

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A glukokortikoid hormon indukálta
jelátviteli mechanizmusok vizsgálata
T-sejt alcsoportokon**

Dr. Berki Timea



Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

2016

dc_1343_16

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	9
2. BEVEZETÉS	13
2.1. A glukokortikoid hormon hatásmechanizmusa.....	13
2.1.1. A glukokortikoid hormonok szintézise	13
2.1.2. A glukokortikoid hormonok élettani hatásai	14
2.2. A glukokortikoid receptor	15
2.3. A glukokortikoid receptor jelátviteli útvonalak áttekintése	18
2.3.1. Genomikus hatások.....	19
2.3.2. Nem-genomikus hatások	20
2.3.2.1 Direkt membránhatás - nemspecifikus GC hatás	21
2.3.2.2 Membrán GR -mGR	21
2.3.2.3 A GR interakciója más citoplazmatikus fehérjékkel	22
2.3.2.4 A GR mitokondriális transzlokációja.....	23
2.4. A T-limfociták jellemzése és differenciálódása	25
2.4.1. Az elsődleges T-sejt differenciálódás.....	25
2.4.2. A tímusz fejlődése és sejtes összetevői	26
2.4.3. A T-sejtek érése és szelekciója a tímuszban.....	27
2.4.3.1 A T-sejt fejlődés korai szakasza	28
2.4.3.2 A szelekciós folyamatok: a T-sejt fejlődés késői szakasza	30
2.4.3.3 A timocita szelekció affinitásmodellje.....	32
2.4.4. A perifériás T-sejt differenciálódás	33
2.5. A regulatórikus T-sejtek	34
2.5.1. A regulatórikus T-sejtek kialakulása	35
2.5.2. Treg sejtek működése	36
2.5.2.1 Kontakt-dependens mechanizmusok.....	36

2.5.2.2 Kontakt-independens (citokin-mediált) szuppressziós mechanizmusok	37
2.5.3. Treg sejtek szerepe pathológiás folyamatokban.....	38
2.6. A T-sejt aktiváció jelátviteli folyamatai	38
2.6.1. A ZAP-70 kináz	40
2.7. A GC-k hatása T-sejtekben és a tímuszban.....	41
2.8. Timociták apoptózisa.....	43
2.8.1. T-sejt receptor mediálta apoptózis	44
2.8.2. Glukokortikoid hormon indukálta apoptózis.....	45
2.8.3. A GC és TcR jelátviteli útvonalak kommunikációja: „receptor cross-talk”	45
3. CÉLKÖNYÍTÉSEK	47
I. Timocita alcsoportok GC hormon érzékenységének vizsgálata és annak hatása a sejtek GR expressziójára	47
II. A DP timociták apoptózis mechanizmusának vizsgálata	47
III. Nagydózisú GC kezelés gyors, nem genomikus hatásának vizsgálata a TcR jelátviteli útvonalra <i>in vitro</i> T-sejt modellen	48
IV. A GC hormon hatásának vizsgálata természetes és indukált regulatórikus T- sejtekre és azok citokin termelésére valamint azok <i>in vitro</i> expanziója	48
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	49
4.1. Kísérleti állatok	49
4.2. Sejtvonalak.....	49
4.3. Vegyszerek	50
4.4. Ellenanyagok	50
4.5. Állatok <i>in vivo</i> kezelése, sejtpreparálás	52
4.6. A sejtek kezelése.....	52
4.7. Áramlási citometria.....	53
4.8. Mitokondriális CMX-Ros feltöltés, sejtfelszíni és intracelluláris jelölések.....	54

4.9. Konfokális mikroszkópia.....	54
4.10. Digitális képelemzés, kvantitatív mikroszkópia	55
4.11. A timociták szubcelluláris frakcionálása.....	55
4.12. A mitokondriális GR - Bcl-2 fehérje család asszociáció vizsgálata Western blot és denzitometria	55
4.13. Az intracelluláris kalcium szint mérése áramlási citometriával.....	56
4.14. Az anti-CD3 indukálta foszforiláció változások mérése Foszfo-Flow technikával	56
4.15. TcR-GR jelátviteli út <i>in vitro</i> vizsgálata immunprecipitációval	56
4.16. Treg sejtek <i>in vitro</i> expanziója	57
4.17. Treg sejt szeparálása FACS módszerrel és stimulálásuk citokin termeléshez	58
4.18. Real-time PCR.....	58
4.19. Statisztikai analízis	58
 5. EREDMÉNYEK.....	59
 I. TIMOCITÁK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGE ÉS GR EXPRESSZIÓJUK.....	59
5.1. BALB/C és AND egér tímuszának sejtes összetétele.....	59
5.2. BALB/C egér tímuszának sejtes összetétele DX kezelés hatására	60
5.2.1. Az <i>in vivo</i> ismételt GC kezelés dózis függése	60
5.2.2. Egyszeri, nagy dózisú <i>in vivo</i> DX kezelés hatásának időfüggése.....	61
5.3. A GC hatás gátlása timocitákon	63
5.3.1. <i>In vivo</i> GR antagonista kezelés hatása a tímusz sejtes összetételére	63
5.3.2. GR antagonista hatásának és a GC szintézis gátlásának <i>in vitro</i> vizsgálata.....	64
5.3.3. A kölcsönös antagonizmus vizsgálata: GC és TcR aktiváció együttes hatása a timocitákon	65
5.3.4. DX és anti-CD3 kezelés hatása BALB/c egér timocitáinak apoptózisára	66

5.3.5. Antigén és DX együttes hatása TcR transzgenikus egér timocitáinak korai apoptotikus folyamataira	67
5.3.6. Antigén és DX együttes hatása a timociták késői apoptotikus folyamataira	68
5.4. A GR szerepének vizsgálata a timocita apoptózisban.....	70
5.4.1. Az Intézetben előállított anti-GR monoklonális antitestek jellemzése	70
5.4.2. GR expresszió a különböző timocita alcsoportokban	71
5.4.3. AND transzgenikus egér timocita alcsoportjainak GR expressziója.....	72
5.4.4. Ismételt <i>in vivo</i> DX kezelés hatása a timocita alcsoportok GR expressziójára.....	73
5.4.5. Egyszeri nagy dózisú DX kezelés hatása a GR expresszióra.....	74
II. A DP TIMOCITÁK GR JELÁTVITELI ÚTVONALA ÉS APOPTÓZIS MECHANIZMUSA	75
5.5. A GR ligand indukált lokalizációjának vizsgálata DP sejtekben.....	75
5.5.1. A GR sejten belüli eloszlásának/morfológiájának jellemzése a timocita alcsoportokon konfokális mikroszkópiával	75
5.5.2. DP sejtekben rövid idejű DX kezelés hatására a GR a mitokondriumba transzlokálódik.....	77
5.5.3. A GR mitokondriális transzlokációjának kvantifikálása DP sejtekben.....	78
5.5.4. A timocita alcsoportok mitokondriális funkciójának vizsgálata CMX-Ros festéssel.....	79
5.5.5. A GR mitokondriális transzlokációjának megerősítése szubcelluláris frakcionálással és Western blottal	80
5.6. A timociták GC indukált mitokondriális apoptózis útvonalának vizsgálata.....	82
5.6.1. A GR aszociációja a Bcl-2 fehérjecsalád tagjaival	82
5.6.2. A GC indukálta kaszpáz aktiváció útvonalának vizsgálata.....	86
III. A GC GYORS NEM-GENOMIKUS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A TcR JELÁTVITELI ÚTVONALRA	88
5.7. A GC és a TcR jelátviteli útvonal aktivációjának korai eseményei	88

5.7.1. Timociák Ca ⁺⁺ jele és tirozin-foszforilációja <i>in vitro</i> TcR aktiváció hatására DX jelenlétében.....	88
5.7.2. Azonnali foszforilációs változások vizsgálata GC és anti-CD3 kezelés hatására	89
5.7.3. A ZAP-70 kináz GR dependens foszforilációjának vizsgálata.....	90
5.7.4. A GR - ZAP-70 kináz asszociáció vizsgálata	92
5.7.5. Nagydózisú DX kezelés gátolja a ZAP-70 asszociációját a CD3 komplexhez és a Ca ⁺⁺ jelet Jurkat sejtekben	93
5.8. A ZAP-70 tirozin foszforilációs helyek szerepe a nem-genomikus GC hatásokban	95
5.8.1. A ZAP-70 kináz tirozinjainak pontmutációja megváltoztatja a DX indukálta jelátviteli folyamatokat	95
5.8.2. A ZAP-70 kináz Y315 és Y492 maradékai vesznek részt a nem-genomikus GC hatások kialakításában	95
5.8.3. A ZAP-70 Y-F pontmutációja a 315 és 492 pozíciókban meggátolja a rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés indukálta SLP-76 és Cbl foszforilációt.....	97
IV. GC HORMON HATÁSA A REGULATÓRIKUS T SEJTEK <i>IN VIVO</i> ÉS <i>IN VITRO</i> DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRA ÉS FUNKCIÓIRA	98
5.9. A természetes és indukált regulatórikus T-sejtek eloszlása és GC érzékenysége	98
5.9.1. Treg sejtek előfordulása a limfoid szervekben	99
5.9.2. <i>In vivo</i> DX kezelés hatása a Treg sejtekre	99
5.9.3. <i>In vivo</i> DX kezelés hatása a Treg sejtek citokin termelésére	101
5.10. Treg sejtek GR és FoxP3 expressziójának vizsgálata	103
5.10.1. A GR és Foxp3 expresszió Treg sejtekben 2 napos DX kezelés után	103
5.10.2. A GR és Foxp3 fehérjék lokalizációjának vizsgálata Treg sejtekben	104
5.11. <i>In vitro</i> Treg expanzió lép és tímusz CD4+ sejtekből	106
5.11.1. Az <i>in vitro</i> Treg expanzió mikrokörnyezetének optimalizálása.....	107
5.11.2. <i>In vitro</i> differenciáltatott Treg sejtek citokin termelése	108

6. ÖSSZEFoglalás és MEGBESZÉLÉS	113
I. TIMOCITÁK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGE ÉS GR EXPRESSZIÓJUK.....	113
II. A DP TIMOCITÁK MITOKONDRIÁLIS GR JELÁTVITELI ÚTVONALA ÉS APOPTÓZIS MECHANIZMUSA	115
III. A GC GYORS NEM-GENOMIKUS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A TcR JELÁTVITELI ÚTVONALRA	118
IV. GC HORMON HATÁSA A REGULATÓRIKUS T SEJTEK <i>IN VIVO</i> ÉS <i>IN VITRO</i> DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRA ÉS FUNKCIÓIRA	121
7. ÚJ EREDMÉNYEK.....	125
8. A DOLGOZAT ALAPJÁT ADÓ PUBLIKÁCIÓK	127
8.1. A TÉMÁBAN MEGJELENT TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK.....	128
8.2. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK.....	129
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	131
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	133
11. MELLÉKLETEK.....	153

