

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A retinoidok glükokortikoid hormon által indított sejthalált
gyorsító és az adenozin sejthalált kiváltó hatásmechanizmusának
vizsgálata egér timocitákon**

Tóth Katalin Ágnes



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2011

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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

A retinoidok glükokortikoid hormon által indított sejthalált gyorsító és az adenzin sejthalált kiváltó hatásmechanizmusának vizsgálata egér timocitákon

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta:

Tóth Katalin Ágnes

okleveles biológus/biokémikus

Készült a

Debreceni Egyetem

Fogorvostudományi

doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

Prof. Dr. Ifj. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2011. 05. 25. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Berki Tímea, kandidátus

Dr. Lányi Árpád, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

tagok: Dr. Berki Tímea, kandidátus

Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

Prof. Dr. Ifj. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

Dr. Lányi Árpád, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

2011. 05. 25. 13:00

DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1. 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 főlegben képződnek; (b) élettani funkcióval nem rendelkeznek; (c) már betöltötték szerepüket; (d) fejlődésük nem megfelelően megy végbe; (e) az életfolyamatokra potenciálisan veszélyesek. Ez a fiziológiás folyamat leggyakrabban „programozott sejthalál” révén valósul meg. A programozott sejthalál, vagy másnéven apoptózis, aktív sejteliminációs folyamat, amelyben a károsodott vagy szükségtelenné vált sejtek elpusztulnak és tartalmuk a fagocitáló makrofágok révén újrahasznosul. Apoptózis során az elhaló sejtek elvesztik 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. Az apoptotikus sejtek nem jutnak ki az extracelluláris térbe, így nem alakul ki gyulladásos reakció, hegképződés. 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. 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, növekedési faktorok) hiánya vagy koncentrációjának csökkenése, egymásnak ellentmondó szignálok kombinációja, illetve nem fiziológiás hatások is (pl.: UV, toxinok, hipoxia).

1.2. A T-limfociták fejlődése és az apoptózis

A T-limfociták képződése csontvelői őssejtekből indul ki és a timuszban megy végbe, ahol a timusz epitheliális sejtjei, a dendritikus sejtek és a sztróma egyes elemei (pl. fibroblasztok) által biztosított mikrokörnyezet elengedhetetlenül szükséges a T-sejtek további éréséhez. Azok a T-sejtek, amelyek túl alacsony affinitással kötődnek az MHC molekulákhoz, neglektció révén elpusztulnak. A neglektált sejtek elhalását gyorsítja a tímikus epitélisejtek által termelt glükokortikoid hormon. A negatív szelekció során apoptózissal elhalnak azok a T-limfociták is, amelyek nagy affinitással képesek felismerni a saját MHC-saját fehérje peptidkomplexet. Csak azok a korlátozott antigén felismerő képességgel rendelkező timociták élnek túl és jutnak ki a perifériára, melyek nem jelentenek veszélyt a saját szöveti struktúrára, vagyis toleránsak.

1.3. 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. Endogén keletkező, gyulladást szabályozó hormon. A glükokortikoidok erős gyulladásgátló és immunszuppresszív, limfocita apoptózist kiváltó hatása miatt a leggyakrabban használt gyógyszerek közé tartoznak. Gyógyító hatásának ellenére mellékhatásai miatt, mint például az osteoporosis vagy bőratrófia, a terápiában történő alkalmazhatósága vagy annak időtartama korlátozott. Nem csak a mellékvese kéreg, hanem a timusz kortiko-epitelális sejtjei is képesek glükokortikoid hormon termelésére, ezért a glükokortikoidok lokálisan keletkezve is hathatnak a timocitákra.

1.4. A glükokortikoid receptor

A glükokortikoid hormon hatását a magban ható glükokortikoid receptorhoz kötődve fejt ki. A szteroid receptorok a ligand által indukálható transzkripciós faktorok

szupercsaládjába tartoznak. 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). Bár a szteroid receptorok többsége a magban található, hormon hiányában a GR a citoszolban tartózkodik különböző szabályozó fehérjékkel (Hsp90, Hsp70, Hsp56) komplexet alkotva. 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 hőszokk fehérjéről, dimerizálódik és a sejtmagba transzlokálódik. A sejtmagban a receptor homodimer formában felismeri különböző gének erősen konzervált palindrom szekvenciáit (GGRACAnnnTGTTCT) és ezekhez a specifikus DNS szakaszokhoz, másnéven glükokortikoid válaszadó elemekhez kötődik hozzá. A kötődés után fokozza, vagy gátolja számos gén transzkripcióját. Sok génről ismert, hogy glükokortikoidok hatására fokozottan íródik át, beleértve azokat is, amelyek részt vesznek az immunsejtek aktiválásában, működésének szabályozásában, apoptózisukban, mint pl. GILZ.

