

T SEJT AKTIVÁCIÓ ÉS APOPTÓZIS: A DÖNTÉS MOLEKULÁRIS HÁTTERE

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

LUDÁNYI KATALIN

Témavezetők:

Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, egyetemi tanár

Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, egyetemi tanár

Imunológia Intézet

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

2004

ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációban bemutatott munka során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy T limfocitákban az antigén-specifikus receptoron keresztül érkező jel mennyiségi és minőségi eltérései hogyan képesek az adott sejten ellentétes előjelű folyamatokat kiváltani és ezáltal az aktivált sejt további sorsát irányítani. Továbbá vizsgáltuk, hogy egy adott vegyület különböző receptorok aktiválásán keresztül miként tud ellentétes sejten belüli folyamatokat irányítani.

Egy általunk előzetesen kifejlesztett *in vitro* T sejt aktivációs modell segítségével egy homogén sejt populációban (IP12-7 egér CD4⁺ effektor/memória T sejt hibridóma) különböző sajátosságú antigén prezentáló sejtek (APS) alkalmazásával eltérő minőségű és mennyiségű jeleket tudunk kiváltani, amelyeket a T sejt aktiváció korai, középtávú és késői eseményeinek monitorozásán keresztül vizsgáltunk. Kimutattuk, hogy a T sejt receptoron (TSR) keresztüli antigén-specifikus stimulációt követő választ a bemutatott peptid mennyisége mellett nagymértékben befolyásolják az antigént bemutató sejtek sajátosságai is. Igazoltuk, hogy a T sejten lezajló aktivációs és apoptotikus folyamatok egymástól nem választhatók el, mivel a legnagyobb mértékű sejtaktiváció (a 2PK3 APS alkalmazásakor) egyben az aktiváció indukálta sejthalál kiváltásával is együtt jár.

A retinoidokról ismert, hogy szabályozzák a timociták osztódását és aktiváció indukálta elhalását valamint, hogy a különböző retinsav receptorokon keresztül zajló jelátviteli folyamatok döntő szerepet játszanak a TSR-stimulációt követő sejthalál folyamatok szabályozásában. Ezért indokoltnak láttuk megvizsgálni a különböző retinsav receptorok aktivációjának hatásait a perifériás T limfocitákra. Kísérleteinkben receptor specifikus retinoid agonistákat és antagonistákat alkalmaztunk egy vagy több retinoid receptor aktiválására, illetve gátlására. A különböző retinoid receptorok aktivált perifériás T sejtekre kifejtett hatásait vizsgálva bizonyítottuk, hogy az RAR α és γ receptorok stimulációjának eltérő hatásai vannak; míg az RAR α aktiváció megmenti a sejteket a TSR-indukálta apoptózistól és segíti azok proliferációját, addig az RAR γ ligandkötése sejthalált indukál és gátolja a T sejtek osztódását. Kimutattuk, hogy ezeket a hatásokat a retinoid receptorok a Nur77 transzkripciós faktor transzaktivációs képességének, a FasL apoptotikus fehérje sejtfelszíni megjelenésének, valamint az IL-2 jelátvitel szabályozásának befolyásolásával fejtik ki.

A T sejtek antigén-specifikus és egyéb stimulációt követő válasza – aktiválódása, osztódása, effektor sejtté válása vagy elhalása – nagymértékben befolyásolja a perifériás T sejt készlet képződését és egyensúlyának fenntartását, illetve az immunológiai memória kialakulását. E folyamatok összehangolása elengedhetetlen feltétele az immunrendszer megfelelő működésének.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldalszám:
A dolgozatban szereplő rövidítések jegyzéke	7.
1. Irodalmi háttér	9.
1.1 Az immunhomeosztázis fenntartása	9.
1.2 Sejthalál	10.
1.2.1 A nekrotikus és az apoptotikus sejthalál	11.
1.2.2 Sejthalál az immunrendszerben	12.
1.3 A CD4 ⁺ T sejtek aktivációja és apoptózisa	13.
1.3.1 A T sejt aktiválás „kétlépcsős” modellje	13.
1.3.2 Az immunológiai szinapszis és a lipid mikrodomének szerveződése	15.
1.3.3 A CD4 ⁺ T sejtek aktiváció indukálta apoptózisának eseményei	16.
1.3.4 A T sejt aktiváció és apoptózis kísérletes kiváltásának lehetőségei	22.
1.4 Aktiváció vagy apoptózis?	22.
1.5 A természetes retinsavak	22.
1.6 A retinsavak szerepe az immunrendszer szabályozásában	24.
1.7. A kísérleteink közvetlen alapjául szolgáló eredmények	25.
2. Célkitűzések	27.
3. Anyagok és módszerek	29.
3.1 Peptid specifikus T sejt hibridóma aktivációjának és sejthalálának vizsgálata	29.
3.1.1 A kísérletekben alkalmazott sejtek és a sejtenyésztés feltételei	29.
3.1.2 Szintetikus peptid	30.
3.1.3 A sejtvonalak jellemzése és a sejtfelszíni molekulák vizsgálata áramlási citofluorimetriával	30.
3.1.4 Funkcionális vizsgálatok	32.
3.1.4.1 Alloreakció kiváltása	32.
3.1.4.2 A T sejt hibridómák antigén specifikus aktiválódásának mérése citokin termelés alapján	32.
3.1.5 A sejtkultúra felülűszók citokin tartalmának meghatározása bioesszék segítségével	32.
3.1.5.1 A felülűszók IL-2 tartalmának meghatározása	32.
3.1.5.2 A felülűszók TNF tartalmának meghatározása	33.
3.1.6 A T sejtek antigén specifikus aktivációjának vizsgálata az	

intracelluláris Ca^{++} koncentráció emelkedésének mérése alapján	33.
3.1.6.1 A minták előkészítése	33.
3.6.1.2 Az intracelluláris Ca^{++} koncentráció mérése	34.
3.1.7 Az aktiváció indukálta sejthalál vizsgálata áramlási citofluorimetriával	34.
3.1.8 A T sejt – B sejt kapcsolatok mérése	35.
3.1.9 A sejtek mágneses elválasztása	35.
3.1.10 Transzkripciós faktorok DNS kötő képességének vizsgálata	35.
3.1.11 Génexpressziós vizsgálatok RT-PCR-rel	36.
3.1.11.1 RNS nyérése	36.
3.1.11.1 Reverz transzkripció	36.
3.2 Retinoidok hatásának vizsgálata a nur77 gén kifejeződésére és transzaktivációs képességére	37.
3.2.1 Retinoidok, kötődési vizsgálatok és transzaktivációs esszé	37.
3.2.2 A kísérletekben alkalmazott sejtek és a T limfociták tisztítása	38.
3.2.3 A sejtenyésztés feltételei	38.
3.2.4 A DNS szintézis vizsgálata	39.
3.2.5 Az apoptózis vizsgálata	39.
3.2.6 Sejtciklus analízis	39.
3.2.7 Az interleukin-2 termelés vizsgálata	40.
3.2.8 Az IL-2 receptor sejtfelszíni megjelenésének detektálása	40.
3.2.9 A fehérje tartalom kimutatása	40.
3.2.10 Stat5a és b fehérjék foszforilációjának vizsgálata	41.
3.2.11 T sejtek aktiválása	41.
3.2.12 A nur77 génexpresszió vizsgálata	41.
3.2.13 Tranziens transzfekciós esszé	41.
4. Eredmények	43.
4.1 Az antigén-specifikus T sejt aktiváció és az aktiváció indukálta sejthalál vizsgálata peptid specifikus T sejt hibridómákkal	43.
4.1.1 A T sejt–B sejt kapcsolat erőssége függ az adott APS egyedi sajátságaitól	43.
4.1.2 A peptiddel stimulált T sejtek korai jelátviteli eseményei függenek az APS fenotípus sajátságaitól	44.
4.1.3 A B sejt APS-ek eltérő T sejt aktiváló képességének molekuláris háttere	46.
4.1.4 A T sejtek citokin termelő képességét az antigén prezentáló sejt egyedi sajátságai és a bemutatott peptid koncentrációja is befolyásolja	48.

4.1.4.1 Az aktivált T sejtek által termelt oldott citokinek termelésének vizsgálata funkcionális vizsgálatokkal	48.
4.1.4.2 A T sejt aktiváció nyomonkövetése a citokinek génexpressziójának vizsgálatával	51.
4.1.5 A különböző APS-ekből származó jelek meghatározzák a T sejt differentiáltsági fokát és további sorsát	52.
4.1.6 A T sejtek apoptózisa csak a leghatékonyabb antigén prezentálás feltételei mellett váltható ki	54.
4.2 Retinoidok hatásának vizsgálata	56.
4.2.1 A T sejt aktiváció indukálta sejthalálát gátolják a retinsavak és az RAR α szelektív retinoidok	56.
4.2.2 Az aktiváció indukálta sejthalál gátlása az RAR α receptoron keresztül befolyásolható az RXR vagy az RAR γ kostimulációjával	58.
4.2.3 A retinoidok szabályozzák a nur77 transzaktivációját	59.
4.2.4 Az RAR α ligandkötése fokozza, míg az RAR γ ligand általi aktivációja gátolja a humán perifériás T sejtek osztódását	61.
4.2.5 Az RAR γ receptor kis mértékben ha az IL-2 termelődésére és az IL-2 receptor megjelenésére	65.
4.2.6 Az RAR γ ligandkötése nem indít apoptózist a PHA stimulált T sejtekben	67.
4.2.7 Az RAR γ ligandkötése beleavatkozik az IL-2 jelátviteli útvonalába	68.
4.2.8 Az RAR α ligand kötése fokozza a PHA stimulált T limfociták IL-2 termelését	71.
4.2.9 Az RAR α ligandkötést követő IL-2 szint növekedés korábbi sejtciklusba lépést és az apoptózis gátlását eredményezi	72.
4.2.10 Az RXR kostimuláció elősegíti az RAR α vezérelt proliferáció növekedést	72.
5. Az eredmények megbeszélése	74.
6. Irodalomjegyzék	83.
7. Közlemények	109.
7.1 Az értekezésben felhasznált közlemények	109.
7.2 Egyéb közlemények	109.
7.3 Konferencia absztraktok és előadások	110.
Köszönetnyilvánítás	112.

A DOLGOZATBAN SZEREPLŐ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

7-AAD: 7-amino-aktinomicin-D
9CRA: 9-*cisz*-retinsav
AICD: aktiváció indukált sejthalál
AP-1: aktivációs fehérje-1
APS: antigén bemutató sejt
BSA: borjú szérum albumin
c-SMAC: centrális szupramolekuláris aktivációs komplex
DMSO: dimetil-szulfoxid
DNS: dezoxi-ribonukleinsav
DTT: dithiothreitol
EDTA: etilén-diamin tetraecetsav
EGTA: etilén glikol-bis(β -aminoethyl éter)-N,N,N',N'-tetraacetilsav
ELISA: enzim kötött immunszorbens esszé
EMSA: elektromobilitási shift esszé
FACS: fluorescein aktivált sejt szorter
Fas: APO1/CD95
FasL: APO1L/CD95L/Fas ligand
FCS: magzati borjú szérum
FITC: fluorescein-izo-tiocianát
GM-CSF: granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
HA: hemagglutinin molekula
HRP: torma peroxidáz
IgG: immunglobulin G
IL-2: interleukin-2
ISZ: immunológiai szinapszis
LFA: leukocita funkcionális antigén
M: mol/liter
MHC: fő hisztokompatibilitási génkomplex
MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)5-difenil tetrazólium bromid
NBRE: nur77 kötő válaszoló elem
NF-AT: aktivált T sejtek nukleáris faktora

NF- κ B: κ B nukleáris faktor
PBS: foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat
PE: fikoeritrin
PHA: fitohemagglutinin
PI: propidium jodid
PMSF: fenilmetilszulfonil fluorid
p-SMAC: perifériás szupramolekuláris aktivációs komplex
RA: retinsav
RAR: retinsav receptor
RB-pRB-ppRB: retinoblasztóma-foszforilált retinoblasztóma
RNS: ribonukleinsav
RLU: relatív fény egység
RT-PCR: reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
RXR: retinoid X receptor
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
SLE: szisztémás lupus eritematózus
TSR: T sejt receptor
TNF: tumor nekrosis faktor
TRA: *transz*-retinsa
Tris: 2-amino-2-hidroximetilpropán-1,3-diol

1. IRODALMI HÁTTÉR

1.1 Az immunhomeosztázis fenntartása

A homeosztázis fenntartása az élő szervezet normális működésének elengedhetetlen feltétele. Sejtek születnek, funkcionálnak és halnak el térben és időben jól körülhatárolt, szigorú feltételek között. Testünk majdnem minden sejtjének megvan az a potenciális képessége, hogy olyan rosszindulatú átalakuláson menjen át, ami korlátlan szaporodást enged meg és ezáltal veszélyt jelent a szervezet működésére és az egyed életére. A sejtosztódás számos ellenőrző ponton szabályozott folyamat, ami a szervezetben lezajló számtalan proliferációs esemény során a legtöbb esetben káros következmények nélkül meg végbe. Ezzel szemben egyetlen sejt pusztulása soha nem jár az egész szervezetet érintő, drámai változásokkal, így a leghatékonyabb sejtosztódást szabályozó folyamat a sejthalál (*Green és mtsai, 2002*).

A gerincesek adaptív immunológiai védekezését biztosító limfociták megfelelő ingerek jelenlétében gyors szaporodásra képesek, ami nagymértékben fokozza a kórokozókkal szembeni védekezés határfokát. A szervezetet saját molekuláit felismerő ún. autoreaktív limfociták nem megengedett osztódása azonban a szervezet maradandó károsodását okozhatja. Ezért a limfocita készlet kialakulásának és működésének szabályozása rendkívül szigorú szabályozás alatt áll. Csakúgy, mint az onkogenezis felügyelete, a limfocita fejlődés, szaporodás és differenciáció regulálása is gyakran igényli sejthalál folyamatok beindítását.

Az immunsejtek elsődleges feladata a szervezetbe került idegen anyagok (antigének) vagy károsan megváltozott saját struktúrák felismerése és eltávolítása. Ezt a feladatot a T és B limfociták, valamint az egyéb immunkompetens sejtek összehangolt működése biztosítja. Az immunkompetens sejtek megfelelő mennyiségben és minőségben való képződését az aktiváció, a klonális felszaporodás és a sejthalál megfelelő egyensúlya biztosítja oly módon, hogy az idegen anyagok eliminációja mellett a szervezetet felépítő saját struktúrák ne károsodjanak. Tímuszon belüli fejlődésük és érésük során azok a T sejtek, amelyek antigénfelismerő receptorai nem működőképesek, nem szaporodnak tovább és már a tímuszból elpusztulnak, a potenciálisan autoreaktív T limfociták pedig a helyi aktiváció eredményeként apoptózissal elhalnak. A sejthalál sorsára jutnak azok a timociták is, amelyek az MHC molekulák révén nem tudnak kapcsolatot teremteni a szervezet saját sejtjeivel.

A tímusból kilépő perifériás T sejtek osztódását és további differenciálódását az antigénnel való találkozás váltja ki, de az antigén-specifikus aktiváció a végrehajtó (effektor) sejtek pusztulását is eredményezi. A fehérje természetű antigének fajlagos felismeréséhez a T sejteknek kapcsolatba kell lépniük az antigén prezentáló sejtekkel (APS). A T limfociták és APS-ek kapcsolatát adhéziós molekulák biztosítják, a specifikus felismerésért az APS membránon megjelenő MHC molekulákhoz kötött peptidek és a T sejt antigén felismerő receptor (TSR) kölcsönhatása biztosítja. Az APS felszínén prezentált adott MHC – peptid komplex csak a megfelelő TSR-al rendelkező T limfociták reakcióját váltja ki. Az antigének belépését követően a specifikus T limfociták gyors klonális felszaporodása biztosítja azt, hogy az antigén eredetű peptidet bemutató sejteket a T limfociták elpusztítsák vagy az antigénnel specifikus reakcióba lépő ellenanyagok megfelelő mennyiségben képződjenek. Az antigén hatékony eltávolítását követően azonban a szervezet számára feleslegessé válnak a felszaporodott T limfociták, amelyek zöme az aktiváció által kiváltott programozott sejthalál révén eltávolítódik a szervezetből, visszaállítva a homeosztázis felborult egyensúlyát. Az immunológiai memória kialakulását és fenntartását azonban néhány antigén-specifikus T sejt túlélése biztosítja.

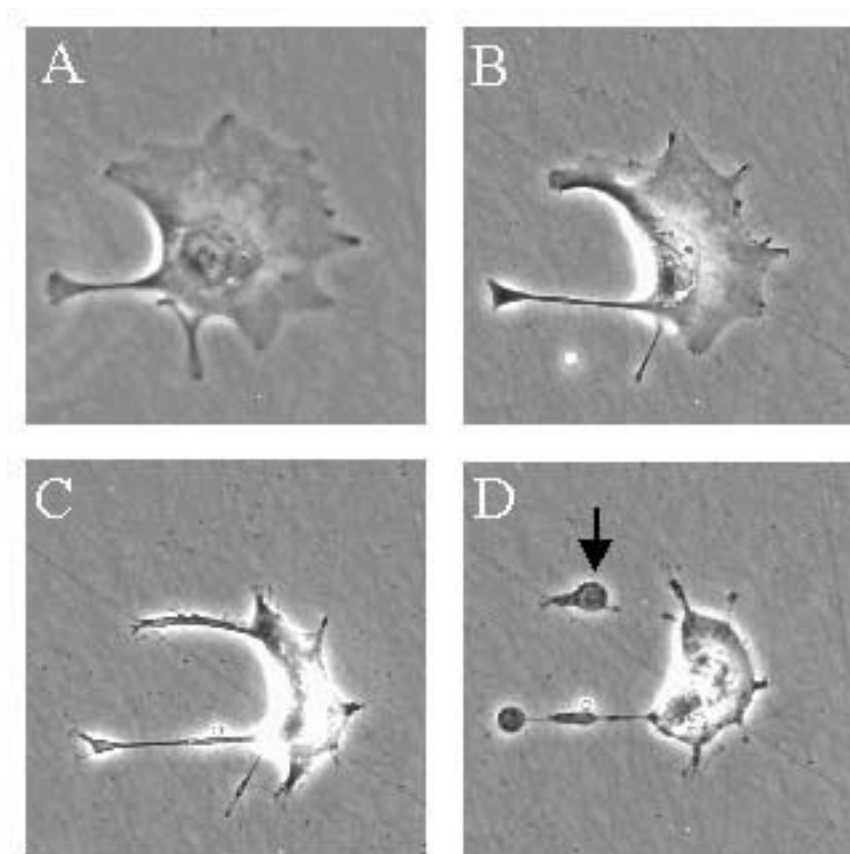
1.2 Sejthalál

A sejthalál szerepet játszik a limfocita homeosztázis fenntartásában, a károsodott sejtek eltávolításában, valamint a túlélési faktorokban szegény szöveti környezetből a nem funkcionáló sejtek eliminálásában. Az immunválasz folyamán a sejthalál két mechanizmus közvetítésével ellensúlyozza a limfociták nagymértékű klonális felszaporodását: (1) növekedési faktor megvonással és (2) aktiváció indukálta sejthalállal (AICD). A sejthalált szabályozó faktorok a proliferációt és sejt differenciálódást reguláló tényezőkkel összehangoltan szabályozzák a limfocita homeosztázist és az immunválaszok lefolyását. Számos példa mutatja, hogy mindkét folyamat nagyon érzékeny a sejthalál útvonalak ellenőrző pontjainak meghibásodására. A sejthalál csökkent mértékű előfordulása gyakran vezet rosszindulatú daganatok és autoimmun betegségek kialakulásához, míg túl sok sejt pusztulása immundeficienciákat és leukopéniát okozhat (*Thompson, 1995; Kroemer és Martinez, 1995; Abbas, 1996*).

1.2.1 A nekrotikus és az apoptotikus sejthalál

Egy adott típusú és funkciójú sejt pusztulását két folyamat válthatja ki: (1) nekrózis, vagy (2) apoptózis. A nekrózis a nem fiziológiás károsodások eredménye, amelyet morfológiailag visszafordíthatatlan ozmotikus változások, a sejt duzzadása és nem kontrollált lízise jellemez (Duvall és Wyllie, 1986; Kerr és mtsai, 1991). Nekrózis során a sejtmag nem kondenzálódik, a DNS darabolódás számos enzim részvételével random módon történik (Duvall és Wyllie, 1986; Dong és mtsai, 1997). A sejtmembrán sérülése következtében a sejt tartalom kiszabadul és a környező szövetekben gyulladásos folyamatokat eredményez.

A nekrotikus sejthalállal ellentétben az apoptózis folyamata morfológiailag megkülönböztethető szakaszokra osztható (1.1 ábra), amelyek végül a sejt öngyilkosságához vezetnek (Kerr és mtsai, 1972; Duvall és Wyllie, 1986). Így az apoptózist programozott sejthalálnak is nevezik.



1.1 ábra. Az apoptózis folyamata

A laminok és az aktin filamentumok hasítódásának következtében a citoplazma zsugorodásnak indul (A). A magi strukturális fehérjék károsodása és a kromatin összeomlása

miatt a sejtmag kondenzálódik, sok esetben patkó alakot vesz fel (**B**). Az egész sejt hatékonyan vesznek fel (**D**).

Az apoptózis folyamata során a sejtek először elhatárolódnak a szomszédos sejtektől, sejtmagjuk és a citoplazmájuk kondenzálódik. Korai jelenséggé a mitokondriumokból citokrómtól jut a citoszólba és a membrán potenciál csökken (*Kluck és mtsai, 1997; Yang és mtsai, 1997; Marchetti és mtsai, 1996; Zamzami és mtsai, 1996; Vander Heiden és mtsai, 1997; Bossy-Wetzel és mtsai, 1998*). A magi szerveződés megszűnik, a sejtmag és a nukleólusz felbomlik, a kondenzált kromatin 180 bázispárnyi (vagy ennek többszöröséből álló) oligonukleoszómális darabokra hasítódik (*Wyllie, 1980; Wyllie és mtsai 1984*). Agaróz gélben végzett elektroforézis és etidium bromiddal végzett festés után ezek az adott méretű darabok jellegzetes „apoptotikus DNS létra” képét mutatják. Apoptózis során a plazma membrán összezsugorodik, a membránnal határolt sejtfragmentumok apoptotikus testek formájában lefűződnek. Így a sejttartalom nem jut ki a környezetbe és – ellentétben a nekrozissal – a környező szövetekben nem kezdeményez gyulladásos folyamatokat. *In vivo* az apoptotikus sejtek nagy részét a makrofágok receptor közvetítette endocitózissal gyorsan felveszik és kiküszöbölik a rendszerből. Ebben a folyamatban számos – az apoptotikus sejtek felszínén megjelenő – molekula, így pl. a vitronektin (*Savill és mtsai, 1990*) vagy a foszfatidilszerin szerepét igazolták, amelyeket a fagocita sejtek receptorai ismernek fel (*Martin és mtsai, 1995; Castedo és mtsai, 1996; Verhoven és mtsai, 1995; Bratton és mtsai, 1997*). A fagocita rendszer gyors eltakarító működése miatt az apoptotikus sejtek *in vivo* jelenlétét és az apoptózis folyamatát nehéz kimutatni.

1.2.2 Sejthalál az immunrendszerben

Míg az apoptózis központi szerepe a magzati fejlődésben és a szervképződésben régóta ismert, jelentőségét az immunrendszer működésében csak az utóbbi évtizedben fedezték föl (*Kroemer és Martinez, 1995*). Régebben az „apoptózis” kifejezést specifikus sejthalál utak morfológiájának leírására alkalmazták (*Kerr és mtsai, 1972*). Az utóbbi időben a biokémiai és molekuláris biológiai ismereteink robbanásszerű fejlődésével lehetővé vált a sejthalál fő útvonalainak és molekuláris mechanizmusainak feltérképezése különböző sejttrendszerekben a nematódáktól az emlősökig. Számos új információt az apoptózissal kapcsolatban az immunrendszer – azon belül is a T limfociták – vizsgálatán keresztül nyertünk.

A központi tolerancia kialakításában alapvető fontosságú folyamat, az autoreaktív T sejtek kiküszöbölése a tímuszban, elsősorban programozott sejthalállal történik. Kevésbé ismert azonban, hogy az apoptotikus folyamatok miként szabályozzák a perifériás T sejtek szelekcióját, a tolerancia fenntartását és a memória sejtek kialakulását. A perifériás tolerancia kialakításában és fenntartásában több mechanizmus szerepét is igazolták. Így a funkcionális válaszképtelenség, az „anergia” kialakulása (O’Hehir és Lamb, 1990; Falb és mtsai, 1996), a sejtfelszíni TSR expresszió csökkenése (Schönrich és mtsai, 1991), valamint az antigén-reaktív T sejtek aktiváció indukálta kiküszöbölése a rendszerből (Kawabe és Ochi, 1991; Webb és mtsai, 1990; D’Adamio, és mtsai, 1993; Arnold és mtsai, 1993) egyaránt szerepet játszik az immunfolyamatok negatív szabályozásában.

A TSR-en keresztüli aktiváció apoptotikus sejthalált eredményez a timociták negatív szelekciójakor (Smith és mtsai, 1989), perifériás effektor T sejtek eltávolításakor (Kawabe és Ochi, 1991) és HIV fertőzött egyedekben a nem fertőzött T sejtekben (Gougeon, 1995). Nagy antigén dózis esetén az előzetesen aktivált T limfociták az ismétlődő antigén stimuláció hatására aktiváció indukálta sejthalált (AICD) szenvednek (Mixer és mtsai, 1999). Az aktivált perifériás T limfociták apoptotikus pusztulását a növekedési faktorok (pl. IL-2) hiánya (Cantrell és Smith, 1984), a naiv T sejtek esetében az antigén stimulust erősítő kostimulációs jel hiánya is kiválthatja (Pestano és mtsai, 1999).

1.3 A CD4⁺ T sejtek aktivációja és apoptózisa

1.3.1 A T sejt aktiválás „kétlépcsős” modellje

A T sejtek számára az antigént az MHC–peptid komplexeket hordozó APS-ek mutatják be. A CD8⁺ T limfociták az MHC-I, a CD4⁺ T limfociták az MHC-II molekulák által prezentált peptidek felismerésére szakosodtak. Az MHC-II molekulák megjelenése a hivatásos APS-ekre korlátozódik, így a CD4⁺ T limfociták csak a B limfocitákkal, makrofágokkal és dendritikus sejtekkel kapcsolatot teremtve képesek aktiválódni. A TSR kapcsolata az MHC–peptid komplexekkel nem elegendő a T sejt proliferáció kiváltásához, a megfelelő aktivációhoz az antigén felismerésén túl szükség van járulékos jelekre is. Az első jel az MHC-peptid-TSR komplex felől, míg a második szignál a T sejt – APS közötti kölcsönhatásban szerepet játszó membrán fehérjék felől érkezik (Chambers és Allison, 1997). Az előaktivált T sejtek kisebb peptid dózist és kevesebb kostimuláló jelet igényelnek az

aktivációhoz, mint a naív T limfociták. Így az effektor T sejt aktiváció mértékét (*Liu és mtsai, 1997, Gause és mtsai, 1997*) és az AICD kiváltásának feltételeit az antigen bemutatás színhelyén jelenlévő APS-ek sajátosságai határozzák meg (*Van Parijs és mtsai, 1996*).

A hivatásos APS-ek közös jellemzője, hogy felszínükön MHC-I és MHC-II molekulákat, valamint számos kostimulátor molekulát fejeznek ki, amelyek a sejt-sejt kapcsolat stabilizálásában és járulékos jelek közvetítésében játszanak szerepet. A T sejt felszínén lévő CD28 koreceptor és az APS-en megjelenő B7 családba tartozó ligandok kölcsönhatása képezi a T limfociták legfontosabb kostimulációt biztosító kölcsönhatását. Ez a kapcsolat elősegíti a sejtosztódást, az IL-2 termelés növekedését váltja ki és csökkenti a T sejt aktivációhoz szükséges antigén dózis küszöb értékét (*Chambers és Allison, 1997; Powell és mtsai, 1998; Shapiro és mtsai, 1997*). Ezért a CD28 receptor adhéziós és egyben koreceptor funkciót is betölt és képes a TSR aktivációt követő jelátviteli folyamatok szabályozására (*Bachmann és mtsai, 1997; Tuosto és Acuto, 1998*). CD28 hiányos egerekkel végzett kísérletek bizonyították, hogy ez a kostimuláció nem minden antigén függő aktiváció előfeltétele (*Green és mtsai, 1994*). Ez azt sugallja, hogy más jelek is kiválthatják a kostimuláló hatást, illetve hogy a nagy erősségű vagy hosszan tartó MHC-peptid-TSR kölcsönhatás kostimuláció nélkül is elégséges lehet a teljes T sejt stimuláció kiváltásához (*Kundig és mtsai, 1996*). A $CD4^+$ T limfociták sokkal érzékenyebbek a kostimulációs jelek meglétére, mint a $CD8^+$ T sejtek (*Kundig és mtsai, 1996*), így mind a naív, mind az előaktivált $CD4^+$ T sejtek aktivációjának mértéke a kapcsolatban résztvevő APS funkcionális aktivitásától függ. Bizonyítékot nyert az is, hogy a B7-CD28 kölcsönhatásnak és az IL-2 citokinnek szerepe van a saját struktúrák felismerését követő perifériás tolerancia kialakulásában is, így a T sejt válaszüthítésében és befejezésében egyaránt szerepet játszik.

A $CD4^+$ helper T sejtek kapcsolata specifikus peptid ligandjukkal az APS felszínén számos jelátviteli folyamatot indít el, amelyeket membránhoz kötött és intracelluláris adaptor molekulák összegeznek (*Buday és mtsai, 1994; Zhang és mtsai, 1998; Peterson és mtsai, 1998; Rudd, 1999*). A T sejt aktiváció eredményeként különböző citokinek termelésért és sejt felszíni molekulák megjelenéséért felelős gének kifejeződése és/vagy aktivációja indul el, melyet transzkripció faktorok összehangolt működése biztosít (*Karin, 1995; Jain és mtsai, 1995; Gerondakis és mtsai, 1998*). A TSR-en keresztül induló jelátvitel fontos mozzanata a TSR komplex és a kostimuláló jeleket továbbító receptorok immunológiai szinapszisba való szerveződése, mely foszfo-tirozin kinázok toborzását, gátló molekulák eltávolítását és a citoszkeleton átszerveződését eredményezi (*Sperling és mtsai, 1998; Penninger és Crabtree,*

1999; Sanchez-Madrid és del Pozo, 1999). Különböző modelleken végzett számos kísérlet bizonyította, hogy a TSR specifikus ligandjához (adott MHC-peptid komplexek) mutatott affinitása, az APS segítségével bemutatott peptidek természete és koncentrációja és főként a TSR aktiváció időtartama meghatározó fontosságú a stimulációt követő biokémiai folyamatok szabályozásában. Ezek a hatások – amelyek az APS-sel kialakított kapcsolat következtében érik a T sejtet – meghatározzák a T limfocita aktiváció kimenetelét (Valitutti és mtsai, 1995; Kundig és mtsai, 1996; Itoh és Germain, 1997; Lezzi és mtsai, 1998; Lanzavecchia és mtsai, 1999).

