai, 1991**). A poszttranszlációs módosítás során a GR-on számos szerin és treonin aminosav foszforilálódik, főként az amino (N) – terminális szakaszon. Mind konstitutív, mind pedig ligand indukált foszforilációt megfigyeltek (**Wang és mtsai, 2002**). Bár ezeknek a módosításoknak a hatása még nem teljesen tisztázott, a nagyszámú foszforilációs helyet érintő módosulások megváltoztathatják a receptor stabilitását és működését (**Bodwell és mtsai, 1991**). A foszforilációnak a receptor működését szabályozó szerepét támasztja alá az a megfigyelés, hogy ligand kötődést követően a Ser203 foszforilált receptorok inkább a citoplazmában, míg a Ser211 foszforilált receptorok a sejtmagban helyezkednek el (**Bodwell és mtsai, 1991**). Szintén megfigyelték, hogy a Ser211 foszforilációja promóter specifikus úton emeli a GR transzkripció aktivitását (**Webster és mtsai, 1997**). Ezek alapján mi is teszteltük, hogy a retinoid kezelés hogyan befolyásolja a GR dexametazon indukálta Ser211 foszforilációját egér timocitákban. A kísérlet során a timocitákat 1 órán át kezeltük 0.1 μ M dexametazonnal önmagában vagy 0.3 μ M AM580, CD2503 illetve 50nM LG268-al együttesen. A kezelést követően a GR-t immunoprecipitációs technikával agaróz konjugált anti-GR antitesttel vontuk ki a sejtekből, majd Western blot során GR és Ser211 specifikus antitesttel azonosítottuk a foszforilált GR-t. Ahogy a 23. ábrán látszik, a dexametazon hatására Ser211-en a GR foszforilálódott, azonban azt a retinoid hatása nem fokozta, valószínűsítve, hogy a retinoid receptorok más útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat.



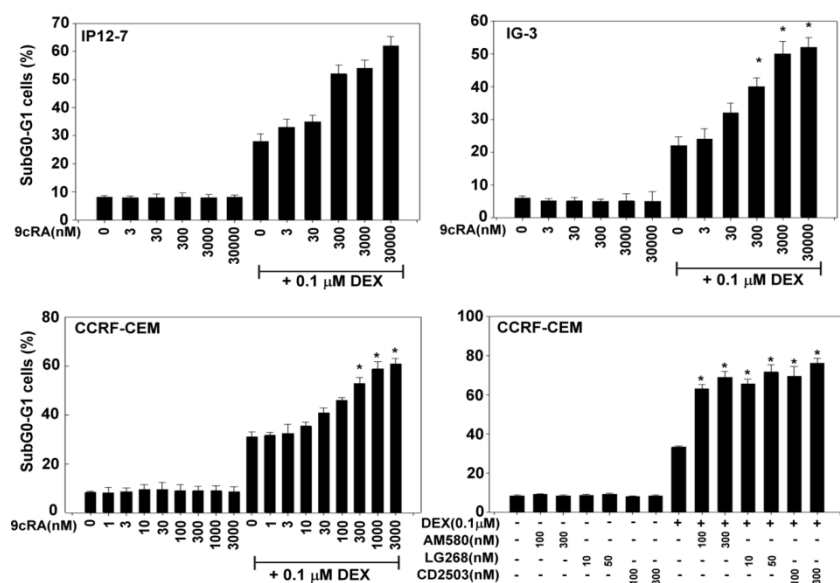
23. ábra: A S211 foszforilációjának fokozása nem figyelhető meg a retinoid kezelést követően.

Timocitákat 0.1 μ M dexametazonnal önmagában, illetve amellet 0.3 μ M AM580 és CD2503-al, valamint 50nM LG268-al kezeltünk együttesen 1 órán

keresztül. A kezeléseket követően a sejtlizátumból a GR-t agaróz-konjugált anti-GR antitesttel használva immunprecipitáltuk, majd a foszforilálódott Ser211 oldalláncot egy arra specifikus antitesttel Western blot analízis során mutattuk ki.

6. 6. A retinoidok daganatos T-sejt eredetű sejtvonalak glükokortikoid indukálta apoptózist is fokozták

Mivel az eddig leírt eredményeket egér timocitákon végzett kísérletek során kaptuk, vizsgálni kívántuk, hogy vajon a megfigyelt hatások csak timocitákra jellemzőek-e. Ezért a retinoidok apoptózis fokozó hatását egy egér (IP-12-7) (Rajnavölgyi és mtsai, 1994) és két humán (IG3 (Eicher és Waldmann, 1998) és CCRF-CEM (Foley és mtsai, 1965)) glükokortikoid-szenzitív T sejt eredetű sejtvonalakon is teszteltük. Ahogy a 24. ábrán látszik, az alkalmazott retinoidok ezen sejtvonalak esetén is hatásosan fokozták a glükokortikoid indukálta sejtelhalás mértékét, hasonlóan az egér timocitákon elvégzett kísérletekhez.



24. ábra: A retinoidok nem csak timociták, hanem T sejt eredetű sejtvonalak glükokortikoiddal kiváltott apoptózist is fokozzák.

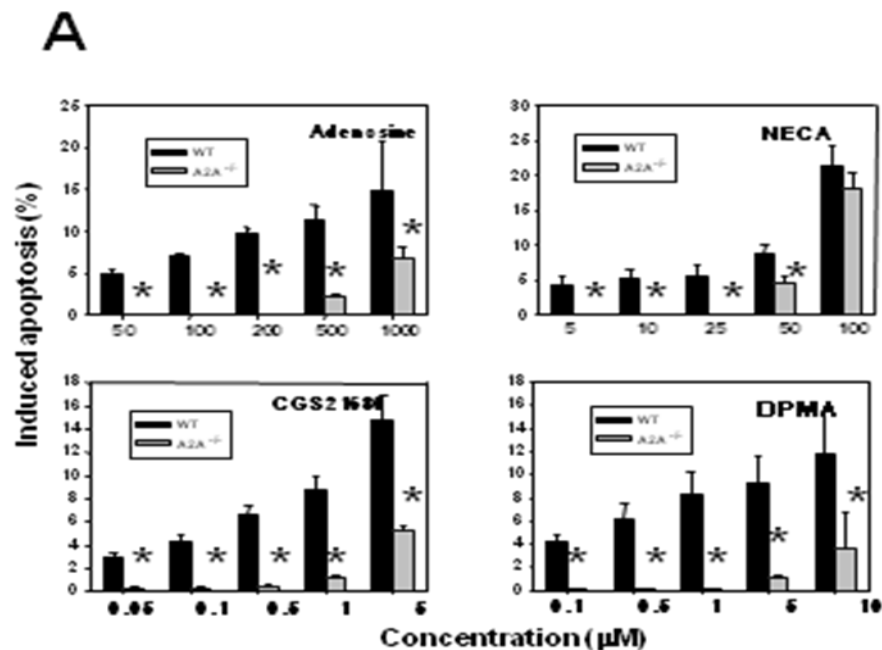
IP12-7, IG-3 és CCRF-CEM T sejteket kezeltünk a 9cRA növekvő koncentrációival 0.1 μM dexametazon mellett és anélkül, majd propidium jodid jelölést alkalmazva 6 órát követően meghatároztuk a SubG0-G1 sejtek %-os arányát. A CCRF-CEM sejtek esetében AM580 és CD2503

(0.1 μM, 0.3 μM), illetve LG268 (10 nM, 50 nM) kezelést is alkalmaztunk a dexametazon kezelés mellett. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A dexametazon-kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérését Student t-tesztel határoztuk meg, ahol ($p < 0.05$).

6. 7. Az adenosin *in vitro* adenosin A_{2A} receptor függő és független sejthalált is indukál egér timocitákban

Ismert, hogy az adenosin a normál körülmények között zajló limfocitaszelekció során termelődik a szelektálódó timociták mikrokörnyezetében. A limfociták az adenosin receptorok 4 típusát expresszálják felszínükön (**Plaut, 1987**), melyek közül az A₁ receptort az adenosin már 10⁻⁷ M-os koncentrációban aktiválja, miközben az intracelluláris ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) szintjét csökkenti. Az adenosin A_{2A} és A_{2B} az adenosin magasabb, 5X10⁻⁷ M és 10⁻⁵ M-os koncentrációja aktiválja a cAMP szint növelését eredményezve. A 4. típus az adenosin A₃ receptor, melyet az adenosin már 10⁻⁶ M koncentrációnál stimulál az adenilát-cikláz gátlása közben (**Oláh és Stiles, 1995**). Korábbi kísérletek kimutatták, hogy egér timocitákban az adenosin A_{2A} receptora közvetíti az adenosin kiváltotta sejtelhalást, de a mechanizmus nem volt tisztázott (**Armstrong és mtsai, 2001**).

Kísérleteink első részében az adenosin hatását vizsgáltuk egér timociták apoptózisának kiváltásában. Az adenosin emelkedő koncentrációival kezeltük a sejteket 44 órán keresztül, majd propídium jelölést követően áramlási citométerrel meghatároztuk az apoptotikus sejtek %-os arányát. Ahogy a 25. ábra mutatja, az adenosin dózis függő módon fokozta az egér timociták apoptózist. A korábbi publikációkban közöltekkel megegyezően mi is azt tapasztaltuk, hogy az adenosin egy relatíve magas koncentrációja szükséges a timociták maximális sejtelhalásához, ami azzal magyarázható, hogy a timociták adenosin-deamináz aktivitása hamar elbontja az adenosint. Mivel valószínűsíthető, hogy az adenosin egér timociták esetén az A_{2A} receptoron keresztül fejti ki előzetesen bemutatott hatását (**Armstrong és mtsai, 2001**), az adenosin hatását vizsgáltuk A_{2A}^{-/-} egerek timocitáin is (**Ledent és mtsai, 1997**). A kapott eredmények azt mutatták, hogy az A_{2A} receptor hiányos egerekben az adenosin 200μM-os koncentrációja alatt apoptózist nem váltottunk ki, az a fölötti koncentrációkban viszont, már apoptózist indukált (25. ábra). Ugyanezt figyeltük meg akkor is, amikor a sejteket adenosin analógokkal kezeltük. Mind a NECA (egy nem specifikus adenosin receptor agonista), mind pedig a DPMA és CGS21680 (adenosin A_{2A} receptor specifikus agonisták) dóziszfüggő apoptózist váltott ki vad típusú timocitákban. E vegyületek az A_{2A} receptor hiányos timocitákban az alacsony koncentrációkban nem voltak apoptózist kiváltó hatásúak, de a magas koncentrációk itt is kiváltottak sejtelhalást, bár sokkal kisebb mértékben, mint a vad típusú timocitákban (25. ábra).



25. ábra: Az adenoszin és adeozin analógok hatásosan fokozták a timociták sejtehalását

A timocitákat vad típusú és A_{2A} receptor hiányos egerekből izoláltuk majd adenoszinnal vagy adeozin receptor agonistákkal kezeltük, majd vizsgáltuk a kiváltott apoptózis mértékét az apoptózisba lépett timociták %-os arányának meghatározásával.

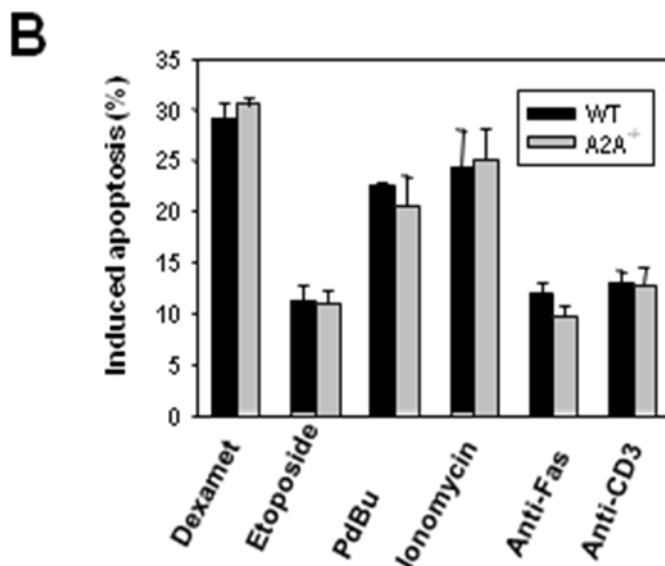
Ugyanezt az eltérő dózis érzékenységet figyeltük meg, amikor egy adenoszin A_{2A} receptor antagonistával (ZM41385) is kezeltük a timocitákat adenoszin illetve NECA mellett adva. Míg az antagonista 100μM adenoszin, valamint 25μM NECA mellett mindkettő apoptózist kiváltó hatását meggátolta, addig ezen vegyületek magasabb koncentrációban (1mM adenoszin, 100μM NECA) történt alkalmazása során ez a gátló hatás nem volt megfigyelhető (1. táblázat).

