

# **A timociták szelekciós lépéseit befolyásoló szolubilis molekulák és sejtes interakciók modell vizsgálata**

**Ph.D. ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Pálinkás László**

A-139 Az Immunológia alapjai  
Programvezető: Dr. Németh Péter  
Témavezető: Dr. Berki Timea

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar



**Pécs  
2009**



## BEVEZETÉS

A T-limfociták a B-sejtek mellett az adaptív (specifikus) immunrendszer meghatározó sejttípusai. Az immunválasz fontos szabályozói, de részt vesznek a vírussal vagy intracelluláris parazitákkal fertőzött sejtek felismerésében és eliminálásában, a tumor sejtek elpusztításában, továbbá alapvető szerepet játszanak a saját és nem-saját struktúrák megkülönböztetésében és az MHC (maior histocompatibility complex) inkompatibilis szervek kilökődésében. Két nagy sejtcsoportot tudunk elkülöníteni a T-sejteken belül: az  $\alpha\beta$  T-sejt receptorról (TCR) és a  $\gamma\delta$  TCR-rel rendelkező sejteket. T-sejt receptornak a T-limfociták felszínén megjelenő antigén felismerő molekulákat nevezzük, amelyek két doménes felépítésű polipeptid láncból állnak és a CD3 molekulakompleksszel kiegészülve alkotnak funkcionális egységet. A T-sejt érés eredményeként lényegesen több  $\alpha\beta$  TCR-t hordozó sejt jön létre, mint  $\gamma\delta$  TCR-t kifejező T-limfocita. Az érett  $\alpha\beta$  T-sejtek két alcsoportra oszthatók attól függően, hogy melyik koreceptor molekulát expresszálnak: a CD4<sup>+</sup> T helper sejtek az MHC II-vel együtt bemutatott extracelluláris antigéneket ismerik fel, míg az MHC I-el bemutatott, intracelluláris antigéneket felismerő sejtek a CD8-at hordozó a sejtpusztító (citotoxikus) T-limfociták.

A T-sejtek nevüket az érésük helye miatt a tímuszról (csecsemőmirigy) kapták. Ez az a szerv, ahol a csontvelői eredetű előalakokból egy bonyolult, szelekciós lépéseket is tartalmazó érési folyamat során naív, immunokompetens T-sejtekké érnek. A T-limfocita irányba való elköteleződés és az  $\alpha\beta$  illetve  $\gamma\delta$  irányú differenciálódás szétválása már a T-sejt érés korai stádiumában megtörténik. A TCR-gének átrendeződése után az  $\alpha\beta$  T-sejtek szelekciója, majd a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> irányba történő elköteleződés zajlik a tímuszban. A timociták érése celluláris és humorális faktorok által irányított bonyolult folyamat, melynek minden részlete még nem teljesen tisztázott.

A T-sejt fejlődés egy fontos ellenőrzési pontját jelenti a DP érési stádium, ahol a funkcióképtelen és az autoreaktív T-sejtek a pozitív és a negatív szelekció során apoptózissal elpusztulnak. A pozitív és a negatív szelekció modelljeiben a TCR ligand kötésének affinitása által meghatározott jelátviteli folyamatok határozzák meg a timociták sorsát. A kölcsönös antagonizmus modell szerint a glukokortikoid hormonok (GC) és TCR indukálta apoptotikus útvonalak közötti kölcsönhatások során dől el a sejt apoptózisa vagy életben maradása.

Az apoptózis egy olyan szigorúan szabályozott folyamat, amely proteolitikus folyamatok sorozatából áll, a sejtek jellegzetes morfológiai elváltozásai kísérik, és végső soron a sejt halálához vezet. A pozitív szelekció során mind a TCR/CD3-komplexen keresztül jövő, mind a GC hatására kialakuló szignál önmagában apoptózishoz vezet. A kölcsönös antagonizmus modell szerint mind a lokálisan termelődő GC hormon, mind az antigén prezentáló sejthez való kötődés során a TCR-on keresztül kapott jel, ha egyszerre éri a DP timocitát, a sejt túlélését eredményezi. Ugyanezzel a kölcsönös antagonizmus modellel írhatók le különböző citokinek és a glukokortikoid hormon együtthatását leíró megfigyelések is.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. BALB/c és AND TCR transzgenikus egértörzs tímuszában a timocita alcsoportok arányának nyomon követése *in vivo* glukokortikoid hormon és antigén, illetve anti-CD3 kezelések hatására. Egyszeri glukokortikoid kezelés hatásának vizsgálata tímusz sejtes összetételére, és annak időbeli nyomon követése.
2. Az egyes timocita alcsoportok glukokortikoid receptor (GCR) expressziós szintjének meghatározása BALB/c és AND TCR transzgenikus egértörzsben. A GCR expresszió változásának vizsgálata T-sejt aktiváció, GC hatás, illetve GC antagonisták kezelése után.
3. *In vivo* GC antagonisták előkezelés hatása GCR indukálta jelátviteli utakra és a tímusz sejtes összetételére.
4. *In vivo* TCR aktiváció és GC kezelés hatására kialakuló korai és késői apoptotikus sejtek arányának meghatározása, valamint a pro-apoptotikus mitokondrium-funkció változás, caspase-3 aktiváció illetve az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje expressziójának vizsgálata.
5. *In vitro* glukokortikoid hormon hatásának vizsgálata tímusz szövet és timocita sejtkultúrában GCR antagonisták és GC hormon szintézis gátló jelenlétében.
6. CD69<sup>+</sup> DP timociták arányának vizsgálata BALB/c és AND TCR transzgenikus egérmodellen TCR aktiváció, GC kezelés és GC antagonisták hatására.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

EGÉRMODELLEK. Kísérleteinkhez 4 hetes Balb/C (Charles Rives) egereket és 4 hetes B10.Cg-TgN (TcrAND)53Hed (AND) galamb cytochrome C (PCC) specifikus I-E<sup>k</sup> (MHC-II) restrikcióval rendelkező V $\beta$ 3/V $\alpha$ 11 T-sejt receptor transzgenikus egereket (AND) használtunk. A kísérletes munkák megfelelnek a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által megállapított szabályoknak.

ÁLLATOK OLTÁSA ÉS TIMOCITA PREPARÁLÁS. Kísérleti állatainkat intraperitoneálisan oltottuk magas dózisu (20,0 illetve 10,0 mg/testtömeg kg), közepes dózisu (2,0 mg/kg), és alacsony dózisu (1,0 illetve 0,2 mg/kg) DX-al önmagában vagy az egyéb kezelésekkel kombinációban. A GCR kompetitív antagonistáinak tekintett RU486 vagy RU43044 vegyületeket 1 mg/testtömeg kg szezámolajban hígítva alkalmaztuk intraperitoneális oltásként. Az AND egereket 2 napig oltottuk naponta intraperitoneálisan 10 mg/testtömeg kg PBS-ben hígított PCC-vel. A Balb/c egerek intravénásan kaptak 5 vagy 50  $\mu$ g/állat (magas dózisu) aktiváló hatású anti-CD3 monoklonális antitestet önállóan vagy DX-al kombinációban.

A timocita preparálást Compton és Cidlowski módszere szerint végeztük röviden: az egerek gyors dekapitulása után a tímuszokat eltávolítottuk és hideg PBS oldatba helyeztük. A tímusz szövetét üveg-üveg homogenizátorral homogenizáltuk és a szuszpenziót nylon vattán átszűrtük. A sejteket megmostuk PBS-ben és az élő timocita számot Bürker kamrában meghatároztuk Trypán kék festékkizárásos teszt segítségével.

### TÍMUSZOK ÉS TIMOCITÁK IN VITRO TENYÉSZTÉSE

1-2 napos BALB/c egerek eltávolított tímuszainak egy-egy lebenyét 24 órán át inkubáltuk in vitro DMEM médiumban,  $10^{-7}$  mol/l DX-al, RU43044 GCR antagonistával, a kettő kombinációjával vagy szteroid szintézis gátló Methyraponnal, hogy vizsgáljuk a glukokortikoid hormon hatásának szerepét az egyes timocita alcsoportok túlélésében.