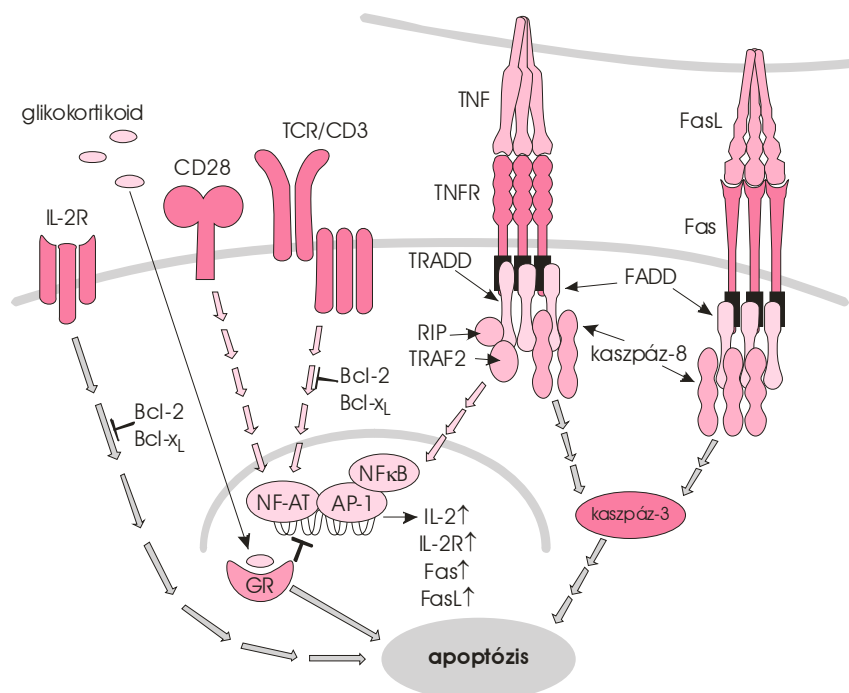
1.3.2 Az immunológiai szinapszis és a lipid mikrodomének szerveződése

A T sejt és az APS között kialakuló közvetlen sejt-sejt kapcsolatot az utóbbi időben immunszinapszisként (ISZ) nevezik. A T sejt és az APS közötti kölcsönhatás eredményeként kialakuló érintkező membrán felszínnek jellegzetes „bivalyszem” mintázata van (Monks és mtsai, 1998). A középső régió (centrális szupramolekuláris aktivációs komplex – c-SMAC) 1-3 μM átmérőjű kis méretű sejt felszíni molekulákat tartalmaz, (TSR, CD28, CD2), amelyek jelátvivő molekulaként működnek. Ezt öleli körül a perifériás adhéziós gyűrű (p-SMAC), melyet LFA-1 adhéziós molekulák és talin citoskeletális fehérjék alkotnak. A korai és az érett immunszinapszis (ISZ) összetétele eltérő. Az érett ISZ kialakulása néhány percet vesz igénybe, míg a TSR aktiváció néhány másodpercnyi T sejt - APS kontaktus alatt lezajlik. Ez arra enged következtetni, hogy az érett ISZ kialakulásához nem szükséges a specifikus TSR kapcsolódása az MHC-peptid ligandhoz (van der Merwe és mtsai, 2000; Delon és Germain, 2000). Az érett ISZ kialakulásának szükségességét eltérő elméletek próbálják magyarázni (van Der Merwe és Davis, 2002). Az egyik elképzelés azt valószínűsíti, hogy az aktivált T sejtek polarizált citokin szekréciójában van szerepe (Stinchcombe és mtsai, 2001). Egy másik értelmezés azzal áll kapcsolatban, hogy a T sejt aktiváció kiteljesedéséhez több, mint 2 óra hosszát tartó folyamatos jel szükséges, ami az érett ISZ központjában elhelyezkedő CD28 kostimuláló molekulák folyamatos kötődésének segítségével valósítható meg (Bromley és mtsai, 2001). Így a CD28 molekulák jelentősen felerősíthetik a TSR által közvetített jelet. Azt az ellenmondást, hogy a TSR molekulák miért halmozódnak föl az érett ISZ közepén, ha nem növelik a jel hatékonyságát, több magyarázat is próbálja feloldani. Lee és munkatársai szerint a TSR által közvetített aktivációt a receptor internalizációja követi és az érett ISZ ebben játszik szerepet (Lee és mtsai, 2002), míg mások az APS felé történő aktivációs jelek közvetítésében tulajdonítanak szerepet a jelenségnek (van Der Merwe és Davis, 2002).

Nemrég vált nyilvánvalóvá, hogy a TSR keresztükötést követően a plazma membrán laterális kompartmentalizációját lipid mikrodoménekbe – raftokba (tutajokba) – a jelátviteli folyamatok komponenseinek összerendeződése követi (*Xavier és mtsai, 1998; Montixi és mtsai, 1998; Leitenberg és mtsai, 2001; Harder, 2001*). A lipid tutajok szfingolipid/koleszterol-gazdag mikrodomének, amelyek a plazma membránban azt a felületet körvonalazzák, ahol lehetővé válik a szignál komponensek kölcsönhatása (*Leitenberg és mtsai, 2001; Harder, 2001*). A különböző membránhoz kötött molekulák tutajba szerveződése makromolekuláris komplexet hoz létre, melyet szignaloszómanak is neveznek. Ezen speciális membrán szerveződés felelős a TSR általi jelátvitel minőségi és mennyiségi szabályozásáért. A TSR szignaloszómat számos, eltérő funkciójú molekula – koreceptorok, kinázok, foszfatázok és adaptorok - alkotja, melyek különböző szerepet játszanak a jelátviteli folyamatokban (*Germain és mtsai, 2001; Leitenberg és mtsai, 2001; Harder, 2001*). Ez a makromolekuláris komplex kapcsolja össze a plazmamembránban történő eseményeket a későbbi jelátviteli kaszkáddal, amelyek végeredményben a T sejt további sorsát határozzák meg. Mikroszkópos vizsgálatokkal kimutatták, hogy az MHC-I és MHC-II molekulák szintén tutajokban lokalizáltak, aggregátumokban helyezkednek el az APS felszínén (*Szöllősi és mtsai, 1996; Anderson és mtsai, 2000*). Lehetségesnek tartják, hogy ezek a csoportosulások a B7 molekulákat is magukban foglalják (*Turley és mtsai, 2000*).

1.3.3 A CD4⁺ T sejtek aktiváció indukálta apoptózisának eseményei

A CD4⁺ T sejtek apoptózisáról szerzett ismereteink főként T sejt hibridómákon és Jurkat T sejt vonalon végzett kísérletekből származnak. Ezekben a sejtekben a TSR általi jelátviteli folyamat a Fas (CD95) receptor fokozott kifejeződéséhez és a Fas ligand (FasL, CD95L) aktivációs membrán fehérje megjelenéséhez vezet. A Fas receptor kölcsönhatása az aktivált T limfocitákra jellemző FasL membrán fehérjével apoptotikus jelet továbbít a T sejteknek (**1.2 ábra**) (*Yang és mtsai, 1995*). A folyamathoz transzkripciós faktorok (pl. a Nur77) közreműködésére valamint *de novo* RNS és fehérje szintézisre van szükség (*Ucker és mtsai, 1989; Woronicz, és mtsai, 1995*).



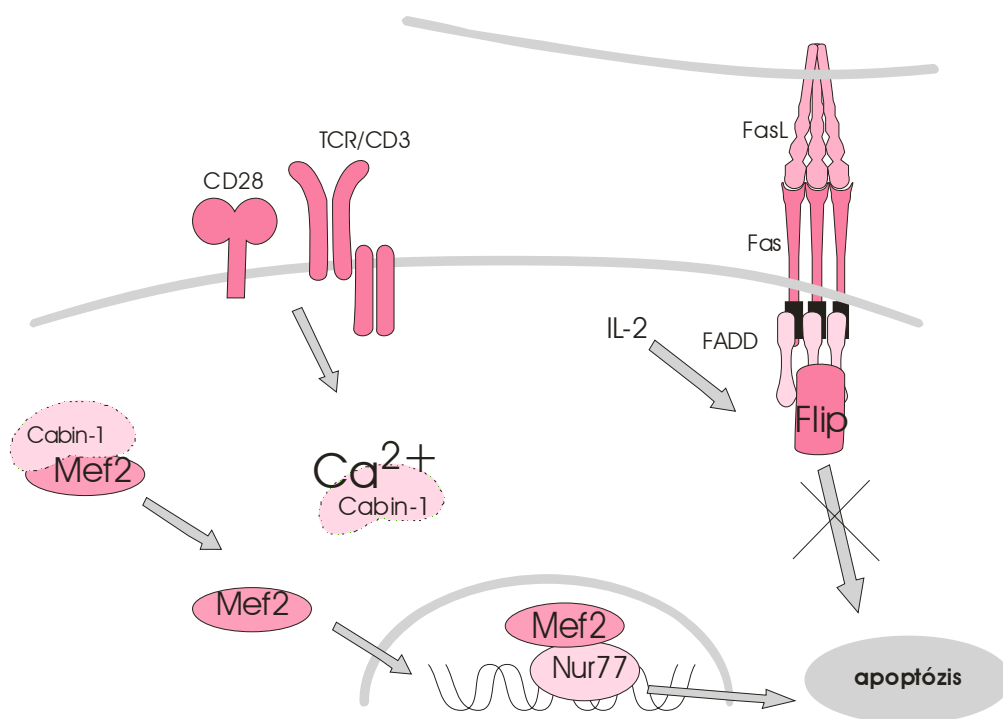
1.2 ábra. A T sejtben zajló aktiváció indukálta apoptózis folyamata

A TSR által kiváltott intracelluláris jel kis affinitású receptor – ligand kötés esetében, növeledési faktorok hiányában vagy a CD28 általi kostimulációs szignál hiányában apoptózist vált ki. A folyamat IL-2 citokin jelenlétében, vagy a Bcl-2/Bcl-X_L fehérjék fokozott kifejeződésével kivédhető. A TSR által közvetített jel a CD28 felől érkező kostimulációs szignállal együtt a sejtmagban az NF-AT/AP-1 transzkripciós faktorok révén az IL-2 és IL-2R α láncát (CD25) kódoló gének aktiválását, valamint a FasL-ot kódoló gén expresszióját és a fehérje sejtfelszíni megjelenését váltja ki. A TNFR ligand kötése az NF-κB aktiválódásához vezet és anti-apoptotikus hatású. Az oldott vagy membránhoz kötött FasL illetve a TNF a “halál doménnel” (death domain – DD) rendelkező Fas és TNF receptorok trimerizációját, a DD-t hordozó FADD és TRADD intracelluláris adaptor molekulák kapcsolódását és közvetlenül a kaszpáz-8 enzim aktiválását váltja ki. A kaszpáz enzim kaszkád aktiválódása a T sejt apoptózisához vezet. A glükokortikoidok a nukleáris glükokortikoid receptorhoz (GR) kötődve az NF-AT és az NF-κB aktivitásának gátlása révén indukálnak apoptózist. (Gergely és Erdei (szerk.): “Immunbiológia” nyomán)

Az utóbbi néhány évben vált nyilvánvalóvá a Fas/Fas ligand (FasL) (CD95/CD95L) rendszer szerepe a T sejtek apoptózisának elindításában és szabályozásában. Kimutatták, hogy az AICD számos esetben a Fas receptortól függő sejthalál, a FasL a TSR-en keresztüli aktiváció eredményeként jelenik meg. Az általános mechanizmus a következő: a T sejtek stimulációja a TSR/CD3 jelátvivő komplexen keresztül tirozin foszforilációt és a TSR aktivációjától függő transzkripciós faktorok aktivációját eredményezi. Ezek a FasL-ot kódoló gén gyors expresszióját, mRNS szintézist és a fehérje sejtfelszíni megjelenését eredményezik.

A FasL vagy a sejt saját, illetve egy másik T sejt felszínén megjelenő Fas receptorhoz kötődik és elindítja a Fas-függő apoptózist (Dhein és mtsai, 1995; Brunner és mtsai, 1995; Ju és mtsai, 1995; Alderson és mtsai, 1995).

Bár a Fas/FasL rendszer szerepe a T sejt apoptózisban egyértelműen igazolt, feltételezhető hogy a T limfociták apoptózisában nem csak a Fas/FasL útvonal vesz részt, hanem más molekulák is szerepet játszanak. (Peter és mtsai, 1995; Tucek-Szabo és mtsai, 1996; Katsikis és mtsai, 1996). Bizonyos körülmények között a TNF- α is szerepet játszik az aktivált T sejtek apoptózissal történő pusztulásának szabályozásában (Zheng és mtsai, 1995; Sytwu és mtsai, 1996). A T limfocitákat CD2 molekulán keresztül történő aktivációját követően a Fas receptortól független apoptózist is leírtak (Mollereau és mtsai, 1996).



1.3 ábra. A Nur77 apoptotikus transzkripció faktor szabályozása és a Flip apoptózist gátló szerepe

A Nur77 korai apoptotikus transzkripció faktor; az intracelluláris calcium szint emelkedésének hatására a Cabin-1 és a Mef-2 fehérjék közvetítésével szintézise fokozódik és aktiválódik. A Flip anti-apoptotikus molekula a Fas receptorhoz kötődve gátolja a további, sejthalált közvetítő jelátviteli folyamatokat.

A Nur77 a szteroid/tiroid/retinoid magreceptor család tagja, árva receptor, mivel ligandja nem ismert (Mangelsdorf és mtsai, 1995). Az intracelluláris calcium szint emelkedése indirekt módon fokozza szintézisét (1.3 ábra). A magas calcium szint közvetlenül a Cabin-1 fehérjére hat, amelynek a calcium kötést követően megváltozik a

konformációja, és elengedi a Nur77 génjének átírását pozitívan szabályozó Mef-2 transzkripció faktort. Az újonnan szintetizálódó Nur77 meghatározó szerepet tölt be a sejthalál program elindításában, amit a domináns-negatív Nur77 fehérjét kifejező transzgén egerekben igazoltak. Ezekben az állatokban a tímuszon belüli negatív szelekció nem meg végbe és szisztémás lupusz eritematózus (SLE) szerű autoimmun betegség fejlődik ki. A Nur77 funkcióját a vele rokonságban álló Nor-1 transzkripció faktor részben helyettesítheti. A nur77 a DNS-en az őt kötő válaszoló elemhez (NBRE) kapcsolódik (*Wilson és mtsai, 1993*), de az RXR-hez kötődve heterodimereket is képez és lehetővé teszi a 9 *cisz*-retinsav vezérelt génátírást a DR5 szabályozó elemet tartalmazó reporter szekvenciákban (*Perlmann és Jansson, 1995*). Korábban bizonyították, hogy a T limfociták TSR aktiváció által kiváltott sejthalála folyamán a nur77 szintje növekszik és az NBRE-hez való kötődése korrelációt mutat az apoptotikus folyamatokkal. A Nur77 domináns-negatív formáját vagy antiszensz oligonukleotidokat alkalmazva meg lehet gátolni a TSR aktivációt követő, sejthalálhoz vezető eseményeket (*Woronicz és mtsai, 1995; Woronicz és mtsai, 1994*). A vad típusú Nur77 transzgén formájában történő konstitutív kifejezése egerekben a timociták fokozott apoptózisához vezet (*Calnan és mtsai, 1995*). Mindezek az eredmények a Nur77 fontos szerepét bizonyítják a TSR-vezérelt apoptózisban.

A Fas-vezérelt AICD központi szerepet játszik a saját struktúrákat felismerő autoreaktív limfociták eliminálásában, valamint a perzisztáló fertőzések eredményeként krónikusan aktivált T sejtek elhalásában. Az AICD másik útvonala akkor kapcsol be, ha a T sejtek a természetes immunitás segítségével nélkül vagy kostimuláció hiányában aktiválódnak. Ekkor a Bcl-2 család pro-apoptotikus tagjai lépnek működésbe (például a Bim) és a sejthalál anti-apoptotikus molekulák hiányában, valamint a halálreceptorok aktiválása nélkül következik be (*Hildeman és mtsai, 2002*).

Az AICD-re való fogékonyság részben a Fas receptor sejtfelszíni megjelenésétől és érzékenységtől, részben a Fas receptoron át közvetített jelátviteli út gátló molekuláinak (FLICE inhibitor fehérjék: c-FLIP-ek, **1.3** ábra) aktivitásától függ (*Hu és mtsai, 1997; Irmeler és mtsai, 1997; Tschopp és mtsai, 1998; Peter és mtsai, 1997; Peter és Krammer, 1998*). A Fas útvonalat szabályozó c-FLIP molekula szerepe az apoptózis gátlásában még nem teljesen tisztázott. A c-FLIP fokozott expressziója gátolja a Fas-vezérelt sejthalált, azonban nincs szerepe a Fas-érzékeny limfociták apoptózisában (*Scaffidi és mtsai, 1999*). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy T sejtekben más – eddig még nem azonosított – a Fas receptor útvonalat szabályozó molekulák is működnek. Feltételezik azt is, hogy a c-FLIP a kaszpáz-8 enzimmel együttműködve a Fas-vezérelt kaszpáz aktivációban játszik szerepet. A

T sejtek IL-2-vel való érzékenyítése az AICD-re összefüggést mutat a c-FLIP mennyiségének csökkenésével, az apoptózist gátló c-FLIP fehérje túltermelése pedig gátolja a sejthalállal szembeni érzékenység kialakulását (*Refaeli és mtsia, 1998*). Így a c-FLIP összetett szerepet játszik a T limfociták AICD-ának szabályozásában.

Az AICD kifejlődése aktivált T sejtekben azonban egyéb paraméterektől is függ. A T sejtek növekedési faktoraként ható IL-2 érzékenyíti az aktivált T limfocitákat az AICD-re (*Lenardo, 1991; Wang és mtsai, 1996*). Ennek alapján feltételezhető, hogy a növekedési faktorok szerepe az apoptózis beindításában az, hogy a T sejteket a sejtciklus S fázisába hajtva érzékenyítik a TSR-indukálta sejthalálra (*Boehme és Lenardo, 1993*).

Az IL-2 két lehetséges úton hathat a T sejt immunválasz terminálására. Az előzőek szerint elősegíti a T limfociták Fas-függő apoptózisát (*Lohr és mtsai, 1991; Van Parijs és mtsai, 1997*), ezen pro-apoptotikus szerepért a Fas útvonalat gátló c-FLIP gátlásán keresztül fejti ki (*Refaeli és mtsai, 1998*). Így az immunválasz korai fázisában az IL-2 elsődlegesen növekedési faktorként hat és a T sejtek túlélését valamint a sejtciklusba lépését segíti elő. Hosszan tartó antigén stimuláció – mint például magas antigén dózis vagy a saját struktúrák elleni immunválasz - során az IL-2 folyamatosan magas koncentrációja a T sejteket érzékenyíti a Fas-közvetített apoptózisra és elősegíti az aktivált és effektor T limfociták aktiváció által kiváltott elhalását. Emellett az IL-2 citokin elősegíti a CD4⁺ CD25⁺ regulátor T sejtek képződését is, amelyek képesek az aktivált T sejtek effektor funkcióit gátolni (*Malek és mtsai, 2002; Nelson és mtsai, 2002*).

Az IL-2 tehát kulcsszerepet játszik a T sejt osztódás megindításában, majd ugyanazon sejt apoptózisra való érzékenyítésében is. Az AICD ezáltal a sejtciklus ellenőrző pontja, a sejthalál programja olyan transzkripciós faktorok ellenőrzése alatt áll, amelyek a sejtciklus indukciójában is szerepelnek. Így pl. a TSR-on keresztüli stimuláció aktiválja az E2F-1 transzkripciós faktort, amely a p73 molekulán keresztül apoptózist indukál (*Lissy és mtsai, 2000; Irwin és mtsai, 2000*).

Az IL-2 citokin mellett az AICD programot a T sejt felszíni molekuláinak ligand kötése is módosíthatja. A CD4 kostimuláló molekula keresztkötése anti-CD4 ellenanyaggal vagy a humán immundeficiencia vírus (HIV) gp120 fehérjéjével a TSR/CD3 komplexen keresztüli aktivációt követően a nyugvó CD4⁺ sejtekben apoptózist vált ki (*Newell és mtsai, 1990; Banda és mtsai, 1992*). Míg a CD4 molekula keresztkötése növeli a nyugvó T sejtek apoptózissal szembeni érzékenységét, aktivált T limfocitákban ez a hatás ellenkező, amennyiben a CD4 keresztkötése specifikus ellenanyaggal vagy a HIV gp120 fehérjéjével fokozza a TSR/CD3 komplexen keresztüli aktivációt és az AICD gátlását a FasL fehérje

temelődésének gátlásán keresztül fejti ki (*Oberg és mtsai, 1997; Sanzenbacher és mtsai, 1999*). Kostimulációs inger hiányában a CD3 és a CD4 molekulák együttes aktiválása azonban gátolja a T sejt aktivációt (*Portolés és mtsai, 1999*).

1.3.4 A T sejt aktiváció és apoptózis kísérletes kiváltásának lehetőségei

A T limfociták TSR/CD3 komplexen keresztüli stimulációjához és az AICD kiváltásához széles körben alkalmaznak monoklonális anti-TCR és anti-CD3 antitesteket. Az anti-CD3 és az anti-TCR monoklonális ellenanyagok – az antigén-specifikus aktivációhoz hasonlóan – Ca^{2+} beáramlást, citokin szintézist és IL-2 vezérelt sejtosztódást indukálnak (*Meuer és mtsai, 1983*). Bár ez az eljárás a TSR-en keresztüli antigén felismerést követő aktivációnak megfelelő folyamatokat vált ki, a jel erőssége és minősége különbözik attól a fiziológias folyamattól, amelyet az APS által bemutatott MHC-peptid komplexek váltanak ki a specifikus TSR-ral való kölcsönhatás követően (*Gonzalo és mtsai, 1994; Kabelitz és Janssen, 1997*). Az anti-TCR/CD3 monoklonális antitestek éretlen timocitákban apoptózist indukálnak (*Smith és mtsai, 1989; McConkey és mtsai, 1989; Shi és mtsai, 1991; Tadakuma és mtsai, 1990*). A T sejtek fejlődésük további stádiumaiban is érzékenyek az anti-CD3 által kiváltott osztódás gátlásra, amely gyakran vezet programozott sejthalálhoz. A transzformált sejtek és a T sejt hibridómák spontán proliferációja szintén gátolható anti-CD3 antitestekkel, mely folyamat DNS darabolódással járó sejthalálhoz vezet (*Mercep és mtsai, 1988; Takahashi és mtsai, 1998; Ucker és mtsai, 1989; Okada és mtsai, 1990; Vukmanovic és mtsai, 1991; Shi és mtsai, 1990*). Később igazolódott, hogy nem csak az éretlen és a transzformált sejtek, hanem a normál, érett T limfociták is érzékenyek az anti-CD3 által kiváltott növekedés gátlásra és apoptózisra. Korai kísérletek bizonyították, hogy az anti-TCR/CD3 ellenanyagokkal kezelt aktivált perifériás egér és humán T sejtekben gátlódik az IL-2 vezérelt *in vitro* sejtosztódás (*Nau és mtsai, 1987; Nau és mtsai, 1988; Webb és Sprent, 1987; Breitmeyer és mtsai, 1987*). Számos kutatócsoport leírta, hogy a monoklonális antitestekkel keresztkötött TCR/CD3 komplex AICD-t vált ki (*Russell és mtsai, 1991; Bensussan és mtsai, 1990; Janssen és mtsai, 1991; Janssen és mtsai, 1992*). A nyugvó perifériás T limfociták általában érzéketlenek az anti-TCR/CD3 antitestek által kiváltott AICD-re és proliferációval válaszolnak erre a stimulusra. *In vitro* körülmények között több napos aktivációra van szükség ahhoz, hogy a frissen izolált perifériás T sejtek AICD-érzékenyvé váljanak (*Klas és mtsai, 1993; Janssen és Kabelitz, 1993; Radvanyi és mtsai, 1996; Salmon és mtsai, 1994*).

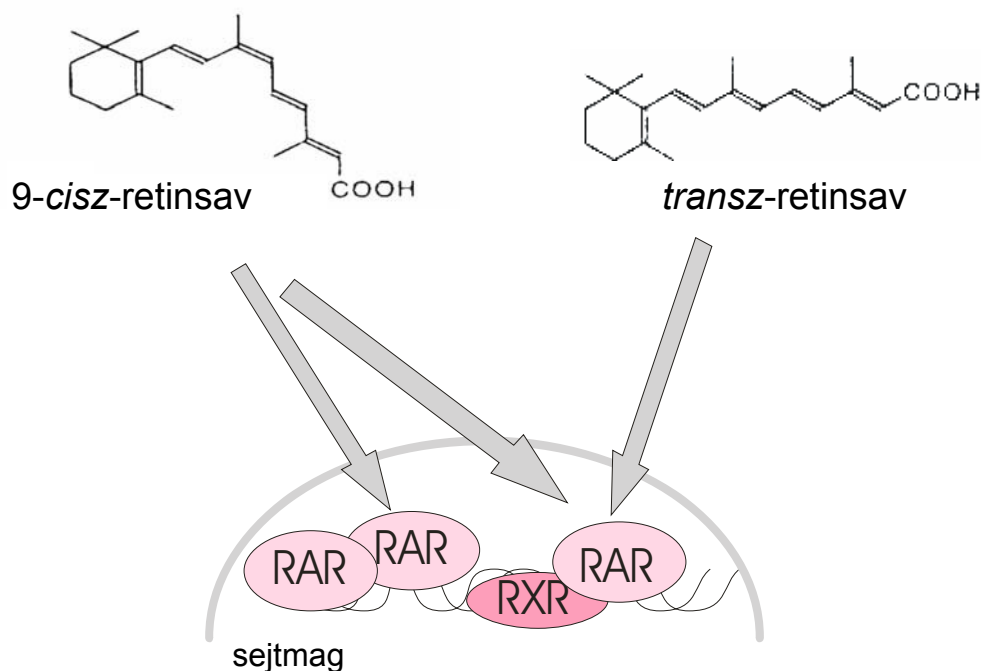
1.4 Aktiváció vagy apoptózis?

Az immunrendszer T sejtjeinek azon képessége, hogy ugyanazokat a jelátviteli utakat (TCR/CD3, B7-CD28 és IL-2-IL-2 receptor) használja mind a sejtaktiváció beindításához, mind annak fékezéséhez, leállításához, további érdekes kutatási irányokat jelöl ki. Annak kutatása, hogy a T limfocita a monovalens TSR a ligand megkötését követően miként képes a jelek integrált továbbítására és eltérő kimenetelű válaszok – effektor sejté történő differenciáció, anergia, memória sejtek kialakulása, AICD – szabályozására, a mai biokémiai és immunológiai kutatások egyik kulcskérdése (*Bongrand és mtsai, 1998; Germain és Stefanova, 1999*). Alapvető kérdésként merül fel az is, hogyan és mikor dönt a T sejt a lehetőségek között, hogyan tudja a sejtaktiváció két egymással ellentétes kimenetelét – az effektor és memória sejté történő differenciálódás folyamatát és a klonális expansió apoptózis útján történő korlátozását – egyensúlyban és kontroll alatt tartani.

Az aktivált T sejtek sorsa meghatározza effektor funkcióikat, az AICD mértékét és a memória kialakulását, amely folyamatok szabályozása a sejtes immunválasz tanulmányozásának még megoldatlan kérdései közé tartozik.

1.5 A természetes retinsavak

Az A vitamin fontos szerepet játszik az immunfunkciók szabályozásában (*Blomhoff és mtsai, 1994; Semba, 1998*). Régóta ismert, hogy az A vitamin hiánya immundeficienciát eredményez és számos fertőző betegséggel szemben érzékenyít (*Goodman, 1994*). A vitamin hiányos egerekben erőteljes tímusz és lép atrófiát figyeltek meg (*West és mtsai, 1989*), ezen állatokban mind a veleszületett, mind a szerzett immunitás elégtelenül működik (*Ross, 1992*). Az A vitamin pótlásával a deficiens állatokban és az A vitamin hiányos gyermekekben az immunfunkciók általánosan javíthatóak és bizonyos antigénekkal szemben az immunválasz fokozható (*Semba, 1994*). Ezeket az immunrendszerre gyakorolt hatásokat valószínűsíthetően az A vitamin aktív metabolitjai, a 9-*cisz*-retinsav (9CRA) és a *transz*-retinsav (TRA) váltják ki (1.4 ábra) (*Semba, 1998*). A 9CRA és a TRA T sejt hibridómákban (*Yang és mtsai, 1995; Bissonette és mtsai, 1995*), timocitákban (*Fésüs és mtsai, 1995*) és HIV vírussal fertőzött egyének perifériás vér limfocitáiban (*Yang és mtsai, 1995; Szondy és mtsai, 1998*) gátolják a TSR indukált apoptózist.



1.4 ábra. A természetes retinsavak és receptoraik

Az RAR és RXR retinoid receptorok homo- és heterodimerek formájában funkcionálnak. A 9-*cisz*-retinsav mindkét típusú receptorhoz tud kötődni, míg a *transz*-retinsav csak az RAR-hez.

Ezek a retinsav izomerek a retinsav receptorok két eltérő családjához tartozó receptorokhoz kötődnek, a retinsav receptorokhoz (RAR) és a retinoid X receptorokhoz (RXR). A 9CRA és a TRA ugyanolyan affinitással kötődik az RAR-ekhez, míg a 9CRA RXR-hez való kötődési képessége 50-szer magasabb, mint a TRA-é (Heyman és mtsai, 1992). Mivel a TRA fiziológiás koncentrációban nem köt az RXR receptorhoz (1.4 ábra), a nagyobb koncentrációinál megfigyelhető RXR aktiváció annak lehet a következménye, hogy a TRA 9CRA-vá alakul egy eddig még nem ismert mechanizmussal (Urbach és Rando, 1994). A retinoid receptorok retinsavak jelenlétében RAR/RXR heterodimerekként vagy RXR/RXR homodimerekként funkcionálnak (Zhang és mtsai, 1992) és a retinsav válaszoló elemmel rendelkező gének átíródását szabályozzák. Az RXR képes heterodimert képezni más, a szteroid/tiroid/retinoid receptor családba tartozó tagokkal, így a Nur77-tel is (Mangelsdorf és Evans, 1995). Továbbá a ligandum-kötött retinoid receptorok más transzkripció faktorok aktivitását is befolyásolhatják, valószínűleg direkt interakció útján (Salbert és mtsai, 1993; Perlmann és Jansson, 1995). A különböző RAR-ek (α , β és γ) és RXR-ek (α , β és γ) kifejeződése a különböző szövetekben és sejttípusokban eltérő és pleiotróp hatásokat fejtenek ki. Kimutatták, hogy a 9CRA hatékonyabban gátolja a TSR aktivációt követő apoptózist, mint a TRA (Bissonette és mtsai, 1995; Fésüs és mtsai, 1995), ami azt valószínűsíti, hogy az RXR-

ek szerepet játszanak a folyamatban. Mivel a Nur77 szerepét az apoptózis folyamatában igazolták, felmerült, hogy az RXR a Nur77-tel heterodimert formálva akadályozza annak az apoptózis során kifejtett hatását (*Okabe és Nawata, 1996*). Szelektív RXR agonista retinoidok önmagukban gátolták a TSR indukált sejthalált, de csak nagyobb koncentrációban, mint a 9CRA. RAR és RXR szelektív agonisták együttes alkalmazásakor az apoptózis teljes mértékben gátolható volt, olyan koncentrációknál is, ahol egyenként alkalmazva a retinoidokat a hatás nem volt kimutatható (*Bissonette és mtsai, 1995; Yang, és mtsai, 1995*). Ezek az adatok azt bizonyították, hogy nem csak az RXR, hanem az RAR receptorok is nélkülözhetetlenek az aktiváció indukálta sejthalál kivédésében.

1.6 A retinsavak szerepe az immunrendszer szabályozásában

A retinoidok immunrendszerre gyakorolt hatásának egyik módja a T sejt proliferáció befolyásolása. A szervezetben a TSR-en keresztül az APS által bemutatott antigén hatására aktiválódnak a T limfociták, ez és a kostimulátor jelek kiváltják a T sejtek IL-2 termelését, ami proliferációhoz vezet (*Robey és Allison, 1995*). Az IL-2 nagy affinitású receptora a citokin kötéseért felelős IL-2R α -láncból és két jelátvivő egységből, az IL-2R β -láncból és egy közös γ -láncból (γ_c) áll (*Theze és mtsai, 1996*). Az IL-2 által kiváltott sejtosztódás a Janus kinázok (Jak1 és Jak3) aktiválódását igényli, melyek az IL-2R β és a γ_c -láncához kapcsolódnak (*Gesbert és mtsai, 1998*). Az IL-2R β -lánc tirozinon foszforilálódik, ami a Shc adaptor protein és a Stat5 transzkripciós faktor számára dokkoló helyek kialakulását eredményezi. Az IL-2 jel itt két úton halad tovább, a Shc vagy a Stat5 közvetítette jelpályákon, melyek promotogén gének expresszióját eredményezik (*Friedmann és mtsai, 1996*). A mitogének általi sejtosztódás beindulásához a Stat5 foszforilációja és aktivációja szükséges. Az inaktivált Stat5a/Stat5b géneket hordozó egerek T sejtjei képtelenek az osztódásra és nem tudnak belépni a sejtciklusba (*Moriggl és mtsai, 1999*). Ez azt sugallja, hogy a Stat5 TSR-en keresztüli foszforilációja a mitogén indukálta T sejt aktiváció kritikus pontja (*Welte és mtsai, 1999*). A sejtciklusba lépés további foszforilációs eseményeket is igényel, például a retinoblasztoma tumor szupresszor gén (Rb) fehérje különböző mértékű foszforilációját. A retinoblasztoma foszforilációja különböző transzkripciós faktorok (pl. az E2F) komplexekből való kiszabadulását és így az S-fázis gének átíródását eredményezi (*Weinberg, 1995*). A sejtciklus regulációján túl a Stat5 bizonyítottan fokozza a Bcl-2 és a Bcl-X expresszióját, ezen a ponton is kapcsolódva a sejt túlélésének szabályozásához (*Lord és mtsai, 2000*).

Emellett egy IL-2 függő, de Jak3 független sejt túlélési út létezését is igazolták (*Kawahara és mtsai, 1995*).

A T sejtek poliklonális aktivációját *in vitro* körülmények között számos természetes és szintetikus komponenssel is elő lehet idézni, ilyenek a CD3 és a CD28 molekulák elleni antitestek, a concanavalin A és a fitohemagglutinin (PHA) növényi lektinek, valamint a forbol mirisztil acetát (*Abb és mtsai, 1979; Coligan és mtsai, 1992*). Ezen mitogéneket használva már viszonylag korán kimutatták, hogy a *transz*-retinsav fokozza az aktivált T limfociták aktivációját (*Abb és Deinhadt, 1980; Friedman és mtsai, 1993*). Az eredmények arra utaltak, hogy a retinoidok mind a mitogén kiváltotta IL-2 produkció fokozása (*Ertesvag és mtsai, 2002; Ballow és mtsai, 1997*), mind az IL-2 receptor megjelenése révén hatnak (*Jiang és mtsai, 1993*). Utóbbi feltételezés alapja az IL-2 koncentráció növekedésének az IL-2R α kifejeződését növelő parakrin hatás (*Ballow és mtsai, 1997*). Szintetikus RAR agonistákat használva bebizonyították, hogy a retinoidok hatásukat a retinoid receptorokon keresztül közvetítik (*Ertesvag és mtsai, 2002*).