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTH: adrenokortikotróp hormon

AICD: activation induced cell death, aktiváció indukálta sejthalál

AIF: apoptosis inducing factor

AIRE: autoimmune regulatory element

AP-1: activator protein 1

APC: antigen bemutató sejt

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bcl-XL: B-cell lymphoma-extra large

BSA: bovine serum albumine

CBG: kortikoszeroid kötő fehérje

Cbl: casitas B-lineage lymphoma

cGR: citoplazmatikus glukokortikoid receptor

CLL: krónikus limfoid leukémia

CMX-Ros: chloromethyl-X-Rosamine

COX: ciklooxygenáz

CREB: cAMP-response element binding

CRH: corticotrop releasing hormon

cTEC: kortikális tímusz epitél sejt

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

CyC: Cychrome

DAG: diacil-glicerol

DBD: DNA-binding domain, DNS-kötő domén

DC: dendritic cell

DIC: differenciál interferencia kontraszt

DLL: Delta-like ligand

DMSO: dimetil-szulfoxid

- DN:** double negative, kettősen negatív
- DP:** double positive, kettősen pozitív
- DX:** Dexamethasone
- ER:** estrogen receptor, ösztrogénreceptor
- ERK:** extracelluláris szignál által regulált kináz
- ETP:** early thymic progenitor
- FACS:** fluoreszcent activated cell sorter
- FCS:** fetal calf serum
- FITC:** fluoreszcein izotiocianát
- FLT-3:** FMS related tyrosine kinase 3
- FoxN1:** forkhead box N1 transzkripciós faktor
- FoxP3:** forkhead box P3 transzkripciós faktor
- Fyn:** Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
- GADS:** GRB2-related adaptor downstream of Shc
- GC:** glukokortikoid hormon
- GR:** glukokortikoid receptor
- GRB2:** growth factor receptor-bound protein 2
- GRE:** glucocorticoid response element
- HRPO:** horseradish-peroxidase, tormagyökér peroxidáz
- Hsp:** hősokk fehérje
- IAP:** inhibitors of apoptotic proteins
- IL:** interleukin
- IP₃:** inozitol-1,4,5-triszfoszfát
- IPEX:** immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
- ITAM:** Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
- IκB/IKK:** inhibitor of kappa B kinase
- LAT:** linker of activated T cells
- LBD:** ligand-binding domain, ligandkötő domén

- Lck:** leukocyte specific protein kinase
- MAIT:** mucosal associated invariant T-cell
- MAPK:** mitogén aktivált protein kináz
- MFI:** mean fluorescence intensity, átlag fluoreszcencia intenzitás
- mGR:** membrán glukokortikoid receptor
- MHC:** major histocompatibility complex
- MLS:** mitokondriális lokalizációs szekvencia
- MR1:** MHC-related molecule 1
- mTEC:** medilláris tímusz építősejt
- Nck:** non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
- NFAT:** nuclear factor of activated T cells
- NF-κB:** nuclear factor kappa B
- NKT:** natural-killer T-sejt
- NTD:** nukleáris transzaktivációs domén N-terminális domén
- P2A:** protein phosphatase 2 A
- PBS:** phosphate buffered saline
- PE:** phycoerythrine
- PFA:** paraformaldehid
- PI:** propidium jodid
- PIP:** phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate
- PKB:** protein kináz B
- PKC:** protein kináz C
- PKCθ:** proteine kináz C theta
- PLCy:** foszfolipáz C gamma
- PS:** foszfatidil szerin
- PSGL-1:** P-selectin glicoprotein ligand-1
- RAR:** retinoic acid receptor, retinsavreceptor
- Ras:** rat sarcoma

RXR: retinoid receptor alpha

S1P-R: szfingozin foszfát receptor

SCA-1: stem cell antigen-1

SCID: severe combined immunodeficiency, súlyos kombinált immundeficiencia

SLE: systemic lupus erythematosus, szisztémás lupusz eritematozusz

SLP-76: SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa

SP: single positive, egyszeresen pozitív

Src: src-family kinase, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

STAT: signal transducer and activator of transcription

Syk: spleen tyrosine kinase

TBS: tris-buffered saline

Tcf: T-cell factor

TcR: T-sejt receptor

Th: helper T-sejt

TNF: tumor nekrózis faktor

TRA: tissue-related antigens

Treg: regulatórikus T-sejt

Wnt: Frizzled receptor ligand

ZAP-70: zéta-lánc asszociált protein-kináz 70

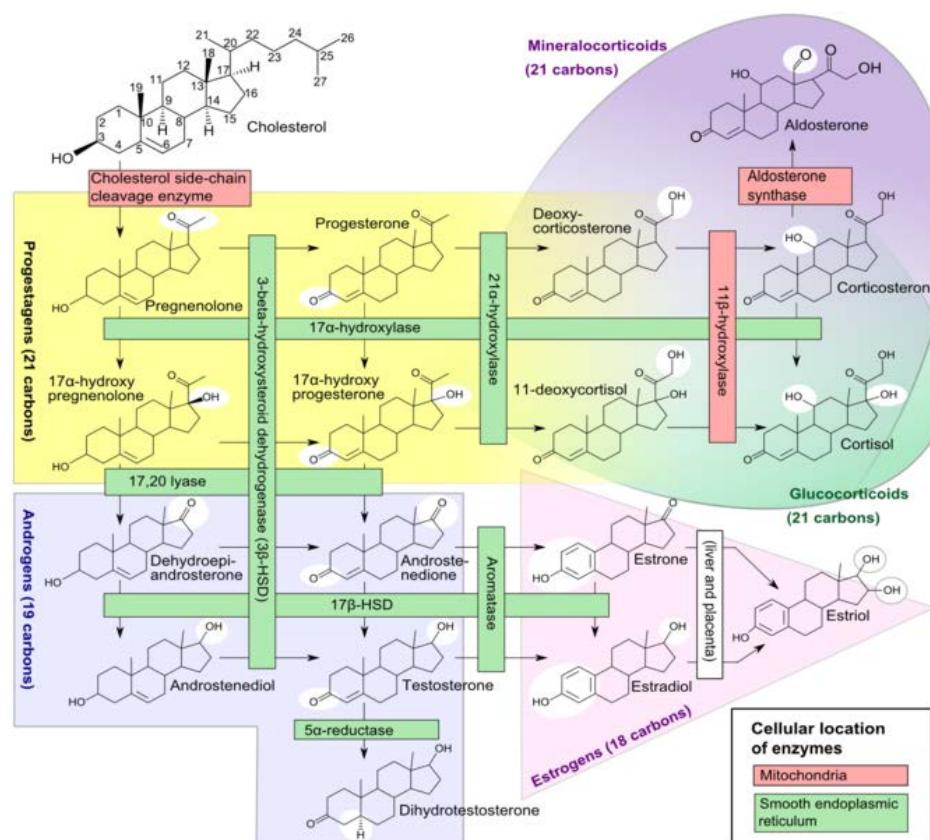
2. BEVEZETÉS

2.1. A GLUKOKORTIKOID HORMON HATÁSMECHANIZMUSA

A „glukokortikoid” szó abból a korai megfigyelésből származik, hogy ezen hormonok a glukóz metabolizmusban játszanak fontos szerepet (Barf T. 2004.). Kémiai szerkezetük tekintetében a glukokortikoid hormonok (GC) a szteroid hormoncsalád tagjai a mellékvesekéreg zona fasciculátájában koleszterinből szintetizálódnak.

2.1.1. A GLUKOKORTIKOID HORMONOK SZINTÉZISE

A glukokortikoid hormonok szintézisében részt vevő enzimek közül a 3-β-hidroxiszteroid dehidrogenáz az aldoszteron és a GC szintézis közös enzimje. A 17-α-hidroxiláz és a 11-β-hidroxiláz csak a kortizol és a kortikoszteron szintézisében vesznek részt (Boron WF. 2008.) (**1. ábra**).



1. ábra: A szteroid hormonok szintézise.

Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach, (2008) page 1300, Elsevier/Saunders.

A GC-ök szintézisét a hipotalamo-hipofizeális-mellékvesekéreg tengely szabályozza. A kortikotróp releasing hormon (CRH) felszabadulása a hipotalamuszból ultradián ritmust mu-

tat, ébredés után és délután éri el a legmagasabb szintet. A stressz és a vér kortizol szintje szintén befolyásolják a CRH felszabadulását. A CRH a portális erekben keresztül jut a hipofízis elől lebonyébe, ahol a kortikotróp sejtek adrenokortikotróp hormon (ACTH) felszabadulását indukálja. Az ACTH a véráram útján jut a mellékvesekéreghez, hatására a koleszterinből GC hormonok szintetizálódnak (Melmed S., 2016). A GC-k szekréciója pulzatilis (ultradián) módon, óránként történik, majd a vérben a kortikoszteroid-kötő fehérjékhez (CBG) kötődnek, amelyek a célszervekhez szállítják (Heuys W. 1988). A szabad kortizol a biológiaileg aktív formá, amit a 11-β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz alakít kortizzonná.