1.5. A retinsavak és a 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. 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. Az A-vitamin immunrendszerre gyakorolt hatását elsősorban annak aktív metabolitjai, a retinsavak – a transz és a 9-cisz-retinsav – közvetítik. A retinsavak a sejtmagban

elhelyezkedő retinsav receptor család ligandjai. 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. A retinoid receptoroknak két típusa ismert: retinsav receptor (RAR) és retinoid X receptor (RXR). Az RXR specifikus agonistája a 9cRA, míg az RAR ligálásában mindkét retinsav egyaránt, de különböző affinitással vesz részt. Az RAR-nak és az RXR-nak is 3 altípusa van az α , β és γ . Az RAR-ok a retinoid X receptorokkal alkotott heterodimerekként funkcionálnak. Az RXR receptorok 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 transzkripciós faktorként működő „árva” receptor, mint pl. a Nur77. A retinsavak hatása az immunrendszer működésének szabályozására nézve szintén elég sokrétű. Fiziológias koncentrációban gátolják a B-sejtek és B-sejt prekurzorok proliferációját. Ezzel szemben a fiziológias koncentrációjú retinsav fokozza a perifériás vérben lévő T-sejtek proliferációját, amit fokozott interleukin-2 termelés közvetít. Ezek mellett az ATRA indukálja a naiv FoxP3- CD4+ T-sejtek átalakulását FoxP3+ regulatórikus T-sejtekké. Az intézetünkben évek óta folyó kutatómunka mutatott rá, hogy a retinsavak fontos szerepet töltenek be a csecsemőmirigyben lezajló T-limfocita fejlődés, timopoézis szabályozásában is.

1.6. 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, antiinflammatorikus és proinflammatorikus folyamatokban egyaránt megfigyelhető, de megfigyelték apoptotikus funkcióit is. A timociták esetében az adenozin a normál körülmények között lezajló limfocita szelekció során folyamatosan termelődik, mert az elhaló sejteket fagocitáló makrofágok kibocsátják. 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. 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 féle alcsoportra oszthatóak: A₁, A_{2A}, A_{2B} és A₃. Ezek közül valamennyi G fehérje kapcsolt. A receptorok működése során létrejövő tényleges sejtválasz a PKA rendszer aktivációja és további fehérjék foszforilációja révén jön létre. Emelett az adenozin receptorok G-fehérjéken keresztül a foszfolipáz C (PLC) enzim működését is befolyásolhatják, melynek megnövekedett aktivitása révén, az IP₃ termelésén keresztül, az intracelluláris raktárakból történő Ca²⁺- felszabadulás figyelhető meg. Az adenozin dezamináz enzim hiányában megfigyelt adenozin koncentrációemelkedés, és az azt követő T (és B) sejttes immundeficiencia hívta fel a figyelmet arra, hogy az adenozinnak erős timocita öld hatása van. Egér kísérletek bizonyították, hogy ez az öld hatás az adenozin A_{2A} receptorokon keresztül közvetítődik. Az öld mechanizmusát azonban korábban nem tisztázták.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi, a laborunkban folytatott vizsgálatok azt mutatták, hogy retinoidok termelődnek a tímikus környezetben is, és képesek a neglektált sejtek apoptózisát is kiváltani, valamint fokozzák a glükokortikoid hormon által kiváltott sejtelhalást is.

A laborunkban folyó vizsgálatok azt is igazolták, hogy az apoptotikus sejteket eltávolító makrofágok adenzint bocsátanak ki, illetve, hogy az adenzin sejthalált is kiválthat. Más kutatócsoportok egér timocitákon végzett kísérletei azt bizonyították, hogy a hatást az adenzin az A_{2A} receptor közvetíti.

Ezen előzmények alapján, kísérleteimben két területet kívántam vizsgálni:

1. Milyen mechanizmussal fokozzák a retinoidok a glükokortikoidok által kiváltott timocita sejtelhalást?
2. Milyen mechanizmussal váltja ki az adenzin az A_{2A} receptor stimulációján keresztül az egér timociták elhalását?

3. 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, *vav-bcl-2-269*, *Eμ-bcl-2* transzgén egerek. Az NMRI egereket kivéve minden egér C57/BL6 háttérű. Az *in vivo* timocita apoptózis indukció során 4 hetes egereket oltottunk intraperitoneálisan 0,2 mg dexametazon-acetáttal önmagában vagy 50μg AM580-al vagy 50μg LG268-al együtt 0,1ml etanol és 0,4ml fiziológiás sóoldatban oldva. Az adenzin *in vivo* hatásának teszteléséhez, a kísérleteknél feltüntetett módon és mennyiségben, NECA-t alkalmaztunk.

4. MÓDSZEREK

4.1. Timocita populációk karakterizálása és apoptózis detektálás

24 órás különböző *in vivo* kezelések után izoláltuk a timocitákat a timuszból, majd a sejteket 0,1%-os nátrium azidot tartalmazó jéghideg PBS-ben vettük fel a PE jelölt anti-CD4 és FITC jelölt anti-CD8 festés előtt. A túlélő sejteket megszámloltuk. A sejteket 30 percig 4°C-on inkubáltuk a jelölő anyaggal, majd két, 1%-os BSA-t és 0,1%-os nátrium azidot tartalmazó jéghideg PBS-es mosást követően 0.1%-os nátrium azidot tartalmazó PBS-ben vettük fel. A kétszeres fluoreszcenciát 488nm-en, Becton Dickinson FACScan segítségével detektáltuk. Jelöletlen timocitákat használtunk autofluoreszcens kontrollként.