TIMOCITÁK CMX-Ros FESTÉSE. A mitokondriumok funkcionális aktivitásának mérését a Mito Tracker CMX-Ros festék segítségével végeztük. A CMX-Ros egy lipofil fluoreszcens festék, amely az aktív mitokondriumokban felhalmozódik azok negatív membránpotenciálja miatt. Az élő sejtek ezért CMX-Ros festékekkel intenzíven festődnek, s mivel az apoptotikus

sejtek elveszítik a mitokondriális membránpotenciáljukat, nem festődnek. A 10 millió sejtet 30 percen át inkubáltuk 0,1µg/ml CMX-Ros festék tartalmú RPMI médiumban, majd a sejteket mosás után összegyűjtöttük és sejtfelszíni jelölést követően áramlási citométerrel analizáltuk az eredményeket.

**TIMOCITÁK SEJTFELSZÍNI ÉS INTRACELLULÁRIS JELÖLÉSE.** A sejtfelszíni jelölésekhez mintánként  $10^6$  élő timocitát jelöltünk anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr, anti-CD69-FITC fluoreszcens monoklonális antitestekkel. Az intracelluláris jelölésekhez a sejtfelszíni jelölések után fixáló oldatban (4% paraformalehid (PFA) tartalmú PBS) 20 percig fixáltuk a sejteket. Ezután kétszer megmostuk a timocitákat PBS-ben majd 100µl permeabilizáló pufferben felvettük a sejteket és fénytől elzárva, jégen 30 percig végeztük az anti-Bcl-2-FITC, anit-aktivált Caspase-3-FITC, anti-GCR-FITC fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel a jelöléseket. Az inkubáció végén kétszer mostuk a sejteket permeabilizáló pufferben, majd egyszer kötő pufferben. A jelölés végén 500µl fixáló pufferben vettük fel a sejteket és a mérés kivitelezéséig abban tároltuk azokat (Current Protocols in Immunology chapter 5.6).

**INTRACELLULÁRIS SZABAD KÁLCIUMSZINT MEGHATÁROZÁSA.** Az intracelluláris szabad kalciumszint meghatározásához a sejteket Fluo-3 AM festékkel töltöttük fel „Minta et al.” módszere alapján:  $10^6$  timocitát 100µl 10µM Fluo-3 AM tartalmú szövettenyésztő médiumban inkubáltuk 30 percen át szobahőmérsékleten. Ezután a sejtszuspenziót 10ml RPMI + 10% FCS médiummal hígítottuk és további harminc percig inkubáltuk. Végül a mintákat háromszor mostuk RPMI + 10% FCS médiumban és sejtfelszíni anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr jelölés után áramlási citometriás mérést végeztünk. A Fluo-3 AM festék átlagos fluoreszcencia intenzitását 526 nm-en (FL1 csatorna) határoztuk meg a különböző mintákban.

**ANNEXIN V ÉS PI KOMBINÁLT JELÖLÉS.** Az apoptózis korai jeleinek meghatározásához  $10^5$  számú élő timocitát 100 µl Annexin-kötő pufferben 1mg/ml végkoncentrációjú FITC-el konjugált Annexin V-tel és 0,5 µg PI-al 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten, majd 400 µl Annexin-kötő puffert adtunk a sejtekhez. A sejteket a jelölés után maximum 1 órával áramlási citométer segítségével vizsgáltuk.

ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÉRÉS ÉS ANALÍZIS. A mintákat FACSCalibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose CA) mértük, az eredményeket a CellQuest program segítségével analizáltuk.

STATISZTIKAI ANALÍZIS. Az egyes kezelések hatásainak vizsgálatokor a különböző csoportok eredményeit Student féle t-próbával hasonlítottuk össze és a  $p < 0,05$  eltéréseket fogadtuk el szignifikánsan különbözőnek.

## **EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK**

A timociták pozitív és negatív szelekcióját szabályozó molekuláris mechanizmusok a régóta tartó kutatások ellenre még mindig nem teljesen tisztázottak. Az ismert tímusz citokinek, növekedési faktorok és azok jelátviteli útjainak vizsgálata sem oldott meg minden ellentmondást. A glukokortikoidok timociták érésében játszott egzakt szerepe, amelyet a kölcsönös antagonizmus modellel írnak le, még nem egyértelmű, különösen *in vivo* kísérleti eredmények érhetőek el korlátozott számban. A folyamatok további tisztázásához a sokat tanulmányozott BALB/c egérmodell mellett AND TCR transzgenikus egérmodellt is használtuk. A transzgenikus egérmodell szinte minden T-sejtje azonos specificitású TCR-t hordoz, mely a galamb citokróm c (Pigeon Cytochrome c, PCC) 88-104 fragmentumára (KAERADLIAYLKQATAK) specifikus. Az egérmodell segítségével a nem antigén specifikus (pl. aktiváló hatású anti-CD3 monoklonális antitesttel végzett) indirekt TCR aktiváció mellett a specifikus antigénnel történő, direkt TCR-on keresztüli T-sejt aktiváció hatásait is tanulmányoztuk.

BALB/C ÉS AND EGÉR TÍMUSZÁNAK SEJTES ÖSSZETÉTELE. Eredményeink szerint a kétféle egér csecsemőmirigyének sejtes összetétele nagyon eltér: a vad típusúban az intermedier fejlettségű DP sejtek dominálnak, míg a transzgenikus egérnél a CD4 pozitív érett sejtek vannak jelen legnagyobb arányban és szinte nem is lehet CD8 pozitív sejtet kimutatni. Ennek oka a transzgen működése, amely a T-sejt prekurzorokban a germ line TCR-ből egyetlen típusú átrendeződött V $\beta$ 3/V $\alpha$ 11 TCR kialakulását eredményezi, amely az adott MHCII segítségével a pozitív szelekció során csak CD4+ sejtek túlélését biztosítja a timocitáknak.

GCR EXPRESSZIÓ A KÜLÖNBÖZŐ TIMOCITA ALCSOPORTOKBAN. Régóta ismert, hogy a glukokortikoid hormon analóg DX kezelés jelentősen csökkenti a timusz méretét. A glukokortikoidok érett és éretlen timocitáknál is apoptózis váltanak ki. Az egyes timocita alcsoportok eltérő glukokortikoid érzékenységének pontos oka azonban nem magyarázott.

Az egyes populációk különböző GCR expressziós szintje lehetne az egyik kézenfekvő magyarázat a különböző glukokortikoid érzékenységre. A szabad citoplazmáris és ligand kötött receptort egyaránt felismerő monoklonális antitesttel végzett vizsgálataink szerint a GCR szint jelentősen eltérő az egyes timocita alcsoportokban: a DP sejtek tartalmazzák a receptort a legkisebb mennyiségben, melynél több található a CD4 SP, a CD8 SP populációkban, és legtöbb a DN sejtekben. Az AND transzgenikus egérmodellben az alacsonyabb DP GCR expressziót mind a glukokortikoid kezelés, mind TCR aktiváció tovább csökkentette. A TCR aktivációt követő GCR expresszió csökkenés magyarázatához még további kísérletek szükségesek, noha a jelátvitel során bekövetkező AP-1, NFAT, NF $\kappa$ B és Elk aktiváció már ismert, melynek szerepe lehet a GCR downregulációjában. A DP sejtek reagálnak a legintenzívebben a glukokortikoidok indukálta apoptózissal, amely arra utal, hogy a GCR szint önmagában nem meghatározó a glukokortikoidok iránti érzékenység szempontjából. Más jelátviteli mechanizmusok is befolyásolhatják a sejtek glukokortikoid érzékenységét.