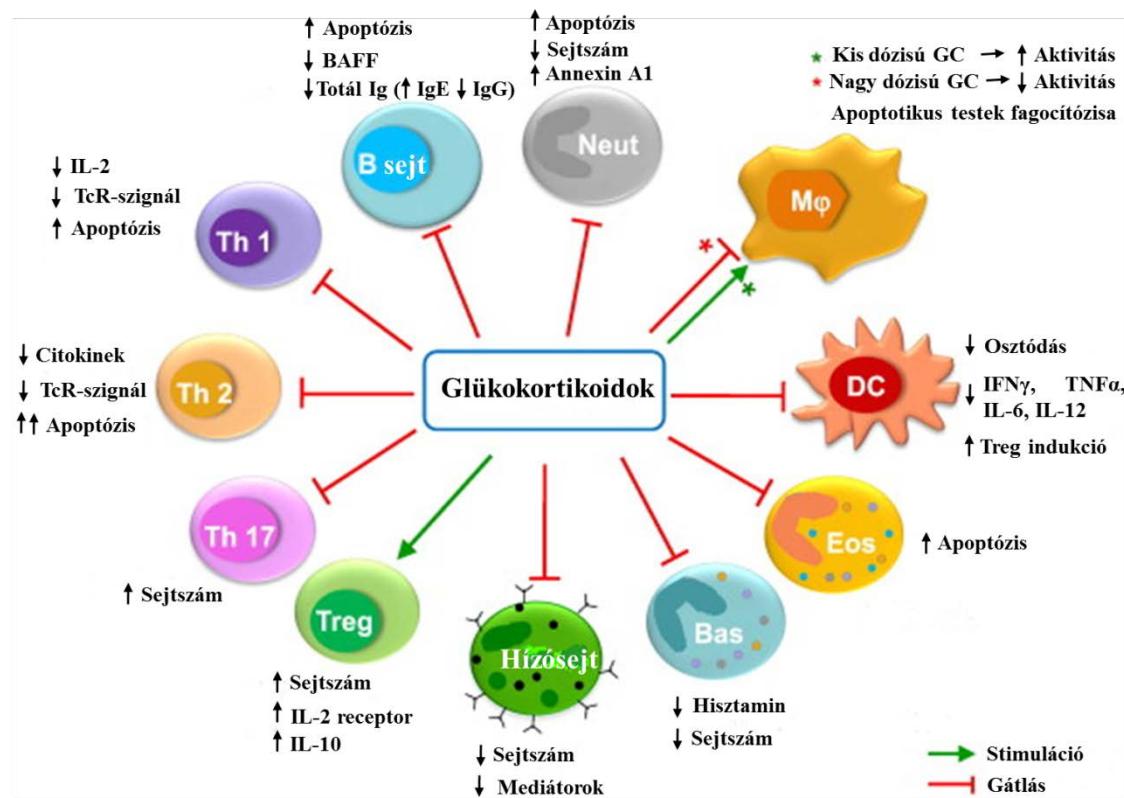
A GC-bioszintézishez szükséges enzimek a mellékvesekérgen kívül, ektopiásan, más szövetekben is jelen vannak, például a tímuszban (Jondal M., 2004) és a bélben (Cima I., 2004) is szintetizálódnak és szekretálódnak biológiaileg aktív GC-k.

2.1.2. A GLUKOKORTIKOID HORMONOK ÉLETTANI HATÁSAI

A mellékvese által termelt GC-ok szerteágazó élettani hatásai révén szabályozzák többek között a protein, lipid és glukóz anyagcserét; különböző fejlődés- és neurobiológiai folyamatokat regulálnak; valamint apoptózist okoznak (Smoak KA. 2004) és negatív „feedback” révén gátolják a CRH és az ACTH kibocsátását (Newton R., 2000).

A GC-ok nemcsak metabolikus folyamatokat szabályoznak, hanem befolyásolják az immunrendszer működését is. Csökkentik a bazofil és neutrofil granulociták, valamint a hízósejtek számát, apoptózist indukálnak a Th1-, Th2- és B-sejtekben, a neutrofil és az eozinofil granulocitákban. Gyulladáscsökkentő hatásuk kiterjed a monocyták/makrofágok, granulociták, T- és endothel sejtek citokin termelésére egyaránt (Rhen T., 2005). A T-sejt jelátvitel gátlása révén csökkentik a citokinek, különösen az IL-2 szintézisét (Stahn C., 2007). Növelik viszont a regulatórikus T-sejtek (Treg) és a Th17-sejtek számát (Zen M., 2011) (**2. ábra**). Régebben ismert, hogy hosszantartó nagyobb stresszhelyzetben a megnövekedő GC szint hatására a tímusz nagymértékű involúcióval reagál és az immunfunkciók romlása figyelhető meg (Olefsky JM., 2001).

Mindezen megfigyelések alapján a szintetikus GC-analógokat (pl. Dexamethasone, Methylprednisolone, Triamcinolone) kiterjedten használják a klinikumban immunszuppresszív gyógyszerként krónikus gyulladások, allergia, asztma (Krishnan JA., 2009) és autoimmun betegségek (Flammer JR., 2011), bizonyos hematológiai malignitások kezelésére, valamint graft rejekció megelőzésére is (Hricik DE., 1994.). A szintetikus GC-ok erős gyulladásgátló és limfocita apoptózist kiváltó hatásuk miatt világosan rendelt gyógyszerek közé tartoznak. Egy dogma alakult ki, amely kiemeli a GC-ok immunszupresszív szerepét, ugyanakkor figyelmen kívül hagyja azt a tényt, hogy fiziológiai koncentráció tartományban nem csak szupresszáló, de stimuláló szerepe is van az immunfunkciókban (Fauci AS., 1976).

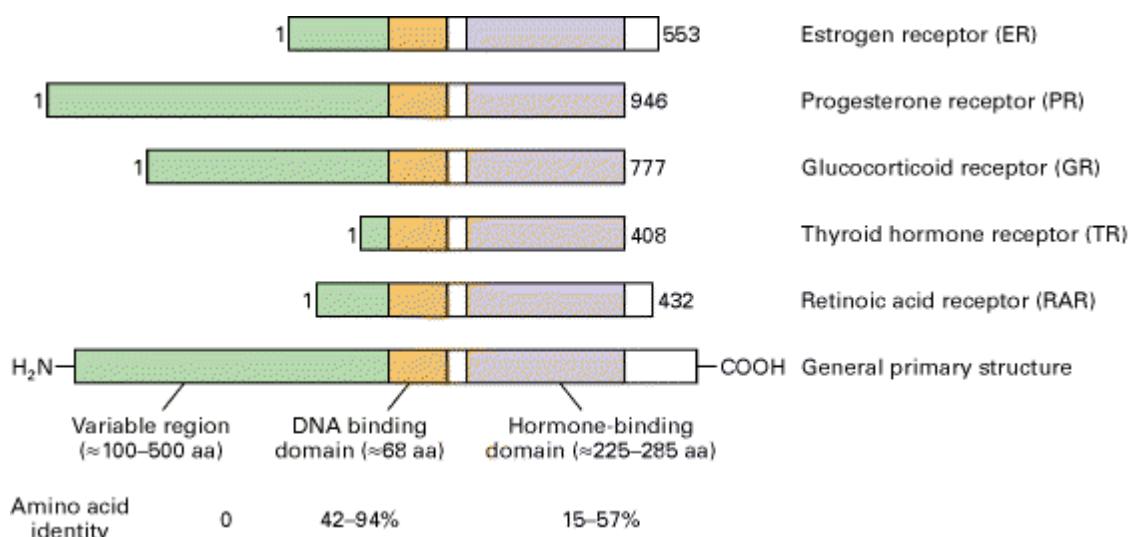


2. ábra: A GC hatásai az immunrendszer sejtjeire.

Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. Autoimmun Rev. 2011; 10(6):305-10.

2.2. A GLUKOKORTIKOID RECEPTOR

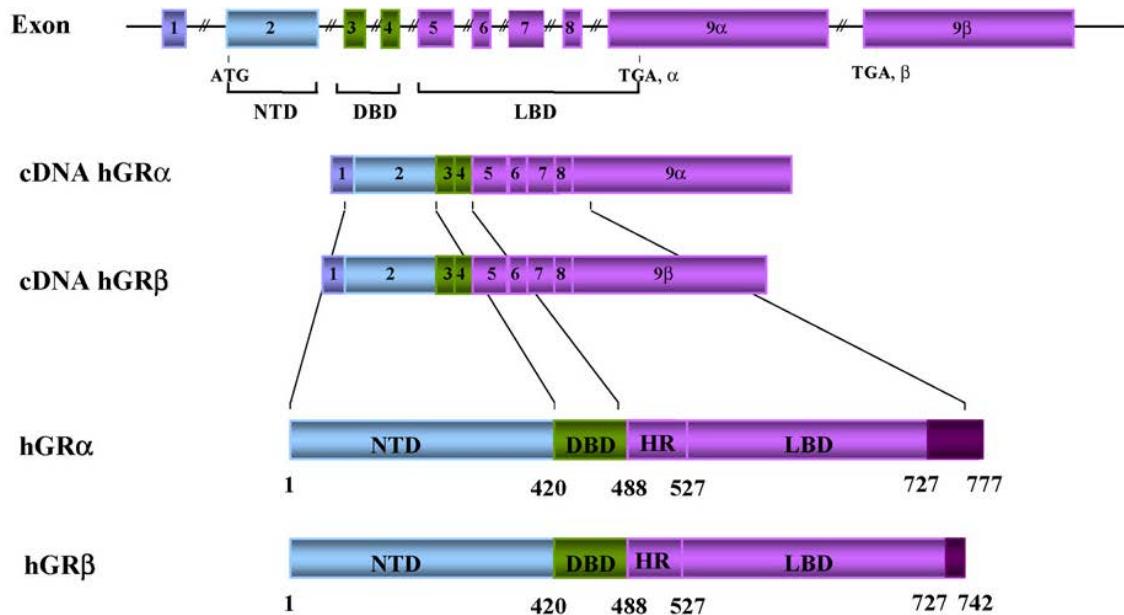
A GC-k intracelluláris receptoron, a glukokortikoid hormon receptoron (GR) keresztül fejtik ki hatásait. A GR a nukleáris receptor szupercsalád tagja, ligand-dependens transzkripció faktor. A receptorcsalád tagjai a szteroid hormonok (ösztrogén, progeszteron, tesztoszteron, aldosszteron) receptorain túl a tiroxin, a retinsav és a D-vitamin receptora is (Olefsky JM., 2001). Jellemző rájuk a moduláris szerkezet, a fehérje tartalmaz egy variáblis az adott receptorra specifikus transzaktivációs domént (NTD, AF1, AF2) az N-terminális régióban belül (1-421 aminosav), egy konzervált cinkujj DNS-kötő domént (DBD) (422-483 aminosavak), illetve egy nyaki régiót követően (H: 484-526 aa) a ligandkötő domént (LBD 527-777 aa.) (Nicolaides NC., 2010). A különböző sejtmagi receptorok N-terminális doménje (NTD) variábilis, a receptorra jellemző. A legtöbb receptor tartalmaz egy szintén változó hosszúságú C-terminális domént (Lodish, H., 2000) (3. ábra).



3. ábra: A nukleáris receptorok alapszerkezete

Lodish, H., Berk, A., Zipurski, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. E., in W.H. Freeman, 2000.