1.7 A kísérleteink közvetlen alapjául szolgáló eredmények

Előzetes eredmények szerint az emberi influenza A vírus hemagglutinin prekursorának (HA0) alegységek közötti, az eltérő altípusokban konzervatív szakasza (a nem hasított molekula 317-341 aminosavak közötti régiója) beltenyésztett BALB/c egerekben a segítő T limfociták és az ellenanyag termelő B sejtek aktivációját egyaránt kiváltja (*Rajnavölgyi és mtsai, 1994; Nagy és mtsai, 1994*). A HA₃₁₇₋₃₄₁ (H1N1 altípus) régiót magában foglaló szintetikus peptiddel történő immunizálás a letális dózisú influenza vírussal szemben immunológiai védelmet vált ki. A protektív epitópot átfogó szintetikus peptid segítségével sejtfúziós módszerrel fejlesztettük ki az IP12-7 helper T sejt hibridómát (*Rajnavölgyi és mtsai, 1994*). A hibridóma által felismert epitópot - átlapoló szintetikus peptidek segítségével - az influenza vírus hemagglutinin HA1 alegységének C-terminális végén a HA₁₃₁₇₋₃₂₉ szakaszra lokalizáltuk (*Rajnavölgyi és mtsai, 1994; Horváth és mtsai, 1998*). Az IP12-7 T sejtek nemcsak a HA₃₁₇₋₃₄₁ régiót magában foglaló szintetikus peptidekkel, de az A/PR8/34 (H1N1) influenza vírussal előkezelt antigén prezentáló sejtekkel is aktiválhatók. Az influenza-specifikus IP12-7 T sejt finomspecificitásának tisztázására irányuló további vizsgálatainkban igazoltuk az I-E^d szerepét a peptid bemutatásban (*Rajnavölgyi és mtsai, 1997*) és feltérképeztük a peptid illeszkedését az MHC-II molekula kötőhelyébe (*Gogolák és mtsai, 2000*). Az epitóp minimális méretének meghatározásakor az

A20 és a 2PK3 APS-ek alkalmazása során eltérő eredményeket kaptunk, aminek alapján arra következtettünk, hogy a két B sejt eltérő hatásfokkal prezentálja az epitóp különböző méretű szakaszait.

Jelen kísérleteinkben ezt a részletesen jellemzett peptid-specifikus T-sejtet használtuk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a TSR-en keresztül érkező antigén-specifikus jel hogyan befolyásolja a T sejt választ, döntését az aktiváció által kiváltott effektor funkció és az aktiváció indukálta sejthalál között. Előzetes megfigyeléseink alapján továbbá azt is vizsgáltuk, hogy az APS milyen szerepet játszik a kiváltott T sejt válasz mennyiségi és minőségi sajátosságainak szabályozásában.

Megelőző kísérletek bizonyították, hogy a timociták $RAR\alpha$ és $RAR\gamma$ receptorral rendelkeznek (Szondy és mtsai, 1997) valamint hogy a két receptornak ellentétes hatása van a timociták aktiváció indukálta sejtpusztulása során. A $RAR\alpha$ ligandkötése gátolja a timociták negatív szelekcióját (Szondy és mtsai, 1998; Szegezdi és mtsai, 2003), míg az $RAR\gamma$ aktivációja timocitákban apoptózist indít el (Szondy és mtsai, 1997) és segíti a negatív szelekciós utat (Szondy és mtsai, 1998). Bizonyítást nyert, hogy az $RAR\alpha$ és az $RAR\gamma$ receptorokhoz kötődő specifikus ligandok az apoptotikus FasL fehérje sejtfelszíni megjelenésének szabályozása révén, a sejthalál indukálásán keresztül fejtik ki ellentétes hatásukat. A folyamatot a Nur77 transzkripció faktor működése befolyásolja (Tóth és mtsai, 1999).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A $CD4^+$ peptid-specifikus effektor/memória T sejt hibridóma (IP12-7) felhasználásával érzékeny módszert állítottunk be az antigén-specifikus aktiváció mértékének és következményeinek tanulmányozására, amit a dolgozatban összefoglalt munkában is alkalmaztunk (*Gogolák és mtsai, 1996; Réthi és mtsai, 2002*). Jelen vizsgálatainkban az IP12-7 T sejteket különböző hivatásos APS-ek jelenlétében, eltérő dózisban alkalmazott peptid antigénnel aktiváltuk és vizsgáltuk a kiváltott T sejt válasz mértékét és következményeit. Kísérleteink során arra a központi kérdésre kerestük a választ, hogy a T sejtek aktivációját követően milyen tényezők befolyásolják a T limfocita aktiválódás mértékét, az effektor funkciók kiváltását és hatásfokát valamint a sejthalál út bekapcsolását. A kérdés tanulmányozása során szisztematikusan követtük végig a TSR antigén-specifikus stimulációját követő eseményeket és kinetikai vizsgálatokban határoztuk meg az azonnali, korai, középtávú és késői jelátviteli eseményeket. Ebből a célból mértük az APS és a T sejt között kialakuló sejtkapcsolatok intenzitását, a T sejtekben kiváltott intracelluláris kalcium szint növekedését, az IL-2 citokin termelés kiváltásában szerepet játszó transzkripciós faktorok aktiválódását, az IL-2 és egyéb citokinek mennyiségét, az aktivált T sejtek membránján végbemenő változásokat valamint a citokin és az apoptotikus gének aktiválódását. Az *in vivo* antigén-specifikus T sejt válasz különböző szakaszainak megfelelően különböző APS-ek jelenlétében vizsgáltuk a bemutatott antigén mennyiségének, a T sejt–APS kölcsönhatás időtartamának valamint az antigén bemutató sejt egyedi sajátságainak a hatását.

A perifériás T limfociták aktivációja az antigén stimuláció mellett egyéb környezeti tényezőkkel is befolyásolható. Ennek vizsgálatára az $RAR\alpha$ és $RAR\gamma$ retinoid receptorok hatását mértük a T sejt osztódásra és az aktiváció indukálta apoptózis kiváltására.

A kísérletek tervezésekor az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. A különböző eredetű, fenotípusú és funkcionális sajátságú APS-ek milyen hatékonysággal képesek az IP12-7 T sejt aktiválására?
2. Magyarázható-e az APS-ek különböző antigén bemutató képessége az eltérő adhéziós sajátságokkal és/vagy a kostimuláló és egyéb sejtfelszíni molekulák megjelenésével?

3. Meghatározhatóak-e molekuláris szinten az aktiváció indukálta effektor funkciókat illetve apoptózist eldöntő feltételek?
4. Hogyan befolyásolják a különböző receptorokkal kölcsönhatásba lépő természetes és szintetikus retinsavak a perifériás T limfociták osztódását és aktiváció indukálta apoptózisát?
5. Milyen jelátviteli utak játszanak szerepet a retinoid receptorok által közvetített folyamatokban?

Eredményeink azt igazolták, hogy az általunk kifejlesztett *in vitro* kísérleti rendszerben az antigén-specifikus T sejt válasz az *in vivo* körülményekhez hasonló, kontrollált feltételek mellett vizsgálható. A T sejt aktiváció mértékét az antigén dózis mellett az APS is érzékenyen szabályozza. Aktiváció indukálta apoptózis az effektor/memória T sejtekben csak nagy peptid dózis és hatékony APS jelenlétében váltható ki. Ezek a feltételek a dendritikus sejtek és antigén-specifikus memória B sejtek, mint a leghatékonyabb APS-ek kiemelt szerepét igazolják a T sejt memória kialakulásában és fenntartásában. A természetes és mesterséges retinsavak a receptor természetétől függően segíthetik vagy gátolhatják a T sejt aktivációt illetve apoptózist.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Peptid specifikus T sejt hibridóma aktivációjának és sejthalálának vizsgálata

3.1.1 A kísérletekben alkalmazott sejtek és a sejtenyésztés feltételei

Munkánk során az Intézetünkben előállított influenza vírus specifikus monoklonális egér T sejt hibridómát használtunk, mint CD4⁺ effektor/memória sejtet (IP12-7). Ez a sejtvonal az influenza vírus hemagglutinin HA₃₁₇₋₃₄₁ peptidszakaszával előimmunizált és ezt követően az A/PR/8/34 humán influenza A vírussal oltott Balb/c egerből származik (*Rajnavölgyi és mtsai, 1997; Horváth és mtsai, 1998; Buzás és mtsai, 1995*). Az A3.4C6 T sejt hibridóma a bálna spermium mioglobin 132-145 peptid régiójára specifikus T sejt receptort hordozza. Az 5/4E8 T sejt hibridóma humán és egér porc proteoglikánra specifikus.

A 2PK3, az A20 valamint a TA3 sejtvonalakat használtuk antigén prezentáló sejtekként. A primer APS-eket C57.B1/6 (H-2^b) egerekből lépéből, steril körülmények között elhomogenizálva azokat frissen izoláltuk. A B sejt blasztokat 20 µg/ml LPS-sel aktiváltuk két napon át. Három nappal a 100µg Concanavalin A-val történő intraperitoneális oltás után a peritoneális üregből kimosott sejteket tenyészedényben 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk, a nem kitapadó sejteket eltávolítottuk, a kitapadt makrofágokat egy napig IFNγ-val aktivált lépsejt kultúra felülúszójával aktiváltuk. A csontvelői dendritikus sejteket granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktort (GM-CSF) tartalmazó transzfektált X63 sejtek 10%-os felülúszójában tenyésztettük 7 napig (*Chen és mtsai, 1994*).

A CTLL-2 és a WEHI-164-13 sejtvonalakat használtuk a citokin kimutatási bioesszéekben.

A kísérleteinkben használt sejtvonalak:

Név:	Jellemzés:	Hivatkozás:
IP12-7	egér T sejt hibridóma	<i>Rajnavölgyi és mtsai, 1994</i>
A3.4C6	egér T sejt hibridóma	<i>Jay Berzofsky (NIH, Bethesda, Maryland, USA)</i>

5/4E8	egér T sejt hibridóma	<i>Espevik és Nissen-Meyer, 1986</i>
2PK3	egér B sejt limfóma	ATCC TIB 203 <i>Spencer és mtsai, 1992</i>
A20.11	egér B sejt limfóma	ATCC TIB 208 <i>Glimcher és mtsai, 1982</i>
TA3	egér B sejt hibridóma	<i>Glimcher és mtsai, 1982</i>
CTLL-2	egér citotoxikus T sejt, IL-2 függő	ATCC TIB 214
WEHI-164-13	egér fibroszarkóma, TNF érzékeny	<i>Espevik és Nissen-Meyer, 1986</i>

Az alkalmazott sejtvonalak fenntartását és a funkcionális vizsgálatokat 2 mM L-glutamint, 1 mM nátrium-piruvátot 5×10^{-5} M 2-merkaptóetanolt, antibiotikumot és 10 v/v% magzati borjú szérumot (FCS) tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban 37 °C-on, 5% CO₂ és >90% páratartalom mellett végeztük.

3.1.2 Szintetikus peptid

A kísérletek során felhasznált, az influenza vírus hemagglutinin adott szakaszát reprezentáló szintetikus peptidet kollaborációs munka keretében Dr. Tóth Gábor (SZTE Orvosi Vegytani Intézet, Szeged) állította elő. A szintézist követően a peptid tisztítása HPLC módszerrel ($\geq 95\%$), jellemzése aminosav analízis és tömeg spektroszkópia felhasználásával történt (*Hollósi és mtsai, 1992; Holly és mtsai, 1993; Tóth és mtsai, 1993; Majer és mtsai, 1995*). A szintetikus peptid (317-329 H1) szekvenciája: VTGLRNIPSIQSR

3.1.3 A sejtvonalak jellemzése és a sejtfelszíni molekulák vizsgálata áramlási citofluorimetriával

A sejteket áramlási citometriához használt csövekbe osztottuk 5×10^5 sejtszámban. A mintákat FACS pufferrel mostuk (PBS, 0.5% FCS, 0.05% azid), a sejtekhez hozzáadtuk a specifikus fluorescensen jelölt ellenanyag megfelelő hígításait. A csöveket fél órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk, majd újra mostuk. Ezután a csöveket fél ml pufferrel feltöltöttük. Az elpusztult, aspecifikusan festődő sejteket a mérés során fényszórási sajátságaik alapján vagy a sérült sejtek membránján áthatolni képes DNS festék (1 µg/ml propidium jodid) alkalmazásával különítettük el.

A fluoreszcencia intenzitásokat Becton Dickinson FACScan készülékkel mértük. A mért értékeket a Becton Dickinson CellQuest programmal értékeltük ki.

A vizsgált mintákat egyes esetekben az átlagos fluoreszcencia intenzitás értékével, máskor a fluoreszcencia intenzitás növekedésére jellemző mesterséges egységgel jellemeztük. A mesterséges egység számítása a következő módon történt: a vizsgált minta fluoreszcencia intenzitásának átlagértékét elosztottuk a kontroll ellenanyaggal történt jelöléssel kapott átlagos fluoreszcencia intenzitás értékével.

Kísérleteinkhez az alábbi ellenanyagokat használtuk:

Megnevezés:	Tulajdonság:	Hivatkozás:
I-A ^d , I-E ^{d,k} specifikus M5/114	patkány IgG2B	ATCC TIB 120
I-E ^d specifikus 14.4.4S	egér IgG2a	
egér B7-1 (CD86) specifikus 1610A	hörsög IgG	<i>Razi-Wolf és mtsai, 1992</i>
egér B7-2 (CD80) specifikus GL1	patkány IgG2a	<i>Hatcjóhcock és mtsai, 1993</i>
egér LFA-1α (CD11a) specifikus M17/4.4.11.9	patkány IgG2a	ATCC TIB 217
egér ICAM-1 specifikus BE29G1	patkány IgG2a	ATCC HB 233
egér CD40 specifikus FGK45.4	patkány IgG2a	
egér HSA specifikus M1/69.16.11	patkány IgG2b	ATCC TIB 125
egér CD44 specifikus III/9	patkány IgG2a	
FITC-konjugált egér CD3 specifikus 145-2C11	hörsög IgG	
egér Fas specifikus Jo2	hörsög IgG	
FITC-konjugált hörsög IgG specifikus ellenanyag	kecske (Fab') ₂	
FITC-konjugált patkány IgG specifikus ellenanyag	kecske IgG	
PE-konjugált egér IgG specifikus ellenanyag	nyúl IgG (Fab') ₂	DAKO R0439
FITC-konjugált egér CD3 specifikus 145-2C11	hörsög IgG	
FITC-konjugált egér Fas specifikus Jo2	hörsög IgG	
PE-konjugált egér B220 specifikus RA3-6B2	patkány IgG2a	
PE-konjugált egér Cd69 specifikus H1.2F3	hörsög IgG	
egér FasL specifikus ellenanyag	nyúl IgG	
FITC-konjugált hörsög IgG	kecske (Fab') ₂	
FITC-konjugált nyúl IgG	kecske IgG	

3.1.4 Funkcionális vizsgálatok

3.1.4.1 Alloreakció kiváltása

Az allogén APSeket (2PK3 és A20) előzetesen tapasztalati úton beállított sugárdózissal kezeltük, majd 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre osztottuk szét (2×10^5 sejt/minta). Ehhez adtuk hozzá a C57.B1/6 (H-2^b) egér lépéből készített lépsejt szuszpenziót (2×10^6 sejt/1 ml minta). A felülúszókból 24 óra elteltével mintákat vettünk és az IL-2 citokin tartalmukat meghatároztuk (lásd „A sejt kultúra felülúszók citokin tartalmának meghatározása bioesszék segítségével” című fejezetet).

3.1.4.2 A T sejt hibridómák antigén specifikus aktiválódásának mérése citokin termelés alapján

A letapadó APS-eket sejtkaparóval mechanikusan távolítottuk el a tenyésztőedény felületéről. 5×10^4 T hibridóma sejtet megegyező számú autológ APS jelenlétében különböző hígítású specifikus antigénnel vagy szintetikus peptiddel 250 μ l térfogatú sejt kultúra médiumban 16-24 órán át inkubáltuk. Egyes kísérletekben az APS-eket 2×10^6 /ml koncentrációban 3 órán keresztül előinkubáltuk a megfelelő koncentrációjú peptiddel, majd 5×10^4 T limfocitát különböző mennyiségű, peptiddel előkezelt APS jelenlétében tenyésztettünk a különböző kísérletekben megadott feltételek szerint. Az antigén specifikus aktiválást követően a citokinek meghatározására a sejt kultúrák felülúszóiból 75 μ l-eket új mikrotitráló lemezekre vittünk át. A mintákat -20°C -on fagyasztva tároltuk.

3.1.5 A sejt kultúra felülúszók citokin tartalmának meghatározása bioesszék segítségével

3.1.5.1 A felülúszók IL-2 tartalmának meghatározása

A sejtkultúrák felülúszójának IL-2 tartalmát a CTLL-2 nevű IL-2 függő sejtvonal felhasználásával határoztuk meg. Ezeket a sejteket egy héten háromszor 5 ml friss 200U/ml IL-2 tartalmú tápfolyadék jelenlétében tenyésztettük. A sejtek az IL-2 adását követő második napon kerültek az IL-2 detektálására alkalmas „éhező” állapotba. A sejteket mostuk, majd az ismeretlen koncentrációjú IL-2-t tartalmazó felülúszó mintákhoz (75 µl) adtuk 2×10^4 sejt szám mennyiségben. Csak üres médiumhoz (negatív kontroll) és meghatározott koncentrációjú IL-2-t tartalmazó sejtenyészítő folyadékhoz (0,02-200U/ml, pozitív kontroll) is adtunk indikátor sejteket a citokin tartalom pontos meghatározásának céljából. Az élő CTLL-2 sejtek számát a tiazoli kék (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólium bromid, MTT) festék átalakításának mértéke alapján határoztuk meg. Ennek alapja, hogy az élő sejtek aktív mitokondriális dehidrogenázai a sárga tetrazólium vegyületet kék színű kristályos formázán terméké alakítják át. A keletkezett termék relatív mennyiségét detergens hozzáadásával feloldva 570 nm hullámhosszon, fotometriásan határoztuk meg.

Az ismeretlen minták IL-2 tartalmát a standard görbe felvételét követően annak lineáris szakaszára történő egyenes illesztés alapján regressziós analízissel számítottuk. Az ábrákon szereplő értékeket a negatív kontroll értékére normalizáltuk.

3.1.5.2 A felülúszók TNF tartalmának meghatározása

A sejtkultúra felülúszók TNF tartalmát a citokin sejtpusztító hatására érzékeny WEHI-164-13 sejtvonal felhasználásával végeztük. A letapadó jelző sejtekből foszfát pufferrel elkészített 10 mM EDTA oldat segítségével sejtuszpenziót készítettünk, majd 100 µl tápfolyadékban kultúránként 3×10^4 sejtet osztottunk szét. A sejtek további osztódását 4 µg/ml emetin hozzáadásával gátoltuk. Az élő és elpusztult sejtek arányát 24 óra elteltével MTT festék hozzáadásával határoztuk meg. Kontrollként ismert koncentrációban humán TNF- α -t tartalmazó mintákat és üres tápfolyadékot is használtunk. Az IL-2 tartalom meghatározásánál említettekhez hasonlóan standard TNF hígításokból számítottuk az ismeretlen TNF koncentrációjú felülúszók citokin tartalmát (U/ml).

3.1.6 A T sejtek antigén specifikus aktivációjának vizsgálata az intracelluláris Ca^{++} koncentráció emelkedésének mérése alapján

3.1.6.1 A minták előkészítése

10^7 T hibridóma sejtet megmostunk, majd 10 ml-es U-aljú csőben 1 ml 5 μ M Fluo-3 AM-et és 100 μ g/ml pluronic F-127-et tartalmazó tápfolyadékban szuszpendáltuk fel. Ezt az elegyet egy órán keresztül 37 °C-os vízfürdőben, folyamatos rázás mellett inkubáltuk. A csöveket ezek után meleg tápfolyadékkal töltöttük fel (9 ml) és az inkubálás további egy órán keresztül folytattuk. A sejteket mostuk és a megfelelő sejtszámra beállítva tápfolyadékban, jégen tároltuk maximum néhány órán keresztül, felhasználásukig.

Az APS-eket 3 órán át 37 °C-on 1 ml tápfolyadékban inkubáltuk 50-100 μ M koncentrációjú peptid antigén jelenlétében, majd a megfelelő sejtszámra beállítva jégen tartottuk felhasználásig.

3.6.1.2 Az intracelluláris Ca^{++} koncentráció mérése

A Fluo-3-mal feltöltött T sejteket az antigénnel előinkubált APS-ekkel megfelelő arányban, áramlásos citofluorimetriához használt csőben 1 ml tápfolyadékban összekevertük. A csöveket 37 °C-os vízfürdőben 5 percig inkubáltuk, majd áramlásos citométerrel 20 másodpercen keresztül mértük az aktiválatlan T sejtek fluoreszcencia intenzitását. Ezután a sejteket a csövekben asztali mikrocentrifugával 30 másodperc alatt sejtsomókba ülepítettük a T sejt–APS kontaktusok gyors kialakulása céljából, majd rázógéppel újra szuszpenzióba vittük és folytattuk az aktivált T limfociták fluoreszcencia intenzitásának mérését.

Az elpusztult sejteket a hagyományos áramlási citometriás méréseknél említett módon, DNS festődésük alapján zártuk ki a mérésből.

3.1.7 Az aktiváció indukálta sejthalál vizsgálata áramlási citofluorimetriával

A sejteket FACS pufferben mostuk, majd 100 μ l Annexin pufferben vettük föl (10 mM HEPES, 140 mM nátrium-klorid, 2.5 mM kalcium-klorid) és hozzájuk adtunk 2 μ l Annexin V-FITC festéket. A mintákat 20 percig szobahőn, sötétben inkubáltuk, 1 μ g/ 10^6 sejt propidium jodidot és 400 μ l Annexin puffert adtunk a csövekhez. A mintákat 30 percen belül FACScan készülékkel lemértük. A kiértékelést Becton Dickinson CellQuest programmal végeztük.

3.1.8 A T sejt–B sejt kapcsolatok mérése

10^6 IP12-7 T sejtet Oregon Green 488 intracelluláris fluoreszcens festékkel töltöttünk fel $1\ \mu\text{M}$ -os végkoncentrációt alkalmazva $1\ \text{ml}$ szérummentes tápfolyadékban. A sejteket $37\ ^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 30 percig, mostuk és újabb 30 percig inkubáltuk. 10^5 peptiddel töltött vagy töltetlen APS-hez adtunk ugyanennyi T sejtet és egy óra hosszat inkubáltuk a mintákat. A T sejt–B sejt komplexeket Olympus fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Mintánként 100 sejtet megszámlálva a komplexek arányát százalékosan fejeztük ki.

3.1.9 A sejtek mágneses elválasztása

A T és B sejteket mágneses sejtszeparáló berendezéssel választottuk el egymástól azon vizsgálatok előtt, amelyeknél erre szükség volt (EMSA és RT-PCR).

Az egyenlő számú T és B sejtet tartalmazó mintákat FACS pufferben mostuk. Ezután a sejteket biotin-konjugált anti-B220 mononukleáris antitesttel ($5\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ puffer) jelöltük, és $10\ \mu\text{l}$ streptavidin mikrogönggyel inkubáltuk 20 percen át. A jelölési lépések nem befolyásolták az APC-k T sejt aktiváló hatásait. $500\ \mu\text{l}$ MACS pufferben történő szuszpendálás után a B sejteket VarioMACS készülékben választottuk el a T sejtektől, LS oszlopot használva. A T limfociták tisztasága 95-99%-os volt, melyet FACS analízissel ellenőriztünk.

3.1.10 Transzkripció faktorok DNS kötő képességének vizsgálata

A $20\ \mu\text{M}$ -os peptiddel feltöltött APS-eket megegyező számú IP12-7 T sejttel asztali centrifugán összefugáltuk és 15 vagy 45 percig $37\ ^\circ\text{C}$ -on tartottuk őket. $25\ \text{mM}$ nátrium-fluoridot, $5\ \text{mM}$ EDTA-t és $0.1\ \text{mM}$ nátrium-ortovanadátot tartalmazó PBS-ben felvéve a sejteket mágneses szeparációval elválasztottuk egymástól (lásd 3.1.9).

A sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben, mely $25\ \text{mM}$ nátrium-fluoridot és $0.1\ \text{mM}$ nátrium-ortovanadátot tartalmazott, majd fölvertük $400\ \mu\text{l}$ frissen elkészített A pufferben ($10\ \text{mM}$ HEPES pH 7.9, $10\ \text{mM}$ KCl, $0.1\ \text{mM}$ EDTA pH 8.0, $0.1\ \text{mM}$ EGTA pH 8.0, $1\ \text{mM}$ dithiothreitol (DTT), $0.5\ \text{mM}$ fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ antipain és $1\ \text{mM}$ nátrium ortovanadát). A sejtszuszenziót 15 percig jégen tartottuk, majd $5\ \mu\text{l}$ 10%-os NP-40-et adtunk a mintákhoz. A sejteket 5 percig $4\ ^\circ\text{C}$ -on

800 rpm-mel centrifugáltuk. A magi pelletet 30-50 µl C pufferben (10 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M nátrium klorid, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml antipain és 0.1 mM nátrium ortovanadát) vettük föl és 15 percig 4 °C-on, állandó rázogatós mellett inkubáltuk. A magi törmelékét 10 perces 16,000 g fordulaton, 4 °C-on végzett fugálással távolítottuk el. A fehérje koncentrációt Lowry esszével mértük. A transzkripció faktorokat EMSA-val analizáltuk (*Van Parijs és Abbas, 1998*), mintánként 4 µg fehérjét alkalmazva.

3.1.11 Génexpressziós vizsgálatok RT-PCR-rel

3.1.11.1 RNS nyérése

A különböző minták T sejtjeiből mágneses szeparálást követően TRI reagenssel RNS-t izoláltunk. 5×10^6 sejthez 500 µl Tri reagenst mértünk és 23 G-s fecskendő tüvel homogenizáltunk. A mintákhoz 50 µl kloroformot adtunk, a fecskendővel újra homogenizáltunk, majd 5 percig jégen inkubáltunk. Ezt követően 12,000 rpm fordulaton, 4 °C-on 15 percig centrifugáltunk. A felső, átlátszó vizes fázist új Eppendorf csőbe pipettáztuk és egyenlő térfogat jéghideg izopropanollal kiegészítettük. A mintákat vortexeltül és 10 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 12,000 rpm fordulaton, 4 °C-on 10 percig centrifugáltunk. A felülúszó leszívása után a pellethez 300 µl jéghideg 70 %-os etanolt adtunk és az RNS-t 7,500 rpm-mel 4 °C-on 8 percig fugáltuk. Az RNS-t 20 µl DEPC kezelt vízben feloldottuk. Az RNS koncentrációkat 100x-os hígításban GeneQuant készülékkel határoztuk meg.

3.1.11.2 Reverz transzkripció

5 µg totál RNS-ből Superscript II reverz transzkriptáz és 1 µg/ml oligo(dT) primer segítségével 42 °C-on történő 1 órás inkubációval cDNS-t gyártottunk. A különböző gének expressziójának vizsgálatát a cdNS-ek 1-1 µl-éből végeztük Taq polimeráz és génspecifikus primerek fölhasználásával. A cDNS koncentrációkat a β-aktin génexpresszió segítségével állítottuk be. A PCR-ekhez az alábbi primer párokat és hőmérsékleti profilokat használtuk:

Gén:	Szenz primer (5'-3'):	Antiszenz primer (5'-3'):	Hőmérsékleti profil:
β-aktin	GCGCTCAGGAGGAGCA ATG	GGCTACAGCTTCACCACCA C	20 x (94 °C-45s, 53 °C-30s, 72 °C-30s)

IL-2	TTCAAGCTCCACTTCAA GCTCTA	GACAGAAGGCTATCCATCT CC	30 x (94°C-45 s, 57°C-30 s, 72°C-30s)
TNF-β/ LT-α	TCACCTTGTGGGTACC CCAGCAA	ATACACAGACTTCTGCGCA C	30 x (94°C-45 s, 57°C-30 s, 72°C-30s)
nur77	TTCATCCTCCGCCTGGC ATACC	GTCCGAAGCTCAGGCAGTT TGC	30 x (94°C-45 s, 57°C-30 s, 72°C-30s)
fasL	CAGCAGTGCCACTTCAT CTTGG	TTCACTCCAGAGATCAGAG CGG	30 x (94°C-45 s, 57°C-30 s, 72°C-30s)
bcl-2	TTCGGTGTAATAAAG ACAC	CTCAAAGAAGGCCACAATC C	30 x (94°C-45 s, 57°C-30 s, 72°C-30s)
flip	GTCACATGACATAACC CAGATTGT	GTACAGACTGCTCTCCCAA GCACT	30 x (94°C-45 s, 57°C-30 s, 72°C-30s)

A termékeket 1.5 %-os agaróz gélen futtatuk meg.

3.2 Retinoidok hatásának vizsgálata a nur77 gén kifejeződésére és transzaktivációs képességére

3.2.1 Retinoidok, kötődési vizsgálatok és transzaktivációs esszé

A kísérleteinkben alkalmazott retinoidokat a Galdrema Research Development cég szintetizálta és előző kísérleteinkben karakterizáltuk (Szondy és mtsai, 1997; Szondy és mtsai, 1998) a CD2781 kivételével, melyet máshol írtak le (Kagechika és mtsai, 1988).

A retinoidok három retinoid receptor (RAR α , β és γ) altípushoz mutatott disszociációs konstansát (K_d értékét) kompetíciós kötődési vizsgálatokban határozták meg [3H]-CD367-et, mint radioaktívan jelzett referencia retinoidot használva (Martin és mtsai, 1992). Mivel radioaktívan jelzett retinoid X receptor (RXR) specifikus ligand nem állt rendelkezésre, a különböző retinoidok ezen receptorhoz való kötődését funkcionális transzaktivációs esszével határozták meg (Delescluse és mtsai, 1990). Az RAR α , RAR β és az RAR γ szelektív anyagok transzaktivációs képességét az előzőekben leírtak szerint vizsgálták (Brand és mtsai, 1998). Kísérleteinkben az alább felsorolt szintetikus retinoidokat alkalmaztuk:

Név:	Kémiai felépítés:	Hivatkozás:
CD336	{4-[(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil) karboxamido-] benzoésav}	Kagechika és mtsai, 1988
CD367		
CD437	{6-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]-2-naftonsav}	Charpentier és mtsai, 1995
CD2019	{6-[3-(1-metilciklohexil)-4-metoxifenil]-2-naftonsav}	Kagechika és mtsai, 1988

CD2081	{2-hidroxi-4-[5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidronaftalén-2-karboxamido] benzoészav}	<i>Charpentier és Bernardon, 1993</i>
CD2314	[2-(5,6,7,8-tetrahidrometil-2-antril)-4- tiofénkarbolsav]	<i>Charpentier és Bernardon, 1993</i>
CD2325	{4-[(E)-2-(3-(1-adamantil)-4-hidrofénil) profénil] benzoészav}	<i>Nagy és mtsai, 1995</i>
CD2503		
CD2624		
CD2665		
CD2781	{[E]-4-[1-hidroxi-1-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftil)-2-propénil] benzoészav}	<i>Kagechika és mtsai, 1988</i>

3.2.2 A kísérletekben alkalmazott sejtek és a T limfociták tisztítása

IP12-7 T sejt hibridóma sejtek (lásd „Anyagok és módszerek” I.). A humán Jurkat sejt vonalat Marie-Lise Gougeon (Pasteur Intézet, Párizs) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani. A mononukleáris sejteket egészséges humán vérből nyertük gradiens centrifugálással. A T limfocitákat mágneses sejtseparálást alkalmazva tisztítottuk az egyéb sejtektől Pán T sejt izolációs kitet alkalmazva. A CD3⁺ sejtek aránya >90% volt. A különböző RAR-ek humán T sejteken történő expressziójának vizsgálatához a T limfocitákat a gradiens centrifugálást követően FITC-konjugált anti-CD3 antitest használatával pozitívan szelektáltuk. A T sejtek tisztasága >98% volt.

3.2.3 A sejtenyésztés feltételei

A T sejteket 10⁵/0.2 ml kezdeti koncentrációban 10% hőinaktivált FCS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban 37 °C-on, 5% CO₂ és >90% páratartalom mellett végeztük. A sejtosztódás beindításához a tisztított T sejtekhez fitohemagglutinint (PHA) adtunk retinoidok jelenlétében vagy azok nélkül. Néhány kísérletben, amikor a retinoidoknak az IL-2 útvonalban betöltött szerepét vizsgáltuk, 5x10⁵ sejt/ml kezdeti koncentrációt használva a proliferációt 5 µg/ml PHA és 30 U/ml IL-2 citokin alkalmazásával váltottuk ki. 2 nappal később a halott sejteket gradiens centrifugálással szeparáltuk és az élőket 30 U/ml IL-2-t tartalmazó tápfolyadékban tartottuk további 4 napig. 8 órával a sejtenyésztő folyadék cseréjét követően a retinoidokat újra

hozzáadtuk a mintákhoz. A Stat5a és b foszforilációját, valamint a DNS szintézist a megadott időpontokban vizsgáltuk. A kontroll mintákhoz minden esetben a retinoid koncentrációknak megfelelő dimetil-szulfoxidot (DMSO 0.5%) adtunk. Mivel a retinoidok fényérzékenyek, a velük végzett kísérleteket vörös fényben végeztük.