A DP timociták alacsonyabb GCR expressziójának egyik lehetséges magyarázata a DP timociták környezetében található, lokálisan magasabb koncentrációjú, a kortikális epitheliális sejtek által termelt glukokortikoid hormon hatására bekövetkező homológ downregulációs folyamat lehet. Nagy dózisu glukokortikoid hormon in vivo alkalmazásakor egyedül a DP populációban találtunk GCR expresszió növekedést, majd ez egy hét múlva visszaállt az eredeti értékre. Az érett SP populációkban a szteroid hatásra még nyolc nappal a nagy dózisu DX kezelés után is alacsonyabb GCR expressziót találtunk, ami feltételezéseink szerint a túlélő és tovább érő (DP) sejtek hormon indukálta GCR downregulációjának a következménye. A glukokortikoid-GCR komplex 30 percen belül a magba transzlokálódik, ahol különböző gének (GRE) transzkripciós faktoraként hat. A GCR génje szintén tartalmaz GRE-t, amely szerepet játszhat a GCR expresszió glukokortikoidok által történő regulációjában. A glukokortikoidok bizonyítottan szerepet játszanak a timociták mellett más sejtvonalak GCR expressziós szintjének meghatározásában is.



A DP sejtek alacsony GCR expressziója és glukokortikoidok iránti nagyfokú érzékenysége között fennálló éles ellentmondás felveti nem genomikus GCR jelátviteli mechanizmusok jelenlétét is. A nem genomikus jelátviteli folyamatok egyik lehetséges módja, hogy a GCR más jelátviteli folyamatokban résztvevő faktorokkal lép kölcsönhatásba a citoplazmában. A Hsp-90 lehet az egyik ilyen faktor, amelyről kiderült, hogy Lck, Raf és ERK kötésen keresztül szerepet játszik a TCR jelátvitelében is, és szerepet játszik a timociták pozitív szelekciójában. Ismert, hogy az inaktív (ligandot nem kötő) GCR szintén a Hsp-90-hez kötve található a citoplazmában, így ez a molekula fontos érintkezési pont lehet a TCR és GCR jelátvitel kapcsolatában, molekuláris magyarázatot adva a kölcsönös antagonizmus modellhez. Intézetünkben folytatott kutatások során Jurkat T sejtekben a ZAP-70 molekulát egy másik lehetséges kapcsolódási pontnak találtuk a GCR és TCR jel között.

Ezen nem genomikus mechanizmusok jelenlétét magyarázhatja az a megfigyelésünk is, hogy a glukokortikoid antagonisták nem tudták meggátolni a DP sejtek DX indukálta deplécióját és nem tudták kiküszöbölni a korai apoptotikus markerek megjelenését 4 órával DX adagolást követően. A glukokortikoid-GCR komplex számos más transzkripciós faktoralal bizonyított interakciója, mint például az NF $\kappa$ B, AP-1, CREB és STAT-5, felelős lehet egyes DX hatásokért.

Autoregulációhoz hasonlóan a glukokortikoidok szerepet játszanak a GCR expresszió szabályozásában. Munkánk egyik eredménye a glukokortikoid indukálta GCR expressziós változások és apoptotikus markerek (Annexin V / PI) időbeli lefolyásának vizsgálata egér timocitákban. Érdekes mintázatot találtunk a GCR szintek változásában: egyszeri nagy dózisú DX adagolást követően BALB/c egerekben 16 óráig nőtt a receptor expressziója, majd azt követően folyamatosan csökkent a vizsgált 24 óra időtartamban. Hasonló változásokról számoltak be patkány hepatoma sejtekben. A 24 óra után talált GCR expresszió mértéke szintén hasonló az irodalomban jegyzett hasonló vizsgálatok eredményeihez.

Úgy tűnik, hogy a DP sejtekben nem működött a többi sejtre jellemző GCR homológ downreguláció, amely jelentős szerepet játszik a glukokortikoid rezisztenciában. A GCR expresszió GC indukálta csökkenése közös mechanizmus minden timocita alcsoportban, kivéve a DP populációt. A módosult GCR szint csökkenési hajlam magyarázhatja a DP sejtek fokozott glukokortikoid érzékenységét a változatlan GCR szint miatt.

TIMOCITA ALCSOPORTOK TCR INDUKÁLTA AKTIVÁCIÓJA. A TCR-n elinduló jelátviteli folyamatok egyik eredménye a  $Ca^{++}$  szignál. Annak tisztázására, hogy van-e szerepe a különböző timocita alcsoportok eltérő TCR-n keresztüli aktivációjában az intracelluláris szabad  $Ca^{++}$  koncentrációnak, meghatároztuk annak szintjét mind a négy populációban. Az eltérő nyugalmi szabad intracelluláris  $Ca^{++}$  szinttel jellemezhető egyes timocita alcsoportok a TCR direkt stimulálásának következtében eltérő kinetikájú és amplitúdójú  $Ca^{++}$  szint növekedéssel reagálnak. A legnagyobb arányú és leggyorsabb  $Ca^{++}$  szint növekedést az érett CD4 SP populáció sejtjeinél találtuk. Ezt az eredményünket alátámasztja az az irodalmi adat is, hogy a DP sejtek érett CD4 SP illetve CD8 SP elköteleződésében szerepet játszik az intracelluláris  $Ca^{++}$  szint mégpedig oly módon, hogy a magasabb  $Ca^{++}$  szint a CD4 SP irányú elköteleződést segíti elő.

GLUKOKORTIKOID HORMON ÉS TCR AKTIVÁCIÓ HATÁSA A TIMOCITA ALCSOPORTOK APOPTÓZISÁRA. A timociták apoptózisa számos faktor által szabályozott bonyolult folyamat melynek tanulmányozása során két érzékeny, az apoptózis korai szakaszára specifikus detektáló módszeren kívül a Bcl-2 expressziót és Caspase-3 aktivációt vizsgáltuk részletesebben.

4 órával a DX kezelést követő növekedést figyeltünk meg a korai apoptotikus sejtek arányában, amit késői apoptotikus markereket mutató sejtek arányának megnövekedése követett 16-20 órával a kezelés után. Nagyon hasonló apoptózis kinetikát találtak C57BL/6 egerekben is. A GCR expresszió és az apoptotikus sejtek arányának változása együtt járt a tímusz DP sejtjeinek depléciójával.

A tímuszt alkotó limfoid sejtek abszolút száma az exogén szteroid adás hatására koncentráció dependens módon drámai mértékben csökkent. Ez volt a helyzet az anti-CD3 vagy TCR stimuláló PCC kezelés hatására is.

A DP sejtekben a GCR vagy a TCR aktiváció önmagában és együttesen is fokozott foszfatidil-szerin externalizálódáshoz és csökkent mitokondrium membránpotenciálhoz vezet. Bár relatíve kevesebb korai apoptotikus DP sejtet találtunk, amikor a két aktivációt együtt váltottuk ki, az egyszeres kezelésekhez viszonyítva, hasonlóan a munkánkat megelőző in vitro eredményekhez. Ezen eredmények világosan mutatják, hogy a szimultán GCR és TCR stimuláció során tapasztalható magasabb arányú DP timocita túlélés a korai apoptotikus

folyamatok gátlásának köszönhető, ami a két jelátviteli út összekapcsolódását jelzi és a kölcsönös antagonizmus modellt támasztja alá.

Mivel az AND TCR transzgenikus egerek tímuszában a DP és CD4 SP sejtek alkotják az összes sejt több mint 90%-át, kísérleteink során főleg erre a két sejtcsoportra koncentráltunk. Mind a GCR, mind a TCR stimulus az éretlen DP sejtek számában okozott nagy csökkenést, míg a CD4 SP érett populáció csökkenése kevésbé volt szembetűnő. Mind a BALB/c, mind az AND TCR transzgenikus egereknél szignifikánsan több DP timocita menekült meg az apoptózistól, ha GCR stimulációt együtt alkalmaztunk a TCR stimulációval, ami nem volt megfigyelhető a CD4 SP populációban.

Az antigén *in vivo* jelenléte szignifikáns DP sejtarány csökkenést okozott, míg a glukokortikoid és a kombinált kezelés szinte teljesen eltűntette a DP populációt. Ezek a változások a CD4 SP alcsoport arányának egyidejű növekedésével jártak, amely arra utal, hogy a DP sejtek egy része a kezelések hatására valószínűleg differenciálódott és átjutott ebbe az érettebb stádiumba.