A humán GR az 5-ös kromoszóma hosszú karján kódolódik (locus 5q31p) (Encio IJ., 1991) és 9 exont tartalmaz. A DNS-ről 2 mRNS íródik át és 2 GR izoforma, a GR α és a GR β szintetizálódik. A GR α 777, a GR β 742 aminosavból áll. A 2 izoforma aminosav sorrendje a 727. aminosavig megegyezik, ezt követően egyedi C-terminális aminosav szekvenciából épülnek fel (Duma D., 2006). A 2 izoforma tehát a ligand kötő doménjében tér el egymástól (Nicolaides NC., 2010) (4. ábra). A GR α ubiquiter módon expresszálódik. Ligand hiányában a molekula inaktív formában a citoplasmában található hősök fehérjékhez (Hsp90, Hsp70 és p23) és az FK506 családhoz tartozó immunofillinkekhez asszociálódik (Grad I., 2007). Ez a receptor felelős a GC közvetítette hatások kialakításáért (Kino T., 2009.1). A GR β állandóan a sejtmagban található és nem képes GC analógok megkötésére. Szerepe nem tisztázott, bár újabb kísérleti eredmények szerint rendelkezik intrinsic, a GR α -tól független transzkripcióssal aktivitással (Kino T., 2009.2). A GR β mint domináns negatív inhibitor gátolja a GR α aktivitást számos target génen a GRE-hez kötődéssel, a transzkripcionális coregulátorokkal kapcsolódva és inaktív GR α /GR β heterodimert képzve (Lewis-Tuffin LJ., 2006). A GR α a legtöbb sejtípusban nagyobb mennyiségben található, mint a GR β , de gyulladásos citokinek és egyéb immun aktivátorok emelhetik a GR β expressziót és ezzel csökkent GC szenszitivitást okoznak (Tliba O., 2008). Emelkedett GR β asszociációt írtak le GC rezisztencia kialakulásában számos gyulladásos kórképben, beleértve az asthma, rheumatoid arthritis, colitis ulcerosa, és a chronikus lymphoid leukémia (Webster JC., 2001, Lewis-Tuffin LJ., 2006).

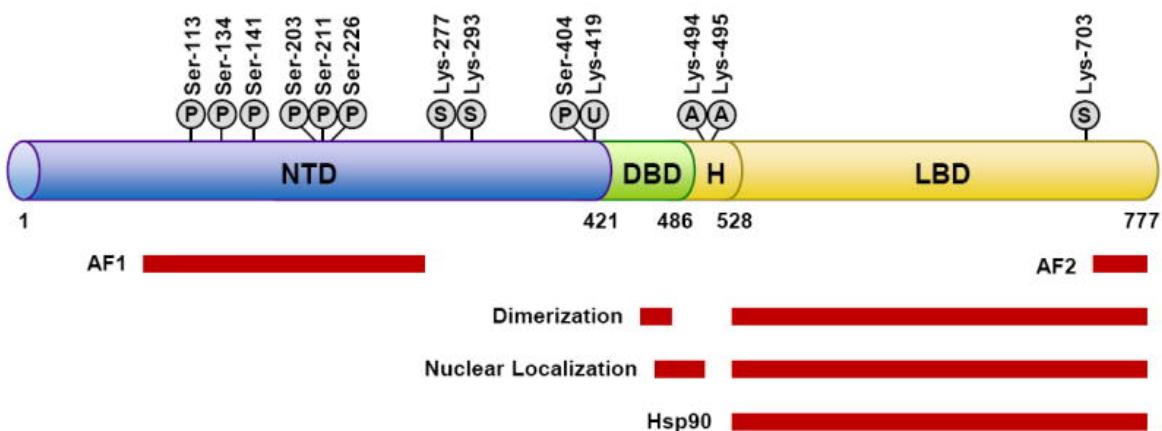


4. ábra: A humán glukokortikoid receptor gén és glukokortikoid receptor izoformák.

Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The humanglucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010;75(1):1-12.

A GR nagyfokban konzervált fehérje, az egér és a patkány, valamint a humán GR aminosav sorrendje kb. 90%-ban megegyezik (Stolte EH., 2006) (5. ábra). A GR molekulán ismert enzimek által létrehozott foszforilációs helyek találhatóak, melynek szerepe van a ligand indukált receptor által létrehozott sejtspecifikus hatások létrejöttében (Galligher-Beckley AJ., 2009). A GR ligand kötés hatására N-terminális szerin maradékokon foszforilálódhat. A foszforilációban a következő enzimek játszhatnak szerepet: ciklin-dependens-kináz (CDK), DNS-dependens protein kináz (DNA-PK), extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK), Jun-N-terminális kináz (JNK), glikogén-szintáz-kináz-3 (GSK-3). A foszforiláció szerepet játszik a GR sejten belüli mozgásában, promóter specificitásában, ko-faktorokkal való összekapcsolódásában, a receptor által kiváltott jelek erősségeinek és időtartamának szabályozásában, a receptor stabilitásában vagy a nem-genomikus glukokortikoid hatások kialakításában (Chen W., 2008).

A GR a legtöbb szövetben expresszálódik, különösen nagy mennyiségben a májban, agyban, vásizomban, tüdőben, csontban és a tímuszban (Kalinyak JE., 1987).



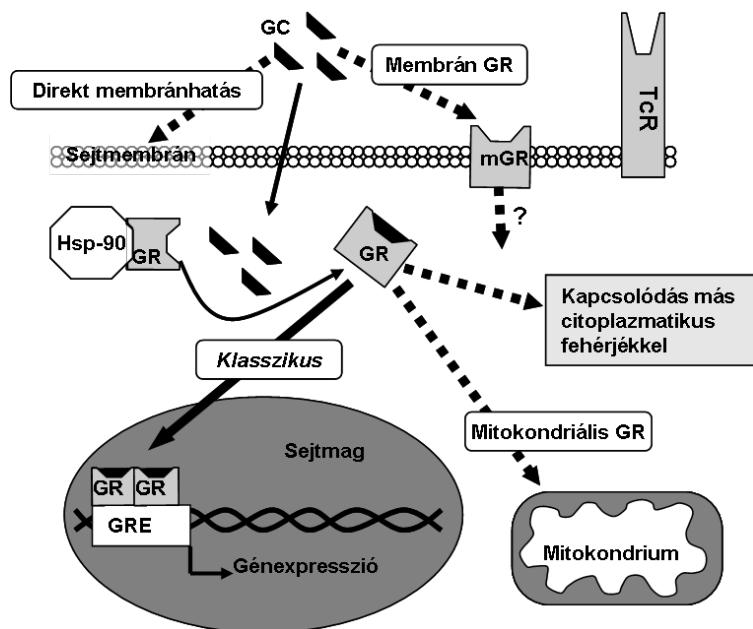
5. ábra: A humán GR doménes szerkezete és a poszttranszlációs módosítások helyei

A GR doménes szerkezetén a transzaktivációban (AF1 and AF2), a dimerizációban, nukleáris lokalizációban, és Hsp-90 kötésben szerepet játszó szakaszai látszanak. Az ábrán látszanak a foszforiláció (P), szumoiláció (S), ubiquitináció (U), és acetiláció (A) alá eső aminósavak.(Oakley RH., 2013)

2.3. A GLUKOKORTIKOID RECEPTOR JELÁTVITELI ÚTVONALAK ÁTTEKINTÉSE

A GC-ok lipofil molekulák, így átdiffundálnak a sejtmembránon és citoplazmatikus receptorokhoz kötődnek. A GR ligandkötés után különböző jelátviteli útvonalakat indíthat el, melyek magyarázzák egyrészt a lassan kifejlődő klasszikus, genomikus hatásokat, másrészről a rövidebb idő alatt létrejövő alternatív, nem-genomikus hatásokat (Boldizsár F., 2009, Oakley RH., 2013)

A klasszikus, genomikus hatásmechanizmus során, ligandkötést követően a GR konformáció változásra megy keresztül, disszociál a hősök fehérjékről és dimerizálódva a sejtmagba transzlokálódik és transzkripció faktorként viselkedik (Freedman LP., 1993). A GC-ok nem minden hatása magyarázható a klasszikus genomikus folyamatokkal. Ezért az utóbbi időben intenzív kutatások tárgyát képezik a GC-ok nem-genomikus hatásmechanizmusai (Buttgereit F., 2004). A jelenleg elfogadott főbb GR-jelátviteli útvonalakat a **6.A és B ábra** foglalja össze.

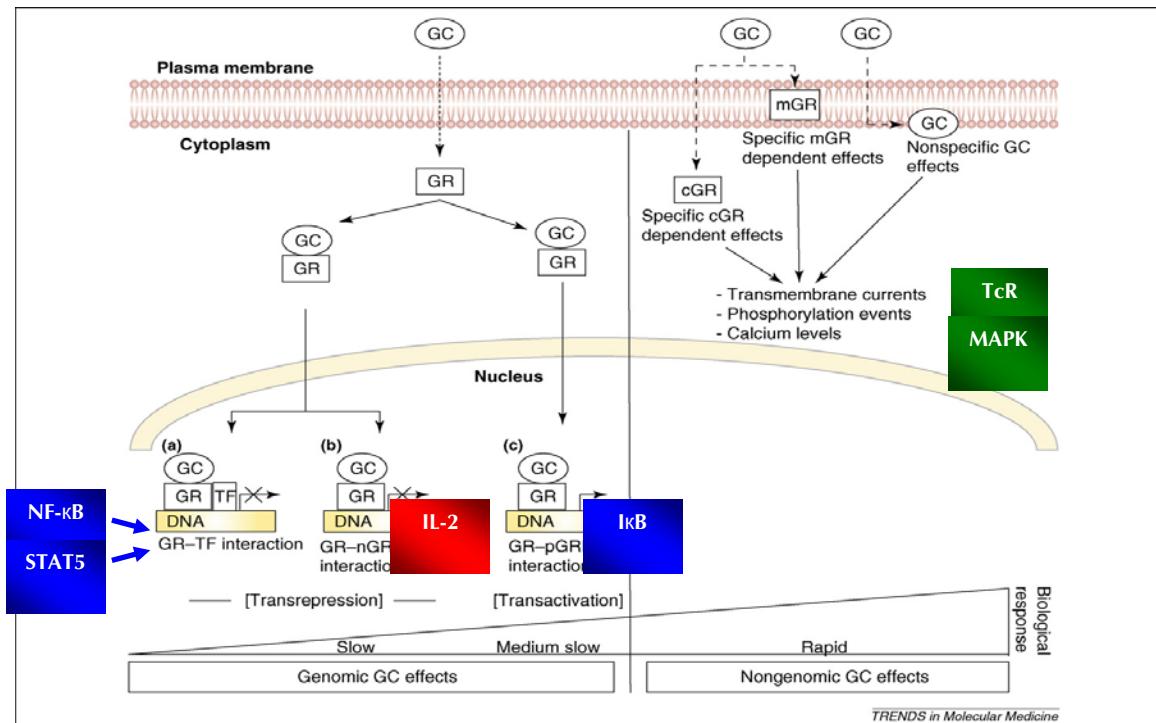


6. ábra: A GR jelátviteli útvonalak áttekintése

Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 2010; 215:521-6.