3.2.4 A DNS szintézis vizsgálata

A DNS szintézis mértékét 96 lyukú sejtenyésző lemezekben vizsgáltuk, a sejteket $10^5/0.2$ ml kezdeti koncentrációban alkalmazva. PHA vagy IL-2 adását követően a megadott időpontokban $2 \mu\text{Ci}$ [^3H]-timidint adtunk a mintákhoz. 12 óra elteltével a sejteket szűrőpapírra szüreteltük és Beckman C5 7500 folyadék szcintillációs készülékben mértük a beütésszámokat.

3.2.5 Az apoptózis vizsgálata

A CD4^+ és a CD8^+ T sejtek apoptózisának megfigyelését 7-amino-aktinomicin-D (7-AAD) módszerrel végeztük (*Schmid és mtsai, 1994*). A módszer alapja, hogy a halott sejtek felveszik a 7-AAD festéket a membrán permeabilitásuk megnövekedése következtében. A festék jelenlétét áramlási citofluoriméterrel detektáltuk FITC-konjugált anti-CD4 és anti-CD8 monoklonális ellenanyagok jelenlétében. A sejteket 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben (FACS puffer) 4°C -on inkubáltuk 30 percig az anti-CD4 vagy az anti-CD8 ellenanyagokkal, majd mostuk és további 20 percig 4°C -on tartottuk őket $20 \mu\text{g/ml}$ 7-AAD hozzáadásával. A sejteket ezután fixáltuk 1% paraformaldehidet és $20 \mu\text{g/ml}$ nem-fluoreszens aktinomicin D-t tartalmazó FACS pufferben. A fluoreszcencia intenzitásokat FACScan áramlási citométerrel detektáltuk, az eredményeket a CellQuest programmal értékeltük ki.

3.2.6 Sejtciklus analízis

A sejtciklusban lévő sejtek százalékos arányát meghatározandó, propidium jodidos DNS festést végeztünk. A T sejteket 70%-os jéghideg ethanolban 5 percig fixáltuk, mostuk, majd $100 \mu\text{g/ml}$ RN-áz tartalmazó PBS-ben ($100 \mu\text{l}$) felvettük és 10 percig szobahőn inkubáltuk. Ezután $400 \mu\text{l}$ $50 \mu\text{g/ml}$ propidium jodidot tartalmazó PBS-t adtunk a sejtekhez. Az

apoptózist szenvedő valamint a G₀-G₁, S vagy G₂-M fázisban lévő sejteket DNS tartalmuk alapján áramlási citofluorimetriával határoztuk meg.

3.2.7 Az interleukin-2 termelés vizsgálata

10⁵ sejt/ml T limfocitát tenyésztettünk a DNS szintézis vizsgálatoknak megfelelő körülmények között (lásd 3.2.4). A megadott időpontokban a mintákat centrifugáltuk és a felülúszókat –70 °C-on tároltuk. Az IL-2 mennyiségeket a BIOTRAK humán IL-2 ELISA kittel határoztuk meg, követve a gyártó utasításait.

3.2.8 Az IL-2 receptor sejtfelszíni megjelenésének detektálása

10⁵ sejt/ml T limfocitát tenyésztettünk a DNS szintézis vizsgálatoknak megfelelő körülmények között (lásd 3.2.4). 12 óra elteltével a sejteket FACS pufferben vettük föl 5x10⁶/ml sejt koncentrációban. A limfocitákat 1 µg/ml PE-konjugált anti-CD25 (IL-2Rα lánc) vagy anti-IgG1 antitest jelenlétében 1 órát 4 °C-on inkubáltuk. A sejteket mostuk és a fluorescens jeleket FACScan áramlási citométerrel detektáltuk, az eredményeket a CellQuest programmal értékeltük ki.

3.2.9 Fehérjetartalom kimutatása

Mintánként 5x10⁶ sejtet használva teljes sejt lizátumokat készítettünk RIPA pufferben (30 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM nátrium ortovanadát, 2 mM nátrium pirofoszfát, 50 mM fenil-arsin-oxid, 0.1% SDS, 0.5% deoxikolát, 1% Triton X-100 és 35 µg/ml PMSF háromszor desztillált vízben) 20 percig jégen. A fehérje tartalmakat BCA kittel mértük. Az egyenlő koncentrációjú sejt-lizátumokat 2 x Laemmli pufferben (*Laemmli, 1970*) 5 percig 95 °C-on tartottuk. A mintákat 7.5% (foszfo-retinoblasztóma – pRB) vagy 12% (Bcl-2) redukáló poliakrilamid gélen futtattuk meg és a fehérjéket Immobilon-P membránokra vittük át. 10% zsírmentes tejport és 0.1% Tween 20-at tartalmazó TBST-ben való blokkolás után a membránokat 1 µg/ml antitestet (anti-humán Bcl-2 – David Y. Mason, John Radcliff Hospital, Oxford, UK, anti-JAK3 mAb - Robert Kirken, Texas University Medical School, Houston, Texas vagy anti-pRB - Pharmingen) tartalmazó TBST-ben

inkubáltuk, majd torna-peroxidáz (HRP)-kötött második antitestet adtunk hozzájuk. A fehérjéket ECL módszerrel röntgenfilmen tettük láthatóvá.

3.2.10 Stat5a és b fehérjék foszforilációjának vizsgálata

A sejteket (10^8 sejt/ml) 1% Triton X-100-at tartalmazó lízis pufferben oldottuk föl, majd centrifugálással tisztítottuk (*Kirken és mtsai, 1999*). Az immunprecipitációhoz a felülúszókat humán Stat5a és Stat5b ellenes poliklonális nyúl antiszérummal inkubáltuk (*Nagy és mtsai, 2002*). A membránokat 1 μ g/ml egér anti-foszfotirozinnal vagy anti-Stat5a és Stat5b antitestekkel reagáltattuk (*Kirken és mtsai, 1999*).

3.2.11 T sejtek aktiválása

Anti-CD3 antitestet (145-2C11 klón) a Pharmingentől (San Diego, CA), az anti-humán CD3 antitestet (IoT3) az Immunotech-től (Marseille, Franciaország) vásároltuk. Az anti-CD3 antitesteket 1 μ g/ml koncentrációban, sejtenyésző platehez kitapasztva használtuk, a sejteket 6 óra hosszat aktiváltuk. A retinoidokat pedig az alábbiak szerint adagoltuk: TRA: 10 μ M, 9CRA: 100 nM, CD336: 300 nM, CD437: 300 nM, CD2019: 10 μ M.

3.2.12 A nur77 génexpresszió vizsgálata

Az IP12-7 és a Jurkat sejtek mintáiból az „Anyagok és módszerek” I. fejezetben említettek szerint RNS-t nyertünk, cDNS-sé írtuk át, β -aktin primerekkel beállítottuk a koncentrációjukat és RT-PCR-rel detektáltuk a nur77 gén kifejeződését. A Jurkat sejtekhez az alábbi nur77 primereket használtuk: szenz: 5'-GCACAACTACCAGCAACACAG-3' és antiszenz: 5'-CGCATCTGGCAACTAGACAC-3'. A PCR termékeket 1.5%-os agaróz gélen futtatuk meg.

3.2.13 Tranziens transzfekciós esszé

2×10^6 Jurkat sejtet transzfektáltunk 10 μ g Tk-NBREx3-Luc reporter plazmiddal (Ron Evans, Salk Intézet) elektroporációval. A halott sejteket Histopaque centrifugálással távolítottuk el. Az inkubációs idő leteltével luciferáz aktivitást mértünk Promega Luciferáz Kit segítségével. A luminescenciát 10 másodpercig detektáltuk és az enzim aktivitást relatív fényegység

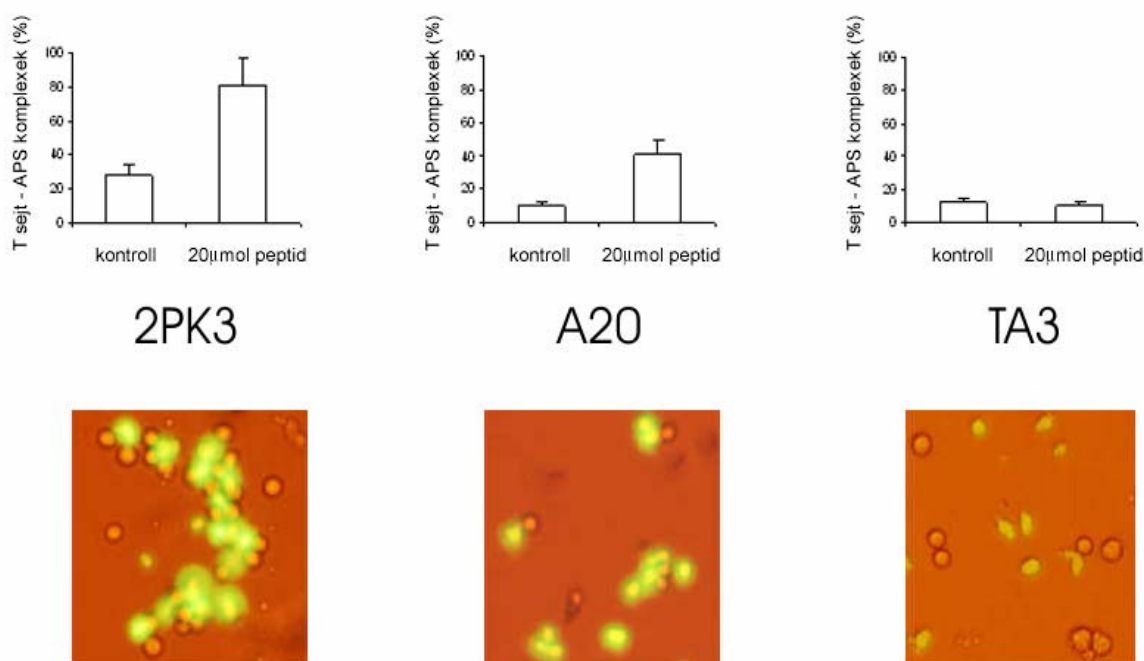
(RLU)/másodperc/mg fehérje egységben adtuk meg. Kontrollként nem kezelt mintákat alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az antigén-specifikus T sejt aktiváció és az aktiváció indukálta sejthalál vizsgálata peptid specifikus T sejt hibridómákkal

4.1.1 A T sejt–B sejt kapcsolat erőssége függ az adott APS egyedi sajátosságaitól

A T sejt–B sejt kölcsönhatás első fázisában a sejtek adhéziós molekuláik segítségével szoros kontaktusba kerülnek egymással. Első kísérleteinkben a sejtek adhéziós képességének vizsgálatával tanulmányoztuk az IP12-7 T sejt hibridóma különböző APS-ekkel kialakított kapcsolatát. E célból a T sejt és az APS közötti sejt-kölcsönhatás mértékét specifikus peptid jelenlétében és annak hiányában fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A T limfocitákat Oregon Green festékkel jelöltük és a vizuálisan értékelt T sejt–B sejt kapcsolatok számát a teljes sejtszám százalékában adtuk meg.



4.1.1 ábra. Az IP12-7 T sejtek és a különböző APS-ek adhéziója

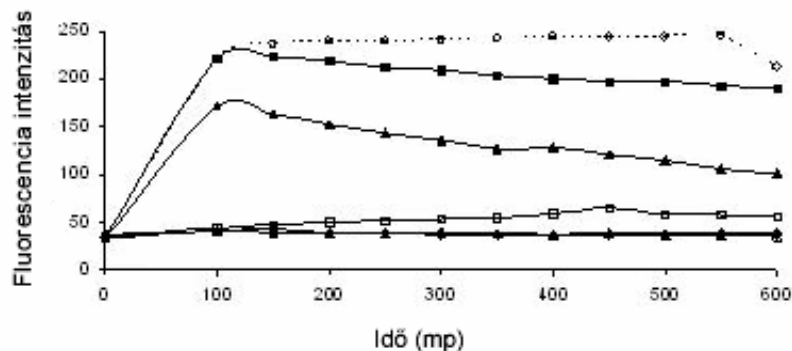
Az IP12-7 T hibridóma sejteket Oregon Green fluoreszcens festékkel jelöltük és 2PK3, A20 valamint TA3 B sejtekkel tenyésztettük együtt 4 óra hosszat. Az APS-eket peptid nélkül vagy 20 μM HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel előzetesen feltöltve adtuk a T sejtekhez. A T sejt–B sejt kölcsönhatásokat fluoreszcens mikroszkóppal figyeltük meg és számoltuk.

Amint az a **4.1.1** ábrán látható, a három különböző APS eltérő mértékben alakított ki kapcsolatot az IP12-7 sejtekkel. A spontán adhézió – amelyet a peptiddel nem feltöltött B sejtek jelenlétében mértünk – a 2PK3 APS esetében nagyobb volt (28%), mint a másik két APS esetén (~10%). A HA₃₁₇₋₃₂₉ peptid és a 2PK3 APS jelenlétében mért T sejt–B sejt komplexek aránya 82%-ra növekedett, A20 B sejt esetén ez 40% volt, míg a TA3 prezentáló sejt jelenlétében nem volt kimutatható különbség a spontán adhézióhoz képest.

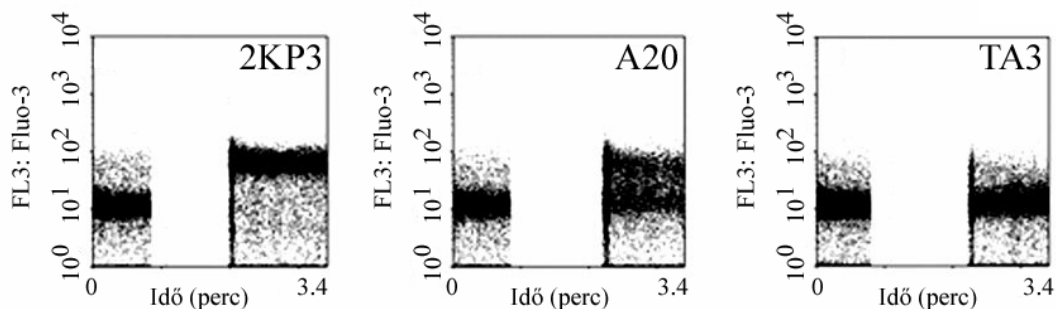
4.1.2 A peptiddel stimulált T sejtek korai jelátviteli eseményei függenek az APS fenotípus sajátosságaitól

Annak vizsgálatára, hogy a különböző adhéziós képességgel rendelkező B sejt APS-ek hogyan befolyásolják a T limfociták antigén-specifikus aktivációját, a továbbiakban egy korai jelátviteli eseményt, az intracelluláris kalcium szint ($[Ca^{++}]_{ic}$) növekedésének mértékét vizsgáltuk eltérő APS-ek jelenlétében, a korábbiakban leírt módszerrel (*Réthy és mtsai, 2002*). A Fluo-3-mal jelölt T sejteket a peptiddel előzetesen feltöltött B sejtekkel együtt centrifugáltuk, majd áramlási citofluoriméterrel mértük az $[Ca^{++}]_{ic}$ változását.

A



B

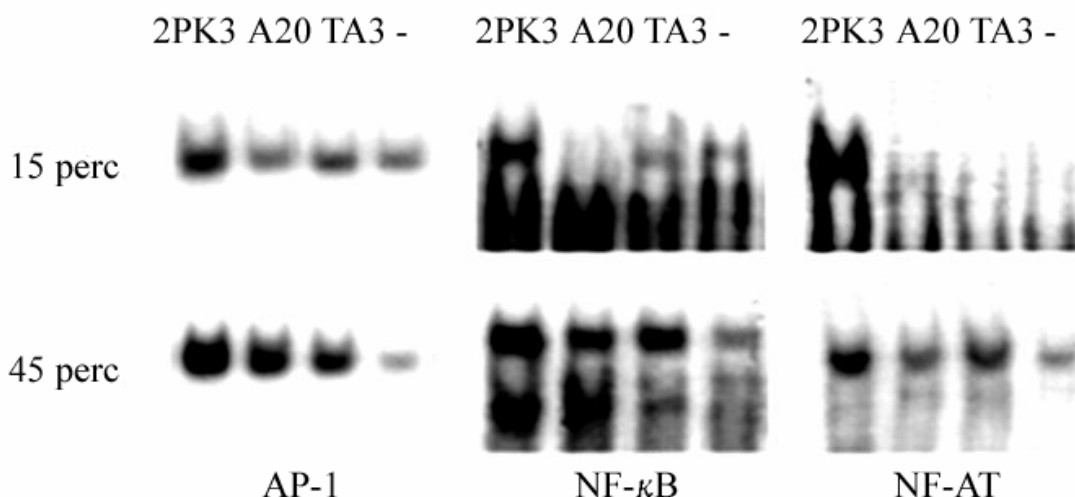


4.1.2 ábra. A különböző APS-ek hatása az intracelluláris kalcium szint emelkedésére

A Fluo-3 jelölt IP12-7 sejtek kalcium jelét peptid jelenléte nélkül (üres szimbólumok) és 20 μM HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel előkezelt 2PK3 (■), A20 (▲) és TA3(◆) APS-ek jelenlétében mértük. Pozitív kontrollként ionomycinnel aktivált T sejteket használtunk (o). A kalcium szint emelkedését a T sejt populáció átlag értékeivel jellemeztük (A). A peptiddel előzetesen feltöltött APS-ekkel stimulált T sejtekben a kalcium jel változásait a populáció egyedi sejtjeinek szintjén is összehasonlítottuk (B).

Amint azt a 4.1.2A és B ábrán bemutatjuk, a specifikus peptid jelenléte nélkülözhetetlen a mérhető kalcium jel kiváltásában. ($[\text{Ca}^{++}]_{\text{ic}}$) emelkedést a 2PK3 és az A20 APS-ek jelenlétében tapasztaltunk, míg a TA3 sejtek által történő peptid bemutatás nem eredményezett mérhető kalcium jel változást. Az APS-ek eltérő T sejt aktiváló képességéből eredő $[\text{Ca}^{++}]_{\text{ic}}$ szint különbségek a T sejtekben különböző (0.1-100 μM) peptid dózisok jelenlétében is kimutathatóak voltak, a kalcium jel mértéke egyenes arányban nőtt a növekvő peptid koncentrációval (nem bemutatott adatok).

A T sejt antigén specifikus stimulációjakor számos transzkripciós faktor aktiválódik. Annak tanulmányozására, hogy ebben a folyamatokban milyen szerepet játszanak a különböző funkcionális aktivitású APS-ek, az IP12-7 T sejt hibridóma sejtekben EMSA módszerrel vizsgáltuk az NF- κB , AP-1 és az NF-AT DNS-hez való kötődési képességét. A vizsgálat eredményei a 4.1.3 ábrán láthatóak.



4.1.3 ábra. Az eltérő funkcionális aktivitású APS-ek hatása a T sejtekben aktiválódó transzkripciós faktorok DNS-kötő képességére

A T sejt aktivációt 20 μM HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel előzetesen feltöltött 2PK3, A20 és TA3 APS-ekkel végeztük. A rövid aktivációt követően az APS-eket biotinált anti-B220 ellenanyagok és streptavidin vasszemcsék segítségével mágneses módszerrel elválasztottuk, majd az aktivált T limfocitákból nyert magi extraktumot vizsgáltunk. Az NF- κB , az AP-1 és az NF-AT

transzkripciós faktorok DNS kötő képességét 15 és 45 perces antigén-specifikus aktivációt követően EMSA módszerrel mutattuk ki.

Eredményeink szerint 15 perc elteltével csak a 2PK3 APS jelenlétében tapasztaltuk a vizsgált transzkripciós faktorok aktivációját, míg az A20 és a TA3 prezentáló sejteknek 45 percnyi peptid specifikus aktivációra volt szükségük, hogy a T sejtben az NF- κ B, AP-1 és az NF-AT transzkripciós faktorok DNS kötő képességét ki tudjuk mutatni. Ebben a vizsgálati időpontban is a 2PK3 APS által előidézett transzkripciós faktor aktiváció bizonyult a leghatékonyabbnak. Eredményeink azt mutatják, hogy az APS egyedi sajátosságai az NF- κ B, AP-1 és az NF-AT molekulák aktivációjának nemcsak az erősségét, hanem a kinetikáját is befolyásolják. Adataink azt is jelzik, hogy a 2PK3, az A20 és a TA3 APS-ek eltérő funkcionális aktivitással vesznek részt a produktív T sejt-B sejt kapcsolatok kialakításában, aminek révén képesek a kalcium jel erősségét és időtartamát valamint a transzkripciós faktorok aktivitását befolyásolni. További vizsgálataink arra irányultak, hogy tisztázzuk az APS-ek eltérő funkcionális aktivitásáért felelős mechanizmusokat.

4.1.3 A B sejt APS-ek eltérő T sejt aktiváló képességének molekuláris háttere

Annak vizsgálatára, hogy a peptid antigének MHC-II molekulákhoz történő kötődése az APS-ek felszínén vagy intracellulárisan megy végbe, további kísérleteinkben a különböző APS-eket rövid ideig előinkubáltuk a HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel, majd kalcium jelet mértünk a fent leírtak szerint. 2PK3 APS jelenlétében a T sejtek 52%-a azonnal aktiválódott, míg a másik két APS jelenlétében azonnali választ nem tudtunk kimutatni. 1–6 perc peptiddel való előinkubáció elegendő volt ahhoz, hogy a 2PK3 sejtek a T limfociták ~77%-át aktiválják, amely megközelíti azt az arányt, amelyet a 2PK3 sejtek jelenlétében 3 órás T sejt aktivációt követően mértünk (4.1.1 táblázat). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a leghatékonyabb T sejt aktiváló képességgel rendelkező 2PK3 APS felszínén üres MHC molekulák jelennek meg, amelyekhez a peptid antigén nagy affinitással kötődik.

	Peptid jelenlét (perc)			
	0*	1	6	180
Antigén prezentáló sejt	Aktivált T sejtek %-a			
2PK3	52.45	62.37	77.02	87.75
A20	0	0	1.5	53.26
TA3	0	0	0.5	1

4.1.1 táblázat. Az IP12-7 sejtekben mért intracelluláris kalcium szint változásai a különböző APS-ek eltérő idejű peptiddel történő feltöltésének függvényében

Az APS-eket 20 μ M HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel a megadott ideig 37°C-on előzetesen inkubáltuk, majd előmelegített, Fluo-3 festékkel jelölt T sejtekkel 1:1 arányban összekevertük, rövid centrifugálással ülepítettük, óvatosan fellazítottuk és a fluoreszcencia intenzitást mértük.

A "0 perces peptid jelenlét" azt jelenti, hogy a peptidet közvetlenül a centrifugálás előtt adtuk az APS és a T sejt keverékéhez.

Korábban bizonyítottuk, hogy a 2PK3 és az A20 B sejtek hasonló hatékonysággal képesek a HA₃₁₇₋₃₂₉ peptid bemutatására az I-E^d molekulákhoz kapcsolódva (*Rajnavölgyi és mtsai, 1997*). Mostani eredményeink arra utalnak, hogy a 2PK3 APS esetén nincs szükség a peptid internalizációjára és az újonnan képződő intracelluláris MHC-II molekulák feltöltésére, hanem a peptid az „üres” vagy a gyengén kötődő peptidekkel feltöltött MHC-II molekulákhoz kötődik.

Az eltérő T sejt aktiválási képesség hátterét tanulmányozva a továbbiakban az APS-ek felszínén megjelenő és az antigén prezentációban, valamint a T limfociták aktiválásában fontos szerepet betöltő egyéb molekulák megjelenését is vizsgáltuk áramlási citofluoriméter segítségével. Az MHC-II, valamint egyes kostimuláló és adhézios sejtfelszíni molekulák megjelenését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 2PK3 sejt nagyobb számban fejezi ki a B7-1, B7-2, CD40 és CD44 molekulákat, mint az A20 vagy a TA3 sejtek (**4.1.2 táblázat**). Mindezek alapján a 2PK3 APS kimagasló funkcionális aktivitásáért a sejtfelszínen megjelenő üres MHC-II molekulák valamint az adhézios és kostimuláló molekulák nagy denzitása tehető felelőssé.

	Fluoreszcencia intenzitás növekedés		
	2PK3	A20	TA3
MHC-II	45.26	83.97	51.76
B7-1	19.03	7.40	3.36
B7-2	7.8	3.37	1.96
LFA-1	5.9	5.29	2.59
ICAM-1	11.34	8.16	7.11
CD40	19.30	8.66	5.22
CD44	3.85	1.11	1.08
Fas	1.36	7.38	3.45

4.1.2 táblázat. Az MHC-II, kostimuláló és adhézións molekulák sejtfelszíni megjelenése a különböző APS-eken

A fluoreszcencia intenzitás növekedésének mértékét az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint határoztuk meg és a megfelelő izotípus kontrollhoz viszonyítva adtuk meg.

Eredményeinket összevetve megállapítható, hogy az erősebb T sejt kapcsolat kialakítására képes és sejtfelszíni molekulái révén aktívabban kommunikáló APS a T limfocita stimulációban is a leghatékonyabbank bizonyult. Az APS-ek antigén prezentáló képességében nem találtunk jelentős különbséget a három APS között (nem bemutatott adatok).

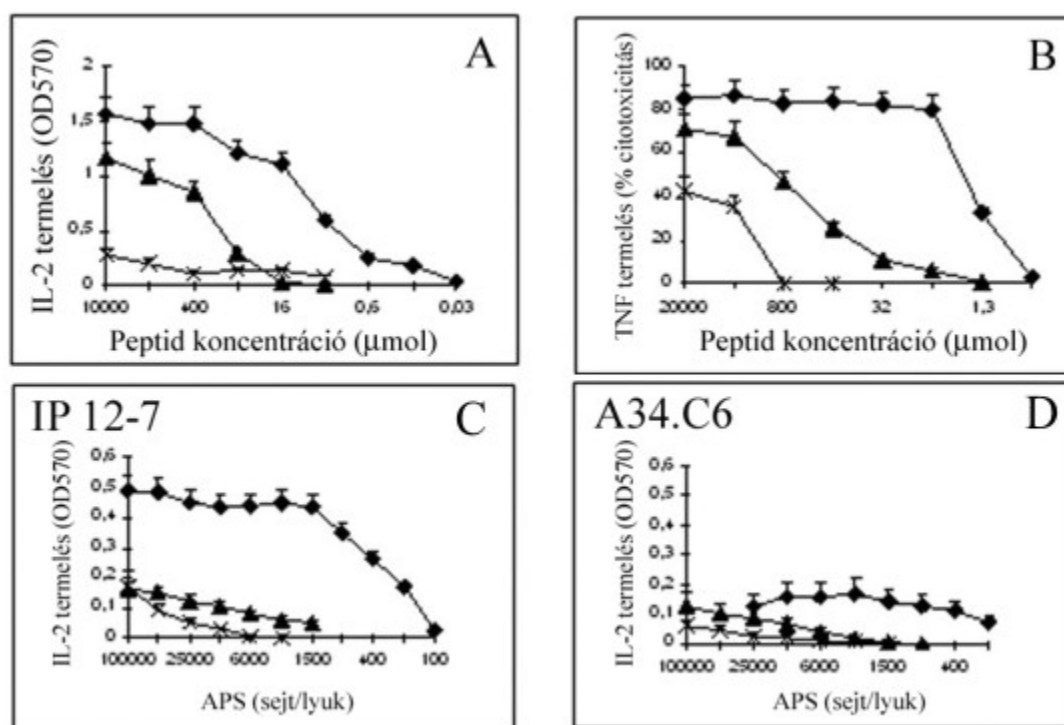
4.1.4 A T sejtek citokin termelő képességét az antigén prezentáló sejt egyedi sajátságai és a bemutatott peptid koncentrációja is befolyásolja

Az IP12-7 T sejt hibridóma antigén-specifikus stimulációját követően IL-2, IFN γ és TNF citokineket termel. A citokin szekréció a T limfocita aktivációt követő késői válasz, amelynek kinetikáját az IL-2 és a TNF- β termelés mRNS és fehérje szintű mérésével követtünk nyomon.

4.1.4.1 Az aktivált T sejtek által kifejezett oldott citokinek termelésének vizsgálata funkcionális vizsgálatokkal

Ezekben a vizsgálatokban különböző peptid specificitású T sejt hibridómákat azonos számú B sejt APS-ek és növekvő peptid koncentráció jelenlétében tenyésztettünk és a termelt

citokinek mennyiségét a sejt kultúra felülészókban határoztuk meg (4.1.4A és B ábra). Más kísérletekben a peptiddel előzetesen feltöltött APS-ek számát, és ezáltal a T sejt:APS arányt változtattuk (4.1.4C és D ábra).



4.1.4 ábra. Az APS szám és a peptid koncentráció hatása a T sejtek citokin termelésére 2×10^4 IP12-7 hibridóma T sejtet 2×10^4 2PK3 (♦), A20 (▲) vagy TA3 (x) APS-sel, csökkenő HA₃₁₇₋₃₂₉ peptid koncentráció mellett tenyésztettünk (A,B). A különböző APS-eket előzetesen 20 μM HA₃₁₇₋₃₂₉ (IP12-7 T sejt) vagy WMG₁₃₂₋₁₄₅ peptiddel (A34.C6 T sejt) peptiddel töltöttük fel és változó számban mértük hozzá a megfelelő T sejtekhez. A T sejt aktivációt 24 órás tenyésztést követően IL-2 (A,C,D) vagy a TNF termelés (B) alapján határoztuk meg.

Az eltérő APS-ek jelenlétében az IP21-7 (4.1.4A-C ábra), az A3.4C6 (4.1.4D ábra) és az 5/4E8 (nem bemutatott adatok) T sejt hibridómák antigén-specifikus aktivációja különböző mértékű volt. Leghatékonyabb APS-nek a 2PK3 B sejt bizonyult, amely alacsony sejt szám (<200) és peptid koncentráció (1-0.5 nM) mellett is aktiválta a bemért 2×10^4 T sejtet (4.1.4A-D ábra). Az A20 APS is stimulálta a T limfocitákat, de csak 50-100-szoros peptid dózis és APS szám esetén (4.1.4A-D ábra). A TA3 APS nem csak az IP12-7 (4.1.4A-C ábra), de az A3.4C6 (4.1.4D ábra), és a H1-10-9-7 hibridóma (amely egy másik I-E^d korlátozással működő influenza-specifikus T sejt hibridóma, nem bemutatott adatok) esetén is csak kis mértékű T sejt aktivációt váltott ki. Az autoreaktív I-A^d specifikus 5/4E8 T sejteket az I-E^d molekulák nem hordozó 2PK3 sejtek nem, de az A20 aktiválta (nem bemutatott adatok).

Eredményeink az mutatják, hogy az eltérő funkcionális sajátságokkal rendelkező APS-ek különböző erősséggel aktiválják a különböző specificitású és MHC-II korlátozással működő T sejteket, ami a T limfocitákban eltérő mértékű citokin termelést vált ki. A különböző APS-ek egymáshoz viszonyított aktivitása a vizsgált T sejtek esetében állandó volt, ami arra enged következtetni, hogy az aktivitásbeli különbségek az APS-ek egyedi sajátságaiból adódnak. A T sejt stimuláció mértéke és a termelt citokinek mennyisége a bemutatásra kerülő peptid mennyiségétől is jelentősen függött. A bemutatott adatok továbbá az IL-2 és a TNF- β citokinek összehangolt termelődését is bizonyítják.

A különböző antigén bemutató sejtek jelenlétében kiváltott sejt aktiváció minőségi és mennyiségi eltérései az antigén specifikus T sejt aktiváció kinetikai vizsgálatát is lehetővé tették. Az IP12-7 T sejtek által termelt IL-2 megjelenésének kinetikáját 2PK3 és A20 APS-ek jelenlétében magas (70 μ M) és optimális (7 μ M) peptid koncentráció mellett is vizsgáltuk. A 2PK3 APS-sel való tenyésztés után 2 órával a T sejtek már kimutatható mennyiségű IL-2 citokint termeltek, míg A20 jelenlétében ehhez hosszabb időre volt szükség. A szecernált IL-2 mennyisége 24 óráig tartó tenyésztést követően sem érte el a 2PK3 APS jelenlétében mért IL-2 mennyiségét (nem bemutatott adatok). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az eltérő APS-ekkel történő T sejt aktiváció a T sejt válasz mértékét, az effektor funkciók kinetikáját és intenzitását egyaránt befolyásolja. A gyors IL-2 termelés a hatékony T sejt–B sejt kontaktus gyors kialakulásával valamint a korai jelátviteli mechanizmusok erőteljes beindulásával magyarázhatóak.

Annak vizsgálatára, hogy az általunk alkalmazott B sejt vonalak T sejt aktiváló képessége mennyire felel meg az *in vivo* működő APS-ek aktivitásának, az A20 és a 2PK3 sejtek által kiváltott IL-2 szekréció mértékét összehasonlítottuk különböző, BALB/c egérből származó primer sejtek T sejt aktiváló képességével. Ezekben a vizsgálatokban APS-ként egér lép sejteket, LPS-sel stimulált B sejt blasztokat és *in vivo* aktivált peritoneális makrofágokat valamint csontvelő eredetű dendritikus sejteket használtunk az IP12-7 és az A3.4C6 hibridóma sejtek aktiválására. Az APS-eket optimális koncentrációjú peptiddel előkezeltük, majd növekvő számban adtuk a T sejtekhez. Az IL-2 termelést kiváltó képességük szerint meghatároztuk a maximális citokin termelődéséhez szükséges minimális sejtszámot. Eredményeinket a **4.1.3** táblázatban foglaltuk össze.