A Bcl-2 egy anti-apoptotikus tagja a Bcl-2 protein családnak, amelybe mind pro-, mind anti-apoptotikus hatású molekulák tartoznak. Más közleményekhez hasonlóan mi is eltérő Bcl-2 expressziót mutattunk ki az egyes timocita alcsoportokban. Egy T-sejt hibridómákkal végzett *in vitro* kísérlet bizonyította, hogy a Bcl-2 és a Bcl-xL molekulák szelektíven antagonizálják a glukokortikoidok által indukált apoptózist. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a TCR stimulus GCR agonistával együtt alkalmazva megnöveli a Bcl-2 pozitív DP sejtek arányát, jelezve azok szelekciós előnyét. Más közlemények leírták azt is, hogy a pozitív szelekció az anti-apoptotikus Bcl-2 expressziójának növekedésével jár, amely összefüggésben van a DP timociták túlélésével.

Az aktivált Caspase-3 az apoptózis effektor szakaszában szerepet játszó fehérje. Eredményeink szerint a DX indukálta DP timocita apoptózisban aktiválódott a Caspase-3 enzim, míg az anti-CD3 antitesttel kiváltott TCR aktiváció hatására kialakuló apoptózisban nem. Amennyiben a két jel együtt érte a sejtet, akkor csak részleges aktivációt figyeltünk meg. Irodalmi adatok alapján a Caspase-3 aktiváció mértéke timocitákban arányos az apoptózis mértékével, a DNS töredezettségével és a FAS és Bax expresszió szintjével.

A DX adagolást 4 órával követő GCR expresszió változásának és a foszfatidil-szerin molekulák külső membránba történő transzlokációjának egyidejűségéből arra következtettünk, hogy a GCR szerepet játszik az apoptózis korai lépéseinek szabályozásában. Mivel ezeket a korai (4 órán belüli) hatásokat nem befolyásolta a glukokortikoid antagonistá kezelés, felmerül a glukokortikoidok nem genomikus hatásmechanizmusának lehetősége. Az egyszeri nagy dózisú DX kezelés után 12-24 órával detektálható apoptózist gátolta a glukokortikoid antagonistá előkezelés, amely jelenségről már más kutatócsoport is közölt adatokat.

**GCR ANTAGONISTÁK HATÁSA.** A konvencionális GC hatás megakadályozására BALB/c egereket 2 napon át 12 óránként oltottunk RU43044 vagy RU 486 glukokortikoid receptor antagonistával önmagában, illetve kombinációban 20 mg/kg DX-al. Önmagában sem az *in vivo* RU486 kezelésnek, sem az RU43044 kezelésnek nem volt hatása a tímuszok abszolút sejtszámára, vagy a sejtes összetételre. A glukokortikoid receptor antagonistával együtt adott DX hatására a korai apoptotikus jelek ugyanúgy megjelentek a timocitákon, míg a késő apoptotikus jelek elmaradtak, amely arra utal, hogy az apoptózis korai fázisának kiváltásához nem szükséges a receptor ligand kötése, míg későbbi apoptózis stádiumban már igen.

**GLUKOKORTIKOID HORMON HATÁSÁNAK *IN VITRO* VIZSGÁLATA.** Az *in vivo* kísérleteinkkel párhuzamosan *in vitro* is vizsgáltuk a glukokortikoidok hiányát a timociták apoptózisában és túlélésében. A tímusz szövet kultúrában, ahol megtartott volt az eredeti mikrokörnyezet, a lokális szteroid szintézist teljesen le tudtuk gátolni és szteroid mentes médium használatával minimálisra tudtuk csökkenteni a glukokortikoid hatást. A DP sejtek mind a glukokortikoidok megvonására, mind a magasabb glukokortikoid szintre érzékenyek mutatkoztak. A GC hatás hiányában a szelekción áteső DP sejteket csak a TCR-en keresztül érte aktiváló jel, mely önmagában a sejtek apoptózist okozhatta a kölcsönös antagonizmus modell szerint. A GC hatás pontos mechanizmusa azonban nem ismert, mivel a GCR antagonistá kezelésünk önmagában nem befolyásolta a sejtszámokat és a DX adás hatását sem tudta kivédeni. Ezért felmerül a DX GCR independens hatásmódja.

Az 1-2 napos BALB/c eger tímusz szövetkultúrában és sejt kultúrában is nagy arányú spontán apoptózist találtunk, mely valószínűleg Caspase dependens folyamat, mivel Caspase

inhibitorral csökkent a mértéke. Az érési és szelekciós folyamatok további in vitro kísérletezéséhez azonban a reaggregált tímusz kultúra használatára lesz szükség.

**TIMOCITÁK POZITÍV SZELEKCIÓJÁNAK MODELLEZÉSE.** A sikeres pozitív szelekciót követően a DP és SP sejtek felszínükön a CD69 antigént expresszálják. Ezt a jelenséget felhasználtunk a TCR + GCR aktiváció indukálta pozitív szelekció detektálására a DP és CD4 SP sejtpopulációkban. Mindkét egértörzsben az antigén/CD3 indukálta TCR aktiváció, illetve a DX kezelések önállóan is növelte a CD69 pozitív DP sejtek arányát, de a kombinált PCC és DX kezelés volt a leghatásosabb. Ugyanakkor a CD4 SP sejtek között csak az antigén, az alacsony dózisu DX és a kombinált kezelések hatására nőtt meg a pozitívan szelektálódott sejtek aránya, míg a jelenség nem volt megfigyelhető magas dózisu DX kezelés után. Valószínű, hogy a magas dózisu DX hatása csak átmeneti CD69 pozitív sejtarány növekedés, amelyet a sejtek apoptózisa követ. Ez a jelenséget támasztja alá az egyes sejtvonalaknál megfigyelhető CD69 és CD25 pozitívitas megjelenése spontán vagy szteroid indukálta apoptózis során. Ezzel szemben az alacsony dózisu DX és/vagy antigén kezelés hatására végbemenő pozitív szelekció következménye a CD69 pozitív, túlélő CD4 SP sejtek nagyobb aránya.

Mindkét egértörzsben talált eredményeink azt a megfigyelést támasztják alá, hogy a glukokortikoidok alacsony dózisban elősegítik a pozitív szelekciót és a sejtek túlélését. Eredményeinkből továbbá arra következtetünk, hogy az antigén és alacsony dózisu glukokortikoidok együtt képesek pozitív szelekció serkentésére a DP timocitákban.

Eredményeink szerint a kölcsönös antagonizmus modellben szereplő GCR és TCR aktiváció hatására kialakuló apoptózis korai lépései (membrán foszfolipid aszimmetria eltűnése, mitokondriumok működésének gátlása) mindenképpen lezajlanak a két jel szimultán jelenlétekor is. A programozott sejthalál effektor szakasza azonban legátlődik, ha a két jel együttesen van jelen, valószínűleg a Ras aktiválásán keresztül.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy eredményeink szerint a DP érési stádiumban lévő timocitákon az amúgy apoptózist kiváltó stimulusok együttesen az éretlen sejtek túléléséhez vezetnek, ellentétben az érett sejtekkel. Feltételezzük, hogy ennek a mechanizmusnak az egyik kulcs eleme a Bcl-2 molekula, amelyet a TCR és GCR szimultán jelének hatására a pozitív szelekción átesett timociták nagyobb arányban expresszálnak.