2.3.1. GENOMIKUS HATÁSOK

A GR a citoplazmában egy fehérjekomplexhez kapcsolódik, melynek tagjai a p23, a Hsp40, a Hsp56, a Hsp70, a Hsp-90 és különböző immunofillin fehérjék (FKBP51 és FKBP52) majd ligandkötés hatására erről a komplexről leválva dimerizálódik (Grad I., 2007). A homodimer GR sejtmagba történő transzlokációját a citoskeletális hálózat biztosítja, pl. a GR tubulinhoz kapcsolódása révén. A GR ezután a DNS meghatározott konzervatív, palindrom szakaszaihoz (GGRACAnnnTGTTC), a glucocorticoid response element-hez (GRE) kötődik és a géntranszkripciót szabályozza (Smoak KA., 2004). A negatív GRE-hez való kötődés gátolja a transzkripciót (transzrepresszió), így a gyulladást szabályozó gének (pl. IL-1 β , IL-2) átíródásának gátlása révén immunszuppresszióhoz vezet (Oakley RH., 2013). Transzaktivációt eredményez a ligand kötött GR pozitív GRE-hez való kötődése, így az immunszuppresszióban fontos szerepet játszó gének, pl. I κ B, annexin-1, IL-10, MAPK foszfatáz-1, lipokortin-1 átíródása fokozódik (Meijssing SH., 2009, Chinenov Y., 2012).



6. B. ábra: Genomikus és nem genomikus GC hatások során a GR interakciója más fehérjékkal

Löwenberg M, et al. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression *TRENDS in Molecular Medicine* 2007.

A GC-k ultradián, azaz egy naposnál rövidebb periódusidejű ciklusokban szekretálódnak, ezért a GR DNS-hez való kötődése és leválása is szigorú periodicitást mutat. Ez csak a természetes GC-kra vonatkozik, a szintetikus GC-k, mint pl. a Dexamethasone sokkal erősebb affinitással kötődnek a hormonreceptorhoz, ezért jelentősen módosulhat a transzkripcionális program a természetes ligandokhoz képest, mivel a receptorkomplex-DNS kölcsönhatás az előbb említett ciklicitást nem tudja a megfelelő mértékben utánozni (Stavreva DA., 2009)

Jellemző a genomikus jelátviteli mechanizmusra, hogy a hatást fel lehet függeszteni transzkripciót gátló antibiotikumokkal (pl. Aktinomycin-D) vagy fehérje szintézist gátló gyógyszerrel (pl. Cycloheximide) (Hudson WH., 2013).

2.3.2. NEM-GENOMIKUS HATÁSOK

Az utóbbi évek kutatásai feltárták, hogy a GC-knak a klasszikustól eltérő nem-genomikus hatásai is vannak, amelyek a genomikus hatásokkal ellentétben, akár perceken belül is létrejöhetnek (Buttgereit F., 2002). Mivel ezek a hatások sokkal gyorsabbak annál, minthogy gének aktivációján vagy elnyomásán alapulhatnak nem-genomikus hatásoknak hívjuk őket (Löwenberg, M., 2007).

Bizonyították, hogy a nagydózisú GC kezelés percek alatt gátolja a fagocitózist és a szuper-oxid-anion termelést rágcsáló peritoneális makrofágjaiban (Long F., 2005). Szintén gyors hatást írtak le a különböző jelátviteli utak aktivitására: *in vitro* GC kezelések hatására gyors

intracelluláris Ca^{++} szint változást, másodlagos messengerek és jelátviteli fehérjék foszforiláció változását (pl.: MAPK, annexin-1, phospholypase A2) érintették (Solito E., 2003, Ayroldi E., 2012). Preklinikai és klinikai megfigyelések szerint a GC homron kardioprotektív hatását gyors, nem-genomikus mechanizmussal váltja ki (Lee SR., 2012), mivel gyorsan alakul ki és nem lehet transzkripció gátlóval megakadályozni a kifejlődését (Hafezi-Moghadam A., 2002). Hasonló, nem-genomikus hatásmódú neuroprotektív hatásról számoltak be nagy dózisú GC kezelés után cerebrális ischaemiás modellben (Samarasinghe RA., 2011)

A GC-ok nem-genomikus hatásai nagy dózisú (30 mg–1g/nap) GC kezelés hatására alakulnak ki (Buttgereit F., 2002). Ezt a dózist alkalmazzák asztmás roham és anafilaxiás reakciók kezelése során, transzplantációkor lökésterápiában, valamint autoimmun betegségek fellángolása esetén is (Falkenstein E., 2000)

A nem-genomikus GC hatások a következők lehetnek:

2.3.2.1 Direkt membránhatás - nemspecifikus GC hatás

A GC analógok plazma membránra gyakorolt hatásai már régóta ismertek vörösvértestekben (Rand PW., 1977). Nagy dózisú szteroid kezelés befolyásolja a membrán lipid mobilitását emlős tumor sejtvonalakban (Van Bömmel T., 1987). Ugyancsak képesek a membrántranszport-folyamatok és a membrán permeabilitás befolyásolására (Fukuda S., 2004). A GC kezelés patkány leukocitákon zavart plazma membrán pszeudopódium retrakcióhoz vezet, míg hörcsög vese sejtvonalban direkt hatása van a szoros sejtközötti kapcsolódások (az un. tight junkciók) képződésére (Samarasinghe RA., 2011). Mitogén aktivált emlős timocitákban nagydózisú GC-ok gátolják a $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPáz, a Ca^{2+} -ATPáz és a $\text{Na}^+ \text{/H}^+$ -kicsérélő csatornák aktivációját, ezzel gátolják a Na^+ -felvételt a sejtmembránban és elősegítik a H^+ -felvételt a mitokondriumba (Chang CP., 2010). Ezen nem-specifikus membránhatások extrém magas GC koncentrációknál figyelhetők meg. *In vitro* kísérleti rendszerekben az alkalmazott GC koncentráció 1-10 mM volt (Buttgereit F., 2002)

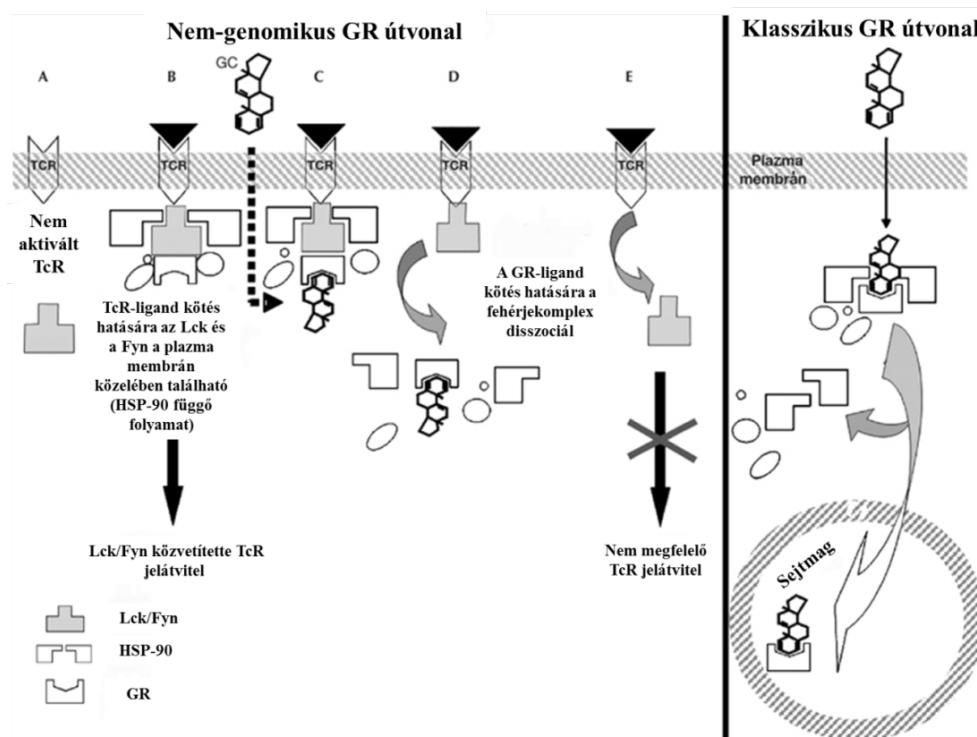
2.3.2.2 Membrán GR -mGR

A membrán GR-t (mGR) kimutatták már kétéltűek agyában, valamint emlős és humán tumor sejtvonalakon, pl. S-49 egér T limfóma sejtekben és CCRF-CEM humán T-sejtes limfoblaszt szerű sejtvonalakon, valamint humán monocitákon és limfocitákon (Grote H., 1993. Gametchu B., 1999). Korrelációt találtak a mGR expresszió és a sejtciklus függő apoptózis érzékenység között humán leukémia sejtvonalakban (Sackey FN., 1997). Újabb kutatások szerint mind a mGR, mind a citoplazmatikus GR (cGR) ugyanarról a génről íródik át és a mGR a p38 MAPK foszforilációját indukálja (Bartholome B., 2004.). Egyes GC-indukálta apoptózisra rezisztens sejtekben, például monocytákon és B-sejtekben mGR-t is azonosítottak, azonban ezen receptorforma által kiváltott jelátviteli hatások továbbra is ismeretlenek (Bartholome B., 2004). A mGR-t fluoreszcens liposzómával konjugált ellenanyagokkal mutatták ki áramlási cytometriás módszerrel, mivel ezek a molekulák nagyon alacsony mennyiségen vannak jelen a sejtmembránban (Strehl C., 2011). Rheumatoid arthritisben és spondilitisz ankiopoetika-ban a mGR molekulák gyakorisága B-sejtekben és monocytákon megemelkedik és összefüggést mutat a betegség súlyosságával, amely arra utal, hogy ezekben a betegségekben ennek a GR izoformának patogenetikai szerepe van (Tryc A., 2006). Az

azonban nem ismert, hogy az éretlen T-sejtekben (timocitákon) expresszálódik-e valamelyik fejlődési stádiumban a mGR, illetve más immunkompetens sejten megtalálható-e.