	Az optimális IL-2 termeléshez szükséges APS (x10 ⁻³)	
Antigén prezentáló sejt	T sejt	
	IP12-7	A3.4C6
Csontvelői eredetű DS-ek	1.5	nem mért
Peritoneális makrofágok	10	15
LPS-aktivált B sejtek	60	250
Lépsejtek	250	1000
A20	50	100
2PK3	1.5	3

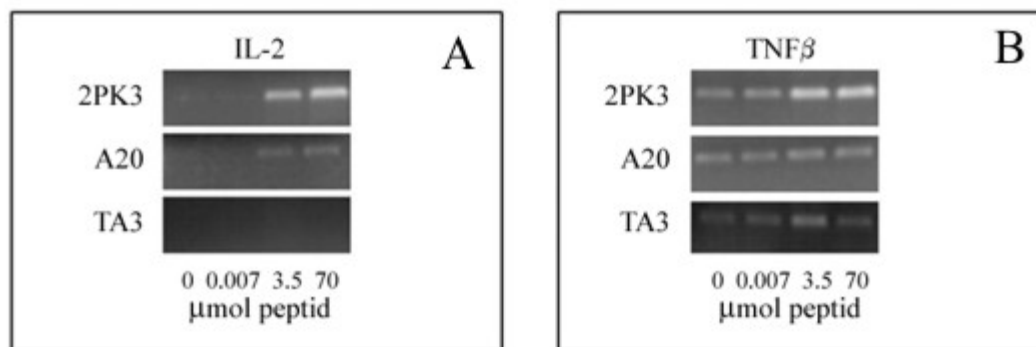
4.1.3 táblázat. Primer APS-ek és B sejtek T sejt aktivációban mutatott relatív hatékonysága

Az APS-eket 20 µM HA₃₁₇₋₃₂₉ (IP12-7 T sejt) vagy WMG₁₃₂₋₁₄₅ (A3.4C6 T sejt) peptidekkel 3 órán át 37°C-on előzetesen töltöttük fel. A peptidfelesleget mosással eltávolítottuk és az APS-eket csökkenő számban 2x10⁴ T sejtrel együtt tenyésztettünk. A termelt IL-2 mennyiségét 24 óra tenyésztés után mértük a sejtek felülcszójából. A maximális IL-2 termeléshez szükséges legkevesebb APS számát három független kísérleti eredményből kapott titrálási görbéből határoztuk meg.

A 2PK3 B sejtek T sejt aktiváló képessége a dendritikus sejtekével, míg az A20 B limfocitáké az LPS-sel stimulált B sejtekével mutatkozott hasonlónak. Eredményeink azt mutatják, hogy a különböző funkcionális aktivitással rendelkező B sejt APS-ek az *in vivo* körülmények között működő primer APS-ekhez mérhető T sejt aktiváló képességgel rendelkeznek.

4.1.4.2 A T sejt aktiváció nyomonkövetése a citokinek génexpressziójának vizsgálatával

A citokin termelés génszintű vizsgálatához a különböző APS-ek jelenlétében eltérő peptid dózisokkal aktivált T sejt hibridómákból RNS-t izoláltunk és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) határoztuk meg az adott citokin génjének transzkripció aktivitását. A cDNS-ek megfelelő koncentrációit a β-aktin szintek alapján állítottuk be (4.1.8 ábra). Eredményeink, melyeket a 4.1.5 ábrán láthatóak, azt mutatják, hogy az IL-2 és a TNF-β gén aktivációja függ az APS egyedi sajátosságaitól és az alkalmazott peptid koncentrációjától.



4.1.5 ábra. A citokin gének kifejeződése különböző APS-ek jelenlétében eltérő peptid dózisok mellett aktivált T sejtekben

5×10^6 T sejtet a HA₃₁₇₋₃₂₉ peptid növekvő koncentrációjával előzetesen feltöltött APS-ekkel 4 órán át tenyésztettünk és a T limfocitákban RT-PCR-rel vizsgáltuk a génexpressziót. A cDNS minták koncentrációját β -aktin cDNS alapján állítottuk be (lásd 4.1.8 ábra).

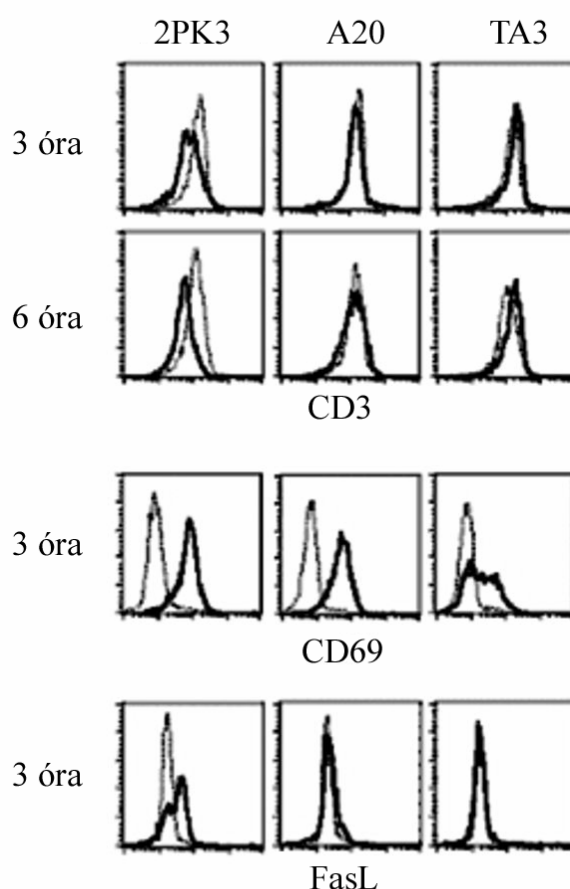
Az IL-2 gén expresszióját nagyon alacsony (7 nM) peptid koncentráció mellett, valamint a TA3 APS alkalmazásakor nem tudtuk kimutatni. Erőteljes aktivációt tapasztaltunk, ha a 2PK3 és az A20 APS-ek jelenlétében magasabb peptid dózisokat (3.5 és 70 μ M) alkalmaztunk. A peptid dózis és az IL-2 gén expressziójának mértéke egyenes arányosságot mutatott.

Ezekkel a vizsgálatokkal sikerült igazolni azt is, hogy az aktivált IP12-7 T sejtek milyen típusú TNF-et termelnek. Specifikus primerekkel végzett RT-PCR vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a T hibridóma anti-CD3 és anti-CD28 hatására (nem bemutatott adatok), valamint 2PK3 APS és 3.5 vagy 70 μ M HA₃₁₇₋₃₂₉ peptid jelenlétében történő T sejt stimulációkor TNF- β (limfotoxin- α) citokint termel. A leghatékonyabb T limfocita aktiválást és ennek megfelelően a legnagyobb mértékű IL-2 citokin gén expressziót a 2PK3 APS és magas peptid koncentráció esetén mutattunk ki. Az A20 és TA3 prezentáló sejtek alkalmazásakor a citokin gének kisebb mértékű aktivációja volt megfigyelhető.

RT-PCR módszerrel kapott eredményeink összhangban vannak a citokinek biológiai aktivitásán alapuló bioesszék segítségével kapott eredményekkel és azokkal a megelőző eredményeinkkel, miszerint kísérleti rendszerünkben a leghatékonyabb antigén prezentáló sejt a 2PK3 B limfocita.

4.1.5 A különböző APS-ekből származó jelek meghatározzák a T sejt differenciáltsági fokát és további sorsát

Az $\alpha\beta$ láncokból álló TSR – a specifikus ligandum megkötését követően – a sejtfelszíni TSR számbeli csökkenését vonja maga után, aminek fontos szabályozó szerepe van a jelátviteli folyamatokban. A CD69 az aktivált T és B sejteken megjelenő korai aktivációs molekula, a később megjelenő FasL fehérje az aktiváció indukálta T limfocita apoptózisban kulcsfontosságú. Az eltérő sajátságú APS-ek T limfociták sejtfelszíni molekuláinak megjelenésére gyakorolt hatását vizsgálva a CD3, a CD69 és a FasL molekulák mennyiségének aktivációt követő változásait követtük nyomon áramlási citofluorimetriával. A T sejteket 3 órán át peptiddel előzetesen feltöltött APS-ekkel aktiváltuk és a T sejteken mértük ezeknek a molekuláknak a kifejeződését. Adatainkat a 4.1.6 ábrán foglaltuk össze.



4.1.6 ábra. A T sejt receptor és az aktivációs molekulák kifejeződése az aktivált IP12-7 T sejtek felszínén

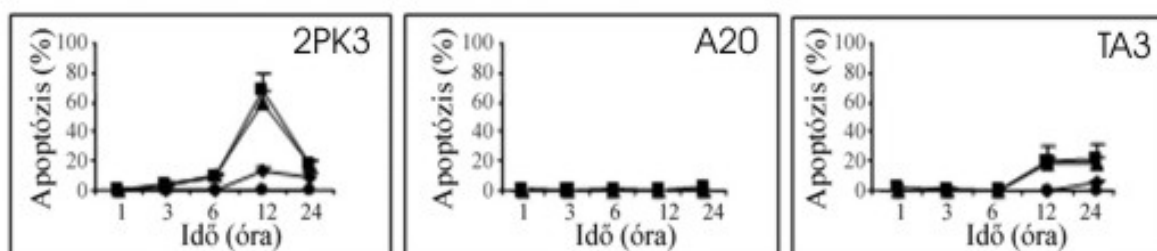
Az IP12-7 T sejteket 20 μ M HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel előinkubált APS-ekkel tenyésztettük 3 és 6 órán át. A B sejteket B220-FITC ellenanyaggal jelöltük és a T sejteken kifejeződő aktivációs molekulákat fikoeritrinnel jelölt anti-CD69, anti-FasL és anti-CD3 antitestekkel detektáltuk.

A 2PK3 B sejtek a TSR-ek nagy mértékű internalizációját eredményezték, A20 APS alkalmazásakor ez a jelenség erősen csökkent. A TA3 APS nem váltotta ki a TSR-ek sejtfelszíni expressziójának változását. Ugyanezen mintákban a CD69 molekula jelentős, bár

eltérő mennyiségű sejtfelszíni megjelenését figyeltük meg, jelezve, hogy a T sejt aktiváció mindhárom esetben elkezdődött. A FasL megjelenése a 2PK3 APS-ekkel stimulált mintákban valamint kisebb számban A20 B sejtek használatakor is kimutatható volt. A TA3 APS jelenlétében a FasL megjelenését nem tudtuk kimutatni. Az áramlási citofluorimetriával nyert eredmények jó összhangot mutatnak a megelőző kísérleteinkben kapott adatainkkal, valamint jól mutatják a T sejtek különböző aktiváltsági állapotait.

4.1.6 A T sejtek apoptózisa csak a leghatékonyabb antigén prezentálás feltételei mellett váltható ki

Az ismétlődő és hosszan tartó antigén-specifikus T limfocita aktiválás a T sejteket programozott sejthalálba hajtja. Az általunk alkalmazott jól jellemzett vizsgálati rendszerben kísérleteket tettünk az apoptózis kiváltására képes aktivációs jel feltételeinek meghatározására. Ebből a célból a különböző APS-ek jelenlétében aktivált T sejtekben mértük a foszfatidil-szerin molekula sejtfelszíni megjelenését áramlási citofluorimetriával. Az IP12-7 T sejteket 2PK3, A20 vagy TA3 APS-ekkel peptid nélkül vagy 70 μM , 3.5 μM és 7 nM HA₃₁₇₋₃₂₉ peptid jelenlétében inkubáltuk. Az apoptotikus és a nekrotikus sejteket az Annexin-V molekula megkötése valamint a propidium jodid festék felvétele alapján különítettük el. Eredményeinket a 4.1.7 ábra foglalja össze.

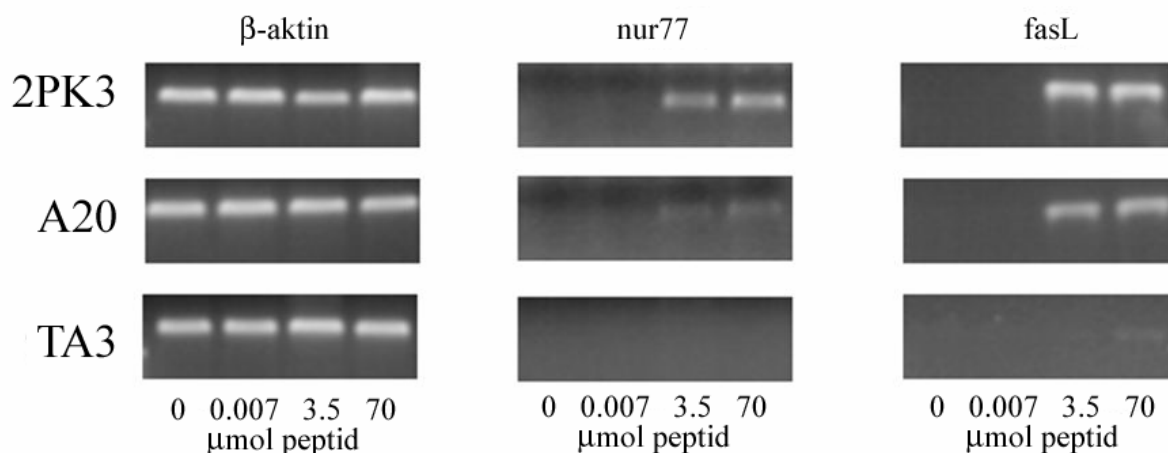


4.1.7 ábra. A T sejt apoptózis kinetikája különböző APS-ek és eltérő peptid dózisok jelenlétében

3x10⁴ IP12-7 T sejtet peptid nélkül (●) illetve 70 μM (▲), 3.5 μM (■) vagy 7 nM (◆) HA₃₁₇₋₃₂₉ peptiddel feltöltött, 3x10⁴ 2PK3, A20 vagy TA3 APS-ekkel tenyésztettük. Az apoptotikus és nekrotikus sejteket Annexin-V-FITC és propidium jodid festékekkel választottuk el és az apoptotikus sejtek arányát áramlási citofluoriméterrel határoztuk meg.

A 3.5 vagy 70 μM peptiddel feltöltött 2PK3 sejtek 12 óra alatt az IP12-7 T sejtek mintegy 70%-ának apoptózist váltottak ki. Ha APS-ként A20 vagy TA3 sejteket alkalmaztunk, nem tapasztaltunk kimutatható vagy jelentős mértékű programozott sejthalált.

Ezt követően az apoptózis bekövetkeztének génszintű vizsgálatát végeztük el. Az AICD-hez kapcsolódó korai apoptotikus *nur77* és a *fasL* gének expressziójának változásait RT-PCR-rel kísértük nyomon, a cDNS koncentrációkat az előzőek szerint a β -aktin gén mennyisége alapján állítottuk be. Az agaróz gélen való futtatás után a 4.1.8 ábrán bemutatott eredményeket kaptuk.



4.1.8 ábra. Különböző APS-ek és peptid koncentrációk hatása a T sejtek apoptotikus génjeinek kifejeződésére

5×10^6 T sejtet 4 órán át különböző APS-ek jelenlétében tenyésztettünk. Az APS-eket peptid nélkül vagy növekvő peptid koncentrációkkal történő előzetes feltöltés után alkalmaztuk. Az APS-eket mágneses szeparálással elválasztottuk, a T sejtekben zajló génexpressziót RT-PCR alapján hasonlítottuk össze.

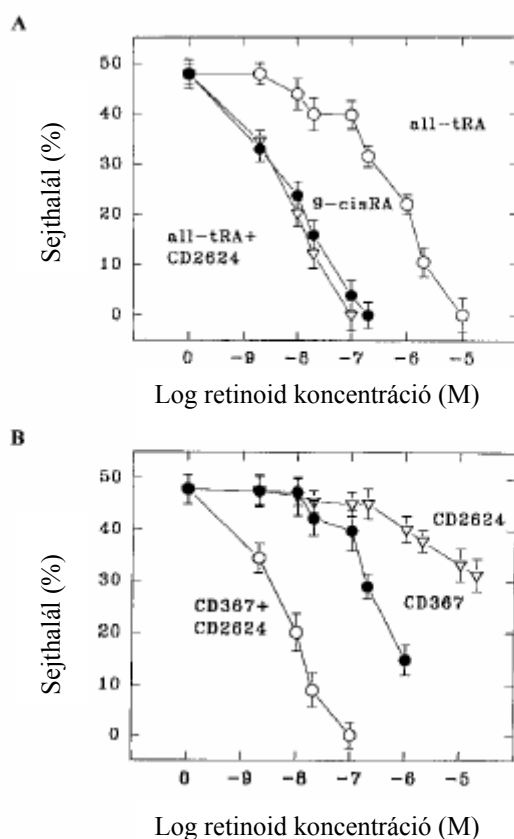
3.5 vagy 70 μM peptiddel előkezelt 2PK3 APS alkalmazásakor a *nur77* és a *fasL* gének nagymérvű expresszió növekedését tapasztaltuk. Az apoptotikus gének megjelenésének kisebb mérvű erősödését tapasztalhattuk A20 antigén prezentáló sejtek jelenlétében. A legkevésbé hatékony antigén bemutatást végző TA3 sejtek használatakor nem láttunk kimutatható mennyiségű géntermékeket.

Az aktiváció indukálta sejthalál vizsgálati kísérleti rendszerünkben megmutatták, hogy csak a legsikeresebb antigén prezentáció vezet a T limfociták apoptózisához.

4.2 Retinoidok hatásának vizsgálata

4.2.1 A T sejt aktiváció indukálta sejthalálát gátolják a retinsavak és az RAR α szelektív retinoidok

A retinoidok hatását a fentebb jellemzett IP12-7 T sejt hibridóma sejteken vizsgáltuk.



4.2.1 ábra. Különböző retinoidok növekvő koncentrációinak hatása a T sejt hibridóma aktiváció indukálta sejthalálára

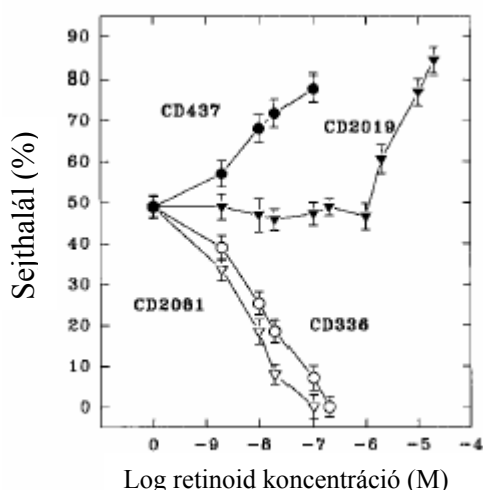
A T hibridóma sejtek sejthalálát immobilizált anti-CD3 antitesttel (1 μg/ml) váltottuk ki. 9CRA (●), TRA önmagában (○) TRA + 1 μM CD2624 (▽) (A), CD2624 RXR agonista (▽), CD367 RAR agonista önmagában (●) vagy 1 μM CD2624 jelenlétében (o) (B). A sejtek életképességét MTT esszével határoztuk meg 16 óra elteltével.

Amint az a 4.2.1 A ábrán látható, az IP12-7 sejtek aktiváció indukálta apoptózist a 9-cis-retinsav (9CRA) és a transz-retinsav (TRA) gátolta. A 9CRA sokkal hatékonyabban fejtette ki ezt a hatást, mutatva, hogy a 9CRA által szelektíven aktivált RXR is szerepet játszhat e folyamatban. A CD2624 (1 μM) RXR agonista egyidejű használata a TRA sejthalált gátló hatását nagymértékben fokozta (4.2.1A ábra). A CD367 RAR pán-agonista retinoid az

aktiváció indukálta apoptózist a TRA-hoz hasonló mértékben gátolta (**4.2.1B** ábra), bár kisebb koncentrációban volt letális a sejtekre, mint a TRA. CD2624 RXR ligand önmagában nem akadályozta az AICD-t, CD367-tel együtt alkalmazva azonban nagymértékben gátolta a sejthalált (**4.2.1B** ábra). Eredményeink alátámasztották azokat a korábbi megfigyeléseket (*Bissonette és mtsai, 1995; Yang és mtsai, 1995*), miszerint mind az RAR, mind az RXR receptorok szerepet játszanak a TSR-indukált sejthalál gátlásában.

A továbbiakban RT-PCR segítségével meghatároztuk, milyen retinoid receptorokat fejeznek ki az IP12-7 T sejtek. RAR α és γ expressziót tudtunk kimutatni, míg az RAR β jelenlétét nem (nem bemutatott adatok).

A CD2304 RAR β specifikus szintetikus retinoid – a receptor hiányában – nem volt hatással a T sejtek apoptózisára. Két RAR γ agonoista (CD437 és CD2019) használata esetén az aktiváció indukálta sejthalál növekedését tapasztaltuk (**4.2.2** ábra). Így világossá vált, hogy az AICD gátlásában sem az RAR β , sem az RAR γ receptorok nem szerepelnek.



4.2.2 ábra. Az RAR α és γ ellentétes hatása a T hibridóma sejtek aktiváció indukálta sejthalálára

A T hibridóma sejtek sejthalálát immobilizált anti-CD3 antitesttel (1 μ g/ml) váltottuk ki. CD2081 (∇) és CD336 (o) RAR α agonistákat vagy CD437 ($\bullet$) és CD2019 ($\blacktriangle$) RAR γ agonistákat adtunk a sejtenyészetekhez a jelzett koncentrációkban.

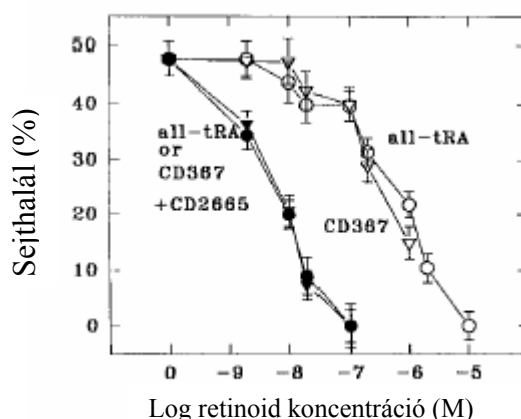
A sejtek életképességét MTT esszével határoztuk meg 16 óra elteltével.

A sejtek kezelése két RAR α agonista (CD336 és CD2081) retinoiddal az aktiváció indította apoptózis nagy mértékű gátlását eredményezte (**4.2.2** ábra). Eredményeink azt sugallják, hogy az RAR α ligandkötése önmagában felelős a természetes retinsavak (9CRA és TRA) apoptózist akadályozó sajátosságáért.

Ezt a lehetőséget megvizsgálva CD2503 RAR antagonistá retinoidot adtunk a sejtekhez. Ez a retinoid önmagában 10 μ M koncentráció felett sem volt hatással a TSR-indukált sejthalálra, de 5 μ M mennyiségben hatékonyan gátolta a 9CRA és a TRA, valamint a CD367 és CD2624 apoptózist gátló hatását (nem bemutatott adatok).

4.2.2 Az aktiváció indukálta sejthalál gátlása az RAR α receptoron keresztül befolyásolható az RXR vagy az RAR γ kostimulációjával

Mivel a TRA, a CD336, a CD364 és a CD2081 közel egyforma mértékben képesek kötődni az RAR α receptorhoz, az apoptózis gátlásban mutatott eltérő hatékonyságuk hátterében más magreceptorokkal való kapcsolatuk állhat. Ezért a továbbiakban az RAR γ és az RXR kostimuláció hatásait vizsgáltuk. Amint azt a 4.2.3 ábrán bemutatjuk, a CD2665 RAR γ antagonistá alkalmazása csökkentette mind a CD367, mind a TRA AICD-t gátló hatékony koncentrációját.



4.2.3 ábra. A T hibridóma sejtek aktiváció indukálta sejthalálának gátlása pán-RAR α agonista vagy RAR γ antagonistá együttes alkalmazásával

A T hibridóma sejtek sejthalálát immobilizált anti-CD3 antitesttel (1 μ g/ml) váltottuk ki a CD367 (∇) vagy TRA (o) jelenlétében 0.5 μ M CD2665 együttes adásával (teli szimbólumok) vagy anélkül (üres szimbólumok).

A sejtek életképességét MTT esszével határoztuk meg 16 óra elteltével.

Továbbá a CD437 RAR γ agonista alkalmazása megakadályozta a CD336 RAR α ligand AICD gátló képességét (nem bemutatott adatok).

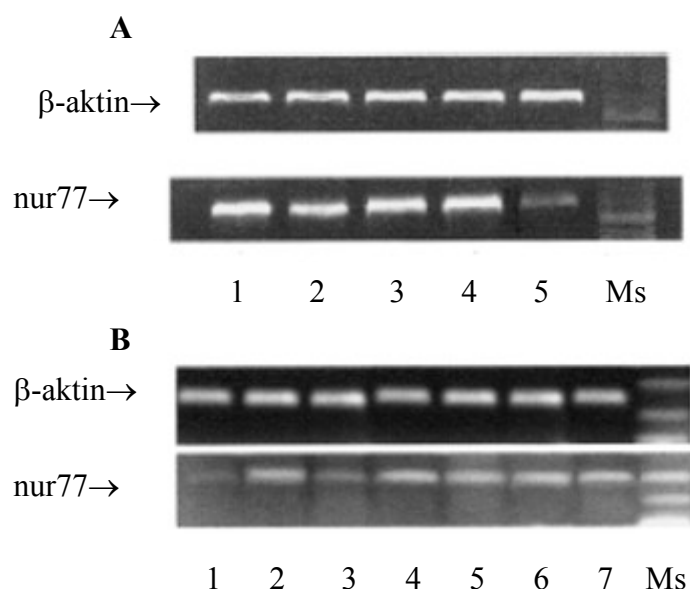
Mivel a 9CRA hatékonyabb TSR-indukált apoptózis gátlónak bizonyult a TRA-nál (2.4.1A ábra) és ezt a tulajdonságát az RXR kostimuláló képességének tulajdonítottuk, megvizsgáltuk az RXR ligandkötés további hatásait is. Az RXR aktiválása csökkentette a

TRA és a CD336 hatékony AICD-gátló dózist, valamint CD2624 RXR agonista jelenlétében a CD437 RAR γ szelektív retinoid nem tudta kifejteni az RAR α útvonal gátlását (nem bemutatott adatok).

4.2.3 A retinoidok szabályozzák a Nur77 transzaktivációját

Az IP12-7 T sejt hibridómáról leírták, hogy a FasL indukciója a Nur77 transzkripció faktor segítségével valósul meg (Tóth és mtsai, 1999). Így az RAR α aktivációt követő AICD gátlás hátterét vizsgálva a Fas és a FasL kifejeződését tanulmányoztuk. Egy RAR α szelektív retinoid (CD336) hatékony AICD-gátló koncentrációja nem volt hatással sem a Fas, sem a FasL mRNS szintjére és sejtfelszíni megjelenésére, viszont hatékonyan gátolta a TSR-aktivációra a sejtmembránon megjelenő FasL-ot. CD437 RAR γ agonista és TSR aktiváció együttes alkalmazása tovább növelte a sejtfelszínen megjelenő FasL mennyiségét. Jurkat T sejtek vizsgálatával hasonló eredményekre jutottunk (nem bemutatott adatok).

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a retinoidok hatással vannak-e a nur77 gén kifejeződésére és transzaktivációs képességére a Nur77 kötő válaszoló elem (NBRE). Mind az IP12-7 sejtekben, mind a Jurkat sejtekben 6 órás anti-CD3 kezelést követően a nur77 gén indukcióját tapasztaltuk.

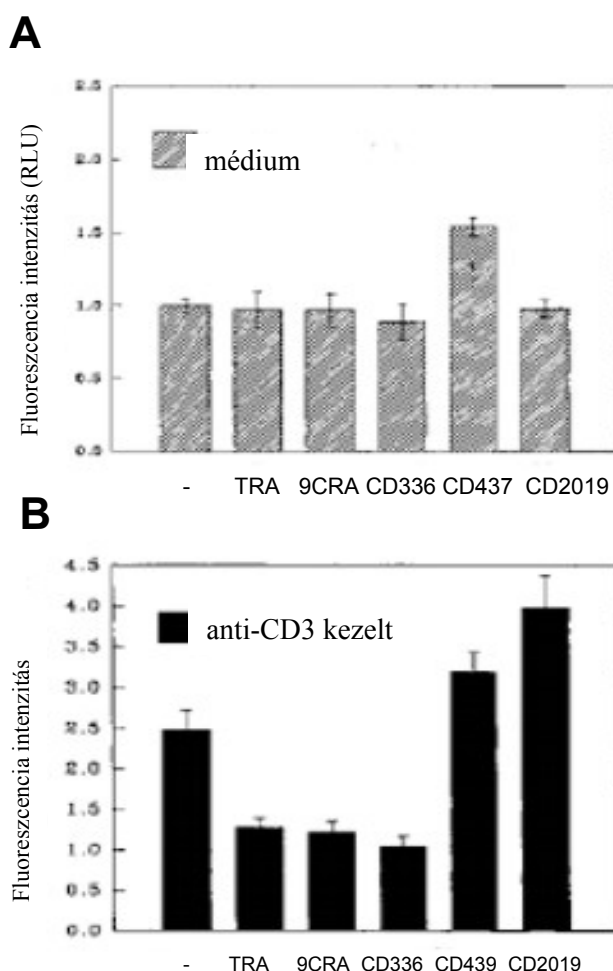


4.2.4 ábra. Különböző retinoidok hatása az aktiváció indukálta nur77 gén kifejeződésére
Anti-CD3 stimulált IP12-7 T sejt hibridómában és Jurkat T sejtekben vizsgáltuk a Nur77 mRNS szintjének változásait RT-PCR-rel. A nur77 kifejeződését T hibridóma sejtekben detektáltuk 6 óra anti-CD3 kezelést követően, az alábbi retinoid kezeléseket alkalmazva: 300

nM CD336 (1), 10 μ M TRA (2), 1 μ M 9CRA (3), csak anti-CD3 (4), médium (5) (A). Nur77 mRNS szintet mértünk Jurkat sejtekben 6 óra inkubációt követően médiumban (1), 300 nM CD437 (2), 10 μ M CD2019 (3) kezelést követően, illetve anti-CD3 stimuláció utáni 300 nM CD437-et adva (4), magában (5), 10 μ M CD2019-cel együtt (6) vagy 300nM CD336-tal.

Mint az a 4.2.4 ábrán látható, az alkalmazott retinoidok (9CRA, TRA, CD336, CD2019) nem befolyásolták lényegesen a Nur77 alap mRNS szintjét, kivéve a CD437 RAR γ analógot, mely önmagában alkalmazva háromszoros növekedést indukált Jurkat T sejtekben. Hasonló módon, a CD437 kissé növelte az anti-CD3 kiváltotta nur77 génexpresszióját, míg más retinoidoknak nem volt jelentős hatása erre.

Vizsgáltuk, hogy a retinoidok beleszólnak-e a Nur77 transzaktivációs képességébe. A Jurkat sejteket tranziensen transzfektáltuk a Tk-NBREx3-Luc plazmiddal.

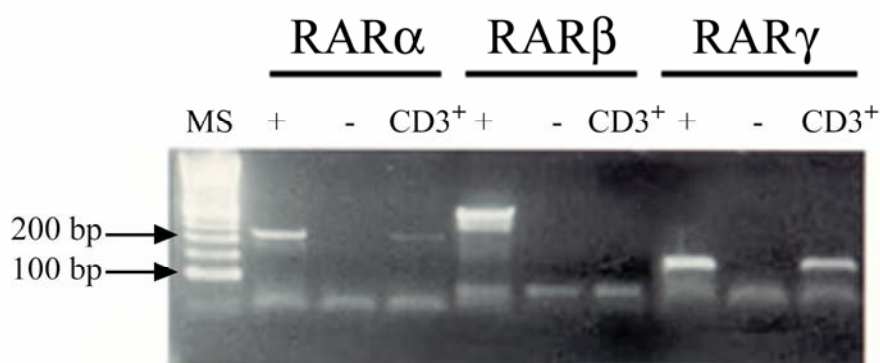


4.2.5 ábra. Különböző retinoidok hatása a Nur77 transzaktivációs képességére
A retinoidok hatását a Nur77 transzaktivációs képességére Jurkat sejtekben vizsgáltuk, egy Nur77 válaszoló promotor konstrukciót használva. Az alap transzaktivációs aktivitás vizsgálata (A). TSR aktivációt követő Nur77 transzaktivációs képesség vizsgálata (B).

Amint az a **4.2.5B** ábrán látható, a reporter tranziens transzfekciója a gén 2.5-szörös emelkedését mutatta anti-CD3 kezelést követően. Az RAR γ ligandkötése tovább emelte ezt a szintet, míg az RAR α stimulációja és a természetes retinsavak (9CRA és TRA) teljesen blokkolták a Nur77 funkciót az NBRE promoteren. Összhangban a CD437 mRNS szintet növelő hatásával, a Nur77 alap transzaktivációs aktivitását is fokozta (**4.2.5A** ábra).