Kezelés	$A_{2A}^{+/+}$	Apoptózis (%)	$A_{2A}^{-/-}$
DMSO 0.5%	29.7±0.7		29.2±0.9
ZM241385 20 µM	30.2±1.1		29.7±1.1
Adenozin 1 mM	44.6±2.7*		35.2±1.4*,**
+ZM241385 20 µM	38.7±1.9*		35.7±1.8
Adenozin 100 µM	36.8±0.3*		29.4±0.8**
+ZM241385 20 µM	29.9±1.9		n.d.
NECA 100 µM	50.9±3.1*		47.4±2.2*
+ZM241385 20 µM	49.9±1.9*		n.d.
NECA 25 µM	37.1±2.6*		29.1±1.6**
+ZM241385 20 µM	29.9±1.9		n.d.

1. táblázat: A különböző kezelések hatása az $A_{2A}^{+/+}$ és $A_{2A}^{-/-}$ timociták in vitro apoptózisában

A kezeléseket követő 44 órával vad típusú és $A_{2A}^{-/-}$ receptor hiányos egerekből izoláltuk a timocitákat, majd meghatároztuk az apoptotikus sejtek %-os arányát. Az adatok 4 különböző egérből származó mérésnek az átlagát és szórását mutatják. *A DMSO kontrolltól, illetve**az azonos módon kezelt vad típusú sejtektől eltérő szignifikáns különbségeket Student t-próbával határoztuk meg ($p < 0.05$).

Hogy tovább bizonyítsuk az A_{2A} receptor szerepét, ki akartuk zárni azt a lehetőséget, hogy az A_{2A} receptor hiányos timociták csökkent adenozin válasza nem egy, az ezekre a timocitákra jellemző általános apoptózis defektus eredménye-e. Ezért a receptor hiányos egerekből származó timocitákat apoptózist más úton is indukáló vegyületekkel kezeltük. Minden használt vegyület (0.1µM dexametazon, 5µM etopozid, 5ng/ml forbol-di-butirát/PdBu, 1ng/ml ionomicin, 10µg/ml anti-CD3) a vad típusú sejtekhez hasonló mértékű apoptózist indukált ezekben a sejtekben is (26. ábra), bizonyítva, hogy az apoptózisra való hajlam nem változott meg az A_{2A} receptor null sejteknél. Ezek az adatok együttesen azt mutatják, hogy az adenozin alacsonyabb koncentrációban A_{2A} receptoron keresztül közvetített apoptózist indukál, azonban amikor az adenozin magas koncentrációban van jelen, akkor az A_{2A} receptortól független mechanizmussal is apoptózist tud indukálni. Ezt azonban a továbbiakban nem tanulmányoztuk.



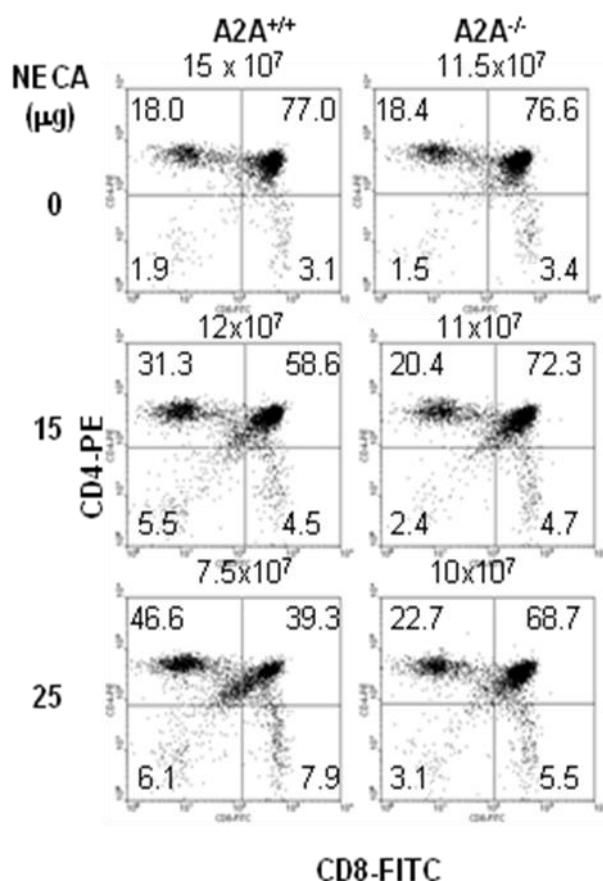
26. ábra: Az adenzin az A_{2A} receptoron keresztül szabályozza a timociták apoptózist

A timociták apoptózist 0.1μM dexametazonnal, 0.5μM etopoziddal, 5ng/mL PdBu-val, 1μg/mL ionomicinnel, 1μg/ml anti-Fas antitesttel, illetve 10μg/ml anti-CD3 antitesttel váltottuk ki, majd 44 órást követően határoztuk meg az apoptotikus sejtek százalékos arányát. A spontán apoptózis mértéke 29±0.7% volt. Az adatok 5 független mérés átlagát és szórását mutatják (p<0.05).

6. 8. Az *in vivo* adenzin indukálta sejtelhalás nagy része az adenzin A_{2A} receptorokon keresztül szabályozódik

A kísérletek következő részében az adenzin által kiváltott timocita sejtelhalás mértékét *in vivo* körülmények között is vizsgáltuk, melyek során a NECA emelkedő koncentrációival intraperitoneálisan oltottunk vad típusú és A_{2A}^{-/-} receptor hiányos egereket. Azért választottuk ezekre a vizsgálatokra a NECA-t az adenzin helyett, mert az adenzin *in vivo* nagyon gyorsan degradálódik az adenzin-deamináz enzim által, valamint előkísérleteink szerint a NECA az egyedüli olyan adenzin receptor agonista, amely nem váltja ki az állatok gyors halálát. Az apoptózis mértékét 20 óra elteltével jellemeztük a NECA emelkedő koncentrációinak oltását követően, a túlélő sejtek mennyiségének meghatározásával. A tímuszból kinyert timociták CD4-PE és CD8-FITC jelölését követően az apoptózis érzékeny timocita populációt is meghatároztuk. A 27. ábrán látható, hogy az oltatlan egerek esetében a különböző timocita populációk eloszlása hasonló a vad típusú és az A_{2A}^{-/-} receptor hiányos egerek esetében, az összsejtszám tekintetében azonban az A_{2A}^{-/-} receptor hiányos egerek tímusza 25%-kal kevesebb sejtet tartalmaz, mint a vad típusúaké. Az *in vitro* kezeléseknél

tapasztaltakhoz hasonlóan a NECA *in vivo* oltása az $A_{2A}^{-/-}$ receptor hiányos timocitákban szintén sejtelhalást indukált, aminek mértéke azonban itt is elmaradt a vad típusú timociták esetében tapasztaltaktól, mivel a 25 μ g-os NECA oltása után a vad típusú egerek timocitáinak 50%-a, míg az $A_{2A}^{-/-}$ receptor hiányos egerek timocitáinak csak 12%-a halt el. A legnagyobb mértékű sejtpusztulás a CD4+CD8+ dupla pozitív populációban volt megfigyelhető mindkét törzs esetében.



27. ábra: A NECA *in vivo* oltása is apoptózist indukál vad típusú egerek CD4+/CD8+ duplapozitív timocita populációiban *in vivo*

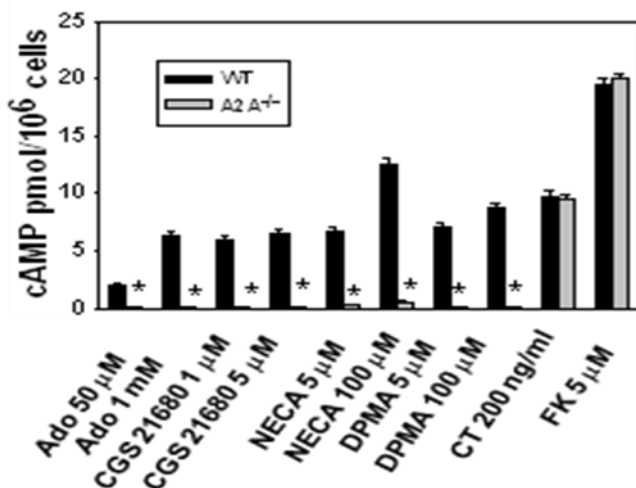
Vad típusú és $A_{2A}^{-/-}$ egereket oltottunk i. p. 0 (DMSO kontroll), 15 és 25 μ g NECA-val, majd 20 órás kezelést követően meghatároztuk a különböző timocita populációk egymáshoz viszonyított arányát. Az eredmények 3 független mérés átlagát mutatják ($p < 0.05$).

Ezen adatok szintén azt támasztják alá, hogy az adenzin indukálta sejtelhalás nagyrészt az A_{2A} receptorokon keresztül szabályozódik és azt mutatják, hogy elsősorban a CD4+CD8+ dupla pozitív timocitákat érinti.

6. 9. Egér timocitákban az adenosin A_{2A} receptor az adenilát cikláz jelátviteli útvonalat aktiválja

Miután egyéb sejtek esetében már megfigyelték, hogy az adenosin A_{2A} receptorok mind az adenilát cikláz, mind pedig a foszfolipáz C által szabályozott jelátviteli utakat aktiválhatják (Fredholm és mtsai, 2000), tisztázni kívántuk, hogy egér timocitákban melyik jelátviteli út közvetíti az adenosin apoptózist kiváltó hatását. Ennek vizsgálatakor egyrészt a timocitákat 15 percig kezeltük adenzinnal és különböző adenosin-analógokkal, majd „cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit” segítségével meghatároztuk a képződött cAMP mértékét. Másrészt, a kezeléseket követően Fura-2AM (a Fura-2 kalcium indikátor membrán permeabilis származéka) jelölés után SPEX Fluoromax spektrofluoriméterrel vizsgáltuk az intracelluláris Ca^{2+} szintjének változását.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a vad típusú timociták esetén az adenosin kezelést követően jól és könnyen detektálható intracelluláris cAMP indukció mérhető, azonban citoszolikus Ca^{2+} koncentráció emelkedést sem adenosin, sem pedig adenosin-receptor specifikus agonisták adásával nem sikerült kiváltani. Ugyanakkor ugyanezen adenosin receptorra ható vegyületek nem voltak képesek cAMP emelkedést indukálni A_{2A} receptor hiányos timocitákban. Az A_{2A} receptor hiányos egerek egyébként képesek voltak cAMP-t termelni, ha a sejteket kolera toxin (cAMP szintet emel az adenilát cikláz stimuláló G-fehérje ADP –riboszilálásával (Cassel és Selinger, 1977)) vagy forskolin (adenilát cikláz aktivátor (Seamon és mtsai, 1981)) hatásának tettük ki (28. ábra), ami arra utal, hogy az adenosin cAMP szintet emelő hatását az A_{2A} receptorokon keresztül közvetíti. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy az adenosin az A_{2A} receptorokon keresztül az adenilát cikláz útvonalat aktiválja.



28. ábra: Vad típusú egerek esetén az adenzin cAMP szint emelkedést vált ki

Vad típusú és A_{2A}^{-/-} timocitákat adenzinnal, CGS221680-al, NECA-val, DPMA-val, kolera toxinnal és forskolinnal kezeltünk, majd 15 perces kezelést követően „cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit”-tel meghatároztuk a keletkezett cAMP mennyiségét. Az adatok 3 független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatják (p<0.05).

6. 10. Egér timocitákban az adenzin a cAMP függő protein kinázok aktiválódásán keresztül indukál sejthalált

Annak vizsgálatára, hogy az adenilát cikláz út aktiválódása elegendő-e az apoptózis kiváltásához, a timocitákat olyan szerekkel kezeltük, amelyek a receptort megkerülve emelik a cAMP szintet. A 2. táblázatban látható módon mindegyik vegyület sejthalált indukált, bizonyítva, hogy az adenilát cikláz út aktiválódása önmagában is sejthalált kiváltó. E vegyületek az A_{2A} receptor hiányos egerekben is sejthalált kiváltóak voltak, bizonyítva, hogy adenzin cikláz útra e sejtek is ugyanúgy képesek reagálni.