## Az értekezés új eredményei

1. Leírtuk, hogy a BALB/C és a transzgenikus TCR AND egértörzs timocita alcsoportjaiban a GCR expressziója eltérő: a glukokortikoid hormonra legérzékenyebb DP populáció fejezte ki a legkisebb mennyiségű receptort.
2. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy az egyes timocita alcsoportok intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  szintje és a TCR aktivációt követő  $Ca^{2+}$  szint változás kinetikája eltér.
3. Bebizonyítottuk, hogy a timociták spontán, ill. DX indukálta apoptózisa kaszpáz-függő, míg a glukokortikoid hatásra és a TCR aktiváció hatására kialakuló apoptózisban kaszpáz-független tényezők is szerepet játszanak.
4. Eredményeink szerint a szimultán GCR és TCR stimuláció során tapasztalható magasabb arányú DP timocita túlélés a korai apoptotikus folyamatok gátlásának köszönhető, ami a két jelátviteli út összekapcsolódását jelzi.
5. GCR antagonisták segítségével leírtuk, hogy az apoptózis korai fázisának kiváltásához nem szükséges a glukokortikoid receptor ligand kötése, míg későbbi apoptózis stádiumban már igen.
6. Leírtuk, hogy a kombinált alacsony dózisu glukokortikoid hatás és antigén stimulus együttes hatása a DP sejtek érett CD4 pozitív sejtekké történő kiérését segítette elő a transzgenikus AND egértörzsben.
7. Kísérleteinkkel sikeresen alátámasztottuk a kölcsönös antagonizmus modellt.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Németh Péter professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy intézetében végezhessem Ph.D. tanulmányaimat. Hálásan köszönöm Dr. Berki Timea témavezetőmnek a munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatást. Köszönöm az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársainak hasznos tanácsaikat és segítségüket. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak türelmüket, megértésüket és támogató szeretetüket.

## A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

(Összesített impakt faktor: 10,058)

1. **Pálinkás L**, Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Németh P, Berki T. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*. 2008; 213(1):39-50 **IF: 2.886 (2007-ben)**
2. Boldizsár F, **Pálinkás L**, Czömpöly T, Bartis D, Németh P, Berki T. Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology*. 2006; 211(10):785-96. **IF: 1,867**
3. Boldizsár F, **Pálinkás L**, Bartis D, Németh P, Berki T. Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunol Lett*. 2003; 90(2-3):97-102. **IF: 1,710**
4. Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *International Immunology*. 2002; 14(5):463-9. **IF: 3,595**

## A TÉZISEKTŐL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK

(Összesített impakt faktor: 27,537)

1. Molnár T, Jakab L, **Pálinkás L**, Molnár TF, Bogár L, Illés Z. Increased levels of baseline biomarkers reflecting platelet and endothelial activation predict early cognitive dysfunction after lung surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2009; publikálás alatt
2. Kumánovics G, Minier T, Radics J, **Pálinkás L**, Berki T, Czirják L. Comprehensive investigation of novel serum markers of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and dermato/polymyositis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(3):414-20. **IF: 2.270 (2007-ben)**
3. Aradi D, Kónyi A, **Pálinkás L**, Berki T, Pintér T, Tahin T, Horváth I, Papp L, Komócsi A. Thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Angiology*. 2008; 59(2):172-8. **IF: 0.625 (2007-ben)**
4. Bartis D, Boldizsár F, Kvell K, Szabó M, **Pálinkás L**, Németh P, Monostori E, Berki T. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354(1):253-8. **IF: 2.749**
5. Hajtó T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56(6A):441-6. **IF: 0,596**
6. Pár G, Berki T, Pálinkás L, Balogh P, Szereday L, Halász M, Szekeres-Barthó J, Miseta A, Hegedus G, Mózsik G, Hunyady B, Pár A. [Immunology of HCV infection: the causes

- of impaired cellular immune response and the effect of antiviral treatment] *Orv Hetil.* 2006; 147(13):591-600. **IF: -**
7. Hajtó T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Effects of mistletoe extract on murine thymocytes in vivo and on glucocorticoid-induced cell count reduction. *Forsch Komplement Med* 2006; 13(1):22-7. **IF: 1,417**
  8. Bartis D, Boldizsár F, Szabó M, **Pálinkás L**, Németh P, Berki T. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* No. 2006; 98(2-3):147-154. **IF: 2,866**
  9. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Nyárády Z, **Pálinkás L**, Czirják L, Berki T, Németh P. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol. Immunol.* 2006; 43(11):1761-8. **IF: 4.768**
  10. Pál J, **Pálinkás L**, Nyárády Z, Czömpöly T, Marczinovits I, Lustyik G, Saleh Ali Y, Berencsi G, Chen R, Varró R, Pár A, Németh P. Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of hepatitis B virus X antigen level in human sera. *J. Immunol. Methods.* 2005; 306(1-2):183-192. **IF: 2,572**
  11. Bánvölgyi A, **Pálinkás L**, Berki T, Clark N, Grant AD, Helyes Z, Pozsgai G, Szolcsányi J, Brain SD, Pintér E. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J. Neuroimmunol.* 2006; 169(1-2):86-96. **IF: 2,824**
  12. Hajtó T, Hostanska K, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (viscum albumin agglutinin-I): Overview of recent results from in vitro experiments and in vivo animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2005; 2(1):59-67. **IF: -**
  13. Engelmann P, **Pálinkás L**, Cooper EL, Németh P. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Developmental and Comparative Immunology* 2005; 29:599-614. **IF: 3,261**
  14. Engelmann P, Molnár L, **Pálinkás L**, Cooper EL, Németh P. Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell. Tissue Res.* 2004; 316:391-401. **IF: 2,670**
  15. Hajtó T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Nagy G, Németh P. Galactoside-specific mistletoe lectin modulate the dexamethasone-induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes. *In Vivo.* 2003; 17(2):163-168. **IF: 0,753**



# **Effects of soluble molecules and cellular interactions in the selection of thymocytes: a mouse model**

**PhD Thesis**

**László Pálincás MD**

A-139 Basic Immunology  
Programleader: Péter Németh MD  
Mentor: Tímea Berki MD

University of Pécs  
Faculty of Medicine



**Pécs  
2009**

## INTRODUCTION

T lymphocytes derive their name from their site of maturation in the thymus. Like B lymphocytes, these cells have membrane receptors for antigen and belong to the adaptive immune system. T cells are important regulators of the immune response, and also take part in the recognition and elimination of virally infected and tumour cells, and are also implicated in transplant rejection. During its maturation T cell starts to express a unique antigen-binding molecule, called the T-cell receptor (TCR), on its membrane. TCR can recognize protein antigens that is bound to cell-membrane protein called major histocompatibility complex (MHC). TCR is associated on the membrane with a signal-transducing complex called CD3. Two different T cell subsets have been discovered according to their TCR: T lymphocytes expressing  $\alpha\beta$  and cells carrying  $\gamma\delta$  chains. The majority of T cells have a TCR composed of  $\alpha$ - and  $\beta$ - TCR chains, while  $\gamma\delta$  T cells represent only a small subset of T cells that possess a distinct TCR on their surface.

Mature  $\alpha\beta$  T lymphocytes can be divided into subsets according to the markers they express: the CD4<sup>+</sup> helper T cells recognise extracellular antigens presented by MHCII molecules and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells that recognise intracellular antigens presented by MHCI molecules.

As thymocytes mature in the thymus, the diversity of their TCRs is generated by a series of random gene rearrangements.

Commitment to T cell and the disjunction of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell differentiation take place in the early phase of T cell maturation in the thymus. The rearrangement of TCR genes is followed by the selection of  $\alpha\beta$  T cells and the commitment to CD4<sup>+</sup> T helper or CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells in the thymus. The maturation of thymocytes, which is a complex process controlled by numerous cellular and humoral factors is not completely understood yet.

After expressing antigen-binding receptors, thymocytes are subjected to a two-step selection process. Any developing double positive (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, DP) thymocyte that is unable to recognize self-MHC molecules (positive selection) or that do have a high affinity for self-antigen plus self MHC (negative selection) are eliminated by programmed cell death (apoptosis). According to the mutual antagonism model interactions between glucocorticoid

hormone (GC) and TCR induced signalling will determine the fate of developing thymocytes.

Apoptosis is the process of programmed cell death which involves a series of biochemical events leading to a characteristic cell morphology and death, in more specific terms, a series of biochemical events that lead to a variety of morphological changes, including blebbing, changes to the cell membrane such as loss of membrane asymmetry and attachment, loss of mitochondrial membrane potential, cell shrinkage, nuclear fragmentation, chromatin condensation, and chromosomal DNA fragmentation. During positive selection both TCR activation or GC effect alone result in apoptosis. While according to the mutual antagonism model locally produced glucocorticoids and TCR signal together induce the survive of DP thymocytes. The same mutual antagonism model describes the interaction of different cytokines and glucocorticoids.