4.2.4 Az RAR α ligandkötése fokozza, míg az RAR γ ligand általi aktivációja gátolja a humán perifériás T sejtek osztódását

Mivel megelőző kísérleteink bizonyították, hogy a timociták RAR α és RAR γ retinoid receptorokat fejeznek ki, melyek a T limfociták apoptózisára ellentétes hatást fejtenek ki (Szondy és mtsai, 1997), további kísérleteinkben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy ezen receptorok milyen hatással bírnak a humán perifériás T sejtek proliferációjára, mely folyamat retinoidok általi meghatározottságát korábban publikálták (Friedman és mtsai, 1993; Ertesvag és mtsai, 2002). A humán perifériás T limfocitákban megjelenő retinoid receptorokat RT-PCR-rel határoztuk meg. Ezen kísérleteinkhez a T sejteket FITC-kapcsolt anti-CD3 antitestekkel végzett tisztítási lépésekkel nyertük. Mint ahogy a **4.2.6** ábrán látható, hasonlóan az egér limfocitákhoz ezek a sejtek is RAR α és RAR γ receptorokat fejeznek ki, míg RAR β -t nem.



4.2.6 ábra. A humán perifériás T sejteken kifejeződő retinsav receptorok
 5×10^6 tisztított humán T sejtől RNS-t nyertünk ki, cDNS átíratot készítettünk és az RAR receptor expressziót RT-PCR-rel detektáltuk. Pozitív kontrollként *transz*-retinsav kezelt humán bőr fibroblasztokat használtunk.

Ezek után meghatároztuk, hogy ezek a receptorok milyen módon vesznek részt a T sejt proliferáció szabályozásában. Kísérleteinkhez receptor specifikus szintetikus retinoidokat

alkalmaztunk, a sejteket fitohemagglutininnal (PHA) aktiváltuk. A retinoidok kötődési állandóit és transzaktivációs képességeit a 4.2.1 táblázatban tüntettük fel.

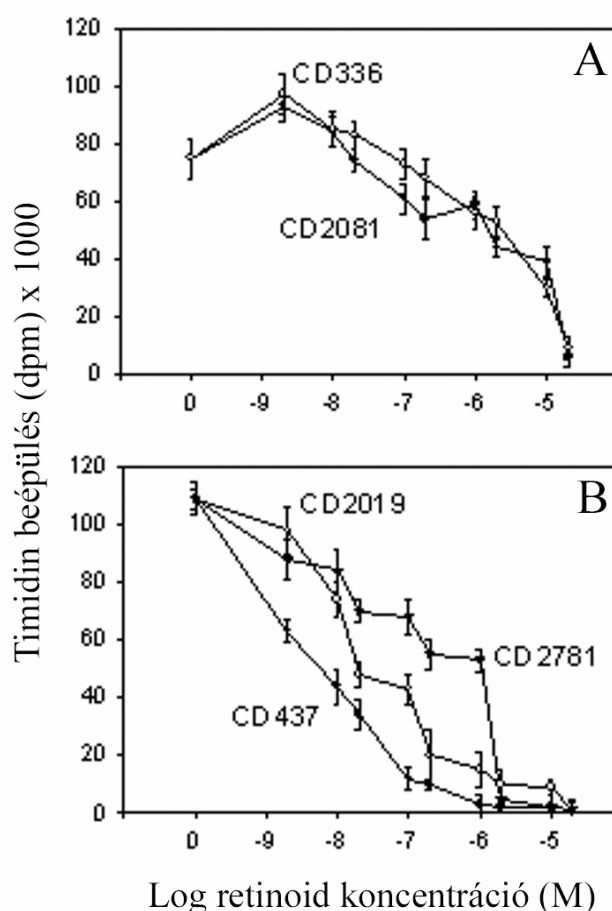
Retinoid	Kötés K_d /nM			Transzakt. EC_{50} /nM	Sajátság
	RAR α	RAR β	RAR γ	RXR α	
<i>transz</i> -retinsav	16	7	3	>1000	agonista
9- <i>cisz</i> -retinsav	30	11	20	24	agonista
CD336	8	131	450	> 1000	agonista
CD367	4	3	2	nincs kötés	agonista
CD2081	6	147	753	> 1000	agonista
CD2314	> 3760	145	nincs kötés	> 1000	agonista
CD437	6500	2480	77	> 1000	agonista
CD2781	388	3500 $\diamond$ 1000 0	76	> 1000	agonista
CD2019	1100	26	160	> 1000	agonista
CD2503	6	964	> 1000	> 1000	antagonista
CD2665	> 1000	306	110	> 1000	antagonista
CD2624	> 5000	> 5000	> 5000	300	agonista

4.2.1 táblázat. A kísérleteinkben alkalmazott retinoidok kötődési konstansai és transzaktivációs képességei

A kötődési konstansokat és a transzaktivációs képességeket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint határoztuk meg. Az adott receptorokhoz való kötődési képességet vastagon szedett számokkal jelöltük.

A sejtosztódást a limfociták vizsgálatánál gyakran használt [3 H]timidin DNS-be való beépülésével követtük nyomon 48 és 60 óra sejtenyésztést követően (*Coligan és mtsai, 1992*). Előzetes megfigyeléseink szerint a jelzett időpontokban a PHA 1.5-25 μ g/ml koncentrációban alkalmazva a [3 H]timidin nagymérvű DNS-be való épülését, tehát erős T sejt proliferációt eredményezett. További kísérleteinkben a PHA szuboptimális hatású, 5 μ g/ml-es koncentrációját

alkalmaztuk, lehetőséget biztosítva a retinoidok esetleges sejtosztódást fokozó hatásának érvényesülésére.



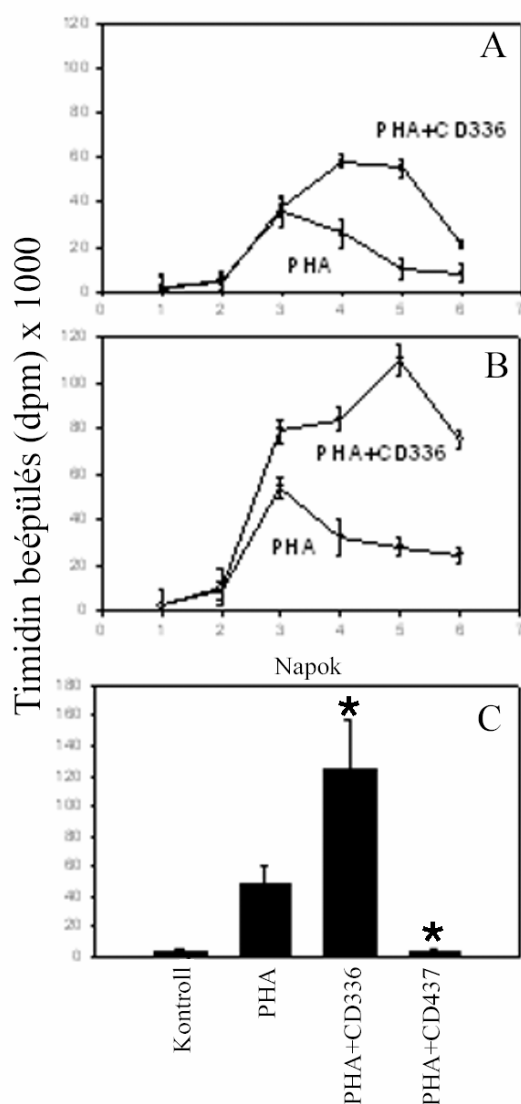
4.2.7 ábra. Az RARα és az RARγ ligandkötésének hatása a perifériás T sejtek osztódására

5×10^5 T sejtet 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA-val aktiváltunk a megadott RARα (A) vagy RARγ (B) retinoid koncentrációk jelenlétében 3 napon át. [^3H]timidint (2 μCi) adtunk a tenyészetekhez és a sejtek DNS-ébe való beépülését 12 órával később detektáltuk. Az adatokat és a szórás értékeket három független kísérlet eredményeiből határoztuk meg.

Míg az RARβ szelektív CD2314-nak – a receptor hiányában – nem volt hatása a PHA aktivált perifériás T limfociták osztódási képességére (nem bemutatott eredmények), addig az RARγ aktiváló retinoidok alkalmazásakor dózisfüggő proliferáció gátlást tapasztaltunk (4.2.7B ábra). A sejtosztódás 50%-os gátlása a CD437 (5 nM) és a CD2019 (40 nM) különböző koncentrációinál valósult meg, az RARγ-hoz mutatott eltérő kötődési képességeikből adódóan (lásd 4.2.1 táblázat). Érdekes módon a CD2781 RARγ agonista – amely erősebb kötődést mutat az RARα receptorhoz, mint a másik két γ receptor agonista – a sejtproliferáció 50%-os gátlását 1 μM körüli koncentrációban mutatta. Az RARα aktivációja szintetikus agonistákkal a T sejt osztódás

serkentésével járt, a retinoidok K_d érték körüli koncentrációinak alkalmazásakor (4.2.7A ábra). Magas koncentrációkban alkalmazva az $RAR\alpha$ szelektív retinoidok az $RAR\gamma$ -hoz is kötődnek, így itt szintén dóziszfüggő osztódás csökkenést tapasztaltunk. 10 μ M-os koncentrációnál a T limfocitákban toxikus hatások lépnek föl, melyet tripánkék festék beépülésével detektáltunk.

Tovább tanulmányozva a különböző retinoid receptorok T sejtekre gyakorolt hatásait, a CD336 $RAR\alpha$ receptor agonista 5 nM-os, hatékony proliferációt serkentő koncentrációját és a CD437 $RAR\gamma$ receptor ligand 300 nM-os, teljes [3 H]timidin beépülést gátló mennyiségét alkalmaztuk.



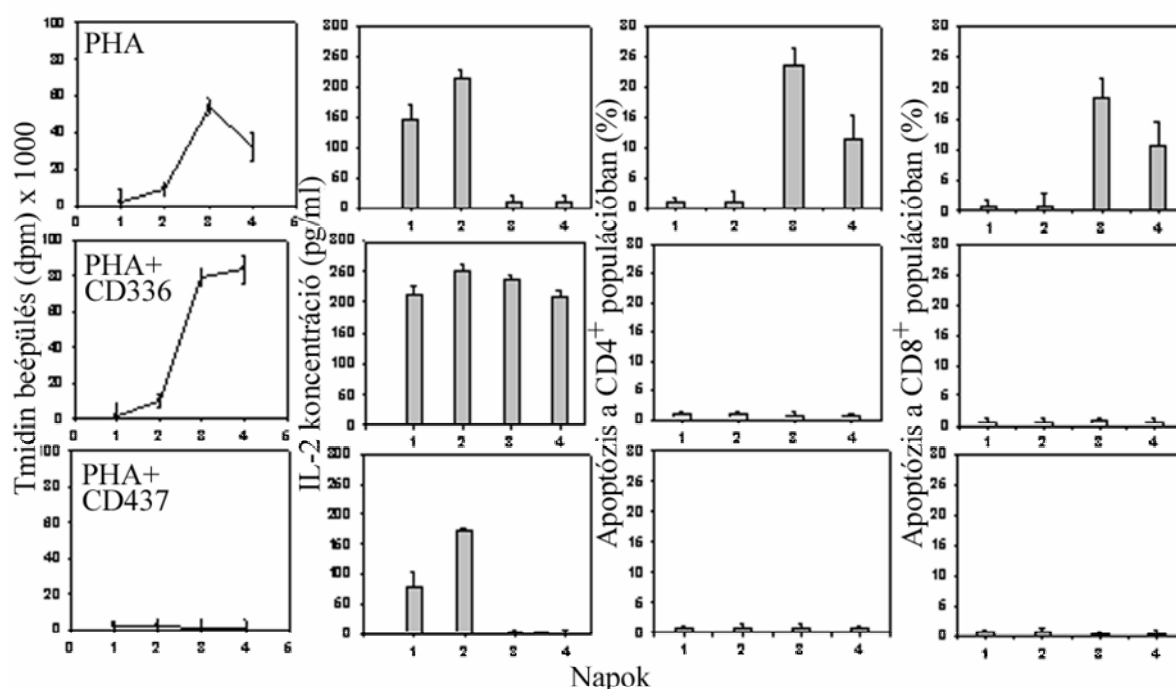
4.2.8 ábra. Az $RAR\alpha$ agonista effektív koncentrációjának hatása a humán perifériás T sejtek [3 H]timidin beépülésére különböző PHA koncentrációk jelenlétében
 5×10^5 T sejtet aktiváltunk 1.5 μ g/ml (A) vagy 5 μ g/ml (B) PHA-val 3 nM CD336 jelenlétében a jelzett ideig. [3 H]timidint (2 μ Ci) adtunk a kultúrákhoz és 12 óra elteltével vizsgáltuk a beépülés mértékét. 3 nM CD336 vagy 300 nM CD437 hatása a humán perifériás T sejtek

[³H]timidin beépülésére 5 nappal az 5 µg/ml PHA stimulációt követően (C). A T sejteket 10 személyből nyertük. *Szignifikánsan eltérő a PHA-kezelt kultúráktól (t-próba, (p<0.05).

Amint az a **4.2.8A és B** ábrán látható, a CD336 ezen koncentrációjának használata a humán perifériás T limfociták fenntartott, nagy mérvű proliferációját eredményezte, ezt a hatást alacsony és magas PHA mennyiség használata esetén is tapasztaltuk. A sejtenyészítés 5. napján a [³H]timidin beépülés mértéke a PHA-aktivált T sejtek esetén szignifikánsan magasabb volt a kontroll tenyészetben tapasztaltakhoz képest (**4.2.8C** ábra). A CD437 alkalmazása minden időpontban gátolta a T sejt proliferációt (**4.2.8C, 4.2.9** ábra).

4.2.5 Az RAR γ receptor kis mértékben ha az IL-2 termelődésére és az IL-2 receptor megjelenésére

Mivel az IL-2 nagyon fontos szerepet játszik a T sejtek növekedésében és klonális szaporodásában, a következőkben megvizsgáltuk az RAR γ specifikus CD437 retinoid szerepét az aktivált T limfociták IL-2 termelésének befolyásolásában valamint az IL-2 receptor kifejeződésének szabályozásában.



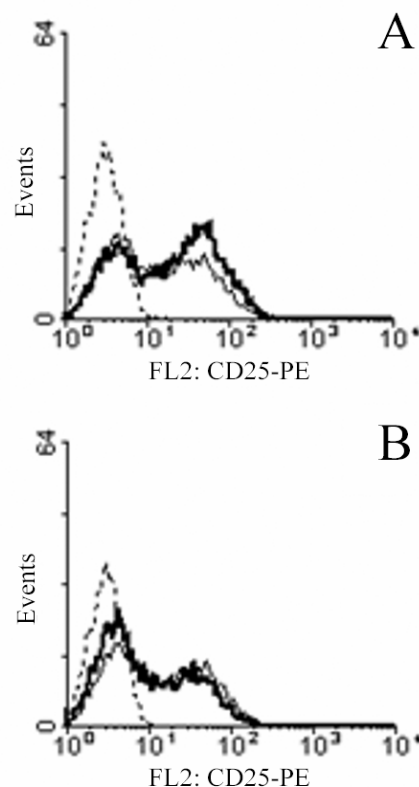
4.2.9 ábra. Az RAR α és az RAR γ ligandkötésének hatása a PHA aktivált perifériás T sejtek osztódására, IL-2 termelésére és apoptózisra

5x10⁵ T sejtet 5 µg/ml PHA-val aktiváltunk retinoidok nélkül vagy CD336 (3 nM) vagy CD437 (300 nM) jelenlétében. A sejtosztódást a [³H]timidini beépülés mértékével vizsgáltuk,

az IL-2 termelést ELISA-val detektáltuk és a T sejt populációk apoptózisát áramlási citofluoriméterrel követtük nyomon 4 napon át.

Szuboptimális PHA-val stimulálva a T sejteket a kezelést követő első két napon IL-2 termelést mértünk (4.2.9 ábra). Az IL-2 szekréció 3. napon tapasztalt csökkenésével párhuzamosan a [³H]timidin beépülése, a sejtosztódás is csökkent. CD437 retinoid alkalmazása esetén a kinetika hasonló volt, az IL-2 termelés kismértékű csökkenését figyeltük meg. Ez jelezte, hogy nem az IL-2 kifejezés szabályozása a CD437 fő hatásterülete.

Az IL-2 receptor három alegységből áll: az IL-2R α -ból (CD25), az IL-2 β -ból és az IL-2R γ -ból, melyek együtt alkotják a nagy affinitású receptort (*Theze és mtsai, 1996*). A T limfociták az IL-2 citokinre adott válaszképességüket képesek az IL-2R α expressziójának transzkripciós kontrolljával szabályozni. (*Algarte és mtsai, 1995*). Áramlási citofluoriméteres vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a PHA 12 óra elteltével a T sejtek 45%-ában megnöveli az IL-2R α kifejeződésének mértékét, de ezt a CD437 alkalmazása lényegesen nem befolyásolja (4.2.10 ábra).



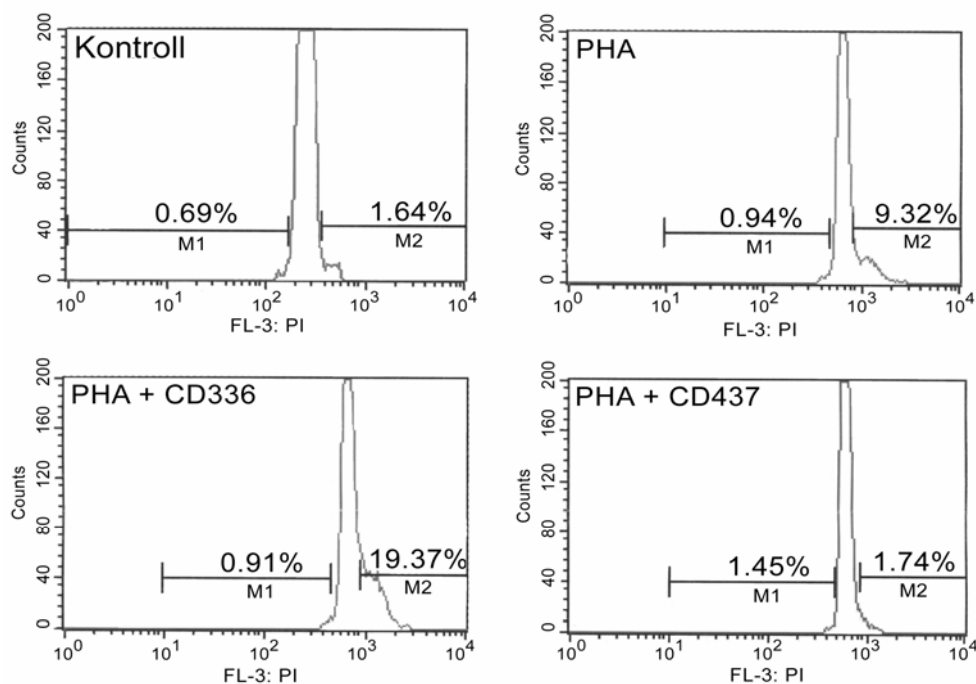
4.2.10 ábra. Retinoidok hatása az IL-2R α (CD25) kifejeződésére
1x10⁶ perifériás T sejtet 5 μ g/ml PHA-val aktiváltunk retinoidok nélkül illetve CD336 (3 nM) (A) vagy CD437 (300 nM) (B) jelenlétében 12 órán át és az IL-2R α sejtfelszíni jelenlétét

fikoeritrin-jelölt anti-CD25 antitesttel, áramlási citofluoriméterrel mutattuk ki. Izotípus anti-IgG1 antitestet használtunk negatív kontrollként.

Eredményeink jelezték, hogy az IL2-R α kifejeződésének szabályozása sem lényeges pontja a CD437 hatásmechanizmusának.

4.2.6 Az RAR γ ligandkötése nem indít apoptózist a PHA stimulált T sejtekben

Mivel az RAR γ ligandkötése nem befolyásolta lényegesen az IL-2 citokin termelését és az IL2-R α kifejeződését, de a timociták apoptózisát elősegítette (*Szondy és mtsai, 1997*), ezért a következőkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a CD437 [3 H]timidin beépülést gátló hatása kapcsolatban van-e a PHA aktivált T sejtek programozott sejthalálával. A CD437 adását követő apoptózis jelenlétét a T sejtek CD4 és CD8 pozitív populációiban a 7-amino-aktinomicinD festék felvétele alapján mutattuk ki (*Schmid és mtsai, 1994*). Mivel az elpusztult sejtek gyorsan degradálódnak a sejtenyészetben, százalékos meghatározásuk az adott napra vonatkozik és nem a tenyészetben való felhalmozódásukra. A kontroll mintákban az alap sejthalás 0.7% körüli értéket mutatott mindkét T sejt populáció esetén az összes vizsgált napon (nem bemutatott eredmények). A T limfociták szuboptimális koncentrációjú PHA-val történő stimulációját követően csak kis mértékben növekedett a sejtpopulációk apoptózisa a tenyésztés első két napján, amikor még volt termelt IL-2 a rendszerben. A 3. napon azonban, amikor a sejtek IL-2 termelése csökkent, az apoptózis növekedését tapasztaltuk (**4.2.11** ábra). A CD437 jelenléte nem növelte a sejthalál mértékét, jelezve, hogy hatása inkább a sejtosztódás gátlásán keresztül érvényesül, mint az apoptózis indukcióján át. Ezt sejtciklus analízis vizsgálattal is alátámasztottuk (**4.2.11** ábra).



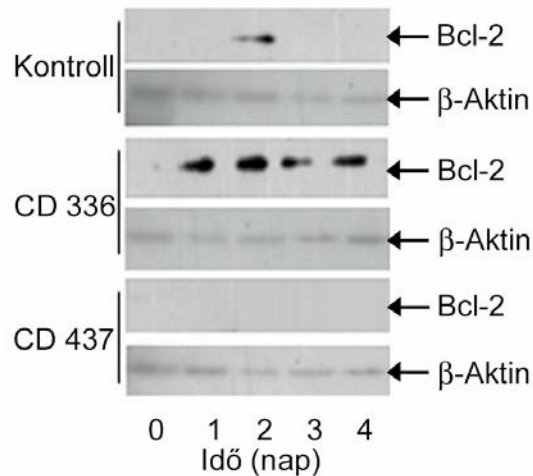
4.2.11 ábra. Az RAR α és az RAR γ ligandkötésének hatása a PHA-aktivált T sejtek sejtciklusba lépésére

A tisztított humán perifériás T sejteket 5 μ g/ml PHA-val stimuláltuk retinoidok nélkül illetve CD336 (3 nM) vagy CD437 (300 nM) jelenlétében. A sejtciklus analízist 48 óra múlva végeztük, a sejtmag állományt propidium jodiddal festettük és a mérést áramlási citofluoriméterrel végeztük.

A CD437 jelenlétében tapasztalt apoptózis mértéke minden mérési időpontban a kontroll tenyészetben láthatóhoz hasonlóan alakult jelezve, hogy azok a sejtek, amelyek nem lépnek be a sejtciklusba kevésbé érzékenyek a sejthalálra, mint azok, amelyek a PHA aktivációt követően osztódnak.

4.2.7 Az RAR γ ligandkötése beleavatkozik az IL-2 jelátviteli útvonalába

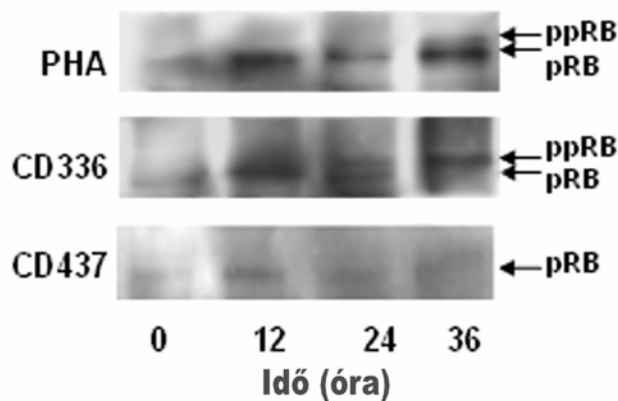
Mivel az exogén adott IL-2 (20U/ml) nem volt képes a PHA stimulált T sejtek proliferációját kiváltani CD437 jelenlétében (nem bemutatott adatok), azt feltételeztük, hogy az RAR γ ligandkötése az IL-2 útvonalba szól bele. Az IL-2 a sejtciklusba való belépést a pRB foszforilációján keresztül szabályozza (Weinberg, 1995) valamint a sejthalált a Bcl-2 expresszió növelésével gátolja (Yang és Korsmeyer, 1996), így a továbbiakban megnéztük a CD437 hatását ezen eseményekre.



4.2.12 ábra. Az RAR α és az RAR γ ligandkötésének hatása a PHA-indukált Bcl-2 fehérje kifejeződésére humán T sejtekben

A humán T sejteket 5 μ g/ml PHA-val aktiváltuk retinoidok nélkül illetve CD336 (3 nM) vagy CD437 (300 nM) jelenlétében a jelzett időpontokig. Teljes sejt lizátumokat készítettünk és a Bcl-2 expressziót Western blot analízissel követtük nyomon. Az azonos fehérje koncentrációkat a β -Aktin fehérje mennyiségének meghatározásával ellenőriztük.

A Western blot kísérlethez használt alacsony sejtszámnál a kontroll tenyészetekben nem tudtuk kimutatni a Bcl-2 jelenlétét. A T sejtek PHA-val való stimulálását követően 2 nappal a Bcl-2 fehérje növekedését tapasztaltuk, ez az időpont egybeesett a legtöbb IL-2 produkció időszakával. Ezt követően a Bcl-2 szintje a kimutathatósági határ alá csökkent. CD437 jelenlétében a PHA stimulációra megjelenő Bcl-2 teljes gátlását tapasztaltuk (4.2.12 ábra).



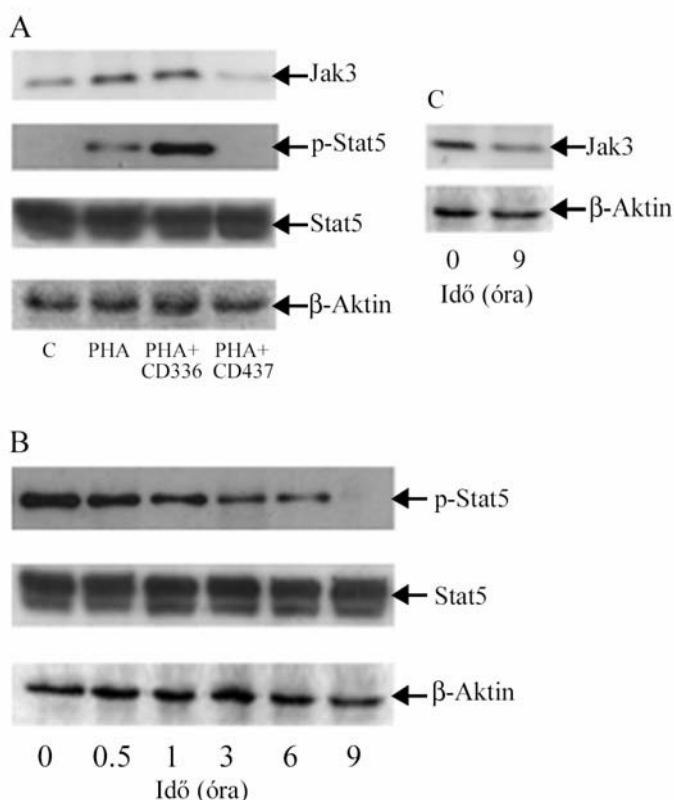
4.2.13 ábra. Retinoid szabályozott változások a pRB foszforilációjában

Humán T sejteket 5 μ g/ml PHA-val aktiváltunk a jelzett időpontokig retinoidok nélkül illetve CD336 (3 nM) vagy CD437 (300 nM) jelenlétében. Teljes sejt lizátumot preparáltunk és egyenlő koncentrációjú fehérjéket vizsgáltunk a pRB foszforilációs állapotának meghatározására Western blot analízissel. A pRb és a ppRB fehérjéket pRB specifikus monoklonális antitesttel tettük láthatóvá.

A foszforilált pRB lassabban mozdul el a poliakrilamid gélben, mint a kevésbé foszforilált forma. Mint az a **4.2.13** ábrán látható, CD437 jelenléte teljesen megakadályozta a pRb PHA adását követően 36 órával megjelenő foszforilálódását.

Eredményeink azt mutatják, hogy az IL-2 hatására bekövetkező kulcsfontosságú lépések nem mennek végbe CD437 jelenlétében.

Korábban már leírt adatok bizonyítják, hogy az RAR receptorok direkt interakciója más transzkripciós faktorokkal gátol bizonyos jelátviteli utakat (*Salbert és mtsai, 1993; Kang és mtsai, 2000*) valamint ismert, hogy a Stat5 fehérje transzkripciós aktivitása kulcsszerepet játszik az IL-2 hatásainak szabályozásában (*Friedmann és mtsai, 1996*). Ezért következő kérdésként azt vetettük föl, hogy a CD437 beleszól-e a Stat5 jelátvitelbe. Mivel a Stat5 fehérje mennyisége és foszforilációs állapota önmagában is befolyásolja a DNS-hez való kötés mértékét, a molekula foszforilációs állapotának változásait vizsgáltuk meg CD437 kezelést követően.



4.2.14 ábra. Az RAR α és az RAR γ ligandkötésének hatása a Jak3 expresszióra és a Stat5 foszforilációra PHA aktivált humán T sejtekben

A CD336 (3 nM) és a CD437 (300 nM) Jak3 és Stat5 kifejeződésre valamint a Stat5 foszforilációra kifejtett hatásait PHA (5 μ g/ml) stimulált T sejtekben a PHA adást követő 48.

órában vizsgáltuk (**A**). Az RAR γ agonista hatását detektáltuk a Stat5 (**B**) vagy a Jak3 (**C**) expresszióra IL-2-ben tartott humán T sejtekben. A T sejteket 5 μ g/ml PHA-val aktiváltuk és 30 U/ml IL-2-ben tartottuk. Ezután CD437 (300 nM) retinoidot adtunk a sejtekhez a jelzett

ideig és teljes sejt lizátumot készítettünk a mintákból. Immunprecipitáltunk Stat5a és b antitesttel. A mintákat Jak3, foszforilált tirozin és Stat5 antitestekkel reagáltattuk, a fehérjéket Western blot analízissel detektáltuk.

Mint azt a **4.2.14** ábrán bemutatjuk, a PHA-val stimulált T limfocitákban a Stat5a és b molekulák mennyisége nem változott, de a foszforilációs állapotuk nagymértékben növekedett 36 óra elteltével. Ez az időkinetika volt megfigyelhető az IL-2 termelés és a pRB foszforiláció vonatkozásában is (**4.2.11** ábra). A CD437 nem volt hatással a Stat5 fehérje kifejeződő mennyiségére viszont jelenlétében a Stat5a és b fehérjék tirozinon keresztüli foszforilációja elmaradt.

A Stat5 foszforilációja a TSR-en keresztül is szabályozódik (*Welte és mtsai, 1999*) valamint kimuattuk, hogy a CD437 kezelés csökkentette az IL-2 termelést, így adódott a feltevés, hogy a Stat5 foszforiláció hiánya esetleg nem megfelelő IL-2 jelátvitellel párosul. A PHA aktivált T limfocitákat 30 U/ml IL-2-ben tenyésztettük, ezután hozzájuk adtuk a CD437 RAR γ agonistát (300 nM) és a Stat5a és b foszforilációra gyakorolt hatását immunprecipitációt követő Western blot analízissel vizsgáltuk a feltüntetett időpontokban. A **4.2.14B** ábrán látható eredmények szerint az RAR γ aktiváció a fent említett körülmények mellett 9 órán belül teljes mértékben meggátolta a Stat5 aktivációt, míg a fehérje mennyiségét nem változtatta meg. Ebben az időintervallumban a kontroll tenyészetekben nem tapasztaltuk a tirozin foszforiláció változását.

Mivel a Jak3 fehérje működése a Stat5 foszforiláció szabályozásának fontos pontja (*Gesbert és mtsai, 1998*) és mennyiségét befolyásolja az IL-2, megvizsgáltuk a Jak3 szint alakulását a PHA stimulált T sejtekben CD437 jelenlétében és anélkül. A **4.2.14A** ábrán bemutatott eredményeink azt mutatják, hogy a PHA aktiváció megnövelte a Jak3 mennyiségét, a CD437 viszont teljesen meggátolta ezt. A CD437 IL-2 függő sejtekben is megakadályozta a Jak3 kifejeződését. Adataink azt mutatják, hogy a CD437 valóban interferál az IL-2 jelátviteli folyamattal és nem kizárt, hogy a TSR vezérelt Stat5 foszforilációt is gátolja

4.2.8 Az RAR α ligandkötése fokozza a PHA stimulált T limfociták IL-2 termelését

Megvizsgáltuk az RAR α receptor agonista CD336 hatásait is az IL-2 produkcióra és az IL-2R expresszióra. A CD336 alkalmazása fokozta a PHA stimulált T sejtek IL-2 termelését 4 napon át fenntartott magas citokin koncentrációt eredményezve (**4.2.9** ábra), de az IL-2R kifejeződésére nem volt lényeges hatással (**4.2.10** ábra). Adataink azt mutatják, hogy

a CD336 fő hatásterülete az IL-2 szint emelése. Összehangoltan a megnövekedett IL-2 szinttel, a Stat5 foszforiláció szintén emelkedett CD336 jelenlétében (4.2.13 ábra).

Mivel a Stat5 foszforiláció az IL-2-től függetlenül is szabályozódhat, megvizsgáltuk a Stat5 aktiváció alakulását CD336 adását követően kívülről adagolt IL-2 jelenlétében is. Míg a CD437 ezekben a sejtekben nagymértékben csökkentette a Stat5 foszforilációt (4.2.14 ábra), a CD336-nak nem volt hatása (nem bemutatott adatok). Nem befolyásolta továbbá a [³H]timidin DNS-be beépülését sem az IL-2 feleslegben adott koncentrációjánál (50 U/ml).