Ismert, hogy a protein-kináz-A alapvető cél fehérjéje a cAMP-nek (Skalhegg és Tasken, 2000), ezért vizsgáltuk e fehérje szerepét is az adenzin indukálta apoptózis jelátviteli útvonalban. A kísérlet során vad típusú timocitákat kezeltünk adenzin mellett Rp-cAMPS-trietilaminnal is, ami egy specifikus inhibitora a cAMP-függő protein-kináz I és II-nek (van Hassert és mtsai, 1984). Az 2. táblázatban feltüntetett eredmények mutatják, hogy vad típusú timociták adenzin-indukálta apoptózisa teljes mértékben gátolható volt Rp-cAMPS-trietilaminnal, igazolva ezen kinázok alapvető szerepét az adenzin kiváltotta sejtelhalásban.

Kezelés	$A_{2A}^{+/+}$	Apoptózis (%)	$A_{2A}^{-/-}$
DMSO 0.5%	29.7±0.7		29.2±0.9
RPcAMPS 100 μ M	28.9±1.4		27.6±0.6
Adenozin 1 mM	44.6±2.7*		35.2±1.4*,**
+RPcAMPS 100 μ M	53.4±1.7*		35.4±2.3
Adenozin 100 μ M	36.8±0.3*		29.4±0.8**
+RPcAMPS 100 μ M	27.4±1.7		n.d.
NECA 100 μ M	50.9±3.1*		47.4±2.2*
+RPcAMPS 100 μ M	57.4±1.7*		n.d.
NECA 25 μ M	37.1±2.6*		29.1±1.6**
+RPcAMPS 100 μ M	27.4±1.7		n.d.
Kolera toxin 200 ng/ml	44.4±2.3*		42.6±1.8*
Forskolin 5 μ M	49.7±3.1*		48.6±2.7*
Dideoxiforskolin 5 μ M	29.4±0.6		29.7±1.2

2. táblázat: A különböző kezelések hatása az $A_{2A}^{+/+}$ és $A_{2A}^{-/-}$ timociták in vitro apoptózisában

A kezeléseket követő 44 órával vad típusú és $A_{2A}^{-/-}$ receptor hiányos egerekből izoláltuk a timocitákat, majd meghatároztuk az apoptotikus sejtek %-os arányát. Az adatok 4 különböző egérből származó mérésnek az átlagát és szórását mutatják.*A DMSO kontrolltól, illetve**az azonos módon kezelt vad típusú sejtektől eltérő szignifikáns különbségeket Student t-próbával határoztuk meg (p<0.05).

6. 11. Vad típusú timociták esetén az adenozin az ic. cAMP szint szabályzásán keresztül stimulálja a Nur77 expresszióját és DNS-hez való kötődését, in vitro

A továbbiakban, annak vizsgálatához, hogy vajon az adenozin indukálta apoptózis igényli-e új fehérjék megjelenését, aktinomicin-D és cikloheximid kezelést alkalmaztunk. Az előbbi vegyület az RNS-, míg az utóbbi a fehérjeszintézis gátlója. A kísérlet során a timocitákat adenozinnal és dbcAMP-vel történt előkezelés után 1 illetve 2 órán keresztül aktinomicin D-vel és cikloheximiddel szintén kezeltük. Ahogy a 3. táblázatban feltüntettük, mind az aktinomicin D, mind pedig a cikloheximid kezelés maximálisan legátolta az adenozin és dbcAMP kiváltotta apoptózist, valószínűsítve, hogy a timociták apoptózisának adenozin

által történő szabályozása intakt transzkripció és transzláció folyamatok aktivitásának függvénye.

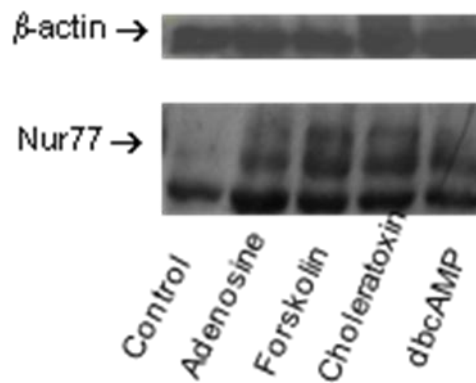
Kezelés	$A_{2A}^{+/+}$	Apoptózis (%)	$A_{2A}^{-/-}$
DMSO 0.5%	29.7±0.7		29.2±0.9
Aktinomicin D 12.5 µg/ml	24.6±1.5		23.4±1.6
Cikloheximid 25 µg/ml	24.8±1.4		23.7±1.1
Adenozin 100 µM	36.8±0.3*		29.4±0.8**
+ Aktinomicin D 12.5 µg/ml	24.8±2.1		n.d.
+Cikloheximid 25 µg/ml	25.1±1.6		n.d.
dbcAMP 100 µM	40.1±1.7*		39.6±2.1*
+ Aktinomicin D 12.5 µg/ml	25.8±2.2		n.d.
+Cikloheximid 25 µg/ml	26.1±1.6		n.d.

3. táblázat: A különböző kezelések hatása az $A_{2A}^{+/+}$ és $A_{2A}^{-/-}$ timociták *in vitro* apoptózisában

A kezeléseket követő 44 órával vad típusú és $A_{2A}^{-/-}$ receptor hiányos egerekből izoláltuk a timocitákat, majd meghatároztuk az apoptotikus sejtek %-os arányát. Az adatok 4 különböző egérből származó mérés átlagát és szórását mutatják. *A DMSO kontrolltól, illetve**az azonos módon kezelt vad típusú sejtektől eltérő szignifikáns különbségeket Student t-próbával határoztuk meg ($p < 0.05$).

Mivel a Nur77-ről már bizonyították, hogy szerepe van a timociták negatív szelekciójának szabályozásában (Woronicz és mtsai, 1994; Liu és mtsai, 1994; Kuang és mtsai, 1999) és a Nur77-ről az is ismert volt, hogy neuronokban kifejeződését fokozhatja az adenilát-cikláz útvonal (Fass és mtsai, 2003), úgy döntöttünk, hogy teszteljük a Nur77 esetleges szerepét az adenozin indukálta sejtelhalás szabályozásában is. Ahogy a 29. ábrán látszik, vad típusú timociták esetén 4 órás *in vitro* adenozin kezelést követően Nur77 indukciót figyeltünk meg. Az adenozin Nur77 indukáló hatásán kívül megfigyeltük, hogy a forskolin, kolera toxin és dbcAMP által kiváltott cAMP szint emelkedése szintén a Nur77 expressziójának a növekedését váltja ki (29. ábra). A Nur77 számos fehérjesávbán volt detektálható, ami arra utal, hogy nemcsak indukálódik, hanem foszforilálódik is az adenilát cikláz út aktivációjának hatására.

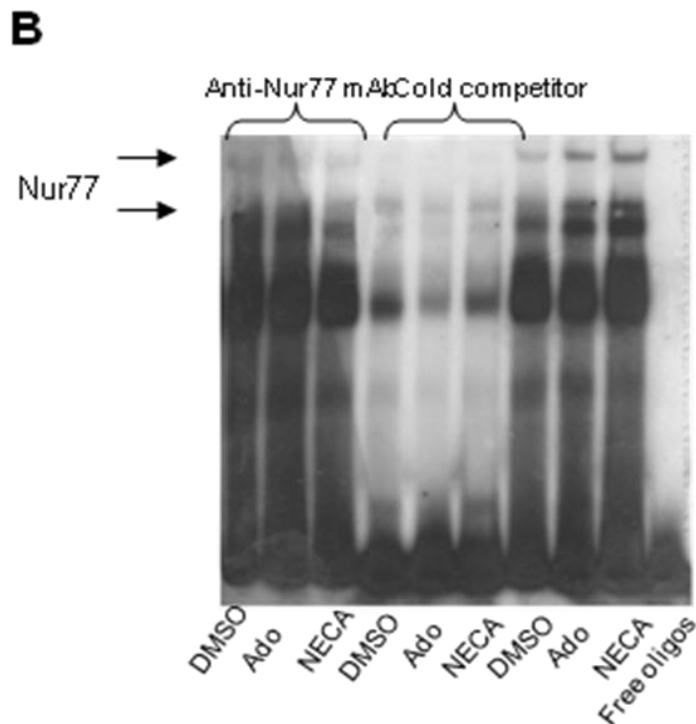
A



29. ábra: A cAMP szint emelkedésével egyidejűleg fokozódik a Nur77 expressziója

Vad típusú timocitákat 1mM adenzinnal, 5 μ M forskolinnal, 200ng/ml kolera toxinnal, illetve 100 μ M dbcAMP-vel kezeltünk, majd 4 órás kezelést követően WB-tal mutattuk ki az expresszálandó fehérjét anti-Nur77 antitest használatával.

A Nur77 egy olyan transzkripció faktor, amely sejthalált indító szerepét részben gének átíródásának fokozásával váltja ki. Ezért „electroforetic mobility shift” esszével megnéztük, hogy az adenzin illetve NECA kezelést követően az adenzin indukálta Nur77 kötődik-e a NBRE-hez, mivel ismert, hogy a Nur77 kötődése ehhez az elemhez együtt jár az apoptózis folyamatának elindításával (**Woronicz és mtsai, 1994**). Az esszé során a 4 órás kezelést követően a sejtekből a sejtmagot kivontuk, majd a kezelés hatására kialakult Nur77-DNS komplexet anti-Nur77 antitesttel azonosítottuk, ami fixálta a kialakult Nur77-DNS komplexet, specifikussá téve a komplex kimutatását (**Kristie és Roizman, 1986**). A kapott eredmények alapján, a DMSO kezelt kontrollhoz, illetve a radioaktívan nem jelzett (hideg) próbákhoz viszonyítva, elmondható, hogy adenzin-, illetve NECA *in vitro* kezelést követően, a Nur77-DNS komplex kialakulásának intenzitása fokozódott (30. ábra), igazolva a Nur77 DNS-hez történő kötődését.

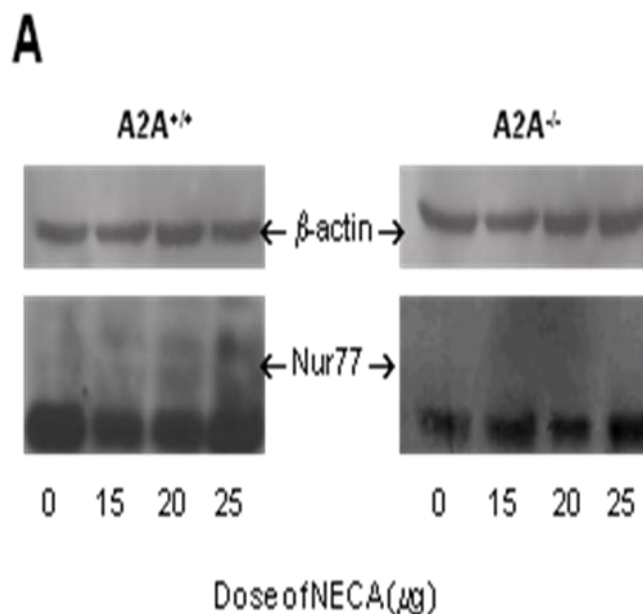


30. ábra: Az adenosin fokozza a Nur77 NBRE-hez történő kötődését

Vad típusú timocitákat kezeltünk 1mM adenizonnal, illetve 5 μ M NECA-val. A sejtmagi kivonatot a kezelést követő 4 órával készítettük, majd 10 μ g extraktumot vittünk fel mintánként a géltre. Az 1, 4 és 7 jelzésű minták a DMSO kontrollok; a 2, 5 és 8-as az adenosin kezelt, míg a 3, 6 és 9-es a NECA kezelt minták. A gél-shift specificitásának vizsgálatához anti-Nur77 antitestet (1-3 minták) és 100-szor töményebb koncentrációjú radioaktívan nem jelzett („hideg”) NBRE-t (4-6 minták) használtunk.