## **OBJECTIVES**

- 1.** Comparison the ratio of the four different thymocyte subpopulations in BALB/C and TCR transgenic AND mouse strain after *in vivo* GC hormone, specific antigen or anti-CD3 treatment (TCR activation). Long term effect of a single dose GC treatment on the cellular composition of thymus.
- 2.** Detection of glucocorticoid receptor (GCR) expression level in the different thymocyte subpopulations. Changes of GCR expression after T cell receptor activation, GC or GC antagonist treatment.
- 3.** Effects of *in vivo* GC antagonist pre-treatment on GCR induced signal transductions and cellular composition of thymus.
- 4.** Measurement of early and late apoptotic cell ratio, mitochondrial membrane potential changes and pro-apoptotic caspase-3 activation and anti-apoptotic Bcl-2 expression in thymocytes after *in vivo* TCR activation and GC treatment.
- 5.** Effect of *in vitro* GC treatment in thymic organ culture and thymocyte culture in the present of GCR antagonists or GC hormone synthesis inhibitor.

6. Detection of CD69+ DP thymocyte ratio in BALB/C and TCR transgenic AND mouse strain after TCR activation, GC and GC antagonist treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

MICE. We used 3–4-week-old (10 g body weight) BALB/C and B10.Cg-TgN (TCR AND) 53Hed (AND) pigeon cytochrome C specific I-Ek (MHC-II) restricted Vb3, Va11 TCR transgenic mice. The animal experiments were carried out in accordance with the regulations set by the University's Committee on Animal Experimentations.

TREATMENT OF ANIMALS AND THYMOCYTE PREPARATION. Mice were injected i.p. with high dose (20,0 or 10,0 mg/kg), middle dose (2,0 mg/kg) or low dose (1,0 or 2,0mg/kg) dexamethasone (DX) alone or with other treatments. We used i.p. 1mg/kg GCR competitive antagonist RU486 and RU43044 dissolved in sesame oil. AND mice were injected i.p. with 10 mg/kg PCC dissolved in PBS once per day for 2 days. Activating anti-CD3 (145.2C11) mAb (5 or 50 µg/animal) was injected i.v. in 100µl PBS. Thymocytes were prepared as described by Compton and Cidlowski. In brief, mice were killed by rapid decapitation, and the thymus glands were removed and placed on ice-cold PBS. Thymus tissue was homogenized in a glass/glass homogenizer; the suspension was filtered through a nylon mesh filter. The thymocytes were washed in PBS, and the cell number and viability determined by counting on a hemocytometer using the Trypan blue dye-exclusion test.

IN VITRO CULTURE OF THYMUS LOBES AND THYMOCYTES. One lobe of a removed thymus gland of 1 or 2 day old BALB/C mice were incubated in DMEM medium containing  $10^{-7}$  mol/l DX, GCR antagonist RU43044 or steroid synthesis inhibitor Methyraponnal, for 24 hours.

CMX-ROS STAINING. CMX-Ros is a lipophilic cationic fluorescent dye that is sequestered in active mitochondria because of their negative mitochondrial membrane potential, therefore living cells show high CMX-Ros fluorescence. Since apoptotic cells lose their mitochondrial membrane potential CMX-Ros staining of mitochondria decreases. The lower CMX-Ros positive cell ratio indicates the loss of mitochondrial membrane potential, i.e. the presence of mitochondrial type of apoptosis. 10 µl CMX-ROS stock solution (1 mg/ml in DMSO) was

added to  $10^6$  cells in 1ml of RPMI medium then cells were incubated for 30–45 min in 37 °C and after cell surface labelling (a-CD4-FITC, a-CD8-CyC) analysed with flow cytometry.

FLUORESCENT CELL SURFACE AND INTRACELLULAR LABELLING OF THYMOCYTES. Thymocyte samples ( $10^6$ ) were incubated with monoclonal antibody cocktails (anti-CD4-PE, anti-CD8-CyChr, anti-CD69-FITC) for 30 min in 100  $\mu$ l binding buffer on ice, then washed twice in PBS, and finally resuspended in 500  $\mu$ l 0.1% buffered PFA in PBS. We used triple labelling technique for the simultaneous detection of cell surface CD4, CD8, and intracellular GR or Bcl-2 protein. Briefly, after cell surface CD4, CD8 labelling thymocyte samples ( $10^6$ ) were fixed in 4% PFA buffer for 20 min at room temperature then cells were further washed and intracellularly labelled in the permeabilisation buffer. Thymocytes were incubated with FITC-conjugated anti-GR or FITC-conjugated anti-Bcl-2 or anti-activated Caspase-3 monoclonal antibodies for 30 min at room temperature. Afterwards cells were washed twice in permeabilisation buffer then once in PBS and finally resuspended in 500  $\mu$ l 0.1% PFA in PBS.

DETECTION OF INTRACELLULAR FREE CALCIUM LEVEL. Intracellular free calcium was measured using Fluo-3 AM according to the protocol described by Minta et al. Briefly,  $10^6$  cells in 100  $\mu$ l RPMI containing 10  $\mu$ M Fluo-3 AM were incubated for 30 min at room temperature. Afterwards, the cell suspension was diluted with 10 ml RPMI+10% FCS and incubated for a further 30 min. Finally, samples were washed three times in RPMI+10% FCS, then cell surface anti-CD4-PE, anti-CD8-CyChr labelling were carried out and immediately measured in a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer using the CellQuest program. The mean fluorescence intensity of Fluo-3 AM dye was determined at 526 nm (FL1 channel) in the different samples, which is proportional to the cytosolic calcium level.

ANNEXIN V AND PI LABELLING. For the detection of early apoptotic thymocytes Annexin V – FITC staining was performed. Briefly, samples ( $10^5$  thymocytes) were incubated with Annexin V – FITC for 20 min in 100  $\mu$ l Annexin binding buffer at room temperature, then diluted with 400  $\mu$ l Annexin binding buffer, immediately followed by flow cytometric measurement.

FLOW CYTOMETRIC ACQUISITION AND ANALYSIS. Samples were measured and analysed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), using the CellQuest software.

STATISTICAL ANALYSIS. The effect of various treatments between groups was tested for statistical significance using Student's t-test.  $P < 0.05$  denoted statistical significance.

## RESULTS AND CONCLUSIONS

The molecular events leading to positive and negative selection steps during thymocyte development are still unclear. The investigation of the role and signaling pathways of known thymic cytokines and growth factors did not solve this problem. Recently it has been suggested that thymic GC synthesis by epithelial cells and local GC action might influence the selection steps by inhibiting TCR-mediated apoptotic signals, but only few *in vivo* results are available. For the further clarification of the maturation process of thymocytes we used a TCR transgenic AND mouse strain beside the well known BALB/C mouse model. Almost all T cells of the transgenic AND mouse express the same TCR specific for antigen 88-104 fragment of the Pigeon Cytochrome C (PCC: KAERADLIAYLKQATAK). Thus we could explore the effects of not only the indirect activation (anti-CD3 mAb) but also the direct, antigen specific activation of TCR *in vivo*.

CELLULAR COMPOSITION OF BALB/C AND TRANSGENIC AND MOUSE THYMUS. We showed that the cellular composition of the two mouse strains differ: in BALB/C the DP population dominated (75-80%) while in the thymus of the transgenic AND mouse strain the CD4 single positive (CD4 SP) cells were more frequently found and the CD8 single positive cells (CD8 SP) were almost totally absent. The reason of this is the transgen in the transgenic mouse strain: in the T cell precursors only one kind of rearranged TCR ( $V\beta 3/V\alpha 11$ ) can be generated from the germ line gene configuration, which through MHCII molecules could ensure only the CD4 SP cell survival during positive selection.