Az apoptózis vizsgálatok során a timocitákat és a T-sejt vonalakat dexametazonnal (1μM) és különböző retinoidokkal kezeltük 6 órán keresztül 10% delipidált FCS jelenlétében. Az adenozinnal folytatott kísérletekben 10% FCS-t alkalmaztunk. A timociták esetében a kezelések hatására bekövetkező DNS degradáció mértékét difenilamin 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 propopidium jodiddal jelöltük. Az apoptózis

indukció további igazolásához Annexin V jelölést alkalmazva, „FITC Annexin V Detection Kit” felhasználásával is meghatároztuk a kezelések hatására kiváltódott apoptózis mértékét.

4.2. A Nur77, FasL, NDG-1 és -2, Bim mRNS kifejeződésének 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 PCR reakciót végeztünk. A kapott, adott hosszúságú termékeket agaróz-gélen futtattuk meg.

4.3. A GILZ, Nur77, FasL, NDG-1 és -2, Bim valamint TRAIL mRNS kifejeződésének mennyiségi meghatározása Q-PCR technikával

A sejtekből a teljes RNS mennyiséget RNeasy® Mini Kit felhasználásával izoláltuk. Ezt követően az RT lépésben, a cDNS szintéziséhez 100nM teljes 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 lezajó 40 ciklust követően TaqMan próbák alkalmazásával meghatároztuk a keletkezett transzkriptek mennyiségét. A kapott eredményt a konstansan kifejeződő ciklofillin génre normalizáltuk.

4.4. Tranziens transzfekció

COS1 sejteket a transzfekció előtt 24 órával 48 lyukú tenyésztőedényben szélesztettük (10^5 sejt/lyuk). Másnap a sejtek tranziens transzfekcióját polietilén-imin 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. A riporter plazmidból (pCMX- β -Gal), is az előzőkhöz hasonló mennyiséget juttattunk a sejtekbe. 5 óra transzfekciót követően követően 48 órán keresztül kezeltük a sejteket dexametazon és retinoidok meghatározott koncentrációival. A kezelés leteltét követően sejtfeltárást végeztünk. A luciferáz enzimaktivitását a felülúszóból Luciferase Assay System Kit segítségével határoztuk meg. A kapott luciferáz aktivitásokat a kontrollként használt β -galaktozidáz aktivitásokra normalizáltuk.

4.5. Ko-immunprecipitáció

A timocitákat (4×10^7) dexametazonnal (1 μ M) és különböző retinoidokkal kezeltük önmagukban vagy együttesen 1 órán keresztül 10% delipidált FCS-t tartalmazó RPMI 1640 médium jelenlétében. A kezelést követően a timocitákat lizáltuk és a GR-t immunprecipitáltuk agaróz-kapcsolt anti-egér GR antitest hozzáadásával. 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. Ugyanilyen módon vizsgáltuk a GR Ser232-en történő lehetséges foszforilálódásának változását retinoid kezeléseket követően. Ebben az esetben specifikus, a foszforilált Ser232 ellenes antitestet használtunk.

4.6. Emlős két-hibrid rendszer

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 történt.

4.7. Az intracelluláris cAMP koncentráció meghatározása

Mintánként 10^6 sejtől kiindulva, a különböző kezeléseket követően az sejten belüli cAMP koncentrációjának meghatározása a cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit használatával történt, a kit által megadott instrukciók alapján.

4.8. A citoszólikus 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 ($0,2 \text{ mM}$ 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 citoszólikus Ca^{2+} koncentrációjában beállt változás mértékét.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A retinsav receptor α (RAR α) és a retinoid X receptor (RXR) ligációja fokozza az egér timociták dexametazon indukálta sejtelhalását *in vitro* és *in vivo*