6. 12. NECA oltását követően a Nur77 és néhány Nur77 függő gén, valamint a Bim is indukálódik vad típusú timocitákban, míg az $A_{2A}^{-/-}$ hiányosakban nem

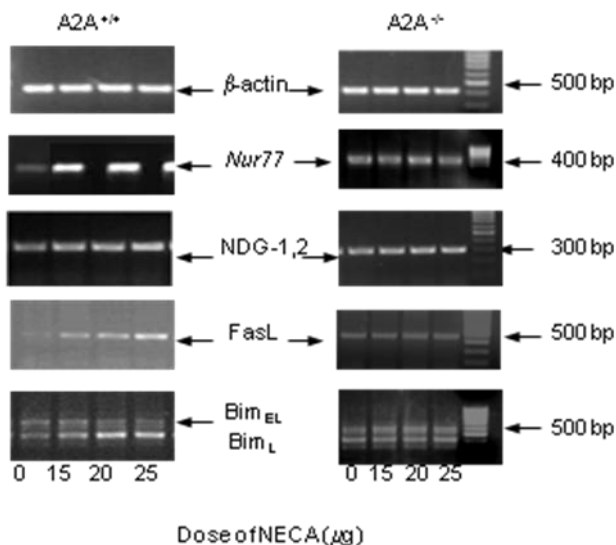
Mivel előzetesen már tapasztaltuk, hogy *in vitro* adenosin kezelést követően a Nur77 indukálódik, tesztelni kívántuk ezt a hatást *in vivo* körülmények között is, NECA oltását követően. Ennek során az egereket a NECA növekvő koncentrációival oltottuk, majd 4 órán belül vizsgáltuk mind az mRNS (RT-PCR és Q-PCR), mind pedig a fehérje szint (Western blot) változását. Ennél a kísérletnél is A_{2A} vad típusú és hiányos egerek kerültek összehasonlításra. Ahogy az 31. ábra is mutatja, az oltásokat követően a vad típusú egerekben dózis-függő módon aktiválódott a Nur77, szemben a hiányos egerekkel, amelyeknél indukció nem volt megfigyelhető. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy az adenosin A_{2A} receptor aktivációja *in vivo* is a Nur77 indukcióját váltja ki.



31. ábra: NECA oltását követően megfigyelhető a Nur77 indukciója vad típusú egerek esetében in vivo is

Vad típusú és A2A^{-/-} egereket oltottunk NECA emelkedő koncentrációival, majd 4 óras oltást követően WB-tal meghatároztuk az expresszáldott fehérje szintjét.

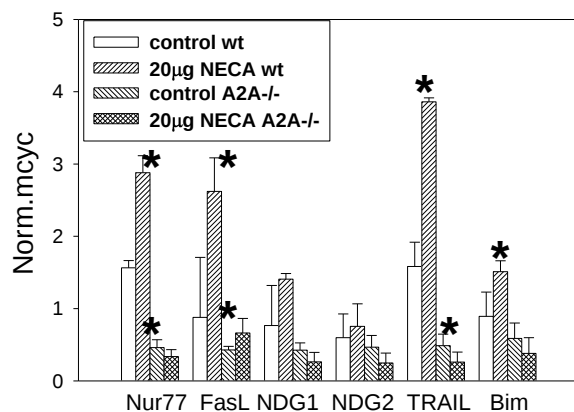
Abból kiindulva, hogy a Nur77 indukálódott adenosin hatására, vizsgáltuk, hogy egyéb Nur77-függő gének (**Rajpal és mtsai, 2003**) indukciója is megfigyelhető-e NECA kezelést követően. A FasL, a TRAIL és a NDG-1,-2 gének expresszióját vizsgáltuk. Az RT-PCR-os kísérletek során használt primerek közül, az NDG-1,-2 esetében azonos helyre voltak tervezve, ezáltal detektálásuk együttesen történt. Ahogy a 32. ábra mutatja, mind az NDG-1,-2, mind pedig a FasL dózis függő módon indukálódott NECA kezelést követően, ami azonban csak vad típusú timociták esetén volt megfigyelhető, hiányos egerek esetén nem (32. ábra).



32. ábra: NECA oltását követően vad típusú timociták esetén Nur77, Bim és Nur77 függő gének, a FasL, NDG-1,2 és a TRAIL expressziója figyelhető meg.

4 hetes A2A^{+/+} és A2A^{-/-} egereket a NECA jelzett dózisaival oltottuk, majd RT-PCR technikával detektáltuk a vizsgált gének expresszióját.

Ezen eredményeket Q-PCR technikával is kimutattuk, amely során 20μg NECA oltását követően 4 órával, FasL, TRAIL és NDG-1,-2 expresszió fokozódást detektáltunk vad típusú sejtek esetén. Az A2A^{-/-} hiányos egerekben azonban nem volt kifejeződés fokozódás egyik gén esetében sem (33. ábra).



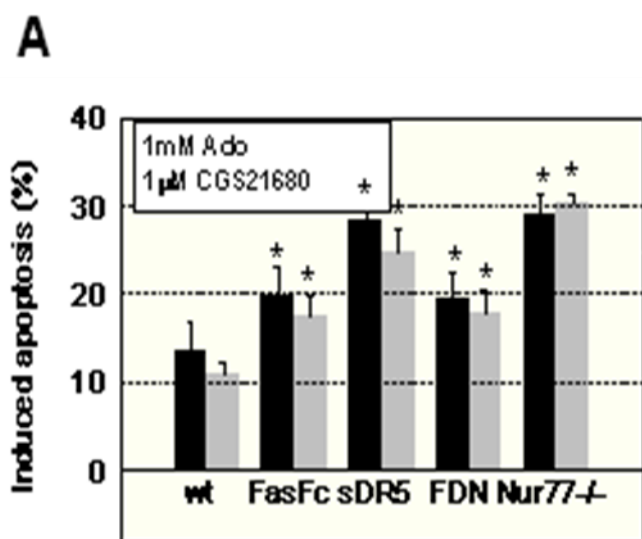
33. ábra: NECA oltását követően vad típusú timocitákban fokozódik a Nur77, a Bim és néhány Nur77 függő gén, a FasL, az NDG-1,2 és a TRAIL expressziója.

4 hetes A2A^{+/+} és A2A^{-/-} egereket a NECA-val oltottunk, majd az oltást követő 4 órával Q-PCR technikával detektáltuk a vizsgált gének mRNS-ének expresszióját. A feltüntetett adatok 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A DMSO kontrollhoz viszonyított többi eredmény szignifikáns eltérést Student t-tesztel határoztuk meg ($p < 0.05$).

Mivel előzetes vizsgálataink a negatív szelekció szabályozásának szempontjából azt valószínűsítik, hogy a Bim (egy „csak” BH3 fehérje) indukciója összefügghet a Nur77 transzkripciós aktivitásával (Szegezdi és mtsai, 2003), a Bim expressziós szintjének változását is teszteltük NECA oltását követően (32. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a Bim két formája, a Bim_{EL} („extralong” forma) és Bim_L („long” forma) közül NECA oltását követően az utóbbi szintén indukálódott. Az előzetesen vizsgált génekhez hasonlóan, azonban az is csak a vad típusú timociták esetén volt megfigyelhető. A Bim_{EL} szintjében változást nem tapasztaltunk.

6. 13. A Bim, „csak” BH3 doménű fehérje, közvetíti az adenzin apoptózist kiváltó hatását egér timocitákban

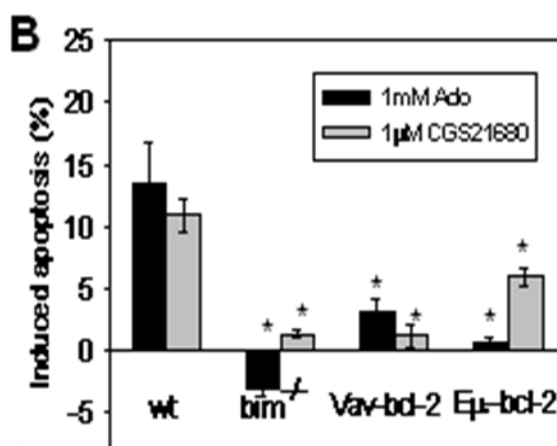
A továbbiakban azt teszteltük, hogy az adenzin által regulált molekulák közül melyik az amely meghatározó szerepet tölt be az apoptózis indukciójában. A Nur77 szerepét Nur77 hiányos timocitákban vizsgáltuk. A Nur77 által regulált gének közül a FasL hatását a FasFc kimérával, a TRAIL hatását szolubilis DR5 molekula adásával közömbösítettük. A legtöbb sejthalál receptor a FADD molekulán keresztül aktiválja a prokaspáz 8 enzimet. A FADD és így a sejthalál receptorok hatása gátolt a FADD domináns negatív fehérjét expresszáló egerekben. Nagy meglepetésünkre, e molekulák hatásának a közömbösítése nem meggátolta, hanem fokozta az adenzin kiváltotta apoptózist. Tehát, bár az adenzin fokozza e molekulák kifejeződését, ezek egyike sem játszik szerepet a megfigyelt apoptózisban (34. ábra).



34. ábra: A Nur77 hiánya, illetve a „sejthalál receptor útvonal” gátlása nem gátolja a timociták adenzin-indukálta sejtelhalását in vitro

FasFc és szolubilis DR5 jelenlétében, FDN-t expresszáló, valamint Nur77 fehérjét nem expresszáló transzgén egerekből származó timociták apoptózist adenzin, illetve CGS21680 adásával váltottuk ki, majd 44 órát követően határoztuk meg az apoptotikus sejtek %-os arányát. Az adatok 3 független kísérlet átlagát és szórását mutatják. (p<0.05)

Ezt követően a Bim szerepét is vizsgáltuk az adenzin kiváltotta timocita apoptózisban, mivel előzetesen megfigyeltük, hogy a Bim szintén indukálódik adenzin analóg hatására *in vivo*. A vizsgálat során egyrészt olyan timocitákat használtunk, amelyekből hiányzott a Bim fehérje (Buillet és mtsai, 1999), másrészt olyan egereket, amelyek T-limfocitáikban bcl2 (antiapoptotikus) transzgént expresszáltak (Ogilvy és mtsai, 1999; Strasser és mtsai, 1991). A 35. ábrán feltüntetett eredményeink mutatják, hogy mind a Bim hiánya, mind pedig a bcl-2 overexpressziója meggátolta az adenzin kiváltotta apoptózist.



35. ábra: Mind a Bim hiánya, mind pedig a Bcl-2 overexpressziója gátolja az adenzin kiváltotta apoptózist

Bim hiányos, VAV-bcl-2 és Eµ-bcl-2 transzgén egerekből izolált adenzin érzékeny timociták apoptózist adenzin és CGS21680 adásával váltottuk ki, majd 44 órát követően meghatároztuk az apoptotikus sejtek %-os arányát. Az adatok 3 független kísérlet átlagát és szórását mutatják ($p < 0.05$).

A CGS21680 adenzin receptor aktiváló vegyülettel elvégzett kísérletek is hasonló eredményt hoztak (35. ábra), valószínűsítve, hogy az adenzin A_{2A} receptor által szabályozott timocita apoptózis egy, a bcl-2 által szabályozott útvonal által regulálódik és kiváltásához szükséges a BH3 doménnel rendelkező fehérje, a Bim is.

7. MEGBESZÉLÉS

Az apoptózis időfüggő indukciójának fontos szerepe van a normál sejtciklusban és fejlődésben. A tímusz az apoptózis tanulmányozásának nagyon érdekes szerve, hiszen több, mint 95%-a a keletkezett timocitáknak apoptózis útján elhal a tímuszban zajló szelekciós folyamatok eredményeként. A timociták érésének szabályozásában központi szerepet tölt be a random generálódó T sejt receptor és az antigén prezentáló tímikus epiteliális sejtek között létrejövő interakció mértéke, illetve annak elmaradása. A timociták 90%-a nem megfelelő T sejt receptort fejez ki, mert az nem képes az antigén prezentáló sejtek MHC molekuláival kapcsolatba lépni. Ezek a sejtek az interakció hiánya miatt nem képesek továbbfejlődni és megrekednek a CD4CD8 dupla pozitív stádiumban. Nem maradnak azonban sokáig jelen a tímuszban, mert a tímikus mikrokörnyezetben számos olyan hatás éri őket, amely apoptózist indukál bennük.