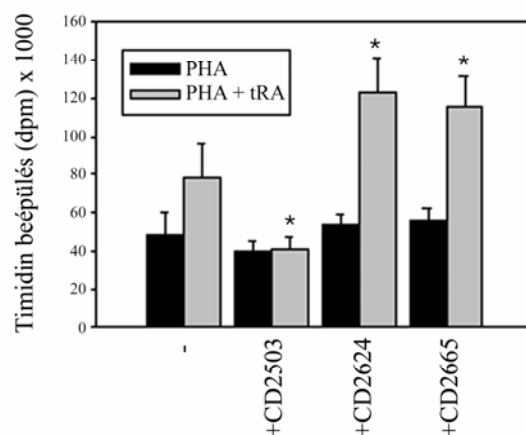
Adataink azt sugallják, hogy a CD336 kezelést követő Stat5 foszforiláció emelkedés PHA stimulált T limfocitákban a megnövekedett IL-2 koncentráció következménye és az RAR α stimulációt követő proliferációt serkentő hatását is az IL-2-n keresztül érvényesíti.

4.2.9 Az RAR α ligandkötést követő IL-2 szint növekedés korábbi sejtciklusba lépést és az apoptózis gátlását eredményezi

Mivel az IL-2 szabályozza a sejtciklusba lépést és hatással van a sejtek apoptózisára, a továbbiakban ezen eseményeket követtük figyelemmel CD336 adását követően. Mint az a 4.2.14 ábrán látható, az IL-2 termelés növekedése emelt szintű Jak3 kifejeződést és Stat5 foszforilációt eredményezett, valamint korábbi sejtciklusba lépést a pRB foszforilációján keresztül (4.2.13 ábra). Ezekkel összhangban 48 óra elteltével több sejt került a sejtciklus S G₂-M fázisába (4.2.11 ábra). Emellett a Bcl-2 fehérje már a CD336 kezelést követő 1. napon detektálható volt és szintje a 4. napig magasan maradt (4.2.12 ábra).

4.2.10 Az RXR kostimuláció elősegíti az RAR α vezérelt proliferáció növekedést

1 μ M-os optimális koncentrációban a *transz*-retinsav serkenti a T sejtek osztódását (Abb és mtsai, 1979; Coligan és mtsai, 1992; Abb és mtsai 1980). A *transz*-retinsav RAR α -hoz kötődő osztódást indukáló hatását vizsgálva a PHA stimulált T sejtekhez CD2503 RAR α antagonistát adtunk az 5. napon, amikor a legmarkánsabb különbséget tapasztaltuk az osztódó és a nem osztódó kultúrák között.



4.2.15 ábra. Az RXR kostimuláció hatása az RAR α kiváltotta T sejt proliferáció serkentésre

5x10⁵ T sejtet 5 μ g/ml PHA-val aktiváltunk retinoidok nélkül (fekete oszlopok) vagy *transz*-retinsav (10 nM) jelenlétében (szürke oszlopok) a jelzett retinoid komponensek mellett (CD2503 RAR α antagonistája, 100 nM; CD2624 RXR agonista, 100 nM; CD2665 RAR γ antagonistája 100 nM) 5 napon át. [³H]timidint (2 μ Ci) adtunk a kultúrákhoz és beépülését 12 óra elteltével detektáltuk. *Szignifikánsan eltérő *transz*-retinsav kezelt mintáktól (t-próba (p<0.05)).

A 4.2.15 ábrán bemutatott adatok szerint a CD2305, melynek önmagában csekély osztódást csökkentő hatása volt, teljesen meggátolta a *transz*-retinsav által kifejtett proliferáció növelő hatást, bizonyítva ezzel az RAR α szerepét e folyamatban. Ezek a megfigyelések sugallják, hogy a *transz*-retinsav származékok, melyek nem térnek el lényegesen a szintetikus retinoidoktól, szintén befolyásolhatják a sejtosztódást.

Mivel a 9-*cisz*-retinsav eltér a *transz*-retinsavtól (Urbach és Rando, 1994) és az RXR kostimuláció befolyásolja a T sejtekben zajló retinoid útvonal kimenetelét (Szondy és mtsai, 1998), megvizsgáltuk az RXR ligandkötés hatásait. Az RXR agonista CD2625 önmagában nem volt hatással a sejtosztódásra 10 μ M-os koncentrációban alkalmazva sem, de erősen fokozta a *transz*-retinsav alacsony koncentrációjánál tapasztalt sejtproliferációt (4.2.15 ábra). A *transz*-retinsav hatásának fokozódását tapasztaltuk RAR γ antagonistája alkalmazása esetén is.

5. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A most bemutatásra kerülő munkában perifériás T sejtek és T sejt klónok stimuláció hatására adott válaszát és az aktiváció indukálta sejthalál kiváltásának feltételeit vizsgáltuk különböző kísérleti rendszerekben. Célunk az volt, hogy felderítsük a TSR antigén-specifikus aktivációját követő molekuláris eseményeket és megtaláljuk azokat a tényezőket, amelyek meghatározzák a T sejt aktivációt követő választ és a T limfociták sorsát.

A naív T limfociták az APC-vel kapcsolatba kerülve aktiválódnak, differenciálódnak és antigén specifikus effektor és memória sejtekké alakulnak. A $CD4^+$ T limfociták fejlődésében szerepet játszó események felderítésével számos kutatócsoport foglalkozik, eredményeik alapján egy olyan progresszív modell képe rajzolódik ki, amelyben a T sejtet érő jel erőssége játssza a meghatározó szerepet a sejt válaszanak meghatározásában. Az aktivációs küszöbérték hierarchikus változásától függően sejtosztódás, differenciáció vagy aktiváció indukált sejthalál következik be (*Iezzi és mtsai, 1999; Sallusto és mtsai, 1999; Reinhardt és mtsai, 2001; Langenkamp és mtsai, 2002*). A segítő T sejtek stimulációjának erősségét befolyásolja 1) az APC felszínén megjelenő, MHC-II molekulákhoz kötött specifikus peptidek mennyisége, ez meghatározza a TSR által közvetített stimulációt, (2) az APC felől érkező kostimuláló jelek erőssége, melyek a jelerősítésben játszanak szerepet valamint (3) az antigén specifikus T sejt és az APS közötti kölcsönhatás időtartama, amely a két sejt adhéziós sajátosságaitól függ és befolyásolja az antigén bemutatás erősségét (*Valitutti és mtsai, 1995; Tuosto és mtsai, 1998; Wulfing és mtsai, 1997; Viola és Lanzavecchia, 1996; Viola és mtsai, 1999; Fraser és mtsai, 1991*). Ezen kísérletek legtöbbjét sejtvonalakon végezték, ahol a sejteket erős stimulussal gyors és teljes válaszra készítették (*Lanzavecchia és Sallusto, 2000*).

Jelen kísérleteinkben egy egér effektor/memória $CD4^+$ T sejt hibridóma vizsgálatával meghatároztuk azokat a feltételeket, amelyek az azonnali, korai, középtávú és késői jelek valamint az AICD indukcióját különböző sajátosságú antigén bemutató sejtek jelenlétében biztosítják. Az előzetes vizsgálatok során kifejlesztett *in vitro* modell rendszer (*Réthy és mtsai, 2002; Rajnavölgyi és mtsai, 1997; Gogolák és mtsai, 1996; Gogolák és mtsai, 2000*) lehetővé tette a stimulációs jelek tervezett irányítását, ezáltal a részleges vagy teljes aktiváció, illetve az AICD kiváltását a stimulált T sejtben.

Eredményeink azt mutatják, hogy az effektor/memória $CD4^+$ T sejtek válasza az antigén-specifikus stimulációra – amely kulcs szerepet játszik mind a sejtes, mind a humorális immunválasz szabályozásban (*Rajnavölgyi és Lányi, 2003*) – különösen érzékeny a vele kapcsolatba kerülő APS által közvetített jelekre. A jelen kísérletsorozatban a $CD4^+$ T limfociták antigén-specifikus aktivációra adott válaszait – amely az APS-ek felszínén megjelenő I-E^d vagy I-A^d molekulákhoz kapcsolódó agonista peptidek hatására alakul ki – kinetikai vizsgálatokban elemeztük. Eredményeink szerint a peptid-specifikus effektor/memória $CD4^+$ T sejtek aktivációjának érzékenysége, kinetikája és mértéke a peptid antigén koncentrációja mellett nagymértékben függ a résztvevő APS egyedi sajátosságaitól is. Így az antigén megjelenési helyén lévő APS száma és funkcionális állapota befolyásolhatja az adott effektor T limfocita válaszában intenzitását és azoknak a sejteknek a számát, amelyek AICD-vel reagálnak.

A szoros sejt-sejt kontaktus elengedhetetlen feltétele a T sejt és a hivatásos APS hatékony találkozásának. A két sejt közelsége az adhézión és kostimulátor molekulák, valamint a specifikus peptidet hordozó MHC és TSR kapcsolódásának eredményeként valósul meg és mindkét résztvevőre ható kommunikációt indít el, amely a közvetlen sejt kapcsolat mellett az oldott citokinek termelésén keresztül valósul meg.

Egyike a legkorábbi jelátviteli mechanizmusoknak az intracelluláris kalcium szint emelkedése, mely akár órákon át is fennmaradhat (*Negulescu és mtsai, 1996; Donnadieu és mtsai, 1992*). A kísérleteinkben alkalmazott APS-ek széles körben használt B sejt vonalak, primer B sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek voltak. A vizsgált B sejt vonalak hasonló mértékben fejezik ki az MHC-II molekulát és közel azonos mennyiségű peptid bemutatására képesek (*Rajnavölgyi és mtsai, 1997*). Mindezek ellenére a kísérleteinkben alkalmazott három, eltérő specificitású effektor/memória fenotípusú $CD4^+$ T sejt hibridómát eltérő mértékben voltak képesek aktiválni. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a peptid bemutatáson túl az APS-ek más egyedi sajátosságai felelősek az eltérő intenzitású T limfocita stimuláló képességért.

A legeredményesebb APS-nek a 2PK3 B sejtek bizonyultak, amelyek az exogén peptidek azonnali prezentálására voltak képesek és a T sejtrel való kapcsolatteremtésben is a leghatékonyabbnak bizonyultak. A teljes mértékű T sejt válasz, amely az erős T és B sejt kontaktus kialakulásában, a hosszan tartó intracelluláris kalcium szint fenntartásában, a transzkripciós faktorok aktiválódásában, a TSR sejtfelszíni megjelenésének csökkenésében, a FasL, CD69 és Nur77 expressziójának növekedésében, az IL-2 és a TNF- β gének

kifejeződésében és ezen citokinek szekréciójának emelkedésében, valamint az AICD megjelenésében nyilvánult meg, egyedül a leghatékonyabb antigén bemutató sejt, a 2PK3 jelenlétében következett be. Más APS-ek minőségileg és mennyiségileg eltérő T limfocita választ eredményeztek. A különböző tulajdonságú APS-ek hatékonysági sorrendje minden T sejt esetében megegyezőnek bizonyult, ami azt igazolja, hogy a B sejt felől érkező összehangolt jelek korán eldöntik az aktiválódó T sejtek további sorsát. Ezen megfigyelések jó összhangban vannak azoknak a kinetikai kísérleteknek az eredményeivel, amelyek szerint a 2PK3 APS képes a T sejt aktiváció leggyorsabb kiváltására.

A 2PK3 APS jelenlétében az összes T limfocita gyorsan aktiválódott, míg az A20 APS esetén a T sejteknek csak egy része vett részt a stimulációban, míg a sejtek másik része nem aktiválódott vagy gyengén válaszolt. A 2PK3 és az A20 esetében tapasztaltakkal ellentétben a TA3 APS nem indított mérhető mennyiségű $[Ca^{++}]_{ic}$ jelet a T sejt hibridóma sejtekben. Ez megerősítette, hogy a kalcium válasz a korai T sejt–B sejt kapcsolat erősségének a függvényében alakul. A T sejt–B sejt kontaktus idejének növelése nem befolyásolta az A20 és a TA3 APS jelenlétében tapasztalt gyengébb T sejt választ (*Réthy és mtsai, 2002*). Hasonló eredményeket kaptunk részlegesen agonista peptid alkalmazásakor is, amelyek az agonista peptiddel ellentétben a T sejteknek csak kisebb hányadában indukáltak kalcium jelet (*Wulfig és mtsai, 1997*). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy az $[Ca^{++}]_{ic}$ növekedése a sorozatos TSR–MHC-peptid kontaktusok számától függnek, ami a T sejt–APS kapcsolat erősségének és időtartamának függvénye.

Feltételezésünk szerint a 2PK3 sejtek gyors peptid felvételét és bemutatását a felszínükön lévő szabad vagy üres, újra felszínre kerülő MHC-II molekulák jelenléte teszi lehetővé. Ilyen molekulák előfordulása nem általános, de jelenlétüket dendritikus sejteken kimutatták (*Santambrogio és mtsai, 1999*). A 2PK3 sejtek különös sajátossága, hogy a sejt felszínükön nemcsak I-E^d molekulák jelennek meg, hanem az I-A^dα lánca deficienciája miatt I-E^dα/I-A^dβ láncokból kialakult vegyes dimerek is nagy mennyiségben fordulnak elő rajtuk (*Spencer és mtsai, 1992*). Feltételezzük, hogy az üres I-E heterodimer molekulák sejt felszínre jutását a feleslegben lévő intracelluláris I-Eβ láncok teszik lehetővé. Így a felszínre került üres, hibrid MHC-II molekulák egy része, képes az exogén peptid gyors megkötésére (*Gogolák és mtsai, 2000*).

Az $[Ca^{++}]_{ic}$ szint emelkedése, frekvenciája és időtartama bizonyítottan olyan transzkripciós faktorokat aktivál, amelyek a T limfociták effektor folyamatainak (pl. citokin termelés, membrán fehérjék kifejezése, AICD) génszintű szabályozásában játszanak szerepet (*Dolmetsch és mtsai, 1997; Dolmetsch és mtsai, 1998*). A TSR-en keresztüli jelátvitel által

szabályozott IL-2 gén transzkripcióját a kalcium/kalcineurin függő NF-AT sejtmagba való áthelyeződése és más transzkripció faktorokkal (AP-1, NF- κ B) való kollaborációja szabályozza (Gerondakis és mtsai, 1998; Rao és mtsai, 1997; Shapiro és mtsai, 1998; Rooney és mtsai, 1995). Az IL-2 citokinhez hasonlóan a TNF- α és a FasL génje is NF-AT szabályozás alatt áll, míg a CD69 és a CD40 promótere AP-1 kötőhelyet tartalmaz (Rooney és mtsai, 1995; Chuvpilo és mtsai, 1993; Goldfeld és mtsai, 1993; Latinis és mtsai, 1997; Tsitsikov és mtsai, 1994). Eredményeink a 2PK3 APS alkalmazása esetén – 15 perccel az antigén specifikus aktivációt követően – a T sejtekben az NF-AT gyors aktivációját mutatták, míg más APS-ek esetén ezt nem tapasztaltuk. Az NF-AT, AP-1 és NF- κ B transzkripció faktorok leghatékonyabb stimulációját 2PK3 jelenlétében figyeltük meg, az A20 és TA3 APS-ek kisebb hatékonysággal aktiválták azokat. Ezek a mérési adatok összhangban állnak a sejt – sejt kapcsolatok és a kalcium szint emelkedésének tanulmányozásakor tapasztaltakkal.

Az IP12-7 T sejtek kontaktusa a specifikus peptidet bemutató különböző APS-ekkel kimutatható mennyiségű IL-2 és TNF termelését valamint a CD69 molekula sejtfelszíni megjelenését eredményezte, ami a T sejt aktiváció kiváltását bizonyította. Az NF-AT, az AP-1 és az NF- κ B gyors aktivációját, a TSR leszabályozását, a TNF- β és a nur77 génnek expressziójának növekedését, a FasL megjelenését és az AICD kiváltását azonban csak a legeredményesebb 2PK3 APS alkalmazása esetén tudtuk kimutatni. Irodalmi adat, hogy az AICD a FasL kifejeződésének (Li-Weber és Krammoler, 2002) és a CD95-mediált apoptózis bekövetkeztének a függvénye (Dhein és mtsai, 1995; Ju és mtsai, 1995; Brunner és mtsai, 1995; Alderson és mtsai, 1995). A TSR leregulálása a TSR-en át kiváltott aktiváció és az Src kinázok által szabályozott korai jelátvivő események függvénye (Lanzavecchia és mtsai, 1999; Germain és Stefanova, 1999; Martin és Bevan, 1998). Összhangban a magas IL-2 termeléssel és a FasL megjelenésével a peptidet bemutató 2PK3 sejtekkel való kölcsönhatás az IP12-7 T hibridóma sejtek gyors apoptózisához vezet. Kimutatták, hogy az AICD függ a TSR stimuláció erősségétől és a FasL fehérjeszintézistől függő sejtfelszíni megjelenésétől (Tóth és mtsai, 1999). A 2PK3 B sejtek tehát a legerősebb T sejt aktiváció kiváltására képesek, mivel optimális peptid koncentráció jelenlétében a jelátviteli folyamatok következményeinek teljes sorát képesek aktiválni. Ezek hatékony effektor folyamatokat és végeredményben a sejtek AICD révén történő eliminációját eredményezik.

A 2PK3 sejtek funkcionális aktivitása a csontvelői eredetű dendritikus sejtekével vethetőek össze, amennyiben nanomoláris mennyiségű peptid és alacsony APS szám esetén is kimutatható mennyiségű citokin termelését váltják ki. A 2PK3 sejteken nagy számban jelennek meg a B7-1 és B7-2, a CD40 és CD44 kostimulátor molekulák. Ezek ligandumhoz való kötődése gátolja a programozott sejthalált (*Iezzi és mtsai, 1998; Kirchhoff és mtsai, 2000*).

A T sejtek 2PK3 sejtek jelenlétében kiváltott IL-2 szintézise a B7/CD28 interakció megaladályozásával teljes mértékben gátolható (*Glimcher és mtsai, 1982*). Ez a kezelés a gyors kalcium jelet csak kis mértékben érinti, de a jel tartós fennmaradása erőteljesen gátlódik. Ez egybevág azzal a megfigyeléssel, hogy a hatékony, de tranziens TSR-függő jelátvitel a CD28/B7 kölcsönhatás hiányában alacsony peptid dózis esetén is megtörténik, amennyiben a sejtfelszínen elegendő számú specifikus MHC-II-peptid komplex van jelen (*Réthy és mtsai, 2002*).

A T sejt válasz molekuláris szintű monitorozása kinetikai mérésekkel ebben a jól karakterizált kísérleti rendszerben elvezetett a különböző T limfocita effektor folyamatok követelményeinek és küszöbértékeinek megértéséhez. Összhangban a „kinetic proofreading” modellel (*McKeithan, 1995*), eredményeink azt demonstrálják, hogy a T sejt és az APS közötti konjugátumok kialakulásának kinetikája és intenzitása a sejten belüli események beindításához szükséges feltételekre eltérő mértékben hat. Így a TSR sejtfelszíni eltűnése, a FasL kifejeződése és az AICD a leghatékonyabb APS (2PK3) közreműködését igényli, a kalcium jel a 2PK3 és az A20 jelenlétében is indukálódik, míg a CD69 molekula sejtfelszíni megjelenését a 2PK3, az A20 és a TA3 APS egyaránt kiváltja.

A különböző sajátosságú APS-ek eltérő T sejt aktiváló képessége *in vivo* szituációkban is jelentős. Az effektor/memória T sejteknek a perifériás szövetekben a makrofágok, a dendritikus sejtek és a memória B sejtek mutathatják be a peptid antigéneket. Ezek a hivatásos antigén bemutató sejtek kevésbé hatékonyak, mint az aktivált dendritikus sejtek, melyek képesek a T sejt válasz elsődleges stimulálására a nyirokcsomóban, de elég prezentáló molekulát hordoznak az effektor/memória T limfociták aktiválásához. Ez – antigén jelenlétében – elősegíti az effektor/memória T sejtek túlélését. Függetlenül az antigénből származó peptid mennyiségétől, az adhézión és kostimulátor molekulák sejtfelszíni megjelenése nagymértékben függ az aktivációs szignáltól és az adott APS mikro környezetéből származó stimulusoktól. Így az antigén-specifikus effektor/memória T limfociták a perifériás szövetekben különböző APS-ekkel találkozhatnak, amelyek különböző T sejt stimuláló képességük révén eltérő mértékű aktivációt, végeredményként részleges vagy

teljes effektor aktivitást, esetleg AICD-t válthatnak ki. Az AICD-t elszenvedő sejtek aránya az antigén eliminálását kontrollálja. A T limfocita funkciók ilyen finomságú szabályozása fontos az antigén specifikus immunválasz pozitív és negatív regulációjában valamint az immunológiai memória és a tolerancia kifejlődésében és fenntartásában.

Mivel a retinoidok szabályozzák a timociták sejtosztódását és aktiváció indukálta sejtelhalását, így indokoltnak láttuk megvizsgálni a különböző retinsav receptorok aktivációjának hatásait a perifériás T limfocitákra.

Az RAR és RXR retinoid receptorok különböző expressziójának és kölcsönhatásainak bonyolultsága miatt a retinoidok fiziológiai hatásainak tanulmányozása nagyon nehéz. A vizsgálatok két lehetséges módja (1) a megfelelő receptor génjének kiütése homológ rekombinációval (*Lohnes és mtsai, 1993*) vagy domináns-negatív variánsok kifejezésével (*Saitou és mtsai, 1995*) és (2) receptor szelektív retinoid agonisták és antagonisták használata a megfelelő retinoid receptorok stimulálására vagy gátlására. Jelen munkánkban a második lehetőséggel éltünk az RAR α és az RAR γ receptorok humán perifériás T sejtek osztódására gyakorolt ellentétes hatásainak vizsgáltatához. Ezt az ellentétes hatást nem csak az bizonyítja, hogy az RAR α agonisták serkentik, míg az RAR γ szelektív retinoidok gátolja a T sejtek osztódását, hanem az is, hogy a különböző szintetikus retinoidok hatása erősen függ az egyes RAR receptorokhoz mutatott affinitásuktól. A CD437 nagy affinitással kötődik az RAR γ -hoz, míg RAR α -kötő képessége kicsi, a sejtproliferációt pedig nagymértékben gátolja. A CD2781 RAR γ -hoz mutatott K_d értéke a CD437-ével megegyező, de az RAR α receptorhoz sokkal nagyobb affinitással köt, így a sejtproliferációt kisebb hatékonysággal gátolja. Az RAR α specifikus retinoidok magas koncentrációban szintén sejtosztódást gátolnak bizonyultak, hiszen ekkor az RAR γ is aktív. A *transz*-retinsavról kimutatták, hogy 1 μ M-os koncentrációig elősegíti a proliferációt (*Abb és mtsai, 1980; Friedman és mtsai, 1993; Ertesvag és mtsai, 2002*), K_d értékei az RAR α -hoz 16 nM, míg az RAR γ -hoz 3 nM (*Szondy és mtsai, 1997*). Az RAR α stimulációja *transz*-retinsavval (*Friedman és mtsai, 1993*) és a sejten belül spontán zajló *transz*-retinsav átalakulás az RXR aktiváló 9-*cisz*-retinsavvá (*Urbach és Rando, 1994*), amely szintetikus retinoidok esetén nem történik meg, megatározhatja az RAR α útvonal sejtosztódást fokozó hatásának kimenetelét. A T sejtek apoptózisának szabályozásában fontos szerepe van az RXR ligandkötésének, mivel dönt az RAR α vagy a RAR γ jelátviteli út kifejeződése között (*Szondy és mtsai, 1998*).

Jelen munkánkban bizonyítottuk, hogy ezek a hatások érvényesülnek az aktivált perifériás T sejtek növekedés szabályozásában és sejtjelük regulálásában is. Kísérleteinkben receptor

specifikus retinoid agonistákat és antagonistákat alkalmaztunk egy vagy több retinoid receptor aktiválására vagy gátlására. Ezzel kíséreltük meg kideríteni, hogy a természetes retinsavak milyen receptorokon keresztül fejtik ki fiziológiás hatásaikat. Eredményeink azt mutatják, hogy az RXR kostimuláció – melyet *in vivo* körülmények között a 9CRA stimulál – hatékonyan befolyásolja a T sejt sorsát, az RAR α jelátviteli úton kifejezett sejthalál gátló és proliferáció fokozó hatásán keresztül.

Az IP12-7 T sejt hibridómáról leírták, hogy a FasL indukciója a Nur77 transzkripciós faktor segítségével valósul meg (Tóth és mtsai, 1999). Kimutattuk egy eger T sejt hibridómát és a humán Jurkat sejtvonalat vizsgálva, hogy az RAR α és az RAR γ retinoid receptorok ellentétes hatásai a nur77 gén transzaktivációs képességét befolyásolják, ezzel befolyásolva többek között a biológiailag aktív FasL forma kialakulását. Ezek az adatok megfelelnek azon későbbi megfigyelésekkel, hogy az RAR α képes gátolni a Jurkat sejtek aktiváció indukálta sejthalálát. Ezenkívül az RAR α és a Nur77 direkt kapcsolatát is sikerült kimutatni (Kang és mtsai, 2000).

Miután igazolódott, hogy a TSR-stimulációt követő sejthalál folyamatok befolyásolásában döntő szerepet játszanak a különböző retinsav receptorokon keresztül zajló jelátviteli folyamatok, indokoltnak láttuk megvizsgálni ezen magreceptorok sejtosztódásra kifejtett hatásait is.

Az RAR α által vezérelt sejtosztódás növelés a megnövekedett IL-2 termeléssel áll összefüggésben, mivel az RAR α szelektív CD336 retinoid elősegítette a PHA kiváltotta IL-2 produkciót, de nem volt hatása nagy feleslegben adott IL-2 esetén. A CD336 adását követő megemelkedett IL-2 koncentráció fokozta a Jak3 kifejeződését, a Stat5 foszforilációt, korábbi sejtciklusba lépést eredményezett (melyet a pRb foszforilációs állapotának emelkedésével detektáltunk), növelte a Bcl-2 expresszióját és gátolta az apoptózist. Ezen megfigyeléseink összhangban állnak azokkal a korábbi eredményekkel, miszerint a retinoidok sejtosztódást stimuláló hatása az IL-2 termelés szabályozásán keresztül érvényesülnek (Friedman és mtsai, 1993; Ballow és mtsai, 1997). Mai tudásunk szerint nincs retinoid válaszoló elem az IL-2 gén promóterében. Azonban bizonyították, hogy az RAR α *in vitro* képes gátolni az AP-1/OAP és specifikus DNS kötő helye közötti kapcsolatot, így akadályozva meg ezen AP-1 elem Oct-2 függő *cisz*-reguláló funkcióját, mely tudvalevőleg jelen van az IL-2 gén enhancerében (de Grazia és mtsai, 1994). Érdekes elgondolás, hogy az RAR α ligandkötése és/vagy az RXR kostimuláció szabályozhatja ezt a gátló hatást.

Amíg az RAR α aktiváció képes volt a T sejtek osztódását serkenteni az IL-2 termelés növelésével, addig az RAR γ ligandkötése gátolta a T sejt növekedést az IL-2 jelátviteli útból való beleszólással. Ráadásul az RAR γ stimuláció kis mértékben csökkentette az IL-2 termelődését, anélkül, hogy az IL-2R α mennyiségét jelentős mértékben befolyásolta volna. Az RAR γ specifikus retinoid alkalmazása csökkentette a Jak3 kifejeződését, valamint a Stat5 foszforilációját, amely transzkripciós faktor az IL-2 sejtosztódást elősegítő hatásának a közvetítője (*Friedmann és mtsai, 1996*). A Stat5 vezérelt sejt ciklusba kerülés elősegítése és a Bcl-2 szint emelkedése szintén gátolt volt az apoptózis beindítása nélkül. Ez összefüggésben lehet azzal a ténnyel, hogy az IL-2 egy Jak3 független sejt túlélő programot is szabályozhat (*Kawahara és mtsai, 1995*). Korábbi kísérleteinkben bizonyítottuk az RAR α és az RAR γ ellentétes hatásait a T sejt apoptózis szabályozásában. Most közölt adataink azt mutatják, hogy ezen retinoid receptorok a T sejtek proliferációjára is hasonló hatással vannak. Mindkét folyamatba kulcsfontosságú fehérjék szintjének szabályozásával és ezek jelátvitelben betöltött szerepének módosításával szólnak bele. A T limfociták osztódásának szabályozása szempontjából elengedhetetlen IL-2 termelődését az RAR α aktiváció elősegíti, míg az RAR γ ligandkötése gátolja. A T sejt apoptózis esetén a Nur77 korai apoptotikus fehérje szintje szabályozódik (*Calnan és mtsai, 1995*). Kísérleteinkből nyert adataink bizonyítják a két retinoid receptor ellentétes hatását a T sejt repertoár kialakításában. Az RAR α a timociták negatív szelekciójának gátlásával, valamint a perifériás T limfociták proliferációjának serkentésével és aktiváció indukálta sejthalálának megakadályozásával elősegíti a T sejt készlet növekedését. Az RAR γ ligandkötése ellenben csökkenti a rendelkezésre álló T sejt repertoár méretét azáltal, hogy elősegíti a timociták apoptózist, valamint gátolja a perifériás T sejtek osztódását és elősegíti aktiváció indította apoptózisukat.

Eredményeinket tehát az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Egy általunk kifejlesztett *in vitro* AICD modell segítségével egyetlen sejtvonalon (IP12-7 CD4⁺ effektor/memória T sejt hibridóma) és különböző sajátságú APS-ek használatával mutattuk be az eltérő minőségű és mennyiségű antigén bemutatás hatását a T sejt aktiváció korai, középtávú és késői eseményeinek indukciójára.
2. Kimutattuk, hogy a T sejtek antigén-specifikus aktivációját követő válasz nagymértékben függ az antigént bemutató sejtek sajátságaitól és a bemutatott peptid mennyiségétől.

3. Igazoltuk, hogy a T sejt aktivációs, effektor és apoptotikus folyamatai egymástól nem elválaszthatóak, mivel a legnagyobb mértékű sejt aktiváció (a 2PK3 APS alkalmazásakor) egyben az aktiváció indukálta sejthalál maximális kifejeződésével is együtt jár.
4. A különböző retinoid receptorok aktivált periferiás T sejtekre kifejtett hatásait vizsgálva bizonyítottuk, hogy az RAR α és γ receptorok stimulációjának eltérő hatásai vannak; míg az RAR α aktiváció megmenti a sejteket a TSR-indukálta apoptózistól és segíti azok proliferációját, addig az RAR γ ligandkötése sejthalált indukál és gátolja a T sejtek osztódását.
5. Kimutattuk, hogy ezen hatásokat a retinoid receptorok a Nur77 transzkripciós faktor transzaktivációs képességének, a FasL apoptotikus fehérje sejtfelszíni megjelenésének, valamint az IL-2 jelátvitel szabályozásának befolyásolása révén fejtik ki.

6. IRODALOMJEGYZÉK

Abb J, Bayliss GJ, Deinhardt F. Lymphocyte activation by the tumor-promoting agent 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). *J Immunol* 1979;122:1639-1642.

Abb J, Deinhardt F. Effects of retinoic acid on the human lymphocyte response to mitogens. *Exp Cell Biol* 1980;48:169-171.

Abbas AK. Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 1996;84:655–657.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:71–77.

Algarte M, Lecine P, Costello R, Plet A, Olive D, Imbert J. In vivo regulation of interleukin receptor α gene transcription by coordinated binding of constitutive and inducible factors in human primary cells. *EMBO J* 1995;14:5060-5072.

Anderson HA, Hiltbolt EM, Roche PA. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* 2000;1:156-162.

Arnold B, Schönrich G, Hämmerling GJ. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today* 1993;14:12–14.

Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7:549-557.

Ballow M, Xiang S, Greenberg SJ, Brodsky L, Allen LC, Rich G. Retinoic acid induced modulation of IL-2 mRNA production and IL-2 receptor expression on T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:167-169.

Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992;176:1099–1106.

Bensussan A, Leca G, Corva N, Boumsell L. Selective induction of autocyotoxic activity through the CD3 molecule. *Eur J Immunol* 1990;20:2615–2619.

Bissonette RP, Brunner T, Lazarchik SB, Yoo NJ, Boehm MF, Green DR, Heyman RA. 9-*cis* retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation. *Mol Cell Biol* 1995;15: 5576-5585.

Blomhoff HK, Smeland EB. Role of retinoids in normal hepatopoiesis and in the immune system. In Vitamin A in health and disease. Blomhoff R. ed. Marcel Dekker, New York, p. 451. 1994.

Boehme SA, Lenardo MJ. Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. *Eur J Immunol* 1993;23:1552–1560.

Bongrand P, Malissen B. Quantitative aspects of T-cell recognition: from within the antigen-presenting cell to within the T cell. *Bioassays* 1998;20:412-22.

Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wulfig C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, Beeson C, McConnell HM, Davis M. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity* 1998;9:459-66.

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green D. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD specific caspase activation and dependently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998;17:37–49.

Brand NJ, Petkovich M, Krust A, Chambon P, De The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 1998;332:850.

Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997;272:26159–26165.