Kísérleteink során először a dexametazon dózisfüggő hatását teszteltük egér timociták apoptózisára. A dexametazon dózisfüggő módon váltotta ki a timociták sejtelhalását 6 órás kezelést követően. A további kísérletekhez a dexametazon 0.1 μ M-os koncentrációját (a sejtek 50%-ának elhalását okozta) választottuk ki, hogy továbbiakban a retinoidok növelő vagy esetlegesen csökkentő hatását tesztelhesük. A 0.1 μ M dexametazon mellett alkalmazott természetes retinsavak közül az ATRA minden RAR receptort aktivál, a 9cRA viszont mind az RAR, mind az RXR receptorok hatásos aktivátora. A szintetikus retinoidok közül az AM580 és CD2081 az RAR α receptor, a CD437, CD666 és a CD2325 az RAR γ , az LG268 pedig az RXR receptor agonistája. Az összes RAR α és RXR specifikus ligand hatásosan, kb 30%-kal fokozta a timociták dexametazon kiváltotta apoptózist. Az RAR γ -n keresztül ható ligandok hatástalannak bizonyultak. Az ATRA a 9cRA-nál kisebb hatékonysággal fokozta a glükokortikoid által kiváltott timocita apoptózist, azonban amikor mellette LG268-at (0,1nM) is adtunk, a 9cRA-nál is hatásosabban növelte glükokortikoid által indukált apoptózis mértékét. Az RAR α szerepének bizonyítására RAR α knock out egerekből izolált timocitákon is teszteltük a retinoidok hatását. Az RAR α receptor hiányában csak az RXR receptort aktiváló LG268 és 9cRA volt képes a glükokortikoid által kiváltott sejtelhalás fokozására. Az RAR α szerepének további bizonyításához egy RAR α antagonistának (CD2503) a hatását is teszteltük. A vad típusú, dexametazon kezelt sejtek esetében a CD2503 önmagában adva dexametazon jelenlétében szintén apoptózis fokozódást hozott létre. Az RAR α null timocitákban nem volt hasonló hatása. Ez a megfigyelés arra utal, hogy ahhoz, hogy a retinoidok hatásosan fokozzák a GR indukálta timocita sejtelhalást, nem szükséges a retinoid receptorok transzkripciós hatása. Az *in vitro* kísérletek mellett dexametazonnal (0,2

mg) és retinoiddal (50µg) injektálva az egereket, 24 órás *in vivo* kezelés is végeztünk, mely során mind az RARα, mind az RXR ligálása fokozta a timociták glükokortikoiddal kiváltott sejtelhalását, ami leginkább a CD4+CD8+ dupla pozitív populációt érintette.

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

Abból kiindulva, hogy a glükokortikoid indukálta apoptózis a glükokortikoid receptor transzkripció aktivitásától függő folyamat, vizsgáltuk, hogy az általunk megfigyelt retinoid hatások a dexametazon kiváltotta sejtelhalásban, befolyásolják-e a glükokortikoid receptor transzkripció aktivitását. Több génről már ismert volt, hogy kifejeződésük fokozódik a timociták dexametazon indukálta sejtelhalása során. Ezen gének közül a közvetlenül glükokortikoidra aktiválódó gént, a GILZ-t választottuk, mert már a glükokortikoid indukálta timocita elhalás kezdeti fázisában aktiválódik, valamint promotere hordoz számos glükokortikoid válaszadó elemet. 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. Megfigyeltük, hogy dexametazonnal történt együttes kezelés során mind az alkalmazott RARα agonista és antagonistá, valamint az RXR receptor agonista is dóziszfüggő módon fokozta a GILZ glükokortikoid indukálta génexpressziós szintjét.

5.3. A retinoidok transzaktivációs hatása RARα/RXR heterodimeren keresztül szabályozódik

A retinoidok előbbieken bemutatott transzaktivációs hatását *in vitro* glükokortikoid luciferáz riporter esszével vizsgáltuk tovább, melynek során olyan sejteket transzfektáltunk transziens transzfekcióban a pCMX-GRE-luc riporter konstrukcióval, illetve pCMX-FL-hRARα, és /vagy pCMX-FL-hRXRα receptorral önmagában vagy

együttesen, melyek nagyon alacsony szinten expresszálják a retinoid receptorokat. Fiziológias koncentrációjú ATRA csak RXR jelenlétében nem befolyásolta a GR indukálta transzkripciót, és RAR α vagy RAR α /RXR jelenlétében is csak nagyon alacsony transzkripció fokozást mutatott. A 9cRA szignifikánsan emelte a GR indukálta transzkripciót mind RXR mind pedig RAR α jelenlétében. A hatás azonban sokkal kifejezettebb volt, amikor az RAR α /RXR receptorok együttesen voltak jelen a sejtekben. Az RXR receptor agonista LG268 szintén szignifikánsan emelte a transzkripciót mind az RXR mind az RAR α /RXR heterodimer jelenlétében. A szintetikus RAR α agonista AM580 és az antagonistája CD2503 az ATRA-hoz hasonlóan szintén hatástalannak bizonyult abban az esetben, amikor csak RXR receptor volt jelen, és csak kis mértékben hatott RAR α jelenlétében. Azonban, amikor mindkét retinoid receptor jelen volt, mindkét vegyület szignifikánsan emelte a glükokortikoid indukálta transzkripciót. 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. Ezekből a kísérletekből arra következtettünk, hogy az RAR α /RXR heterodimer közvetíti retinoidok hatását a glükokortikoidok által indukált transzkripcióra, és akkor a leghatékonyabb, amikor mindkét oldal ligált állapotban van. Az a tény, hogy a CD2503, ami nem fokozza az RAR α receptor transzkripciós aktivitását, hasonló hatással rendelkezett, mint a receptor agonisták, arra utalt, hogy a retinoid receptorok nem a transzaktivációs hatásuk révén fokozzák a GR működését. Ezért a retinoid receptorok DNS-kötő mutánsainak vizsgálataival teszteltük, hogy kell-e egyáltalán a retinoid receptoroknak kötődnie a DNS-hez a hatás kifejtéséhez. Adataink azt mutatják, hogy a retinoid receptorok DNS-hez való kötődése nem szükséges a megfigyelt hatás eléréséhez.