Az általános nézet az, hogy ebben az apoptózist indukáló folyamatban a tímikus epiteliális sejtek által lokálisan termelt glükokortikoid hormonnak van meghatározó szerepe. A timociták glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalási folyamata a legkorábban felismert apoptózis (**Wyllie, 1980**). A glükokortikoid hormon által indított sejtelhalás új gének átíródásának fokozásán keresztül valósul meg, mert olyan timocitákban amelyek olyan mutált GR-t fejeztek ki, ami képes volt ugyan más transzkripciós faktorokkal kapcsolódni, de maga nem volt képes gének transzkripciójának elindítására, nem lehetett apoptózist indítani (**Reichardt és mtsai, 1995**). Máig több olyan gént is azonosítottak, amely indukálódik a glükokortikoid hormon által kiváltott sejtelhalás során. Ilyen gén a GILZ (**Cannarile és mtsai, 2001; Delfino és mtsai, 2004**), a dig2 (**Wang és mtsai, 2003**), a tdag8 (**Malone és mtsai, 2004**), a bim, (**Wang és mtsai, 2003**) és az újonnan leírt Tnfaip8 (**Woodward és mtsai, 2010**).

Egyre több kísérletes eredmény sugallja azt, hogy a glükokortikoidokkal kiváltott apoptózis effektor fázisa a mitokondriális sejthalál úton aktiválódik, és ebben különféle Bcl-2 fehérje családtagok vesznek részt. (**Veis és mtsai, 2003; Rathmell és mtsai, 2002; Bouillet és mtsai, 1999; Villunger és mtsai, 2003**). A mitokondrium szerepét támasztja az is alá, hogy sem az APAf-1, sem a kaszpáz 9 hiányos egerek timocitái nem reagálnak glükokortikoid hormonnal. (**Hakem és mtsai, 1998; Yoshida és mtsai, 1998**).

A laboratóriumunkban jelenleg is folytatott kutatások azonban kimutatták, hogy a tímikus mikrokörnyezetben más molekulák is lehetnek jelen, amelyek hozzájárulhatnak a neglektált sejtek elhalásának fokozásához. A korábbiakban már kimutattuk, hogy retinoidok képződnek a fejlődő tímuszban (Kiss és mtsai, 2008). Bár e közleményben elsősorban a tímikus epiteliális sejtekben azonosítottunk retinsav szintéziséért felelős enzimeket, egy PhD társam, Garabuczi Éva legújabb eredményei azt mutatják, hogy az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok is termelnek retinoidokat, amelyek visszahatnak az apoptotikus sejtek apoptózisára, és többek között hozzájárulnak a transzglutamináz 2 enzim apoptotikus timocitákban megfigyelt megjelenéséhez. Egy másik PhD társam, Köröskényi Krisztina, pedig azt mutatta ki, hogy az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok, az apoptotikus sejt degradálása során adenzint bocsátanak ki, amelynek koncentrációja eléri azt az értéket, amelyben az adenzin A_{2A} receptorok már aktiválódhatnak. **Köröskényi K, Duró E, Pallai A, Sarang Z, Kloor D, Ucker D, Ledent CA, Chawla A, Castrillo A, Fésüs L, Szondy Z. (2010) Involvement of Adenosine A_{2A} Receptors in Engulfment-Dependent Apoptotic Cell Suppression of Inflammation. 2011. J. Immunol. (in press).**

A kutatócsoportunkban folyó kutatásokhoz kapcsolódva munkám során egyrészt azt vizsgáltam, hogy vajon a retinoidok hogyan képesek befolyásolni a glükokortikoidok apoptózis kiváltó hatását éretlen T- sejtekben. Másrészt, hogy a fagocita sejtek által kibocsátott adenzin, milyen módon és mely fehérjék szabályozásán keresztül befolyásolja a szelekciós folyamatokat.

A dolgozatban megerősítettem korábbi megfigyelésünket, hogy a retinoidok képesek fokozni az éretlen timociták glükokortikoid-indukálta apoptózist. Különböző retinoidokat, illetve RAR α hiányos timocitákat alkalmazva, bizonyítottam, hogy a retinoidok apoptózist fokozó hatása RAR α és RXR receptorokon keresztül szabályozódik, egyrészt a két receptor természetes retinsavak által történő együttes aktiválásával, másrészt szintetikus retinoidok által a receptorok külön-külön történő indukálásával. Mivel egy alkalmazott RAR α - specifikus antagonistá szintén emelte a glükokortikoid által indukált apoptózist, feltételeztük, hogy a retinoid receptor a fokozó hatását nem a transzkripció aktivitása révén feje ki. Másrészt a nem genomikus hatásként megfigyelt PI-PLC foszforilációja a dexametazon-indukálta timocita sejtelhalás során (Cifone és mtsai, 1999), a mi esetünkben retinoid kezelés hatására nem fokozódott, ezért más mechanizmust kerestünk a megfigyelt hatás tisztázásához.

Mivel a sejtmagi receptorokról ismert, hogy kölcsönhatnak különböző transzkripciós faktorokkal és ezáltal ligand-függő módon szabályozzák azok transzkripciós aktivitását (Yang-Yen és mtsai, 1990; Shemshedini és mtsai, 1991), mi is vizsgáltuk, hogy vajon a retinoid receptor és a glükokortikoid receptor között szintén megfigyelhető-e kölcsönhatás. Az elvégzett kísérletek azt mutatták, hogy a timocitákban a retinoidok az RAR α és az RXR receptoron keresztül is képesek fokozni a glükokortikoid által indukálható gén, a GILZ kifejeződését. Tovább vizsgálva ezt a hatást, különböző retinoid receptorok transzfekciója után, láttuk, hogy a különböző retinoidok RAR α /RXR heterodimeren keresztül szabályozzák a leghatékonyabban a glükokortikoidok által kiváltott apoptózis fokozó hatást. Megfigyeltük, hogy RAR α /RXR heterodimer jelenlétében minden vizsgált RAR α és RXR agonista, valamint az RAR α antagonistá önmagában is képes volt emelni a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását. Csak az RAR α ligálása a fiziológiás koncentrációjú ATRA-val önmagában nem volt hatékony a transzkripció fokozása szempontjából, azonban az RXR receptor önmagában történő aktiválása specifikus ligandja által, ugyan a ligált heterodimer formánál kisebb mértékben, de hatásos módon fokozta a glükokortikoid receptor transzkripcióját. Ez utóbbi eredmény mutatja az RXR receptor meghatározó szerepét a glükokortikoid receptor indukálta transzkripció szabályozásában, mind önmagában, mind pedig az RAR α receptorral heterodimert alkotva.

Mivel ismert, hogy a transzkripciós faktorok liganddal történő aktiválás után kölcsönhatnak egymással, és ez a létrejövő kapcsolat különböző transzkripciós faktorok között gyakran közvetlen kölcsönhatáson keresztül szabályozódik, amelynek létrejötte nem feltétlenül igényli a kölcsönható partner DNS-hez történő kötődését, emlős két-hibrid rendszerben vizsgáltuk a közvetlen kölcsönhatás lehetőségét a glükokortikoid és a retinoid receptorok között. Eredményeink azt mutatják, hogy a GR és az RAR α illetőleg az RXR receptor közvetlenül kapcsolódnak egymással. Addig azonban, míg ezt az interakciót az RAR α ligand kötődése nem, az RXR ligand kötődése azonban erősen fokozta. Az RAR α és a GR közötti kölcsönhatást a retinoid receptornak a glükokortikoid receptorral történt együttes ko-immunoprecipitálása is bizonyította. E receptorok azonban csak abban az esetben voltak együttesen detektálhatóak, amennyiben a timociták együttesen voltak kezelve dexametazonnal és azokkal a retinoidokkal, amelyek emelték a glükokortikoid indukálta apoptózist, beleértve az RXR agonista LG268-at. Ez utóbbi megfigyelés alapján úgy tűnik, hogy bár az RXR agonista LG268 hatását az RXR homodimereken keresztül is kifejezhetné, *in vivo* az is az RAR α /RXR heterodimeren keresztül hat.

Hogyan magyarázhatjuk azt, hogy az emlős két hibrid rendszerben kifejezett GR és retinoid receptorok ligand nélkül is kapcsolódtak, míg *in vivo* a kölcsönhatás a ligandok jelenlétéhez kötött volt? Fiziológiás körülmények között, amikor a receptorok fiziológiás mennyiségben expresszálódnak a timocitákban, az egyik szerepe a GR/RAR α /RXR interakció létrejöttét szabályozó glükokortikoidoknak az lehet, hogy indukálják a GR transzlokációját a sejtmagba, ahol a retinoid receptorokkal a GR fiziológiás körülmények között kölcsönhathat. Az emlős két hibrid esszében megfigyelt, ligandok nélkül is létrejövő interakció a receptorok között valószínűleg annak a következménye, hogy a glükokortikoid receptor overexpressziójának a hatására a GR fehérje szintje telítődik, nincs elég fiziológiás mennyiségű fehérje, amely a foldoszmában tartaná, ezért ligand hiányában is transzlokálódik a sejtmagba.

Mivel a tranziens transzfekciós kísérletek során azt láttuk, hogy 1, önmagában az RAR α receptor ligálása csak nagyon kis mértékben emelte a GR transzkripció aktivitását, 2, hogy az RXR ligand által aktivált RXR oldal maximális hatékonysággal emelte a GR transzkripció hatékonyságát és 3, az RAR α ligand nem fokozta hatásosan a RAR α és a GR közötti interakciót, azt valószínűsítjük, hogy a RAR α /RXR heterodimer RXR oldala szabályozza a megfigyelt GR transzkripció aktivitás fokozódást. Az RXR-nak azt a konformációját, amely szükséges ahhoz, hogy a kölcsönhatás a glükokortikoid receptorral létrejöjjön, az RAR α /RXR heterodimer mindkét oldalának a ligálása stabilizálhatja. A vizsgált RAR α specifikus retinoidok azonban eltérő módon képesek erre. Az ATRA kötődése nem stabilizálja ezt az RXR konformációt, míg a szintetikus RAR α agonisták és antagonisták igen. Mivel az ATRA és a szintetikus RAR α ligandok, hatásukat tekintve különböznek a RAR α /RXR heterodimer által mediált transzkripció szabályozása és a GR-ral való interakció létrejöttének indukálása szempontjából, valószínűsíthető, hogy mindegyikük különböző konformációját stabilizálja az RAR α -nak. Az Am580 egy olyan, ami fokozza a transzkripciót és az RXR GR kapcsolódási konformációját, az ATRA egy olyan, ami fokozza a transzkripciót, de nem alakítja ki az RXR GR kapcsolódási konformációját, míg a CD2503 egy olyan, ami gátolja a transzkripciót, de kialakítja az RXR GR kapcsolódási konformációját.

Hogy a megfigyelt RXR/GR interakció hogyan fokozza a GR által szabályozott transzkripciót, nem vizsgáltuk, de azt bizonyítottuk, hogy a megfigyelt hatásokhoz nem szükséges a ligált retinoid receptorok DNS-hez történő kötődése. Emellett a retinoid receptorok kötődése nem befolyásolta a GR dexametazon kezelés hatására Ser211-en

bekövetkező olyan foszforilációját sem, amely fokozza a transzkripció képességet. Ezért inkább úgy gondoljuk, hogy a két transzkripció faktor interakciója a GR aktív konformációjának stabilizálásán keresztül hathat.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a retinoidok az irodalomban általánosan elfogadott glükokortikoid hatásokhoz megegyező hatásokat fejtenek ki a tímuszban. Mind a retinoidok, mind a glükokortikoidok fokozzák az immunrendszer szempontjából nem megfelelő timociták elhalását, amit vagy önmagukban (Wyllie, 1980; Fésüs, Szondy és Uray 1995; Szondy, Reichert és Fésüs, 1998; Szondy és mtsai, 1997) vagy, ahogy itt bemutattuk, egymással kölcsönhatva szabályoznak. Emellett mindkét vegyületcsoport gátolja a negatív szelekciót (Szondy, Reichert és Fésüs 1998; Szondy és mtsai, 1998; Szegezdi és mtsai, 2003; Zhang és mtsai, 1992). Adataink azt mutatják, hogy a retinoidok és a glükokortikoidok kölcsönösen úgy hatnak, hogy csak a megfelelő T sejt receptorú timociták érkezhessenek a perifériára.