Breitmeyer JB, Oppenheim SO, Daley JF, Levine HB, Schlossman SF. Growth inhibition of human T cells by antibodies recognizing the T cell antigen receptor complex. *J Immunol* 1987;138:726–731.

Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, Weiss A, Dustin ML. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* 2001;2:1159-1166.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, Green DR. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995;373:441–444.

Buday L, Egan SE, Rodriguez VP, Cantrell DA, Downward J. *J Biol Chem* 1994;269:9019-23.

Buzás EI, Brennan FR, Mikecz K, Garzo M, Negroiu G, Holló K, Cs-Szabó G, Pintye E, Glant TT. A proteoglycan (aggrecan)-specific T cell hybridoma induces arthritis in BALB/c mice. *J Immunol* 1995;155:2679-87.

Calnan BJ, Szychowski S, Chan FKM, Cado D, Winoto A. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 1995;3: 273-282.

Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 1984;224:1312-1316.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 1996;157:512–521.

Chambers CA, Allison JP. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:396.

Charpentier B, Bernardon JM. *Eur Pat* 1993;658553.

Charpentier B, Bernardon JM, Eustache J, Millois C, Martin B, Michel S, Shroot B. Synthesis, structure-affinity relationships and biological activities of ligands binding to retinoic acid receptor subtypes. *J Med Chem* 1995;38:4993-5006.

Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994;179:523-32.

Chuvpilo S, Schomberg C, Gerwig R, Heinfling A, Reeves R, Grummolt F, Serfling E. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5694-704.

Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shewach EM, Strober W. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. In *Current Protocols in Immunology* Wiley New York, 7.10.1. 1992.

D'Adamio L, Awad KM, Reinherz EL. Thymic and peripheral apoptosis of antigen-specific T cells might cooperate in establishing self tolerance. *Eur J Immunol* 1993;23:747-753.

Delescluse C, Cavey MT, Martin B, Reichert U, Maignan J, Darmon M, Shroot B. Selective high affinity RAR alpha and RAR beta retinoic acid receptor ligands. *Mol Pharmacol* 1990;40:556.

Delon J, Germain RN. Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* 2000;10:R923-R933.

Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/ (Fas/CD95). *Nature* 1995;373:438-441.

Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 1997;386:855-858.

Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998;392:933-936.

Dong Z, Sikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 1997;151:1205–1213.

Donnadieu E, Cefai D, Tan YP. Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J Immunol* 1992;48:2643-2653.

Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986;7:115–119.

Engedal N, Naderi S, Blomhoff HK. Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *J Immunol* 2002;169:5555-5563.

Ertesvag A, Engedal N, Naderi S, Blomhoff HK. (2002) Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *J Immunol* 2002;169:5555-5563.

Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986;95:99-105.

Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Geffer ML, Kamradt T. Peripheral tolerance in T cell receptortransgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 1996;26:130–135).

Fésüs L, Szondy Z, Uray I. Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl* 1995;22:151-161.

Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991;251:313-316.

Friedman A, Halevy O, Schrift M, Arazi Y, Sklan D. Retinoic acid promotes proliferation and induces expression of retinoic acid receptor alpha gene in murine T lymphocytes. *Cell Immunol* 1993;152:240-248).

Friedmann MC, Migone TS, Russel SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor β -chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93, 2077-2082.

Gause WC, Mitro V, Via C, Linsley P, Urban JF Jr, Greenwald RJ. Do effector and memory T helper cells also need B7 ligand costimulatory signals? *J Immunol* 1997;159:1055-58.

Germain R, Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* 1999;17:467-522.

Germain RN. The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *J Biol Chem* 2001;276:35223-35226.

Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M. The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1998;10:353-9.

Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Bertoglio J. Recent advances in the understanding of interleukin-2 signal transduction. *J Clin Immunol* 1998;18, 307-320.

Glimcher LH, Hamano T, Asofsky R, Katz EH, Hedrick S, Schwartz RH, Paul WE. I region-restricted antigen presentation by B cell-B lymphoma hybridomas. *Nature* 1982; 298:283.

Gogolák P, Réthi B, Horváth A, Tóth GK, Cervenák L, László G, Rajnavölgyi É. Collaboration of TCR-, CD4- and CD28-mediated signalling in antigen-specific MHC class II-restricted T-cells. *Immunol Letters* 1996;54:135-44.

Gogolák P, Simon A, Horváth A., Réthi B., Simon I., Berkics K., Rajnavölgyi É., Tóth G.K. Mapping of a protective helper T cell epitope of human influenza A virus hemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(1):190-198.

Goldfeld AE, McCaffrey PG, Strominger JL, Rao A. Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J Exp Med* 1993;178:1365-79.

Gonzalo JA, Baixeras E, Gonzalez-Garcia A, George-Chandy A, Van Rooijen N, Martinez C, Kroemer G. Differential in vivo effects of a superantigen and an antibody targeted to the same T cell receptor. Activation-induced cell death vs passive macrophage-dependent deletion. *J Immunol* 1994;152:1597–1608.

Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N engl J Med* 1994;310:1023.

Gougeon ML. Does apoptosis contribute to CD4 T cell depletion in human immunodeficiency virus infection? *Cell Death Differ* 1995;2:1-8.

de Grazia U, Felli MP, Vacca V, Farina AR, Maroder M, Cappabianca L, Meco D, Farina M, Screpanti L, Frati L. Positive and negative regulation of the composite octamer motif of the interleukin 2 enhancer by AP-1, Oct-2, and retinoic acid. *J Exp Med* 1994;180:1485-1497.

Green JM, Noel PJ, Sperling AI, Walunas TL, Gray GS, Bluestone JA, Thompson CB. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1994;1:501-8.

Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002;1:19–30.

Harder T. Raft membrane domains and immunoreceptor functions. *Adv Immunol* 2001;77:45-92.

Hatcjóhcock KS, László G, Dickler HB, Brandshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 1993;262:905-907.

Heyman RA, Mangelsdorf JA, Dyck JA, Stein RB, Evans RM, Thaller. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoic acid X receptor. *Cell* 1992;68:397.

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 2002;16:759–760.

Hollósi M, Ismail AA, Mantsch HH, Penke B, Váradi G, Tóth GK, Laczkó I, Kurucz I, Nagy Z, Fasman G, Rajnavölgyi É. Conformational and functional properties of peptides covering the intersubunit region of influenza virus hemagglutinin. *Eur J Biochem* 1992;206:421-425.

Holly S, Majer Zs, Tóth GK, Váradi Gy, Rajnavölgyi É, Laczkó I and Hollósi M. Circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopic studies on T cell epitopic peptide fragments of influenza virus hemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1247-1254.

Horváth A, Tóth GK, Gogolák P, Nagy Z, Kurucz I, Pecht I, Rajnavölgyi É. A hemagglutinin-based multi-peptide construct elicits enhanced protective immune response in mice against influenza A virus infection. *Immunol Letters* 1998;60:127-36.

Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:17255–17257.

Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998;8:89-95.

Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 1999;29:4092-4101.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190–195.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG Jr. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000;407:645-648.

Itoh Y, Germain RN. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;186:757-66.

Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995;7:333-42.

Janssen O, Wesselborg S, Heckl-Östreicher B, Pechold K, Bender A, Schondelmaier S, Moldenhauer G, Kabelitz D. T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor $\gamma\delta^+$ T cells. *J Immunol* 1991;146:35–39.

Janssen O, Wesselborg S, Kabelitz D. Immunosuppression by OKT3-induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action. *Transplantation* 1992;53:233–234.

Jiang XL, Everson MP, Lamon EW. A mechanism of retinoid potentiation of murine T-cell responses: early upregulation of interleukin-2 receptors. *Int J Immunopharmacol* 1993;15:309-317.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444–448.

Kabelitz D, Janssen O. Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front Biosci* 1997;2:61–77.

Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Himi T. and Shudo K. Retinobenzoic acids: structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *J Med Chem* 1988;31:2182.

Kang HJ, Song MR, Lee SK, Shin EC, Choi YH, Kim SJ, Lee JW, Lee MO. Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of nur77: a possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acids. *Exp Cell Res* 2000;256:545-554.

Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases *J. Biol Chem* 1995;270:16483-6.

Katsikis PD, García-Ojeda ME, Wunderlich ES, Smith CA, Yagita H, Okumura K, Kayagaki N, Alderson M, Herzenberg LA. Activation-induced peripheral blood T cell apoptosis is Fas independent in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996;8:1311–1317.

Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 1991;349:245–248.

Kawahara A, Minami Y, Miyazaki T, Ihle JN, Taniguchi T. Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma-chain-associated Jak3 in the IL-2-induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gene induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8724-8728.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–257.

Kerr JFR, Harmon BV Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO (eds) Apoptosis: the molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 5–29. 1991.

Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammoler PH. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 2000;30:2765-2774.

Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F, Farrar WL. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol* 1999;65:891.

Klas C, Debatin KM, Jonker R, Krammer PH. Activationinterferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625–630.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132–1136.

Kroemer G, Martinez-AC (eds). Apoptosis in immunology. *Current topics in microbiology and immunology*, vol 200, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1995.

Kundig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrucker HW, Sebzda E, Bachmann MF, Mak TW, Ohashi PS. *Immunity* 1996;5:41-52.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;277:680.

Langenkamp A, Casorati G, Garavaglia C, Dellabona P, Lanzavecchia A, Sallusto F. T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intracloal functional diversification. *Eur J Immunol* 2002;32, 2046-2054.

Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 1999;96:1-4.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000;290:92-97.

Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J Immunol* 1997;158:4602-11.

Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 2002;295:1539-1542.

Leitenberg D, Balamuth F, Bottomly K. Changes in the T cell receptor macromolecular signaling complex and membrane microdomains during T cell development and activation. *Semin Immunol* 2001;13:129-138.

Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858–861.

Lezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. *Immunity* 1998;8:89-95.

Lissy NA, Davis PK, Irwin M, Kaelin WG, Dowdy SF. A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 2000;407:642-645.

Liu Y, Wenger RH, Zhao M, Nielsen PJ. Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1997;185:251-62.

Li-Weber M, Krammoller PH. The death of a T-cell: expression of the CD95 ligand. *Cell Death Differ* 2002;9:101-103.

Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M, Chambon P. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* 1993;73, 643-658.

Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD, Nelson BH. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of stat5. *J Immunol* 2000;164:2533-2541.

Lohr J, Knoechel B, Jiang S, Sharpe AH, Abbas AK. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 2003;4(7):664-9.

Majer Zs, Holly S, Tóth GK, Váradi Gy, Nagy Z, Horváth A, Rajnavölgyi É, Laczkó I, Hollósi M. Mapping the intersubunit region of influenza virus hemagglutinin: comparative CD and FTIR spectroscopic studies on multiple antigenic peptides. *Arch Biochem Biophys* 1995;322:112-118.

Malek TR, Yu A, Vincek V, et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002;17:167–78.

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83: 835-839.

Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 1996;184:1155–1160.

Martin S, Bevan MJ. Transient alteration of T cell fine specificity by a strong primary stimulus correlates with T cell receptor down-regulation. *Eur J Immunol* 1998;28:2991-3002.

Martin BJ, Bernardon JM, Cavey MT, Bernard B, Carlavan L, Charpentier B, Pilgrim WR, Shroot B, Reichert U. Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptors. *Skin Pharmacol* 1992;5:57.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545–1556.

McKeithan TW. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5042-46.

McConkey DJ, Hartzell P, Amador-Pérez JF, Orrenius S, Jondal M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 1989;143:1801–1806.

Mercep M, Bluestone JA, Noguchi PD, Ashwell JD. Inhibition of transformed T cell growth in vitro by monoclonal antibodies directed against distinct activating molecules. *J Immunol* 1988;140:324–335.

van der Merwe PA, Davis SJ, Shaw AS, Dustin ML. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 2000;12:5-21.

van Der Merwe PA, Davis SJ. Immunology. The immunological synapse — a multitasking system. *Science* 2002;295:1479-1480.

Meuer SC, Hodgdon JC, Hussey RE, Protentis JP, Schlossman SF, Reinherz EL. Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors on human T cell clones. *J Exp Med* 1983;158:988–993.

Mixter PF, Russell JQ, Morrisette GJ, Charland C, Aleman-Hoey D, Budd RC. A model for the origin of TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ B220 $^+$ cells based on high affinity TCR signals. *J Immunol* 1999;162:5747-5756.

Mollereau B, Deckert M, Déas O, Rieux-Laucat F, Hirsch F, Bernard A, Fischer A, Lynch DH, Charpentier B, Le Deist F, Senik A. CD2-induced apoptosis in activated human peripheral T cells. A Fas-independent pathway that requires early protein tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 1996;156:3184–3190.

Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Threedimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998;395:82-86.

Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M, He HT. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 1998;17:5334-5348.

Moriggl R, Tropham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster MY, Bunting KD, Grosveld G, Ihle JN. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 1999;10:249-259.

Nagy L, Thomazy V, Shipley G, Fésüs L, Lamph W, Heyman RA, Chandraratna AS, és Davies PJA. Activation of retinoid x receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol* 1995;15:3540-3551.

Nagy Z, Rajnavolgyi E, Hollosi M, Toth GK, Varadi G, Penke B, Toth I, Horvath A, Gergely J, Kurucz I. The intersubunit region of the influenza virus hemagglutinin is recognized by antibodies during infection. *Scand J Immunol* 1994;40:281-91.

Nagy Zs, Wang Y, Erwin-Cohen RA, Aradi J, Monia B, Wang HL, Stepkowski SM, Rui H, Kirken RA. Interleukin-2 family cytokines stimulate phosphorylation of the Pro-Ser-Pro motif of Stat5 transcription factors in human T cells: resistance to suppression of multiple serine kinase pathways. *J Leukoc Biol* 2002;72:819

Nau GJ, Moldwin RL, Lancki DW, Kim DK, Fitch FW. Inhibition of IL 2-driven proliferation of murine T lymphocyte clones by supraoptimal levels of immobilized anti-T cell receptor monoclonal antibody. *J Immunol* 1987;139:114–122.

Nau GJ, Kim DK, Fitch FW. Agents that mimic antigen receptor signaling inhibit proliferation of cloned murine T lymphocytes induced by IL-2. *J Immunol* 1988;141:3557–3563.

Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Keschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996;4:421-430.

Nelson BH. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. *Curr Dir Autoimmun* 2002;5:92 –112.

Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T cell receptor for antigen. *Nature* 1990;347:286–289.

Oberg H-H, Sanzenbacher R, Lengl-Janssen B, Dobmeyer T, Flindt S, Janssen O, Kabelitz D. Ligation of cell surface CD4 inhibits activation-induced death of human T lymphocytes at the level of Fas ligand expression. *J Immunol* 1997;159:5742–5749.

O’Hehir RE, Lamb JR. Induction of specific clonal anergy in human T lymphocytes by *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8884–8888.

Okabe T, Nawata H. NGF-B/nur77 family involved in T cell apoptosis. *Nippon Rinsho* 1996;54:1768-1772.

Okada C, Kizaki H, Tadakuma T. T cell receptor-mediated DNA fragmentation and cell death in T cell hybridomas. *J Immunol* 1990;144:2096–2101.

Penninger JM, Crabtree GR. The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 1999;96:9-12.

Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signalling mediated by RXR heterodimerisation with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 1995;9:769-782.

Pestano GA, Zhou Y, Trimble LA, Daley J, Weber GF, Cantor H. Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* 1999;284:1187-1191.

Peter ME, Dhein J, Ehret A, Hellbardt S, Walczak H, Moldenhauer G, Krammer PH. APO-1(CD95)-dependent and –independent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines. *Int Immunol* 1995;7:1873–1877.

Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CG, Medema JP, Debatin KM, Krammer PH. Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 deathinducing signaling complex. *Eur J Immunol* 1997;27:1207–1212.

Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1998;10:545–551.

Peterson EJ, Clements JL, Fang N, Koretzky GA. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1998;10:337-44.

Portolés P, de Ojeda G, Criado G, Fernández-Centeno E, Rojo JM. Antibody-induced CD3-CD4 coligation inhibits TCR/CD3 activation in the absence of costimulatory signals in normal mouse CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Immunol* 1999;195:96–109.

Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev* 1998;165:287-300.

Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB, Miller RG. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 1996;156: 1788–1798.

Rajnavölgyi É, Nagy Z, Kurucz I, Gogolák P, Tóth GK, Váradi G, Penke B, Tigyi Z, Hollósi M, Gergely J. T cell recognition of the posttranslationally cleaved intersubunit region of influenza virus hemagglutinin. *Mol Immunol* 1994;31:1403-1414.

Rajnavölgyi É, Horváth A, Gogolák P, Tóth GK, Fazekas G, Fridkin M, Pecht I. Characterizing immunodominant and protective influenza hemagglutinin epitopes by functional activity and relative binding to major histocompatibility complex class II sites. *Eur J Immunol* 1997;27:3105-14.

Rajnavölgyi É, Lányi Á. Role of CD4⁺ T lymphocytes in antitumor immunity. *Adv Cancer Res* 2003;87:195-249.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707-47.

Razi-Wolf Z, Freeman GJ, Galvun F, Benacerraf B, Nadler L, Reiser H. Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81992;9:4210-4214.

Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 1998;8:615–623.

Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001;410:101-105.

Réthi B, Detre C, Gogolák P, Kolonics A, Magócsi M, Rajnavölgyi É. Flow cytometry used for the analysis of calcium signaling induced by antigen-specific T-cell activation. *Cytometry* 2002;47:207–216.

Robey E, Allison P. T-cell activation: integration of signals from antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* 1995;16:306.

Rooney JW, Sun YL, Glimcher LH, Hoey T. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation *Mol Cell Biol* 1995;15:6299-310.

Ross AC. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:303.

Rudd CE. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* 1999;96:5-8.

Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. Receptorstimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2151–2155.

Saitou M, Sugai S, Tanaka T, Shimouchi K, Fuchs E, Narumiya N, Kakizuka A. Inhibition of skin development by targeted expression of dominant-negative retinoic acid receptor. *Nature* 1995;374:159-162.

Salbert G, Fanjul A, Piedrafita FJ, Lu XP, Kim SJ, Tran P, Pfahl M. Retinoic acid receptors and retinoid X receptor alpha down-regulate the transforming growth factor-beta 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol Endocrinol* 1993;7:1347.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-712.

Salmon M, Pilling D, Borthwick NJ, Viner N, Janossy G, Bacon PA, Akbar AN. The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol* 1994;24:892–899.

Sanchez-Madrid F, del Pozo M. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 1999;18:501-11.

Santambrogio L, Sato AK, Fischer FR, Dorf ME, Stern LJ. Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(26):15050-5.

Sanzenbacher R, Kabelitz D, Janssen O. SLP-76 binding to p56lck: a role for SLP-76 in CD4-induced desensitization of the TCR/CD3 signaling complex. *J Immunol* 1999;163:3143–3152.

Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990;343:170–173.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:1541–1548.

Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, and Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;170:145.

Schönrich G, Kalinke U, Momburg F, Malissen M, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B, Hämmerling GJ, Arnold B. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991;65:293–304.

Semba RD. Vitamin A, immunity and infection. *Clin Infect Dis* 1994;19:489.

Semba RD. The role of Vitamin A and related retinoids in immune function. *Nutr Rev* 1998;56:S38.

Shapiro VS, Truitt KE, Imboden JB, Weiss A. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol* 1997;17:4051-58.

Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A. Nuclear factor of activated T cells and AP-1 are insufficient for IL-2 promoter activation: requirement for CD28 up-regulation of RE/AP. *J Immunol* 1998;161:6455-58.

Shi Y, Szalay MG, Paskar L, Boyer M, Singh B, Green D. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 1990;144:3326–3333.

Shi Y, Bissonnette RP, Parfrey N, Szalay M, Kubo RT, Green DR. In vivo administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. *J Immunol* 1991;146:3340–3346.

Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJT. Antibodies to CD3/T cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989;337:181-184.

Spencer JS, McCormack JE, Kubo RT. Characterization of defective I-A surface expression in a mixed isotype expressing murine B cell lymphoma: continued expression of E α^d A β^d pairs. *Int Immunol* 1992;4:905.

Sperling AI, Sedy JR, Manjunath N, Kupfer A, Ardman B, Burkhardt JK. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J Immunol* 1998;161:6459-62.

Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001;15:751-761.

Sytwu HK, Liblau RS, McDevitt HO. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1996;5:17–30.

Szegezdi É, Kiss I, Simon A, Blaskó B, Reichert U, Michel S, Sándor M, Fésüs L, Szondy Z. Stimulation of RAR α regulates negative selection of thymocytes by inhibiting both DNA binding of nur77 and synthesis of bim. *J Immunol* 2003;170:3577-3584.

Szondy Z, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Tóth R, Ancian P, Fésüs L. Induction of apoptosis by retinoids and RAR gamma selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway. *Mol Pharmacol* 1997;51:972-982.

Szondy Z, Lecoeur H, Fésüs L, Gougeon ML. All-trans retinoic acid inhibition of anti-CD3 induced T cell apoptosis in HIV-infection mostly concerns CD4⁺ T lymphocytes and is mediated via regulation of FAS-L expression. *J Infect Dis* 1998;178:1288-1298.

Szondy Z, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Tóth R, Karászi E, Fésüs L. Inhibition of activation-induced apoptosis of thymocytes by all-trans and 9-cis retinoic acids is mediated via retinoic acid receptor alpha. *Biochem J* 1998;331:767-774.

Szöllősi J, Horejsi V, Bene L, Angelisova P, Damjanovich S. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20 and tetraspan molecules (CD53, CD81 and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol.* 1996;157: 2939-2946.

Tadakuma T, Kizaki H, Odaka C, Kubota R, Ishimura Y, Yagita H, Okumura K. CD4⁺CD8⁺ thymocytes are susceptible to DNA fragmentation induced by phorbol ester, calcium ionophore and anti-CD3 antibody. *Eur J Immunol* 1990;20:779–784.

Takahashi S, Maecker HT, Levy R. DNA fragmentation and cell death mediated by T cell antigen receptor/CD3 complex on a leukemia T cell line. *Eur J Immunol* 1989;19:1911–1919.

Theze J, Alzari PM, Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 1996;17:481-486.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456–1462.

Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998;10:552–558.

Tsitsikov EN, Ramesh N, Geha RS. Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol Immunol* 1994;31:895-900.

Tóth GK, Váradi G, Nagy Z, Monostori É, Penke B, Hegedűs Z, Andó I, Fazekas Gy, Kurucz I, Mák M, Rajnavölgyi É. Branched polypeptides as antigens for influenza virus hemagglutinin and T cell receptor subunits. *Peptide Res* 1993;6:272-280.

Tóth R, Szegezdi É, Molnár G, Lord JM, Fésüs L, Szondy Z. Regulation of cell surface expression of Fas (CD95) ligand and susceptibility to Fas (CD95)-mediated apoptosis in activation-induced T cell death involves calcineurin and protein kinase C, respectively. *Eur J Immunol* 1999;29:383-93.

Tucek-Szabo CL, Andrić S, Lacy E, Elkon KB, Nikolic-Zugic J. Surface T cell Fas receptor/CD95 regulation, in vivo activation, and apoptosis. Activation-induced death can occur without Fas receptor. *J Immunol* 1996;156:192–200.

Tuosto L, Acuto O. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur J Immunol* 1998;28:2131-42.

Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM and Mellman I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 2000;288:522-527.

Ucker DS, Ashwell JD, Nickas G. Activation-driven cell death I. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation. *J. Immunol.* 1989;143:3461-3469.

Urbach J, Rando RR. Isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis retinoic acid. *Biochem J* 1994;299:459.

Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995;375:148-51.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627–637.

Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996;4:321-28.

Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998;280:243-248.

Van Parijs L, Biuckians A, Ibraghimov A, et al. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* 1997;158:3738 –45.

Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:1597–601.

Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996;273:104-106.

Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 1999;283:680-682.

Vukmanovic S, Zamoyska R. Anti-CD3-induced cell death in T cell hybridomas: mitochondrial failure and DNA fragmentation are distinct events. *Eur J Immunol* 1991;21:419–424.

Wang R, Rogers AM, Rush BJ, Russell JH. Induction of sensitivity to activation-induced death in primary CD4⁺ cells: a role for interleukin-2 in the negative regulation of responses by mature CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:2263–2270.

Webb S, Sprent J. Downregulation of T cell responses by antibodies to the T cell receptor. *J Exp Med* 1987;165:584–589.

Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249–1256.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323–330.

Welte T, Leitenberg D, Dittel BN, al-Ramadi NK, Xie B, Chin YE, Janeway Jr, CA, Bothwell ALM, Bottomly K, Fu X-Y. STAT5 interaction with the T cell receptor complex and stimulation of T cell proliferation. *Science* 1999;283:222–225.

Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 1993;150:4338–4345.

West KP, Howard GR, Sommer A. Vitamin A and infection: public health implications. *Annu Rev Nutr* 1989;9:63.

Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 1993;13:5794–5804.

Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor *nur77* in apoptosis of T cell hybridomas. *Nature* 1994;367:277–281.

Wulfig C, Rabinowitz JD, Beeson C, Sjaastad MD, McConnell HM, Davis MM. Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *J Exp Med* 1997;185:1815–1825.

Woronicz JD, Lina A, Calnan BJ, Szychowski S, Cheng L, Winoto A. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:6364–6376.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;184:555–556.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67–77.

Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 1998;8:723-732.

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129–1132.

Yang Y, Bailey J, Vacchio MS, Yarchoan R, Ashwell JD. Retinoic acid inhibition of *ex vivo* human immunodeficiency virus-associated apoptosis of peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 3051-3055.

Yang Y, Mercep M, Ware CF, Ashwell JD. Fas and activation-induced fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J. Exp. Med.* 1995;181:1673-1682.

Yang Y, Minucci S, Ozato K, Heyman RA, Ashwell JD. Efficient inhibition of activation-induced fas ligand upregulation and T cell apoptosis by retinoids requires occupancy of both retinoid X receptors and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 1995;270:18672-18677.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:1533–1544.

Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson MI, Cameron J, Graupner T, Hermann T, Tran P, Pfahl M. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 1992;358:587.

Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998;92:83-92.

Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348–351, Sytwu HK, Liblau RS, McDevitt HO (1996) The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1995;5:17–30.

7. KÖZLEMÉNYEK

7.1 Az értekezésben felhasznált közlemények

Ludányi K, Gogolák P, Réthi B, Detre C, Matkó J, Rajnavölgyi É. Antigen presenting cell-induced fine tuning of murine helper T cell activation and death. *Cell Signal* 2004 (IF: 4.362)

Ludányi K, Nagy Zs, Alexa M, Reichert U, Michel S, Ancian P, Fésüs L, Szondy Z. Ligation of retinoic acid receptor α promotes IL-2 production, while ligation of retinoic acid receptor γ inhibits IL-2 signaling in phytohaemagglutinin-stimulated T cells (bírálatra beküldve)

Tóth R, Szegezdi É, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Ancian P, **Kis-Tóth K**, Macsári Z, Fésüs L, Szondy Z. Activation-induced apoptosis and cell surface expression of Fas (CD 95) ligand are reciprocally regulated by retinoid acid receptor α and γ and involve nur77 in T cells. *Eur J Immunol* 2001;31:8. (IF: 4.99)

7.2 Egyéb közlemények

Hajas Gy, Zsiros E, László T, Hajdú P, Somodi S, Réthi B, Gogolák P, **Ludányi K**, Panyi Gy, Rajnavölgyi É. New phenotypic, functional and electrophysiological characteristics of KG-1 cells. *Imm Letters* (IF: 1.847)

Tóth B, **Ludányi K**, Reichert U, Michel S, Fésüs L, Szondy Z. Retinoid-induced Fas (CD95) ligand expression is mediated via RAR γ and involves Nur77 in T cells. *Eur J Immunol* (IF: 4.832)

Kövesdi D, Pászty K, Enyedi Á, Kiss E, Matkó J, **Ludányi K**, Rajnavölgyi É, Sármai G. Antigen receptor mediated signaling pathways in transitional immature mouse B cells. *Cell Signal* (IF: 4.362)

Rethi B, Fluor C, Mowafi F, Grützmeier S, De Milito A, **Ludányi K**, Kiss Cs, Rajnavölgyi E, Chiodi F. Potential role of IL-7 in modulation of IL-7R α and Fas expression on T cells during HIV infection. (bírálatra beküldve)

Miklós I, Benkő Zs, **Ludányi K**, Sipiczky M. Point mutation in the D-loop of praline tRNA can cause cell division defect in *Shizosaccharomyces pombe*. (bírálatra beküldve)

7.3 Konferencia absztraktok és előadások

2003: 12th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System in Sopron: **Ludányi K**, Gogolák P, Réthi B, Detre C, Horváth A, Matkó J, Rajnavölgyi É. Antigen presenting cell-induced fine tuning of murine helper T cell activation and death. (poszter)

2003: 12th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System in Sopron: Detre C, Kiss E, **Ludányi K**, Pászty K, Enyedi Á, Réthi B, Rajnavölgyi É, Matkó J. Membrane ceramide release may control the sensitive balance of activation, survival and death signals in T cells: implications in rescuing from AICD. (előadás)

2003: EFIS, Rhodos: Detre C, **Ludányi K**, Gombos I, Réthi B, Vámosi G, Rajnavölgyi É, Matkó J. Lipid rafts in APC and ceramide in T cell membrane modulate activation threshold and death signaling in APC (B cell) – T cell conjugates/synapses. (poszter)

2003: XXXIII. Membrántranszport Konferencia, Sümeg: Detre C, **Ludányi K**, Gombos I, Kiss E, Réthi B, Rajnavölgyi É, Matkó J. A ceramid szerepe az antigen-specifikus T limfocita aktivációban és sejthalálban (előadás)

2003: International summer school on: From transcription to physiology; regulation of gene expression and protein function in an integrated context in Spetsai, Greece; Tóth B, **Kis-Tóth K**, Szondy Z. Role of Fas ligand and Nur77 in the T cell apoptosis induced by retinoids. (poszter)

2003: A Magyar Biokémiai Egyesület 8. Munkaértekezlete, Sopron: Tóth B, **Kis-Tóth K**, Fésüs L, Szondy Z.A FasL és a Nur77 szerepe a retinoid-indukált T sejt apoptózisban. (poszter)

2002: A Magyar Immunológiai Társaság 32. Kongresszusa, Kaposvár: **Ludányi K**, Réthi B, Gogolák P, Kósik N, Kurucz I, Rajnavölgyi É. Az Il-7 megvonás molekuláris hátterének tanulmányozása. (poszter)

2001: A Magyar Immunológiai Társaság 31. Kongresszusa, Eger: **Kis-Tóth K**, Gogolák P, Detre C, Rajnavölgyi É. T-sejt aktiváció és apoptózis: a döntés molekuláris háttere. (poszter)

2000: A Magyar Biokémiai Egyesület 6. Munkaértekezlete, Sárospatak: **Kis-Tóth K**, Réthi B, Gogolák P, Rajnavölgyi É. T-sejt aktiváció és apoptózis: a döntés molekuláris háttere. (poszter)

2000: A Magyar Immunológiai Társaság 31. Kongresszusa, Budapest: **Kis-Tóth K**, Réthi B, Gogolák P, Rajnavölgyi É. T-sejt aktiváció és apoptózis: a döntés molekuláris háttere. (poszter)

2000: A Magyar Immunológiai Társaság 30. Kongresszusa, Budapest: Réthi B, Gogolák P, Derte C, Kolonics A, **Kis-Tóth K**, Magócsi M, Rajnavölgyi É. T-sejt aktiváció vizsgálata különböző antigén prezentáló sejtek jelenlétében. (előadás)

2000: The 14th European Immunology Meeting, EFIS, in Poznan, Poland; Réthi B, Gogolák P, **Kis-Tóth K**, Derte C, Kolonics A, Magócsi M, Rajnavölgyi É. Antigen presenting cell-induced fine tuning of murine helper T cell activation. (előadás)

2000: A Magyar Biokémiai Egyesület 5. Munkaértekezlete, Sopron: Réthi B, Gogolák P, Horváth A, **Kis-Tóth K**, Detre C, Kolonics A, Magócsi M, Rajnavölgyi É. Az antigén prezentáló sejt fenotípusának hatása a T-sejt aktivációra. (poszter)

1999: A Magyar Biokémiai Egyesület 4. Munkaértekezlete, Eger: **Kis-Tóth K**, Szondy Zs, Fésüs L. A retinoidok hatása aktivált T-limfocitákra. (poszter)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm **Témavezetőimnek** a számtalan szakmai és emberi segítséget, mellyel ténykedéseimet és lelkeimet támogatták.

Köszönöm **Prof. Dr. Fésüs Lászlónak**, hogy munkámat a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben lehetővé tette.

Köszönöm **Gogolák Péter, Réthi Bence és Lányi Árpád** munkámhoz nyújtott segítségét valamint hogy barátaimként tarthatom őket számon.

Köszönettel tartozom **Nagyné Kovács Erzsébetnek, Veres Ágotának és Tímárné Veres Erzsébetnek** a magas szintű asszisztensi tevékenységükért, mellyel munkámat támogatták.

Köszönöm az **Immunológia Intézet valamennyi dolgozójának**, hogy olyan légkört teremtettek a munkahelyünkön, melyben jól éreztem magam.

Köszönettel tartozom **Fehér Anitának, Detre Cynthiának és Hajas Györgynek** baráti támogatásukért.

Köszönöm **kollaborációs partnereinknek**, hogy megtiszteltek bizalmukkal és velük dolgozhattam.

Köszönettel tartozom **Férjemnek**, aki mindig és mindenben támogatta elhatározásomat és vállalta az ezzel járó lemondásokat.