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

Ismert, hogy a magi receptorok ligandjuk kötődését követően nemcsak saját génjeiket aktiválhatják, hanem befolyásolhatják más transzkripciós faktorok működését is úgy, hogy közvetlenül kötődnek hozzájuk, és ez a kötődés nem feltétlenül igényli a magi receptor DNS-hez történő kötődését. Ezért megvizsgáltuk, hogy létrejön-e kölcsönhatás a retinoid receptorok és a GR között. Immunprecipitációs technikát alkalmazva, együttes dexametazon és retinoid kezelést követően a glükokortikoid receptor mellett kimutatható volt a co-immunprecipitált RAR α receptor. 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 kezelés hatására a co-immunoprecipitált RAR α receptor szintén kimutatható volt. Annak vizsgálatát, hogy a receptorok között létrejött kölcsönhatás közvetlenül történik-e, 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. 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 aktivitást detektáltunk, amelyet dexametazon kezelés mellett, de VP-hRAR α -LBD plazmid hiányában mértünk. Ezek igazolják, hogy a létrejött kölcsönhatás közvetlenül történik. A tranziens transzfekciós kísérletekben láttuk, hogy az RXR α receptor ligációja önmagában is képes volt fokozni a dexametazon indukálta transzkripciót, ezért vizsgáltuk, hogy a GR és az RXR receptor között is kialakul-e hasonló kölcsönhatás, mint a GR és RAR α esetében. A pMH100-TK-luc/pCMX-Gal-L-hGR-ral és VP-hRXR α -LBD-vel együttesen transzfektált sejtekben ahhoz hasonló luciferáz aktivitás volt detektálható, mint amelyet dexametazon kezelés mellett, de VP-hRXR α -LBD plazmid hiányában mértünk. 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.

5.5. A retinoidok nem befolyásolják a glükokortikoid receptor 232-es pozíciójában elhelyezkedő szerin oldalláncán bekövetkező foszforilációt

Mivel előzetesen már megfigyelték, hogy a Ser232 foszforilációja promóter specifikus úton emeli a GR transzkripció aktivitását, mi is teszteltük, hogy a retinoid kezelés hogyan befolyásolja a GR dexametazon indukálta Ser232 foszforilációját egér timocitákban. A kísérlet során a timocitákat 1 órán át kezeltük 0,1 μM dexametazonnal önmagában vagy 0,3 μM AM580, CD2503 illetve 50nM LG268-al együttesen. A dexametazon hatására ugyan a GR foszforilálódott a Ser232-en, azonban azt a retinoid hatása nem fokozta, valószínűsítve, hogy a retinoid receptorok más módon keresztül fejtik ki hatásukat.

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

Korábbi, A_{2A} receptor antagonistán alapuló kísérletek kimutatták, hogy egér timocitákban az adenosin A_{2A} receptora közvetíti az adenosin kiváltotta sejtelhalást. Ebből kiindulva kísérleteink első részében az adenosin és különböző adenosin analógok hatását teszteltük vad típusú és adenosin A_{2A} receptor hiányos egerek timocitáin is. A kapott eredmények azt mutatták, hogy míg az adenosin dózisfüggő módon fokozta a vad típusú timociták apoptózisát, az A_{2A} receptor hiányos egerekben az adenosin 200 μM -os koncentrációja alatt apoptózist nem váltottunk ki. Ugyanezt figyeztük meg akkor is, amikor a sejteket adenosin analógokkal kezeltük. Mind a NECA (egy nem specifikus adenosin receptor agonista), mind pedig a DPMA és a CGS21680 (adenosin A_{2A} receptor specifikus agonisták) dózisfüggő apoptózist váltott ki vad típusú timocitákban. E vegyületek az A_{2A} receptor hiányos timocitákban az alacsony koncentrációkban nem voltak apoptózist kiváltó hatásúak. Egy adenosin A_{2A}

receptor antagonistával (ZM41385) is kezeltük a timocitákat adenzin illetve NECA mellett adva. Az antagonistá 100 μ M adenzin, valamint 25 μ M NECA mellett adva meggátolta az apoptózt kiváltó hatásukat. Annak kizárására, hogy az A_{2A} receptor hiányos timociták csökkent adenzin válasza nem egy, az ezekre a timocitákra jellemző általános apoptózis defektus eredménye-e, a receptor hiányos timocitákat apoptózt más úton indukáló vegyületekkel kezeltük. Minden használt vegyület a vad típusú sejtekhez hasonló mértékű apoptózt indukált a receptor hiányos sejtekben is, bizonyítva, hogy az apoptózisra való hajlamuk nem változott meg. Ezek az adatok együttesen azt mutatják, hogy az adenzin az A_{2A} receptoron keresztül közvetített apoptózt indukál.