GCR EXPRESSION IN THE DIFFERENT THYMOCYTE SUBPOPULATIONS. It is well known that the glucocorticoid analogue Dexamethasone (DX) treatment diminishes thymus size and cellularity. Glucocorticoids cause apoptosis in both mature and immature

thymocytes, but the different thymocyte subpopulations have different glucocorticoid sensitivity. The cause of this phenomenon is not yet known.

The variant expression levels of GCR in the different thymocyte subpopulations could be a plausible explanation. Our laboratory produced a monoclonal antibody against GCR which recognises both free and ligand bound form of the receptor. We showed that the GCR level differ in the different thymocyte populations: DP cells had the lowest and double negative (DN) cells the highest level of the receptor. In the transgenic AND mice the low GCR level decreased after both DX treatment and TCR activation in the DP cells. For the explanation of GCR expression fall after TCR activation further research should be done, but it is known that during TCR signal transduction AP-1, NFAT, NFκB and Elk activation occurs that could have some effects on GCR expression level. GCR level alone could not determine glucocorticoid sensitivity, because DP cells, that had the lowest GCR expression, showed the most intensive apoptosis after glucocorticoid treatment. Other signalling mechanisms also influence the glucocorticoid sensitivity of thymocytes.

The explanation of low GCR expression in DP thymocytes could be the homologous down regulation of GCR expression caused by the high concentration of the locally produced glucocorticoid hormone in the thymus cortex around DP cells. After high dose DX treatment we could detect an initial increase of GCR level before the decrease of its expression but only in DP population. In the SP populations a week after the treatment the GCR levels was still lower. This could be the result of homologous down regulation of GCR expression in the surviving and further maturing DP cells. Within 30 minutes the GCR-ligand complex translocates to the nucleus where acts as a transcription factor of different genes (glucocorticoid responsible elements, GRE). The gene of GCR is also a GRE which involves the glucocorticoids in the regulation of GCR expression. In the literature the role of glucocorticoid hormone in the determination of GCR levels in other cell lines is described.

The low GCR level in DP cells and their high sensitivity to glucocorticoid induced apoptosis raise the possibility of non-genomic GCR signalisation. One mechanism of this non-genomic signal transduction could be the interaction of GCR and other signal transduction factors in the cytoplasm. Hsp-90 may be one of this factors because it is known that through Lck, Raf and ERK binding it affects TCR signaling and has a role in thymocyte selection. It has been

shown that ligand free GCR is bound to Hsp-90 in the cytoplasm, thus this molecule could be an important connection between TCR and GCR signalisation providing an explanation for mutual antagonism theory. Results of other researches in our institute lead to ZAP-70 molecule and another possible connection between TCR and GCR signal transduction. Interactions of GCR-glucocorticoid complex with other transcription factors such as NFκB, AP-1, CREB and STAT-5 could be responsible for some of our results. Using glucocorticoid antagonists we could not inhibit the DX induced thymocyte loss and the appearance of early apoptotic markers on DP cells after 4 hours of DX administration.

One of our goals was to detect the glucocorticoid induced apoptotic markers (Annexin V / PI), the kinetics of apoptosis and GCR level changes in mouse thymocytes. We found an interesting GCR expression kinetics in DP cells: after high dose DX administration the receptor expression increased for 16 hours and then decreased during the examined 24 hours. Similar results were reported in rat hepatic cells.

It seems that in DP cells the homologous downregulation of GCR is not typical like in other thymocyte subpopulations which is important in the development of glucocorticoid resistance. The impaired GCR downregulation of DP cells could explain the high glucocorticoid sensitivity of DP cells beside the unchanged GCR level.

TCR INDUCED ACTIVATION OF THYMOCYTES. Elevation of the free  $Ca^{++}$  level in the cytoplasm is one result of TCR activation. We determined the free cytoplasmic  $Ca^{++}$  level in the four thymocyte subpopulations to clarify its possible role in the different TCR activation. The four thymocyte subpopulations can be characterised by different free intracellular  $Ca^{++}$  level and with different kinetics after TCR activation with anti-CD3 mAb. The highest and quickest increase of  $Ca^{++}$  level was found in the CD4 SP population. It is supported by previous data from literature that free  $Ca^{++}$  level plays a role in the CD4 SP or CD8 SP commitment of DP cells. The higher intracellular  $Ca^{++}$  level induce the further maturation into the CD4 SP direction.

EFFECTS OF GLUCOCORTICOID HORMONE AND TCR ACTIVATION ON THYMOCYTE APOPTOSIS. Apoptosis of thymocytes is a complex process regulated by a number of different factors. To examine this process we analyzed Bcl-2 expression and



Caspase-3 activation in parallel with two sensitive detection methods of the early phase of apoptosis.

Four hours after DX treatment we observed an increase in the proportion of early apoptotic cells which was followed by an increase in the ratio of late apoptotic cells 16-20 hours after DX treatment. Very similar kinetics of apoptosis were found in C57BL/6 mice. Changes in GCR expression, increase of apoptotic cell ratio and depletion of DP cells were observed simultaneously in the thymus.

The activation of GCR or TCR alone or their combination resulted in increased externalization of membrane phosphatidylserine molecules (Annexin V positivity) and decreased mitochondrial potential in DP cells. The ratio of early apoptotic DP cells was lower when the two activation signals were combined similarly to the *in vitro* stimulation results. The co-activation of GCR and TCR caused higher DP survival (compared to single activations) due to the interaction of the two different signaling pathways supporting the mutual antagonism model.

Since in TCR transgenic AND mice more than 90% of thymocytes are DP or CD4 SP, we focused on these two populations in our further work. Both GC treatment and TCR activation caused drastic loss of immature DP cells while the loss of mature CD4 SP cells was not so dramatic. Significantly more DP thymocyte escaped from apoptosis in both BALB/C and TCR transgenic AND mice when GCR and TCR activation were used together which combined effect was not detectable in CD4 SP population.

In the AND transgenic mice the presence of the specific antigen caused significant decrease of DP cells, while glucocorticoid and combined treatment resulted in almost total loss of this thymocyte population. At the same time the increase of CD4 SP cells was detectable suggesting that a portion of the lost DP cells presumably differentiated further into mature CD4<sup>+</sup> cells.

Bcl-2 is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, which includes both pro- and anti-apoptotic molecules. Similarly to other research groups we found different Bcl-2 expression levels in the different thymocyte populations. An *in vitro* examination with a T cell hybridoma showed that Bcl-2 and Bcl-xL selectively antagonised glucocorticoid induced apoptosis. We proved that TCR and GCR activation increased the number of Bcl-2 positive

DP thymocytes giving them advantage during selection steps. Other papers claimed that after successful positive selection the increased anti-apoptotic Bcl-2 expression resulted in DP thymocyte survival.

Activated Caspase-3 is a protein having a role in the effector phase of apoptosis. We did not find Caspase-3 activation after anti-CD3 mAb treatment, but it could be shown in DX induced DP apoptosis. When the two treatments were combined the Caspase-3 activation was partial. Data from literature showed that the ratio of Caspase-3 activation is proportional to DNA fragmentation, FAS and Bax expression during apoptosis. These results reflect a different apoptotic pathway due to GCR or TCR activation.

GCR could have a role in the regulation of early apoptosis since changes of GCR expression and Annexin V positivity could both be detected 4 hours after DX administration. Non-conventional GCR effects can be responsible for that since glucocorticoid antagonist treatment did not affect early apoptosis. Glucocorticoid antagonist pre-treatment inhibited the late (12-24 hours) apoptosis induced by a single high dose DX treatment which is an already known phenomenon.

EFFECTS OF GCR ANTAGONISTS. To inhibit the conventional GC effects we treated our BALB/C mice twice a day with glucocorticoid receptor antagonist RU43044 or RU486 alone or together with 20 mg/kg DX for 2 days. Neither receptor antagonist alone had any effect on thymic cell count or the cellular composition of thymus. After combined treatment with a receptor antagonist and DX the early apoptotic signs of thymocytes (Annexin V in the outer cell membrane) were detectable in thymocytes, while the late signs of apoptosis were absent suggesting that GCR ligation is not needed for the early steps of apoptosis but it is necessary in the late phase (PI positivity).