2.3.2.3 A GR interakciója más citoplazmatikus fehérjékkel

A GR képes más citoplazmatikus fehérjékhez kapcsolódni és így különböző jelátviteli útvonalakat befolyásolni. A ligand kötését követően a GR a T-sejt aktiváció jelátviteli molekuláival is kölcsönhatásba kerül, amely folyamat a GC-ok immunszuppresszív hatásainak megérte szempontjából különösen fontos. Aktivált humán CD4+ T-sejtekben a rövid idejű, nagy dózisú GC kezelés a TcR/CD3 útvonal számos fehérjéjének foszforilációját gátolja. Ezek között megtalálhatók a T-sejt aktiváció kezdeti lépéseiiben nélkülvilágosan Lck és Fyn kinázok, valamint downstream molekulák, pl. a PKB, a PKC és a MAPK kaszkád elemei (Solito E., 2003). Mark Löwenberg és munkatársai aktivált primer humán CD4+ T-sejtekben az Lck és a Fyn fehérjéket találták a GR célpontjának (Löwenberg M., 2005). Eredményeik szerint a GR aktivált T-sejtekben az TcR-Lck-Fyn multimolekuláris komplexhez kötődik, majd ligandkötés hatására ez a komplex disszociál. A folyamatban Hsp fehérjék is részt vesznek (A, B). Az inaktív GR a Hsp-90-hez kötődik. GC ligand kötődés hatására az aktiváció indukálta TcR-Lck-Fyn-hsp komplex disszociál és a T-sejt aktiváció gátlódik (C, D, E) (Löwenberg M., 2006) (7. ábra).



7. ábra: GC hatások aktivált humán CD4+ T-sejtekben.

Löwenberg M, et al.: Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. EMBO Rep. 2006; 7:1023-9.

2.3.2.4 A GR mitokondriális transzlokációja

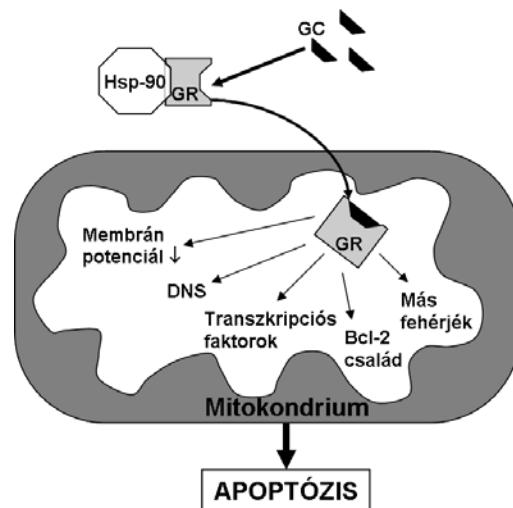
A legújabb eredmények szerint a GR a GC-indukálta apoptózisra érzékeny sejtekben nem-csak a sejtmagba, hanem a mitokondriumba is transzlokálódik, és ezáltal képes egyelőre még ismeretlen mechanizmussal az apoptotikus kaszkádot aktiválni (Sionov RV., 2006). A GR ligandkötő doménjében azonosítottak egy olyan szekvenciát (az 558-580 aminosav között), amely nagyfokú hasonlóságot mutat a citokróm oxidáz fehérjében található mitokondriális lokalizációs szignálszekvenciával (MLS) (**8. ábra**). Ennek ellenére a GR mitokondriális importfolyamata egyelőre ismeretlen, viszont feltehetőleg Hsp-dependens lehet, mivel a GR-ben azonosított MLS-szerű szekvencia (az előbb említett 558-580 aminosav között) átfedést mutat egy Hsp-90 kötőhely szekvenciával is (Sionov RV., 2006).



8. ábra: A GR lehetséges mitokondriális lokalizációs szekvenciája (MLS)

Összehasonlítva a citokróm oxidáz (COX) mitokondriális fehérje MLS-ével. Vörös betűvel a pozitív töltésű arginin és lizin, narancssárgával a hidrofil treonin, míg kékkel a hidrofób leucin, izoleucin, valin és triptofán. Azegyező aminasavak csillaggal jelölve. (Sionov RV. 2006).

A GR mitokondriális transzlokációja után lehetséges hatásmechanizmusként felvetődik **1.)** a mitokondriális membránpotenciál szabályozása **2.)** a GR pro-, illetve antiapoptotikus fehérjékhez való kötődése, **3.)** a mitokondriális DNS-hez való kötődés és a mitokondriális génátírás szabályozása, mivel a mitokondriális DNS-ben azonosítani véltek GRE-hez hasonló szekvenciákat (Demonacos CV., 1996, Sionov RV., 2006). A nukleáris receptorokon kívül egyéb transzkripció faktorokat is azonosítottak a mitokondriumban, mint pl. NF-κB, AP-1, p53, NFAT, CREB (Psarra AM., 2009), szerepük azonban nem teljesen ismert. Néhány közülük fehérjékkel kapcsolódik össze a mitokondriumban, a többiek pedig a sejtmagban ismert mechanizmusokhoz hasonlóan a mitokondriális génátírást szabályozzák (Psarra, AM., 2008). Mint ahogy a genomikus hatásoknál részletezésre került, a GR több transzkripció faktorral is kölcsönhatásba léphet a sejtmagban, de újabb adatok szerint hasonló mechanizmussal ugyanezt a mitokondriumban is képes megtenni (Psarra AM., 2009) (**9. ábra**).



9. ábra: A mitokondriális GR lehetséges hatásmechanizmusai.

(Boldizsár F., 2009.)

A nukleáris receptor szupercsalád tagjai közül nemcsak a GR, hanem más receptorok is képesek a mitokondriumba transzlokálódni, többek között a Nur77, androgén- és ösztrogén receptorokat is azonosítottak már különböző sejtek mitokondriumában (Psarra, AM., 2008) (**1. táblázat.**)

1. táblázat. A nukleáris receptorcsalád tagjai különböző sejtípusok mitokondriumában.

Receptor	Sejt- és szövettípus	Referencia
GR	patkány máj-, HeLa-, HepG2-sejtvonalak, T-sejtek (timocita)	Sionov. RV. 2006
ER-beta	HepG2, nyúl ovárium, uterus	Monje P. 2001
Androgen	spermatocita, LNCaP-sejtvonal	Solakidi S. 2005
Thyroid	patkánymáj, Cardiomyocyták	Morrish F., 2006
RXR	patkánymáj	Casas F. 2003
RAR	patkánymáj	Berdanier CD., 2001
Nur77	T-sejtek, SNU-1 gyomordaganat-sejtvonal	Thomson J. 2008
PPARgamma2	patkánymáj	Casas F. 2000

Psarra, AM., Sekeris CE., Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. IUBMB Life 2008. 60: 210-223.

2.4. A T-LIMFOCITÁK JELLEMZÉSE ÉS DIFFERENCIÁLÓDÁSA

A T-sejtek az adaptív (specifikus) immunrendszer egyik fő sejtes alkotóelemei, egészséges ember perifériás vérében a limfociták körülbelül 75-80%-át teszik ki. Alapvető szerepet töltnek be a szervezet számára idegen antigének (pl. baktériumok, vírusok, tumor sejtek, idegen sejtek stb) felismerésében, ezen antigének ellen irányuló védekező mechanizmusok kialakításában, valamint az immunválasz szabályozásában. Részt vesznek továbbá a saját struktúrák védelmét szolgáló tolerancia mechanizmusok kialakításában is (Chaplin DD., 2010).

Antigén-felismerő receptoruk a T-sejt receptor (TcR), amely jól karakterizált egységekből épül fel. A heterodimer molekula láncösszetétele alapján $\alpha\beta$ -és $\gamma\delta$ - TcR-t különböztetünk meg. A két fehérjelánc 'N-terminális vége közösen alkotja az antigén felismeréséért felelős részt. Nélkülözhetetlen járulékos egysége még a T-sejtek antigénreceptorának a CD3 molekulakomplex, amely szintén több, különböző alegységből áll és funkciója, hogy az antigénfelismerés után elindítsa a jelátviteli folyamatokat. A T-sejtek kizárolag fehérjékből származó, MHC molekulákkal együtt bemutatott peptid antigént ismernek fel egy antigén bemutató sejt (APC) felszínén. Az érett $\alpha\beta$ T-sejtek két alcsoportra oszthatók attól függően, hogy melyik MHC specifikus koreceptor molekulát expresszálják kizárolagosan: az MHC II-vel együtt bemutatott antigéneket felismerő, CD4-et hordozó T helper, míg az MHC I-el bemutatott antigéneket felismerő, CD8-at hordozó citotoxikus T-limfocitákra. A nekik megfelelő peptid-MHC komplex felismerése után a T-sejtek klonális aktivációján és osztódásán esnek át, mely során az egyes altípusoknak megfelelő effektor és memóriasejtek differenciálódnak.

Az evolúciós szempontból ősibb $\gamma\delta$ TcR pozitív T-limfociták emberben és egérben a lép és a nyirokcsomók T-sejt állományának csak nagyon kis (1-5%) hányadát alkotják. Nagyobb arányban találhatóak meg a vékonybél, a máj és a reproduktív szervek hámja alatt. Más antigéneket ismernek fel, mint az $\alpha\beta$ T-sejtek, és még ma is az egyik kevésbé ismert sejtcsoportját alkotják az immunrendszernek (Chien Y., 2006).

2.4.1. AZ ELSŐDLEGES T-SEJT DIFFERENCIÁLÓDÁS

A T-sejtek többlépcsős, bonyolult érési folyamata a csontvelőben kezdődik, majd a tímuszban folytatódik, melynek végeredménye az a naiv, antigénnel még nem találkozott T-sejt készlet („repertoire”), amely a perifériás nyirokszervekbe vándorol, hogy effektorsejteké differenciálódjon és ellássa feladatát.

A vörös csontvelőben a haemopoetikus őssejtekből limfoid irányú elköteleződést követően differenciálódnak a T-sejt előalakok (Res P., 1999). A T-sejt irányú elköteleződésben a Notch1 jelátviteli útvonal játszik fontos szerepet (Radtke F., 2004, Laky K., 2008). Az elköteleződött T-sejt előalakok a csontvelőből a tímuszba vándorolnak. A tímusz endotheliuma által expresszált P-selectinhez kötődnek a limfoid progenitor sejtek (Wu. L. 2006) a PSGL-1 (P-selectin glicoprotein ligand-1) molekulájukkal, mely jelenség nagyon fontos az előalakok tímuszba történő vándorlásának folyamatában. A tímusz limfoid progenitorokat befogadó fészkeinek (niche) telítettsége alapvetően meghatározza a sejtek a P-szelektin expresszióját és ennek következtében a tímuszba vándorlásuk kinetikáját is (Rossi FM., 2005). A folyama-

tot a tímusz által termelt CCL21, CCL25, CXCL19 kemokinek, valamint a T-sejt előalakokon expresszálódó CCR7 és CCR9 receptorok irányítják (Jenkinson WE., 2007, Hu. Z. 2015).

2.4.2. A TÍMUSZ FEJLŐDÉSE ÉS SEJTES ÖSSZETEVŐI

A tímusz az elülső mediastinumban a szív fölött elhelyezkedő szerv, de egyes szerzők beszámolnak (csak egérben) nyaki elhelyezkedésről, ami egy működő, második tímuszt jelenthet (Terszowski, G., 2006). Régóta ismert, hogy a tímusz az életkor előrehaladtával, már az első életévtől kezdődően visszafejlődik (Steinmann GG., 1985). Ez a folyamat az ún. tímusz involúció, aminek eredményeképp a szerv helyén végül csak zsíros szövet marad vissza (Hale LP., 2004).