5.7. Az *in vivo* adenzin indukálta sejtelhálás nagy része az adenzin A_{2A} receptorokon keresztül szabályozódik

Az adenzin által kiváltott timocita sejtelhálás mértékét *in vivo* körülmények között is vizsgáltuk, melyek során a NECA emelkedő koncentrációival intraperitoneálisan oltottunk vad típusú és A_{2A}^{-/-} receptor hiányos egereket. Az apoptózis mértékét 20 óra elteltével jellemeztük a NECA emelkedő koncentrációinak oltását követően, a túlélő sejtek mennyiségének meghatározásával. Az *in vitro* kezeléseknél tapasztaltakhoz hasonlóan a NECA *in vivo* oltását követően az A_{2A} receptor hiányos timociták sejtelhálásának mértéke ebben az esten is elmaradt a vad típusú timociták esetében tapasztaltaktól. A legnagyobb mértékű sejtpusztulás a CD4+CD8+ dupla pozitív populációban volt megfigyelhető mindkét törzs esetében. Ezen adatok szintén azt támasztják alá, hogy az adenzin indukálta sejtelhálás nagyrészt az A_{2A} receptorokon keresztül szabályozódik, és azt mutatják, hogy elsősorban a CD4+CD8+ dupla pozitív timocitákat érinti.

5.8. 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, tisztázni kívántuk, hogy egér timocitákban melyik jelátviteli út közvetíti az adenosin apoptózist kiváltó hatását. Ennek vizsgálatakor egyrészt a timocitákat 15 percig kezeltük adozinnal és különböző adozin-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 vizsgáltuk az intracelluláris Ca²⁺ szintjének változását. Azt találtuk, hogy a vad típusú timociták esetén az adozin kezelést követően jól és könnyen detektálható intracelluláris cAMP indukció mérhető, azonban citoszólikus Ca²⁺ koncentráció emelkedést sem adozin, sem pedig adozin-receptor specifikus agonisták adásával nem sikerült kiváltanunk. Ugyanakkor ugyanezen adozin receptorra ható vegyületek nem voltak képesek cAMP emelkedést indukálni A_{2A} receptor hiányos timocitákban, ami megerősíti, hogy az adozin a cAMP szintet emelő hatását az A_{2A} receptorokon keresztül közvetíti, valamint, hogy az adozin az A_{2A} receptorokon keresztül az adenilát cikláz útvonalat aktiválja.

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

Annak vizsgálatához, hogy vajon az adenosin indukálta apoptózis igényli-e új fehérjék megjelenését, aktinomycin-D és cikloheximid kezelést alkalmaztunk. Az előbbi vegyület az RNS-, míg az utóbbi a fehérjeszintézis gátlója. Mind az aktinomycin D, mind pedig a cikloheximid kezelés maximálisan meggátolta az adozin és dbcAMP kiváltotta apoptózist, valószínűsítve, hogy a timociták apoptózisának adozin által történő szabályzása intakt transzkripciós és transzlációs folyamatok aktivitásának

függvénye. Mivel előzetesen már ismert volt, hogy a Nur77-nek szerepe van a timociták negatív szelekciójának szabályozásában, valamint, hogy neuronokban kifejeződését fokozhatja az adenilát-cikláz útvonal, teszteltük a Nur77 esetleges szerepét az adenzin indukálta sejtelhalás szabályozásában is. Megfigyeltük, hogy vad típusú timociták esetén 4 órás *in vitro* adenzin kezelést követően a Nur77 indukálódik, míg a receptor hiányos timociták esetén ez az indukció elmarad. Az adenzin Nur77 indukáló hatásán kívül megfigyeltük, hogy a forszkolin (adenilát cikláz aktivátor), kolera toxin (Gs aktivátor) és dbcAMP által kiváltott cAMP szint emelkedés szintén a Nur77 expressziójának a növekedését váltja ki. A Nur77 számos fehérjesávbán volt detektálható, ami arra utal, hogy nemcsak indukálódik, hanem foszforilálódik is az adenilát cikláz út aktivációjának hatására.