A normál körülmények között zajló limfocita szelekció során, a szelektálódó timociták mikro környezetében adenzin is termelődik. A tímuszban képződő adenzin nagy részét a timociták adenzin-dezamináz enzime ugyan elbontja, de egy olyan környezetben, ahol a sejtek 95%-a apoptózisba lép, e sejtek fagocitózist követően elegendő mennyiségű adenzin termelődik az adenzin receptorok aktiválásához (Blackburn és mtsai, 1996).

Különbözö fajokból származó limfociták a sejtfelszíni adenzin receptornak 4 típusát expresszálják (Plaut, 1987). Ezek közül az egér timociták embrionális korban adenzin A_{2A} , A_{2B} és A_3 , míg a születést követően már csak A_{2A} receptorokat expresszálnak felszínükön, melyek adenzin hatására apoptózist indukálnak (Van de Wiele és mtsai, 2002). Vad típusú és $A_{2A}^{-/-}$ hiányos egérből származó timocitákon elvégzett kísérleteink megerősítették azokat az irodalmi adatokat, amelyek azt mutatják, hogy adenzin kezelés hatására a timociták A_{2A} receptoron keresztül szabályozott apoptózissal halnak el. Ennek indukálására *in vitro* relatíve magas koncentrációjú adenzin szükséges, azért, mert a timociták magas adenzin dezamináz aktivitása az adenzint gyorsan elbontja. Az a tény azonban, hogy a CGS21680-ból, amit nem bont az adenzin dezamináz, elég volt nanomoláris koncentrációt adni az apoptózis kiváltásához, azt sugallja, hogy ezek a receptorok az adenzin stabil koncentrációjára jól válaszolhatnak *in vivo*. A szérum adenzin koncentrációja 50nM körüli (Drumm és mtsai, 2004), de irodalmi adatok szerint a tímuszban sokkal magasabb (Blackburn és mtsai, 1996). Ráadásul az irodalmi adat, teljes szövet adenzin koncentrációjára vonatkozik, míg az elhaló,

fagocitálódó sejtek környezetében ez még magasabb lehet, ami elegendő az apoptózis indításához. Ezt a feltevést támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy az adenzinnal indukálható gének alap mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb az $A_{2A}^{-/-}$ tímuszban.

Miután egyéb sejtek esetében már ismert volt, hogy az adenzin A_{2A} receptorok mind az adenilát cikláz, mind a foszfolipáz C jelátviteli útvonalat aktiválhatják (**Fredholm és mtsai, 2000**), kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy egér tímociták apoptózisának indításában melyik jelpálya vesz részt. Eredményeink azt mutatják, hogy egér tímocitákban az adenzin A_{2A} receptor az adenilát cikláz aktiválásán keresztül vált ki apoptózist, s a hatást cAMP függő protein kinázok közvetítik. Adataink azt is igazolták, hogy adenzin-mediálta sejthalál a sejtek intakt transzkripció és transzláció aktivitásától függ, és azok a fehérjék, amelyek kritikusak az apoptózis indukciójában, már az első 2 órában megszintetizálódnak.

A Nur77 egy olyan transzkripció faktor, amelyről korábban bizonyították, hogy önmagában kifejeződve is képes tímociták apoptózisának indítására, számos Nur77 függő apoptózis gén átírásán keresztül (**Rajpal és mtsai, 2003**). Mivel idegsejtek esetén a Nur77 család kifejeződését elsősorban a protein-kináz A jelátviteli út szabályozza (**Fass, Butler és Goodman, 2003; Fernandez és mtsai, 2000**), teszteltük, vajon a Nur77 a tímociták adenzin kiváltotta sejthalásában is szerepet játszhat-e.

A Nur77 cAMP függő indukcióját mind mRNS, mind pedig fehérje szinten megfigyeltük adenzin hatására egér tímocitákban. A keletkezett Nur77 DNS-hez is kötődött és több Nur77 függő gén pl FasL, TRAIL vagy NDG-1 kifejeződését is fokozta. Mindezek a hatások elmaradtak adenzin adására adenzin A_{2A} receptor hiányos tímocitákban, bizonyítva az A_{2A} receptor szerepét a Nur77 indukciójában.

Mivel a tímociták negatív szelekciója kapcsán ismert volt, hogy a Nur77 mellett a Bim is indukálódik azt is teszteltük, változik-e a Bim kifejeződése az adenzin kiváltotta sejthalás során. Az adenzinra indukálódó gének között megtaláltuk a Bim-et is, amely azonban a Nur77-t túltermelő tímocitákban nem indukálódott (**Rajpal és mtsai, 2003**). Ez két dolgot jelenthet. Vagy az adenzin indukált Bim kifejeződés független a Nur77 jelenlététől, vagy ugyan függ tőle, de mellette más adenzin-indukált transzkripció faktorokra is egyaránt szükség van. Mivel az adenzin-indukálta sejthalál az intracelluláris cAMP felhalmozódás függvénye, Clustal W programot használva azt kerestük, hogy az egér Bim promótere tartalmaz-e cAMP válaszadó elemet. A TGACGTTA szekvencia, ami egy vélt válaszadó elem, a promóter 1277-es pozíciójában megtalálható, jelezve, hogy a Bim expressziója

valószínűleg közvetlenül szabályozódik az adenilát-cikláz útvonal által hasonlóan a más limfoid sejtekben megfigyeltékhez (**Zhang és Insel, 2004**).

A továbbiakban arra próbáltunk választ adni, hogy a Nur77, vagy a Bim kifejeződése játszik-e meghatározó szerepet az adenozin kiváltotta sejtelhalásban. Ehhez különféle transzgenikus egerekből származó timocitákon teszteltük az adenozin hatását. A Nur77 szerepét Nur77 hiányos, a sejthalál receptorok szerepét FADD domináns negatív fehérjét kifejező timocitákon vizsgáltuk. A TRAIL hatását és a FasL hatását is külön külön blokkoltuk. Nagy meglepetésünkre, ezen útvonalak blokkolása nem gátolta, hanem fokozta az adenozin által kiváltott apoptózist. A jelenséget akkor nemigen tudtuk magyarázni. Feltételezzük, hogy az adenozin Nur77 útvonalra gyakorolt hatása talán az osztódó sejteken nyilvánult meg, mivel a kísérletekben nem választottuk szét az apoptózis érzékeny CD4CD8 DP populációt. A Nur77 osztódó T sejtekben korai időpontban megjelenő transzkripció faktor és hozzájárulhat a proliferációhoz. De nem zárhatjuk azt sem ki, hogy egy bizonyos jelátviteli környezetben a Nur77 a DP sejtekben is antiapoptotikus fehérjeként hat. Ezt alátámasztandó fibroblasztokban a Nur77-nek olyan anti-apoptotikus funkcióját találták, mely az NFkB transzkripcionális aktivitásának fokozásán keresztül különböző anti-apoptotikus gének expressziójának fokozódását eredményezte (**Villunger és mtsai, 2004**).

Előzetes kutatási eredmények igazolták, hogy a glükokortikoidok által kiváltott cAMP/PKA útvonalon keresztül kiváltott apoptózis szorosan összefügg a Bim expressziójával (**Zhang és Insel, 2004**). A Bim szerepét tesztelve megfigyeltük, hogy a Bim egyértelműen az adenozin kiváltott sejtelhalás mediátora is. Nemcsak, hogy Bim hiányos sejtekben nem tudunk apoptózist kiváltani, hanem a Bim antagonistájaként ható Bcl-2 fehérje túltermelése is megakadályozta az adenozin kiváltotta sejtelhalást. Adataink azt mutatják, hogy a Bim több a tímuszban keletkező vegyület apoptózis kiváltó hatását is közvetítheti. Így meghatározó szerepet tölt be a negatív szelekció és a glükokortikoid kiváltott sejtelhalás mellett, az adenozin hatásában is.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a tímuszban összhangban zajlanak az apoptotikus és az apoptotikus sejteket eltávolító fagocitotikus folyamatok. A tímikus sejtek által termelt glükokortikoid hormon fokozza a tímikus sejtek elhalását és az elhalt sejtek fagocitózist is (**McColl és mtsai, 2009**). Az elhaló sejteket eltávolító fagociták retinoidokat és adenozint bocsátanak ki, s ezzel fokozzák a folyamatosan keletkező neglektált sejtek apoptózist. E

vegyületek kibocsátása a fagocitózis következménye, s ahogy a laboratóriumunkban folyó kísérletek mutatják, egyben a fagocitózis fokozódásához is vezetnek.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az apoptózis időfüggő indukciójának fontos szerepe van a normál sejtciklusban és fejlődésben. A tímuszban zajló T-limfocita szelekció és differenciálódás során a timociták 90%-a negatív szelekció, illetve neglekció révén szelektálódik ki. Az utóbbi folyamatban igazolták a glükokortikoid hormonok sejthalált gyorsító szerepét. A tímusz epiteliális sejtjei a glükokortikoid hormonok mellett retinoidok termelésére is képesek, valamint ezek szerepét szintén igazolták mind az a apoptózis folyamatában, mind pedig a glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalás fokozásában.

A glükokortikoidok és retinoidok mellett megfigyelték, hogy az adenzinnak is szabályozó szerepe van az apoptózis folyamatában, melyet az egér timociták esetén az adenzin A_{2A} receptoron keresztül hatva fejt ki. Ismert, hogy az adenzin a szelektálódó timociták mikro környezetében termelődik, az elhalt sejteket fagocitáló makrofágok termelése által.

Megfigyeltük, hogy a retinoidok fokozzák az egér timociták glükokortikoidok által kiváltott apoptózist, mely hatás $RAR\alpha/RXR$ heterodimeren keresztül szabályozódik. A ligált $RAR\alpha/RXR$ heterodimer közvetlenül kölcsönhat a glükokortikoid receptorral, az interakció létrejötte nem igényli a $RAR\alpha/RXR$ heterodimer DNS-hez történő kötődését, viszont fokozza a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását. Eredményeink azonban azt is igazolták, hogy ez a transzkripció fokozó hatás nem a glükokortikoid receptor foszforilációs állapotának megváltoztatásán keresztül jön létre.

Megfigyeltük továbbá, hogy adenzin hatására a timociták A_{2A} receptoron keresztül szabályozott apoptózissal halnak el, mely során az adenilát-cikláz rendszer aktiválódik a Nur77 indukciójához és foszforilációjához vezetve. A Nur77-el összefüggően Nur77 függően indukálódó gének megjelenését is igazoltuk, azonban ezeknek nincs szerepe az adenzin által kiváltott timocita apoptózisban. Az adenzinra indukálódó gének között, az előbb említett géneken kívül, megfigyeltük a Bim indukcióját is, mely egy, a bcl-2-vel összefüggő úton, közvetlenül szabályozódik az adenzin hatásban.