IN VITRO EFFECTS OF GLUCOCORTICOID HORMONE. In parallel with our *in vivo* experiments we also explored the *in vitro* effects of glucocorticoid hormone on thymocyte apoptosis and survival. In thymic organ culture, where the original microenvironment was conserved we were able to minimize the local glucocorticoid production with the help of Methyrapon. With keeping the thymus lobes in steroid free medium we could provide a glucocorticoid free environment. DP cells were sensitive both to the lack of GC and to the high level of the hormone. According to the mutual antagonism model the lack of GC caused

DP cells only to be activated through TCR and this signalisation alone resulted in the apoptosis of thymocytes. With the use of GCR antagonist major changes in the thymus could not be induced and the effects of DX treatment could not be totally inhibited. These results indicate possible GCR independent effects of DX.

In the thymic organ and cell cultures of 1-2 day old BALB/C mice high degree of spontaneous apoptosis was found, which could be Caspase dependent since the aminisation of Caspase inhibitor decreased its rate. We are planning to use the reaggregate thymus organ culture method for further in vitro research of the maturation and selection processes of thymocytes.

MODELING POSITIVE SELECTION OF THYMOCYTES. After successful positive selection of thymocytes the CD69 expression can be detected on the surface of DP and SP cells. We used this phenomenon to detect the positive selection after TCR and GCR co-activation in DP and CD4 SP cells. In both mouse strains antigen or anti-CD3 mAb induced TCR activation or DX treatment alone increased the ratio of CD69 positive DP cells, but co-activation of TCR and GCR had a stronger effect. In the CD4 SP population antigen itself, low dose DX and co-activation of TCR and GCR increased the CD69+ cell ratio, but after high dose DX treatment there was no increase in the number of CD69+ cells. After high dose DX treatment CD69 positivity of DP cells could be transient since CD69 and CD25 positivity has been showed during spontaneous and steroid induced apoptosis of different cell types. On the other hand low dose DX and simultaneous antigen treatment caused positive selection of thymocytes which can be indicated by the increased ratio of CD69 positive, surviving CD4 SP cells.

According to our results after GCR and TCR co-activation, maturing DP thymocytes show the early signs of apoptosis (membrane phospholipid asymmetry, loss of mitochondrial functions), while the effector phase of apoptosis is inhibited probably through Ras activation.

In summary we can say that the combined effect of stimuli which alone cause apoptosis of thymocytes results in the survival of DP cells. A key element of this phenomenon could be the Bcl-2 molecule since TCR and GCR co-stimulation resulted in the increased expression of this molecule in positively selected thymocytes.

## SUMMARY OF NEW RESULTS

1. We proved that in BALB/C and TCR transgenic AND mouse strains the four different thymocyte subpopulations express GCR in different level: DP cells that are the most sensitive to GC hormone expresses the lowest GCR level.
2. We demonstrated that free cytoplasmic  $Ca^{2+}$  level and the kinetics of  $Ca^{2+}$  level after TCR activation are different in the thymocyte subpopulations.
3. We confirmed that the spontaneous and DX induced apoptosis of thymocytes are caspase dependent, while in GC hormone and TCR activation induced apoptosis caspase independent factors are also important.
4. With the help of GCR antagonists we proved that ligand binding of GCR is not essential for the early steps of GC induced apoptosis, but without it apoptosis declines.
5. GCR and TCR co-activation results in higher ratio of surviving DP thymocytes caused by the inhibition of early steps of apoptosis which suggests a link between the two signalling pathways.
6. We showed that in TCR transgenic AND mouse strain low dose glucocorticoid treatment with simultaneous antigen stimulus induced further maturation of surviving DP thymocytes into CD4 positive direction.
7. Our experiments successfully confirmed the presence of the mutual antagonism model in thymocyte selections.

## PUBLICATIONS

(Cumulative impact factor: 10,058)

1. **Pálinkás L**, Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Németh P, Berki T. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*. 2008; 213(1):39-50 **IF: 2.886 (2007-ben)**
2. Boldizsár F, **Pálinkás L**, Czömpöly T, Bartis D, Németh P, Berki T. Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology*. 2006; 211(10):785-96. **IF: 1,867**
3. Boldizsár F, **Pálinkás L**, Bartis D, Németh P, Berki T. Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunol Lett*. 2003; 90(2-3):97-102. **IF: 1,710**
4. Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *International Immunology*. 2002; 14(5):463-9. **IF: 3,595**

## OTHER PUBLICATIONS

(Cumulative impact factor: 27,537)

1. Molnár T, Jakab L, **Pálinkás L**, Molnár TF, Bogár L, Illés Z. Increased levels of baseline biomarkers reflecting platelet and endothelial activation predict early cognitive dysfunction after lung surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2009; publikálás alatt
2. Kumánovics G, Minier T, Radics J, **Pálinkás L**, Berki T, Czirják L. Comprehensive investigation of novel serum markers of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and dermato/polymyositis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(3):414-20. **IF: 2.270 (2007-ben)**
3. Aradi D, Kónyi A, **Pálinkás L**, Berki T, Pintér T, Tahin T, Horváth I, Papp L, Komócsi A. Thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Angiology*. 2008; 59(2):172-8. **IF: 0.625 (2007-ben)**
4. Bartis D, Boldizsár F, Kvell K, Szabó M, **Pálinkás L**, Németh P, Monostori E, Berki T. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354(1):253-8. **IF: 2.749**
5. Hajto T, Berki T, **Pálinkás L**, Boldizsár F, Németh P. Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56(6A):441-6. **IF: 0,596**
6. Pár G, Berki T, Pálinkás L, Balogh P, Szereday L, Halász M, Szekeres-Barthó J, Miseta A, Hegedus G, Mózsik G, Hunyady B, Pár A. [Immunology of HCV infection: the causes

- of impaired cellular immune response and the effect of antiviral treatment] *Orv Hetil.* 2006; 147(13):591-600. **IF: -**
7. Hajtó T, Berki T, **Pálincás L**, Boldizsár F, Németh P. Effects of mistletoe extract on murine thymocytes in vivo and on glucocorticoid-induced cell count reduction. *Forsch Komplement Med* 2006; 13(1):22-7. **IF: 1,417**
  8. Bartis D, Boldizsár F, Szabó M, **Pálincás L**, Németh P, Berki T. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* No. 2006; 98(2-3):147-154. **IF: 2,866**
  9. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Nyárády Z, **Pálincás L**, Czirják L, Berki T, Németh P. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol. Immunol.* 2006; 43(11):1761-8. **IF: 4.768**
  10. Pál J, **Pálincás L**, Nyárády Z, Czömpöly T, Marczinovits I, Lustyik G, Saleh Ali Y, Berencsi G, Chen R, Varró R, Pár A, Németh P. Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of hepatitis B virus X antigen level in human sera. *J. Immunol. Methods.* 2005; 306(1-2):183-192. **IF: 2,572**
  11. Bánvölgyi A, **Pálincás L**, Berki T, Clark N, Grant AD, Helyes Z, Pozsgai G, Szolcsányi J, Brain SD, Pintér E. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J. Neuroimmunol.* 2006; 169(1-2):86-96. **IF: 2,824**
  12. Hajtó T, Hostanska K, Berki T, **Pálincás L**, Boldizsár F, Németh P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (viscum albumin agglutinin-I): Overview of recent results from in vitro experiments and in vivo animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2005; 2(1):59-67. **IF: -**
  13. Engelmann P, **Pálincás L**, Cooper EL, Németh P. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Developmental and Comparative Immunology* 2005; 29:599-614. **IF: 3,261**
  14. Engelmann P, Molnár L, **Pálincás L**, Cooper EL, Németh P. Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell. Tissue Res.* 2004; 316:391-401. **IF: 2,670**
  15. Hajtó T, Berki T, **Pálincás L**, Boldizsár F, Nagy G, Németh P. Galactoside-specific mistletoe lectin modulate the dexamethasone-induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes. *In Vivo.* 2003; 17(2):163-168. **IF: 0,753**