5.10. NECA oltását követően a Nur77 és néhány Nur77 függő gén, valamint a Bim is indukálódik vad típusú timocitákban, míg az adenzin A_{2A} receptor hiányosakban nem

Mivel előzetesen már tapasztaltuk, hogy *in vitro* adenzin kezelést követően a Nur77 indukálódik, tesztelni kívántuk ezt a hatást *in vivo* körülmények között is. NECA oltását követően a vad típusú egerekben dózisfüggő módon indukálódott a Nur77, szemben a receptor hiányos egerekkel, amelyeknél indukció nem volt megfigyelhető. Abból kiindulva, hogy a Nur77 indukálódott adenzin hatására, vizsgáltuk, hogy egyéb Nur77-függő gének indukciója szintén bekövetkezik-e NECA kezelést követően. A FasL, a TRAIL és a NDG-1,-2 sejthalál gének kifejeződését vizsgáltuk. Minden vizsgált gén dózisfüggő módon indukálódott NECA kezelést követően, ami azonban csak vad típusú timociták esetén volt megfigyelhető, receptor hiányos egerek esetén nem. A továbbiakban, mivel előzetes vizsgálataink a negatív szelekció szabályozásának szempontjából azt valószínűsítették, hogy a Bim (egy „csak” BH3 fehérje) indukciója összefügghet a Nur77 transzkripciós aktivitásával, a Bim expressziós szintjének változását is teszteltük NECA oltását követően. Eredményeink

azt mutatták, hogy a Bim két formája, a Bim_{EL} („extralong” forma) és Bim_L („long” forma) közül NECA oltását követően az utóbbi indukálódott. Az előzetesen vizsgált génekhez hasonlóan, azonban ez is csak a vad típusú timociták esetén volt megfigyelhető.

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

A továbbiakban azt teszteltük, hogy az adenosin 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. Eredményeink azt mutatták, hogy e molekulák hatásának a közömbösítése nem meggátolta, hanem fokozta az adenosin kiváltotta apoptózist, tehát, bár az adenosin fokozza e molekulák kifejeződését, ezek egyike sem játszik szerepet a megfigyelt apoptózisban. Ezt követően a Bim szerepét is megvizsgáltuk. A vizsgálat során egyrészt olyan timocitákat használtunk, amelyekből hiányzott a Bim fehérje, másrészt olyan timocitákat, amelyek a Bcl-2 (anti-apoptotikus) transzgént fokozottan expresszálták. Megfigyeltük, hogy mind a Bim hiánya, mind pedig a Bcl-2 fokozott kifejeződése meggátolja az adenosin kiváltotta apoptózist, valószínűsítve, hogy az adenosin A_{2A} receptor által szabályozott timocita apoptózis egy, a Bcl-2 által szabályozott útvonal által regulálódik, és kiváltásában meghatározó szerepet tölt be a BH3 doménnal rendelkező fehérje, a Bim.

6. MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy egyrészt milyen mechanizmussal fokozzák a retinoidok a glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalást, másrészt, hogy az adenzin milyen machanizmussal váltja ki az egér timociták apoptózisát.

A laboratóriumunkban jelenleg is folytatott kutatások kimutatták, hogy a tímikus mikrokörnyezetben számos olyan molekula van jelen, amelyek hozzájárulhatnak a neglektált sejtek elhalásának fokozásához, mint például a retinoidok, melyekről előzetes kísérletek már bizonyították, hogy fokozzák a glükokortikoidok által kiváltott sejtelhalást. Másrészt, a kutatócsoportunkban végzett kísérletek azt is igazolták, hogy az apoptotikus sejteket eltávolító makrofágok adenzint bocsátanak ki, és ez az adenzin sejthalált is kiválthat.

A dolgozatban megerősítettük korábbi megfigyelésünket, hogy a retinoidok képesek fokozni az éretlen timociták glükokortikoid-indukálta apoptózisát. Különböző retinoidokat, illetve $RAR\alpha$ hiányos timocitákat alkalmazva, bizonyítottuk, hogy a retinoidok apoptózist fokozó hatása $RAR\alpha$ és RXR receptorokon keresztül szabályozódik, egyrészt a két receptor természetes retinsavak által történő együttes aktiválásával, másrészt szintetikus retinoidok által a receptorok külön-külön történő ligálásával. Mivel egy alkalmazott $RAR\alpha$ - specifikus antagonistá szintén emelte a glükokortikoid által indukált apoptózist, feltételeztük, hogy a retinoid receptor a glükokortikoid transzkripciót fokozó hatását nem transzkripciós aktivitása révén fejti ki.

Bizonyítottuk, hogy a timocitákban a retinoidok az $RAR\alpha$ és az RXR receptoron keresztül is képesek fokozni a glükokortikoid által indukálható gén, a GILZ kifejeződését, azaz fokozni a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását. Ezt a hatást különböző retinoid receptorok transzfekciójával is igazoltuk, mely kísérletek során azt találtuk, hogy a különböző retinoidok $RAR\alpha$ /RXR heterodimeren keresztül

szabályozzák a leghatékonyabban a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását. 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 önmagában nem volt hatékony a transzkripció fokozása szempontjából, azonban az RXR receptor önmagában történő aktiválása specifikus ligandja által, hatásos módon fokozta a glükokortikoid receptor transzkripcióját, igazolva az RXR receptor meghatározó szerepét a glükokortikoid receptor indukálta transzkripció szabályozásában, mind önmagában, mind pedig az RAR α receptorral heterodimert alkotva.