Az elvégzett munkát támogatta OTKA K77587

9. IRODALOMJEGYZÉK

- **Ádám, Dux, Faragó, Fésüs, Machovich, Mandl, Sümegi. (2002)** Orvosi biokémia Medicina Könyvkiadó RT. Bp. 495-504
- **Ameisen, JC. (1992)** The origin of programmed cell death. Science 272: 1278-1279
- **Apasov, S., Koshiba, M., Redegeld, F., Sitkovsky, M. (1995)** Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic effector functions. Immunol Rev. 146: 5-19
- **Armstrong, JM., Chen, JF., Swarzschild, MA., Apasov, S., Smith, PT., Caldwell, C., Chen, P. (2001)** Gene-dose effect no Gs-coupled A_{2A} adenosine reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A_{2A}-receptor-gene-deficient mice. Biochem J. 354: 123-130
- **Berki, T., Grama, L., Németh, P. (2000)** Detection of steroid induced glucocorticoid receptor (GR) translocation and expression with a FITC labeled monoclonal antibody. Cytometry. 10(Suppl.): 99
- **Blackburn, MR. (2003)** Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. TRENDS in Pharmacol Science . 24/2: 66-70
- **Blackburn, MR., Datta, SK., Wakamiya, BS., Kellems, RE. (1996)** Metabolic and immunologic consequences of limited adenosine deaminase expression in mice. J Biol Chem. 271: 15203-15210
- **Blomhoff, HK. (2004)** Vitamin A regulates proliferation and apoptosis of human T- and B-cells. Biochem Soc Trans. 32(Pt 6): 982-984
- **Bodwell, JE., Orti, E., Coull, JM., Pappin, DJC., Smith, LI., Swift, FJ. (1991)** Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor in. J Biol Chem. 266: 7549-7555
- **Boise, LH., Minn, AJ., Noel, PJ., June, CH., Accavitti, MA., Lindstein, T., Thomson, CB. (1995)** CD28 costimulation can promote T-cell survival by enhancing the expression of bcl-x. J. Immunity. 3: 87-98

- **Buillet, P., Metcalf, D., Huang, DCS., Tarlinton, DM., Kay, TWH., Kontgen, F., Adams, JM., Strasser, A. (1999)** Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis and to preclude autoimmunity. *Science*. 286: 1735-1738
- **Buttgereit, F., Straub, RH., Wehling, M., Burmester, GR. (2004)** Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*. 50(11): 3408-3417
- **Cannarile, L., Zollo, O., D'Adamio, F., Ayroldi, E., Marchetti, C., Tabilio, A. *et al.* (2001)** Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ*. 8: 201-203
- **Cao, X., Liu, W., Lin, F., Li, H., Kolluri, SK., Lin, B., Han, YH., Dawson, MI., Zhand, XK. (2004)** Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol Cell Biol*. 24(22): 9705-9725. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 25(1): 524
- **Cassel, D., Selinger, Z. (1977)** Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 3307-3311
- **Chan, SL., Mattson, MP. (1999)** Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res*. 58: 167-190
- **Chapellier, B., Mark, M., Garnier, JM., LeMeur, M., Chambon, P., Ghyselinck, NB. (2002)** A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor alpha (RARalpha) gene. *Genesis*. 32: 87-90
- **Chen, H., Howald, WN., Juchau, MR. (2000)** Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from all-trans-retinol: catalysis of all-trans-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. *Drug Metab Dispos*. 28(3): 315-322
- **Cifone, MG., Migliatorati, G., Parroni, R., Marchetti, C., Millimaggi, D., Santoni, A. (1999)** Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase and caspases. *Blood*. 93: 2282-2296
- **Cohen, JJ. (1992)** Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin Immunol* 4: 863-869

- **Crettaz, M., Baron, A., Siegenthaler, G., Hunziker, W. (1990)** Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR alpha and RAR beta. *Biochem J.* 272: 391-397
- **Delfino, DV., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P., Riccardi, C. (2004)** Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood.* 104: 4134-4141
- **Drumm, D., Hoefer, M., Juhasz, J., Huszar, E., Sybrecht, GW. (2004)** Plasma adenosine during investigation of hypoxic ventilatory response. *Sleep Breath.* 8: 31-51
- **Eicher, DM., Waldmann, TA. (1998)** IL-2R alpha on one cell can present IL-2 to IL2R beta/gamma (c) to another cell to augment IL-2 signaling. *J Immunol* 161: 5430-5437
- **Elmore, S. (2007)** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):459-516
- **Evans, RM. (1988)** The steroid and thyroid receptor superfamily. *Science.* 240: 889-895
- **Fadock, VA., Voelkr, DR., Campell, PA., Cohen, JJ., Bratton, DL., Henson, PM. (1992)** Exposition of phosphatidyl serine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207
- **Falus, A. (1998)** Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. Semmelweis Kiadó, Bp. 114-117
- **Fass, DM., Butler, JE., Goodman, RH. (2003)** Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *J Biol Chem.* 278: 43014-43019
- **Fauci, AS., Dale, DC., Balow, JE. (1976)** Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med.* 84(3): 304-315
- **Fernandez, PM., Brunel, F., Jimenez, MA., Saez, JM., Cereghini, S., Zakin, M. (2000)** Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 141: 2392-2400
- **Fésüs, L., Szondy, Z., Uray, I. (1995)** Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl.* 22: 151-161

- **Frankfurt, O., Rosen, ST. (2004)** Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr Opin Oncol.* 16:553-563
- **Fredholm, BB., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Wasserman, W. (2000)** Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 364-374
- **Freedman, LP., Luisi, GV. (1993)** Ont he mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *J. Cell. Biochem.* 51: 140-150
- **Gergely, P., Erdei, A. (2000)** Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó RT., Bp. 212-238
- **Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, RM., Lazar, MA., Leid, M., De Lera, AR., Lotan, R., Mangelsdorf, DJ., Gronemeyer, H. (2006)** International Union of Pharmacology, LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev.* 58(4): 712-725
- **Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, RM., Lazar, MA., Leid, M., De Lera, AR., Lotan, R., Mangelsdorf, DJ., Gronemeyer, H. (2006)** International Union of Pharmacology, LXIII. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev.* 58(4): 760-772
- **Goodman, DS. (1994)** Vutamin A and retinoids in death and desease. *N engl J Med* 310: 1023
- **Green, DR. (1998)** Apoptotic pathways: the roads to ruin (minireview). *Cell* 94: 695-698
- **Green, DR., Reed, JC. (1998)** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
- **Hafezi-Moghamad, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, FP., Plumier, JC., Rebsamen, MC., Hsieh, CM., Chui, DS., Thomas, KL., Prorock, AJ., Laubach, VE., Moskowitz, MA., French, BA., Ley, K., Liao, JK. (2002)** Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8: 473-479
- **Hakem, R., Hakem, A., Duncan, GS., Henderson, JT., Woo, M., Soengas, MS., *et al.* (1998)** Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell.* 94: 339-352
- **Harvey, NL., Kumar, S. (1998)** The role of caspases in apoptosis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 62:107-128

- **He, YW. (2002)** Orphan nuclear receptors in T lymphocyte development. *J Leukoc. Biol.* 72(3): 440-446
- **Hershfield, MS., Mitchell, BS. (1995)** Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In Scriver, CR., Beaudet, AL., Sly, WS., Valle, D. (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill Inc., New York, pp 1725-1738
- **Hickman, JA., Boyle, CC. (1997)** Apoptosis and cytotoxins. *Br. Med. Bull.* 53(3):632-643
- **Hollenberg, SM., Weinberger, C., Ong, ES., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, EB., Rosenfeld, MG., Evans, RM. (1985)** Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318: 635-641
- **Itoh, N., Tsujimoto, Y., Nagata, S. (1993)** Effect of Bcl-2 on Fas antigen mediated cell death. *J. Immunol.* 151:621-627
- **Iwata, M., Mukai, M., Nakai, Y., Iseki, R. (1992)** Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J Immunol* 149: 3302-3308
- **Iwata, M., Ohoka, Y., Kuwata, T., Asada, A. (1996)** Regulation of T cell apoptosis via T cell receptors and steroid receptors. *Stem Cells.* 14:632-641
- **Kellems, RE., Yeung, CY., Ingolia, DE. (1985)** Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiencies. *Trends Genet.* 1: 278-286
- **Khodarev, NN., Sokolova, IA., Vaughan, AT. (1998)** Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation. *Int. J. Radiat. Biol.* 73: 455-467
- **Kiss, I., Rühl, R., Szegezdi, E., Fritzsche, B., Tóth, B., Pongrácz, J., Perlmann, T., Fésüs, L., Szondy, Z. (2008)** Retinoid receptor-activating ligands are produced within the mouse thymus during postnatal development. *Eur J Immunol.* 38(1): 147-155
- **Kizaki, H., Suzuki, K., Tadakuma, T., Ishimura, Y. (1990)** Adenosine-receptor mediated accumulation of cyclic AMP-induced-T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 265: 5280-5284
- **Kopper L, Fésüs L. (2002)** Apoptózis. *Medicina Könyvkiadó RT., Bp.* 16-23, 240-250
- **Kristie, TM., Roizman, B. (1986)** DNA-binding site of major regulatory protein alpha 4 specifically associated with promoter regulatory domains of alpha genes of herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 4700-4704

- **Kuang, AA., Cado, D., Winoto, A. (1999)** Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo. *Eur J Immunol.* 29: 3722-3728
- **Ledent, C., Vaugeois, JM., Schiffmann, SN., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaegen, JJ., Costentin, J. (1997)** Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. *Nature.* 388: 674-678
- **Liu, ZG., Smith, SW., McLaughlin, KA., Schwartz, LM., Osborn, BA. (1994)** Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T cell hybrid require the immediate-early gene Nur77. *Nature.* 367: 281-284
- **Long, F. (2005)** Rapid nongenomic inhibitory effect of dexamethasone on phagocytosis and superoxid anion production by macrophages. *Steroids.* 70: 55-61
- **Maggi, E., Cosmi, L., Liotta, F., Romagnani, P., Romagnani, S., Annunziato, F. (2005)** Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* 4(8): 579-586
- **Malone, MH., Wang, Z., Distelhorst, CW. (2004)** The glucocorticoid-induced gene tdag8 encodes a pro-apoptotic G protein-coupled receptor whose activation promotes glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 279: 52850-52859
- **Mangelsdorf, DJ. (1994)** Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.* 52: S32-S44
- **Mazzioti, G., Giustina, A., Canalis, E., Bilezikian, JP. (2007)** Glucocorticoid-induced osteoporosis: clinical and therapeutic aspects. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 51(8): 1401-1412
- **McColl, A., Bournazos, S., Franz, S., Perretti, M., Morgan, BP., Haslett, C., Dransfield, I. (2009)** Glucocorticoids induce protein S-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by human macrophages. *J. Immunol.* 183(3): 2165-2175
- **Mendelsohn, C., Lohnes, D., Décimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., Mark, M. (1994)** Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* 120(10): 2749-2771
- **Monte, AH., Bochan, MR., Hobbs, JA., Lynch, DH., Bahmi, Z. (1995)** Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell. Immunol.* 166: 236-246
- **Muzikar, KA., Nickols, NG., Dervan, PB. (2009)** Repression of DNA-binding dependent glucocorticoid receptor-mediated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 15598-15603

- **Nagata, S. (1997)** Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365
- **Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, CG., Bath, ML., Harris, AW., Adams, JM. (1999)** Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 14943-14948
- **Ohta, A., Sitkovsky, M. (2001)** Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. 414: 916-920
- **Oláh, ME., Stiles, G. (1995)** Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 581-606
- **Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjo, vall, J., Jondal, M., Okret, S. (1999)** Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymus epithelial cells. *FASEB J.* 13: 893-901
- **Penninger, JM, Kroemer, G. (1998)** Molecular and cellular mechanisms of T-lymphocyte apoptosis. *Adv. in Immunol.* 68:51-143
- **Pitkänen, J., Peterson, P. (2003)** Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun.* 21: 139-176
- **Plaut, M. (1987)** Lymphocyte hormone receptors. *Annu Rev. Immunol.* 5: 621-569
- **Polosa, R. (2002)** Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 20: 488-496
- **Rajnavölgyi, E., Nagy, Z., Kurucz, L., Gogolák, P., Tóth, G., Váradi, G. (1994)** T cell recognition of the posttranslationally cleaved intersubunit region of influenza virus haemagglutinin. *Mol Immunol.* 31: 1403-1414
- **Rajpal, A., Cho, YA., Yelent, B., Koza-Taylor, PH., Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, C., Turi, TG., Winoto, A. (2003)** Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *EMBO J.* 22(24): 6526-6536
- **Rathmell, JC., Lindsten, T., Zong, WX., Cinalli, RM., Thompson, CB. (2002)** Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol.* 3: 932-939
- **Reichardt, HM. (2004)** Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. *Curr. Pharm. Des.* 10: 2797-2805

- **Reichardt, HM., Kaestner, KH., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R. *et al.* (1995)** DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*. 93: 531-541
- **Reifen, R. (2002)** Vitamin A as anti-inflammatory agent. *Proc Nutr Soc* 61(3): 397-400
- **Ross, AC. (2003)** Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *Nutr.* 133(1): 291-296
- **Schorr, K., Li, M., Krajewski, S., Reed, JC., Furth, PA. (1999)** Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4(2):153-164
- **Seamon, KB., Padgett, W., Daly, JW. (1981)** Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 3363-3367
- **Shemshedini, L., Knauthe, R., Corsi-Sassone, P., Pornon, A., Gronemeyer, H. (1991)** Cell specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J.* 10: 3839-3849
- **Skalhegg, BS., Tasken, K. (2000)** Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5: D678-693
- **Solito, E., Mulla, A., Morris, JF., Christian, HC., Flower, RJ., Buckinham, JC. (2003)** Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin I in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 144: 1164-1174
- **Starr, TK., Jameson, SC., Hogquist, KA. (2003)** Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev. Immunol.* 21: 139-176
- **Strasser, A., Harris, AW., Cory, S. (1991)** Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*. 67: 889-899
- **Szegezdi, E., Kiss, I., Simon, A., Blasko, B., Reichert, U., Michel, S. (2003)** Ligand of RAR α regulates negative selection of thymocytes by inhibiting both DNA binding and the synthesis of Bim. *J Immunol.* 170: 3014-3022