A tímusz a 3. és 4. garattasakból kezd el fejlődni, az embryonális fejlődés 10-11. napján (Anderson G., 2006), amiben a „forkhead box” transzkripció faktor családba tartozó Foxn1 molekula kulcsszerepet játszik (Rodewald HR., 2008). A Foxn1 hiányában („nude egér”) a tímusz epithelium kezdeti fejlődése zavartalan (ennek oka ismeretlen), azonban később a tímuszt nem kolonizálják a timociták, és emiatt a fejlődő tímuszból csak egy üres, cisztózus képlet marad vissza (Anderson G., 2006). A Foxn1 transzkripció faktor expresszióját a Wnt-4 glikoprotein molekula indukálja egyelőre még ismeretlen jelátviteli lépésekben keresztül (Balciunaite G., 2002). Részleteiben még nem tisztázott, hogy a tímusz későbbi fejlődésében milyen szerepet játszhat a Foxn1, újabb adatok alapján viszont úgy tűnik, hogy a tímusz posztnatális fenntartása szempontjából is elengedhetetlen (Chen L., 2009).

A csecsemőmirigynek elsődleges szerepe van a T-sejt repertoár kialakításában, melyben nagyon fontosak a specializált funkciójú stórmaelemek és a tímusz jellegzetes szerkezete (Anderson G., 2001). A tímusz stróma eleme közé tartozik a hematopoetikus eredetű sejtek kivételével minden tímusz felépítésében résztvevő sejt, tekintet nélkül ezen sejtek pontos eredetére. Ezek a sejtek legegyszerűbben a CD45 pán leukocita marker és a keratin segítségével csoportosíthatóak (**2. táblázat**). A tímuszt alkotó sejtek tranziens, folyamatos kolonizációt folytató hematopoetikus eredetű, CD45+ sejtekre és rezidens stróma sejtekre (CD45-) osztathatóak. A CD45- sejtek további két csoportja a tímusz epithel sejtek (TEC, Keratin+) és mesenchimális eredetű sejtek (Keratin-), mely utóbbi csoportba különböző alapstruktúrákat (pl.: tok, erek) felépítő sejtek tartoznak. A CD45+ : CD45- sejtek aránya kb. 50:1.

2. táblázat. A tímuszt alkotó főbb sejttípusok és azok eredete.

Fenotípus	Sejttípus	Eredet
CD45-	Keratin+	Kéreg TEC (CEC)
		Velő TEC (MEC)
	Keratin-	Tok
		Szeptum
		Endotel
		Fibroblaszt
		Egyéb
	CD45+	Timociták
		Dendritikus sejtek
		Makrofágok
		B-sejtek

Rodewald HR., *Thymus organogenesis*. Annu Rev Immunol 2008. 26: 355-388.

2.4.3. A T-SEJTEK ÉRÉSE ÉS SZELEKCIÓJA A TÍMUSZBAN

A T-sejtek a tímuszban egy többlépcsős, bonyolult fejlődési folyamatban vesznek részt, melynek végeredménye funkcióképes, saját antigénekkel szemben toleráns perifériára kiterülő naiv T-sejt készlet.

A T-sejtek fejlődését

1. timociták és a strómasejtek közötti direkt sejt-sejt kapcsolatok (Notch a timocitákon és ligand párja a Jagged (Notch-ligand DLL) a tímusz epithelsejtekben) (Laky K., 2008)
2. strómasejtek által szekretált szolubilis molekulák –
 - citokinek (IL-7), (Yarilin AA., 2004)
 - kemokinek (CCL19, CCL25), (Takahama Y., 2007)
 - Wnt-glikoprotein-család tagjai (különösen aWnt-4) (Staal FJ., 2008)
 - különféle hormonok (pl. GC-k) (Talabér G., 2013)- befolyásolják.

A fejlődési szakaszok feloszthatóak **korai** (az éretlen sejtek proliferációja) és **késői** (szelekciós lépések és az érett sejtek kikerülése a perifériára) szakaszra (Bommhardt U., 2004).

2.4.3.1 A T-sejt fejlődés korai szakasza

A csontvelőből érkező korai T-sejt előalakok (ETP) c-Kit receptort (CD117) expresszálnak, valamint jellemző még rájuk az FLT-3 kináz és a stem cell antigén (SCA-1) molekulák expressziója. A tímuszba vándorlás és megtelkedés során nagy szerepe van a CCR9 molekulának (melynek ligandja a CCL25 kemokin) az éretlen sejtek felszínén (Bhandoola A., 2007).

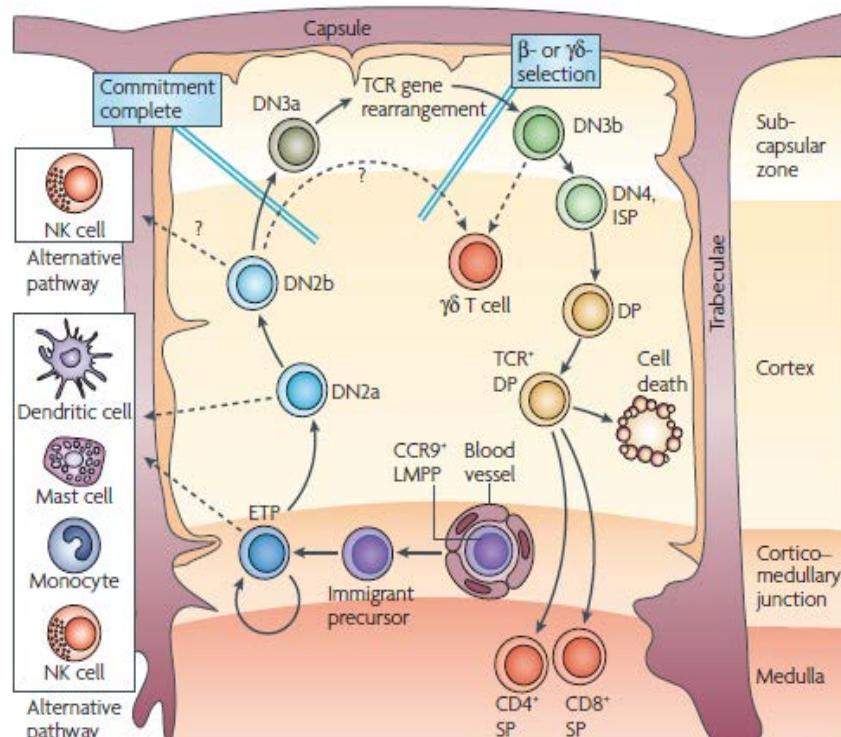
Az érési folyamat első szakasza során a timociták „kettős negatív” (DN) fenotípusúak, azaz sem CD4-et, sem CD8-at nem expresszálnak a felszínükön. A DN stádium négy szakaszra osztható fel a sejtfelszíni CD25 (IL-2R alfa lánc) és CD44 (adhéziós molekula) expresszió alapján: DN1 (vagy ETP: korai T-sejt progenitor), DN2, DN3, DN4 (Rothenberg EV., 2008) (**3. táblázat**). A sejtek a DN2 stádiumban intenzív osztódáson mennek keresztül, ami a DN3 stádiumban leáll. A DN2-stádiumban a progenitor sejtek differenciációs programja még „rugalmás”: ezek még dendritikus-sejt, monocyta, NK-sejt és hízósejt irányba is differenciálódnak (**10. ábra**), (Taghon T., 2006). Mivel ezeken a sejtekben még nem expresszálódik TcR és a CD3 molekula sem (ez alapján „triple negative”: TN-sejteknek is nevezik őket), azonban a DN3 stádiumban megkezdődik a TcR-gének átrendeződése és ezzel a plaszticitás is megszűnik, befejeződik a T-sejt irányba történő elköteleződés („lineage commitment”) (Rothenberg, EV., 2008). A DN3b-sejteket az különbözteti meg a DN3a-sejtektől, hogy már sikeresen átrendezték a TcR β -lánc génjét (sikeres béta-szelekció mentek keresztül), a DN4-sejtek pedig már intracelluláris TcR β -át expresszálnak, ami a CD8, illetve valamivel később a CD4-gének bekapcsolásához és így fenotípusosan a kettős pozitív (double positive DP) (CD4 $^+$ CD8 $^+$) stádiumhoz vezet. A DN3-sejteknél válhatnak le a $\gamma\delta$ -T-sejtek, (**10. ábra**) melyek egy külön T-sejt vonalat képeznek és nem fehérje természetű antigéneket ismernek fel. Ezek a sejtek érésük után szelekciós lépések nélkül azonnal elhagyják a tímuszt és főleg a mukózában, illetve a bőrben halmozódnak fel (Nanno M., 2007).

A tímusz epithelium a T-sejt fejlődés minden egyes lépéséhez biztosítja a megfelelő környezetet, ezekben a korai fázisokban az IL-7 és a strómasejtek felszínén expresszálódó Notch-ligandok (főleg a DLL1 és a DLL4) kritikusak (Shah DK., 2014).

3. táblázat. Az éretlen T-sejt alcsoportok fenotípus-jellemzői

	ETP	DN2a	DN2b	DN3a	DN3b	DN4
c-KIT	Magas	Magas	Közepes	Alacsony	Alacsony	Alacsony
CD44	Magas	Magas	Magas	Alacsony	Alacsony	Alacsony
CD25	Negatív	Magas	Magas	Magas	Közepes-Magas	Alacsony
CD24	Negatív-Közepes	Magas	Magas	Magas	Magas	Magas
CD27	Magas	Magas	Közepes	Alacsony	Magas	Magas
Thy-1	Alacsony	Magas	Magas	Magas	Magas	Magas
Proliferáció	+	+	+	-	+	+
TcR β átrendeződés	GL > DJ	GL > DJ	GL > DJ	DJ VDJ	VDJ ⁺	VDJ ⁺

A táblázat különböző markerek expressziós szintjét és a sejtproliferáció, valamint a TcR génátrendeződés mértékét mutatja az éretlen T-sejt alcsoportokon.(Rothenberg EV.,2008)



10. ábra: A T-sejt fejlődés korai stádiumai a tímuszban.