Emlős két-hibrid rendszerben vizsgálva a közvetlen kölcsönhatás lehetőségét a glükokortikoid és a retinoid receptorok között, bizonyítottuk, 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 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. Adataink összességében arra utalnak, hogy a GR transzkripció fokozó hatását az RAR α /RXR heterodimeren belül az RXR közvetíti, és 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 továbbiakban, az adenosin timocita apoptózisban betöltött szerepének vizsgálata során vad típusú és adenosin A_{2A} receptor hiányos egérből származó timocitákat

bizonyítottuk, hogy adenzin kezelés hatására a timociták A_{2A} receptoron keresztül szabályozott apoptózissal halnak el. Miután egyéb sejtek esetében már ismert volt, hogy az adenzin A_{2A} receptorok mind az adenilát cikláz, mind a foszfolipáz C jelátviteli útvonalat aktiválhatják, vizsgáltuk, hogy eger timociták apoptózisának indításában melyik jelpálya vesz részt. Eredményeink azt mutatják, hogy eger timocitákban 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 transzkripciós és translációs aktivitásától függ, mely során a Nur77 és Nur77 függő gének is indukálódnak, azonban ez utóbbiaknak nincs szerepe az általunk vizsgált adenzin indukált sejtelhalás szabályzásában. A megfigyelt hatások az A_{2A} receptor hiányos timociták esetén elmaradtak, igazolva az A_{2A} receptor szerepét a Nur77 indukációjában is.

Mivel a timociták negatív szelekciója kapcsán ismert volt, hogy a Nur77 mellett a Bim is indukálódik, azt is teszteltük, változik-e a Bim kifejeződése az adenzin kiváltotta sejtelhalás során. Eredményeink azt mutatták, hogy adenzin hatásra a Bim indukálódik, ami szintén csak vad típusú timociták esetében volt megfigyelhető, valamint azt is láttuk, hogy a Bim antagonistájaként ható Bcl-2 fehérje túlermelése megakadályozta az adenzin kiváltotta sejtelhalást, valószínűsítve, hogy az adenzin A_{2A} receptor által szabályozott timocita apoptózis, egy, a Bcl-2 által szabályozott útvonat által regulálódik és kiváltásában meghatározó a Bim.

Eredményeinknek két orvosi vonatkozása van. Egyrészt azt találtuk, hogy a retinoidok nemcsak a timociták, hanem glükokortikoid érzékeny malignus T sejtvonalak glükokortikoiddal kiváltott sejtelhalását is fokozzák, ami felveti alkalmazhatóságukat leukémiák kezelésében. Másrészt az adenzin timocita öllő hatása magyarázatot adhat arra, miért lesznek immunhiányosak az adenzin dezamináz hiányos betegek, ahol az

adenozin lebontásának zavara, magas adenozin koncentrációt eredményez e sejtek környezetében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az apoptózis időfüggő indukciójának fontos szerepe van a normál sejtciklusban és fejlődésben. A timuszban 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 timusz epitéliális 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 mikrokörnyezetében termelődik, az elhalt sejteket fagocitáló makrofágok termelése által.

Megfigyeltük, hogy a retinoidok fokozzák az egér timociták glükokortikoidok által kiváltott apoptózisát, 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 transzkripciót fokozó hatás nem a glükokortikoid receptor foszforilációs állapotának megváltoztatásán keresztül jön létre.

Megfigyeltük továbbá, hogy adenzin hatására a timociták adenzin A_{2A} receptoron keresztül szabályozott apoptózissal halnak el, mely folyamat 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

adenozinra indukálódó gének között az előbbi említett mely egy, a bcl-2-vel összefüggő úton, közvetlenül szabályozódik az géneken kívül megfigyeltük a Bim indukcióját is, adenzin hatásban.

8. Publikációk

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

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.* IF: 8.24

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 IF: 4.772

8.2. Beküldött közlemény

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

8.3. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia prezentációk

8.3.1. Angol nyelvű előadás

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

8.3.2. Posztterek:

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*

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

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

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 transzkripciós folyamatokat; Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése; 2008. augusztus 31. – szeptember 3; Szeged, Magyarország

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 transzkripciós folyamatokat; Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése; 2010. augusztus 24. – augusztus 27; Budapest, Magyarország

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**

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**

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**

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**

Iktatószám: DEENKÉTK /43/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Tóth Katalin Ágnes

Neptun kód: HG4QIF

Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, K.Á.**, Sarang, Z., Scholtz, B., Brázda, P., Ghyselinck, N., Chambon, P., Fésüs, L., Szondy, Z.: Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T cells by facilitating glucocorticoid receptor-mediated transcription.
Cell Death Differ. Epub ahead of print (2010), 10.p, 10.p.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.136>
IF: 8.24 (2009)
2. Kiss, I., Kovácsné Oskolás, H., Tóth, R., Bouillet, P., **Tóth, K.Á.**, Fülöp, A., Scholtz, B., Ledent, C., Fésüs, L., Szondy, Z.: 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, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200535334>
IF: 4.772

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.03.17