- **Szondy, Z. (1994)** Adenosine stimulates DNA fragmentation in human thymocytes by Ca^{2+} -mediated mechanisms. *Biochem J.* 304: 877-885
- **Szondy, Z. (1997)** Methyprednisolone and 2-chloroadenosine induce DNA fragmentation at different stages of human T-lymphocyte development. *Immunol Lett.* 58: 59-65
- **Szondy, Z., Reichert, U., Bernardon, JM., Mchel, S., Tóth, R., Karászi, E. (1998)** Inhibition of activation-induced apoptosis of thymocytes by all-trans and 9-cis retinoic acids is mediated via retinoic acid receptor alpha. *Biochem J.* 331: 767-774
- **Szondy, Z., Reichert, U., Bernardon, JM., Michel, S., Tóth, R., Ancian, P. (1997)** Induction of apoptosis by retinoids and RAR gamma selective compounds in mouse thymocytes through a novel a apoptosis pathway. *Mol Pharmacol* 51: 972-982
- **Szondy, Z., Reichert, U., Fésüs, L. (1998)** Apoptosis regulation of T lymphocytes by retinoic acids: a novel mode of interplay between RAR and RXR receptors in regulating T lymphocyte death. *Cell Death Differ.* 5: 4-10
- **Szondy, Z., Reichert, U., Fésüs, L. (1998)** Retinoic acids regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. *Cell Death Differ.* 5(1): 4-10
- **Tuckermann, JP., Kleiman, A., McPherson, KG., Reichhardt, HM. (2005)** Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 42: 71-104
- **Vacchio, MS., Papadopoulos, V., Ashwell, JD. (1994)** Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J. Exp. Med.* 179: 1835-1846
- **Van de Wiele, CJ., Vaughn, JG., Blackburn, MR., Ledent, CA., Jacobson, M., Jiang, H., Thompson, LF. (2002)** Adenosine kinase inhibition promotes survival of fetal adenosine deaminase-deficient thymocytes by blocking dATP accumulation. *J Clin Invest.* 110: 395-402
- **van Hassert, PJM., van Driel, R., Jastorff, B., Baraniak, J., Stec, WJ., De Wit, RJW. (1984)** Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. *J. Biol. Chem.* 259: 10020-10024

- **Veis, DJ., Sorenson, CM., Shutter, JR., Korsmeyer, SJ. (1993)** Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 75: 229-240
- **Vermot, J., Fraulob, V., Dollé, P., Niederreither, K. (2000)** Expression of enzymes synthesizing (aldehyde dehydrogenase 1 and retinaldehyde dehydrogenase 2) and metabolizing (Cyp26) retinoic acid in the mouse female reproductive system. *Endocrinology* 141(10): 3638-3645
- **Villunger, A., Marsden, VS., Zhan, Y., Erlacher, M., Lew, AM., Bouillet, P., Berzins, S. (2004)** Negative selection of semimature CD4(+)8(-)HSA(+) thymocytes requires the BH3-only protein Bim but is independent of death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 7052-7057
- **Villunger, A., Michalak, EM., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, MJ., *et al.* (2003)** p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*. 302: 1036-1038
- **Wang, Z., Frederick, J., Garabedian, MJ. (2002)** Deciphering the phosphorylation 'code' of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem*. 277: 26573-26580
- **Wang, Z., Malone, MH., He, H., McColl, KS., Distelhorst, CW. (2003)** Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3 only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 278: 23861-23867
- **Wang, Z., Malone, MH., Thomenius, MJ., Zhong, F., Xu, F., Distelhorst, CW. (2003)** Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel prosurvival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem*. 278: 27053-27058
- **Webster, JC., Jewel, CM., Bodwell, JE., Munck, A., Sar, M., Cidlowski, JA. (1997)** Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem*. 272: 9287-9293
- **Woodward, MJ., de Boer, J., Heidorn, S., Hubank, M., Kioussis, D., Williams, O., Brady, HJ. (2010)** Tnfrsf10b is an essential gene for the regulation of glucocorticoid-mediated apoptosis of thymocytes. *Cell Death Differ*. 17: 316-323
- **Woronicz, JD., Calnan, B., Ngo, V., Winoto, A. (1994)** Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T cell hybridomas. *Nature*. 367: 277-281

- **Wyllie A. (1980)** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284: 555-556
- **Yang-Yen, HF., Chambard, JC., Sun, YL., Smeal, T., Schmidt, TJ., Drouin, J. (1990)** Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*. 62: 1205-1215
- **Yoshida, H., Kong, YY., Yoshida, R., Elia, AJ., Hakem, A., Hakem, R., *et al.* (1998)** Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 94: 739-750
- **Zhang, L., Insel, PA. (2004)** The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/protein kinase A- and glucocorticoid-promoted apoptosis lymphoid cells. *J Biol Chem*. 279: 20858-20865
- **Zhang, XK., Lehmann, J., Hoffman, B., Dawson, ML., Cameron, J., Graupner, G. (1992)** Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature*. 358: 587-591
- **Ziouzenkova, O., Plutzky, J. (2008)** Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett*. 582(1): 32-38

10. TÁRGYSZAVAK

Apoptózis

Negatív szelekció

Glükokortikoid

Retinoid

Timociták

Adenozin

Bim

Nur77

T sejtek

10. Keywords

Apoptosis

Negative selection

Glucocorticoid

Retinoid

Thymocytes

Adenosine

Bim

Nur77

T cells

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Szondy Zsuzsának, amiért tudásával és tapasztalatával irányította és segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fésüs László intézetvezetőnek, amiért lehetőséget adott arra, hogy az intézetben dolgozhassak és tanácsaival segítette munkám sikeres kivitelezését és elvégzését.

Köszönöm Komóczi Editnek, hogy a kezdetektől mellettem állva segítette a laboratóriumi munkámat.

Köszönöm Dr. Scholtz Beátának és Buslig Júliának a Q-PCR technika elsajátításában nyújtott segítségét.

Köszönöm Brázda Péternek a különböző transzfekciós technikák megtanulásához nyújtott segítségét.

Köszönöm Kiss Beáta Ph. D. hallgatónak a kísérletek kivitelezésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Sarang Zsoltnak, hogy tapasztalatával segített, valamint laborunk és a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet minden dolgozójának, hogy kellemes és hozzáértő légkört teremtve támogatták és segítették munkámat.

Köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek, testvéreimnek és egész családomnak türelmüket és a nehézségeken is átsegítő támogatásukat, szeretetüket.

12. KÖZLEMÉNYEK

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

1. **Tóth, K., Sarang, Z., Scholtz, B., Brázda, P., Ghyselinck, N., Fésüs, L., Szondy, Z. (2010)** Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T cells by facilitating glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Cell Death and Differ.*
2. **Kiss, I., Oskolás, H., Tóth, R., Bouillet, P., Tóth, K., Fülöp, A., Scholtz, B., Ledent, C., Fésüs, L., Szondy, Z (2006)** Adenosine A2A receptor-mediated cell death of mouse thymocytes involves adenylate cyclase and Bim and is negatively regulated by Nur77. *Eur. J. Immunol.* 36(6):1559-1571

Egyéb közlemények:

1. **Kiss B., Tóth K., Sarang Z., Fésüs L., Szondy Z. (submitted)** Retinoids induce a Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes.

Poszterek hazai konferenciákon:

1. **Tóth K., Fésüs L., Szondy Z.:** A természetes retinsavak és retinsav receptor specifikus retinoidok fokozzák a T-sejtek glükokortikoidok kiváltotta sejtelhalását; *XIII. Sejt-és fejlődésbiológiai Napok; 2005. április 10-12; Eger, Magyarország*
2. **Tóth K., Fésüs L., Szondy Z.:** Az RAR α ligálása emeli a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist és fokozza a glükokortikoid receptor által szabályozott transzkripciós folyamatokat; Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése; 2006. augusztus 30. – szeptember 2; Sopron, Magyarország
3. **Tóth K., Sholtz B., Fésüs L., Szondy Z.:** Az RAR α ligálása emeli a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist és fokozza a glükokortikoid receptor által

szabályozott transzkripciók folyamatokat; Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése; 2007. augusztus 26-29; Debrecen, Magyarország

4. **Tóth K., Sholtz B., Fésüs L., Szondy Z.:** Az RAR α ligálása emeli a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist és fokozza a glükokortikoid receptor által szabályozott transzkripciók folyamatokat; Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése; 2008. augusztus 31. – szeptember 3; Szeged, Magyarország
5. **Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy, László Fésüs:** Effect of retinoids on apoptosis of mouse thymocytes, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, 2009. augusztus 23-26, Budapest, Magyarország
6. **Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy, László Fésüs:** Regulation of retinoid induced apoptosis of thymocytes Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, 2010. augusztus 25-28, Budapest, Magyarország
7. **Tóth K., Sarang Z., Sholtz B., Brázda P., Ghyselinck N., Fésüs L., Szondy Z.:** Az RAR α ligálása fokozza a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist és elősegíti a glükokortikoid receptor mediálta transzkripciók folyamatokat; Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése; 2010. augusztus 25-28; Budapest, Magyarország

Posztterek nemzetközi konferenciákon:

1. **Tóth K., Sarang Z., Sholtz B., Fésüs L., Szondy Z.:** Retinoic Acids and Retinoic Acid Receptor Specific Retinoids Promote the Apoptosis Induced by Glucocorticoids in T-cell; 30thFEBS Congress and 9thIUBMB Conference; 2005. július 2-5; Budapest, Magyarország
2. **Tóth K., Sarang Z., Sholtz B., Fésüs L., Szondy Z.:** Retinoic Acids and Retinoic Acid Receptor Specific Retinoids Promote the Apoptosis Induced by Glucocorticoids in T-cell; 14thEuroconference on Apoptosis, 2006. szeptember 29 – október 4.; Chia, Sardinia, Olaszország
3. **Tóth K., Sarang Z., Sholtz B., Fésüs L., Szondy Z.:** Ligation of RAR α Enhances the Glucocorticoid-induced Apoptosis of T-cells and Promotes Glucocorticoid Receptor Mediated Transcriptional Processes; 2007. október 26-31; 15th Euroconference on Apoptosis, Portoroz, Szlovénia

4. **Tóth K., Sarang Z., Sholtz B., Brázda P., Ghyselinck N., Fésüs L., Szondy Z.:** Retinoic Acids and Retinoic Receptor Specific Retinoids Enhance the Glucocorticoid-induced Apoptosis of T-cells and Promotes Glucocorticoid Receptor Mediated Transcriptional Processes; 2009. október 1-3. *MAC09' EMBO Workshop on Mitochondria, Apoptosis and Cancer, Prága, Csehország*
5. **Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy, László Fésüs:** Retinoids induce apoptosis in mouse thymocytes via inducing Nur77 expression; 2009. október 1-3. *MAC09' EMBO Workshop on Mitochondria, Apoptosis and Cancer, Prága, Csehország*
6. **Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy, László Fésüs:** Regulation of retinoid induced apoptosis of thymocytes; 2010. szeptember 1-4. *18th Euroconference on Apoptosis, Ghent, Belgium*

Nemzetközi kurzusok:

1. 3rd Training Course on Concepts and Methods in Programmed Cell Death “ Role of organelles in cell death”; 2006. szeptember 30. *Chia, Szardínia, Olaszország*
2. 4th Training Course on Concepts and Methods in Programmed Cell Death “ Role of organelles in cell death”; 2007. október 26. *Portoroz, Szlovénia*
3. Spetses Summer School on Nuclear Receptor Signalling: From Molecular Mechanisms to Integrative Physiology; *Spetses, Görögország, 2009. augusztus 23-28.* “Short talk” előadás: **Tóth K., Sarang Z., Sholtz B., Brázda P., Ghyselinck N., Fésüs L., Szondy Z.:** Retinoic Acids and Retinoic Receptor Specific Retinoids Enhance the Glucocorticoid-induced Apoptosis of T-cells and Promotes Glucocorticoid Receptor Mediated Transcriptional Processes
4. 15th International Summer School on Immunology: Immune System: Genes, Receptors and Regulation, Hvar, Horvátország, 2009. szeptember 5-12. Poszter: **Katalin Tóth, Zsolt Sarang, László Fésüs, Zsuzsa Szondy.:** Retinoids induce apoptosis in mouse thymocytes via inducing Nur77 expression