A T-sejt előalakok a csontvelőből a véréramon keresztül kemotaktikus ingerek hatására vándorolnak a tímusz lebénye kortikomedulláris régiójába. Innen a kettős negatív (DN) sejtek a kéregállományba vándorolnak, osztódnak, és a TcR gének átrendezése után kettős pozitív (DP) stádiumban jól szabályozott szelésekben esnek át. Ezen szelésekben van szerepe a GC hormonnak. (Rothenberg EV., 2008)

2.4.3.2 A szelekciós folyamatok: a T-sejt fejlődés késői szakasza

A DN stádiumot követően a timociták kettős pozitív (DP) sejteké érnek, amelyek már expresszálnak funkcionális TcR-t, valamint CD4 és CD8 molekulát is. A TcR-ok α és β vagy γ és δ láncokból épülnek fel. A β és δ láncok esetében variabilitás (V), diverzitás (D) valamint joining (J); az α és γ láncok esetében V és J génszakaszok rekombinációja révén alakul ki a receptorok variális doménje. Az egyes génszakaszok száma, valamint ezek rekombinációs lehetőségei révén jön létre az a TcR repertoár, ami több milliárd antigén felismerését teszi lehetővé (Alt FW., 1992). A DP-timociták ezt követően a pozitív és a negatív szelekciós lépésekben mennek keresztül (Starr TK., 2003).

A pozitív szelekció

A DP-sejtek a tímusz kéregállományban közvetlen kapcsolatba kerülnek a kortikális tímusz epithel sejetekkel (cTEC), amelyek MHC-n keresztül különböző peptideket prezentálnak nekik. A cTEC különleges proteoszómával (β 5t-timoproteoszóma) rendelkezik, amely ezeket a peptideket generálja (Murata S., 2008). Lehetséges, hogy a timoproteoszóma olyan kevésbé stabil peptideket generál, melyek alacsony affinitással kötődnek az MHC-komplexhez (Bommhardt U., 2004). Ha a DP-sejtek nem tudnak az epithelialis sejtek MHC-jéhez kötődni és ezeket a peptideket felismerni, apoptózissal elpusztulnak, mivel nem kapnak túlélési szignált („death by neglect”) (Klein L., 2009) (**11. ábra a**). Az apoptózissal elpusztuló sejtek aránya ebben a folyamatban kb. 90% (Egerton M., 1990). A túlélő, pozitívan szelektált sejtek viszont folytatják az érési folyamatot, és a medullába vándorolnak kemokinszignálok hatására (**11. ábra b**). Ebben fontos szerepe van a DP timociták felszínén expresszálódó CCR7-nek (Kurobe H., 2006), amelynek ligandja a medulláris tímusz epithélsejt (mTEC) által szekretált CCL19 és CCL21 (Nitta T., 2009).

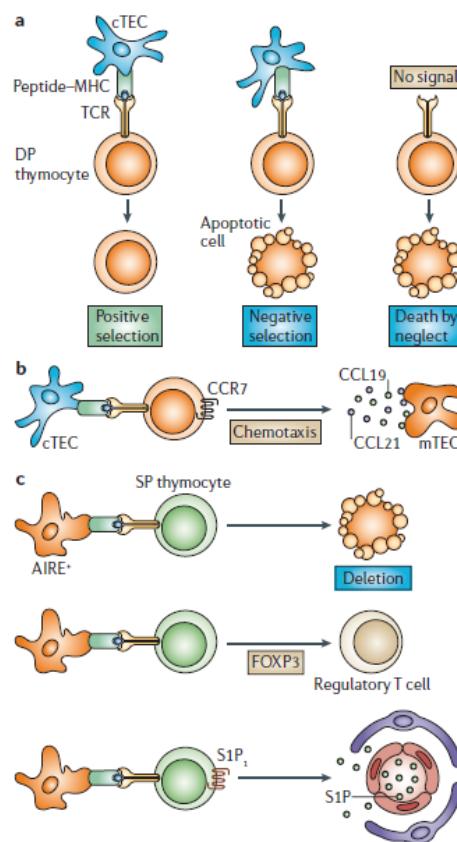
A negatív szelekció

A túlélő sejtek ezután negatív szelekciót esnek át, amelyben a saját antigénekhez túl erősen kötődő, potenciálisan autoreaktív sejtek pusztulnak el apoptózissal, az aktiváció indukálta sejthalál (AICD) mechanizmusával (Green DR., 2003). A negatív szelekcióban nagy jelentősége van a mTEC-nek és a dendritikus sejteknek is (Klein L., 2009). Az így túlélő a tímuszol kikerülő érett sejtek, CD4⁺ vagy CD8⁺ egyszeresen pozitív (SP) fenotípusúak.

Annak érdekében, hogy autoreaktív T-sejtek ne kerülhessenek ki a perifériás nyirokszervekbe az mTEC egyéb szövetek antigéneit is expresszálja bizonyos kombinációkban, hogy az érett T-sejtek a tímuszon kívül meg tudják különböztetni a sajátot a nem sajáttól (Kyewski B., 2009). A tímuszon kívüli szövetek antigéneit a legkülönbözőbb mértékben expresszálja az mTEC, példaként a pancreas fehérjéi közül az inzulin és a glutamát-dekarboxiláz, a központi idegrendszer antigénei közül a myelin bázikus protein említhetők (Gotter J., 2004). Ezt az AIRE (autoimmune regulatory element) transzkripciósi faktor szabályozza, amely egyúttal a fő mTEC marker is (Mathis D., 2009). Annak a tények, hogy mTEC széles körben expresszál szöveti antigéneket (TRA- tissue related antigens, a jelenséget az irodalomban „promiscuous gene expression”-nak nevezik) a negatív szelekció során nagy jelentősége van az ún. centrális tolerancia kialakítása szempontjából (Pitkänen J., 2003). A centrális tolerancia kialakulásának eredményeképp autoreaktív T-sejtek nem kerülhetnek ki a perifériára (Anderson G., 2007). Az AIRE-hiányos egerekben több szervet is érintő autoimmun betegség alakul ki,

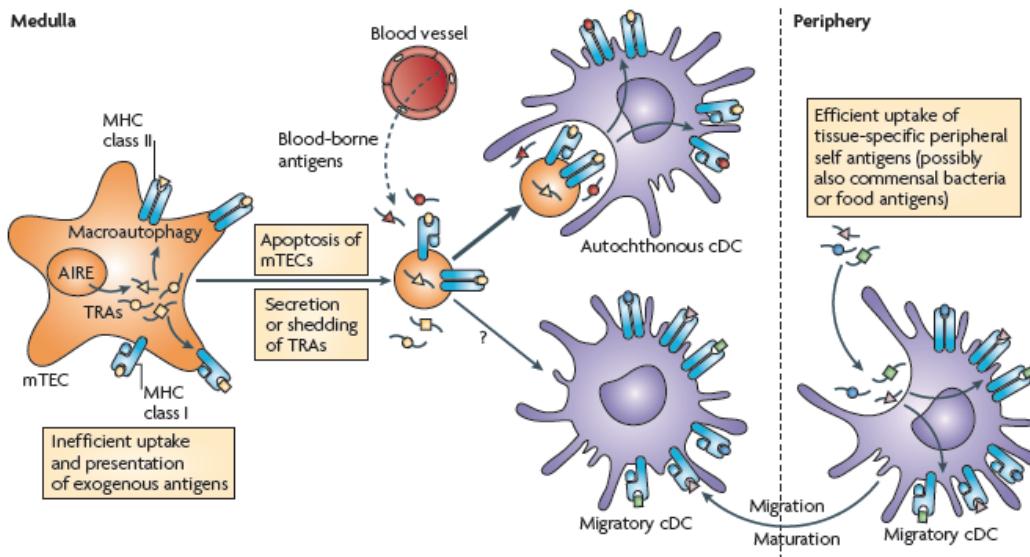
gyulladásos infiltrációkkal és emelkedett szérum autoantitest koncentrációkkal (Anderson MS., 2002). Továbbá az AIRE-nek humán mutációja is ismert, ez áll a monogénesen öröklődő APECED-szindróma (autoimmun poliendokrinopátia-candidiasis-ektodermális disztrófia) patogenezisének hátterében (Vogel A., 2002)

A fent említett klasszikus mechanizmus mellett újonnan felfedezett antigénprezentációs mechanizmusoknak is jelentősége van a centrális tolerancia kialakítása szempontjából: az egyik a makroautofágia, a másik pedig az mTEC és a DC-k között történő intercelluláris antigéntranszfer (**12. ábra**). Makroautofágia során intracellulárisan sejtorganellumok és más sejtrézletek bontódnak le nem-lízoszómális úton, kétrétegű membránok segítségével (Yu L., 2008). A tímuszban konstitutívan nagy aktivitású biológiai folyamatról van szó, ami nemcsak a cortexben, hanem a medullában is fontos az antigénprezentáció szabályozása szempontjából (Nedjic J., 2008). Ekkor nem exogén, hanem endogén antigének prezentálódnak az MHC II-n keresztül a szelektálódó tímocitáknak. Az intercelluláris antigéntranszfer során pedig az mTEC-ek MHC-peptid fragmentumokat tudnak átadni a helyi és a kívülről bevándorló DC-eknek a medullában (Koble C., 2009).



11. ábra: A szelekciós folyamatok és a T-sejt export összefoglaló ábrája.

(a) A saját MHC molekulákat felismerni nem tudó DP-sejtek túlélési szignál hiányában apoptózissal elpusztulnak („death by neglect”), a saját MHC-hoz kötődni képes TcR-t expresszáló sejtek viszont túlélnek, azaz megtörténik a pozitív szelekció. A túlélő sejtek közül a negatív szelekció során a túl nagy affinitású TcR-ral rendelkező sejtek pusztulnak el. (b) A pozitívan szelektált sejtek a CCR7-t célzó kemokin szignálerek (CCL19, CCL21) hatására a medullába vándorolnak. (c) A negatív szelekció során regulátoros T-sejtek is képződnek, bennük megjelenik a Foxp3 transzkripciói faktor. Az érés befejeztével a sejtek elhagyják a tímuszt és a perifériás nyirokszervekbe vándorolnak, ebben fontos szerepe van a szfingozin-1-foszfátnak és a receptorának. Takahama Y., Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. Nat Rev Immunol 2006; 6: 127-135.



12. ábra: Az intercelluláris antigéntranszfer fő mechanizmusai a negatív szelekció során.

Az mTEC MHC I-en és MHC II-n keresztül prezentál antigéneket, a TRA-expresszióját elősegíti a makroautofágia. Az mTEC apoptózisa során, illetve szekréciós mechanizmussal a tímikus DC-k felvethetik ezeket az antigéneket. Ahhoz, hogy a tímuszban perifériás saját antigének expresszálódjanak, nagyban hozzájárulnak a kívülről érkező DC-k is. Klein L., Hinterberger M., Wirnsberger G. and Kyewski B., Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. Nat Rev Immunol 2009; 9: 833-844.

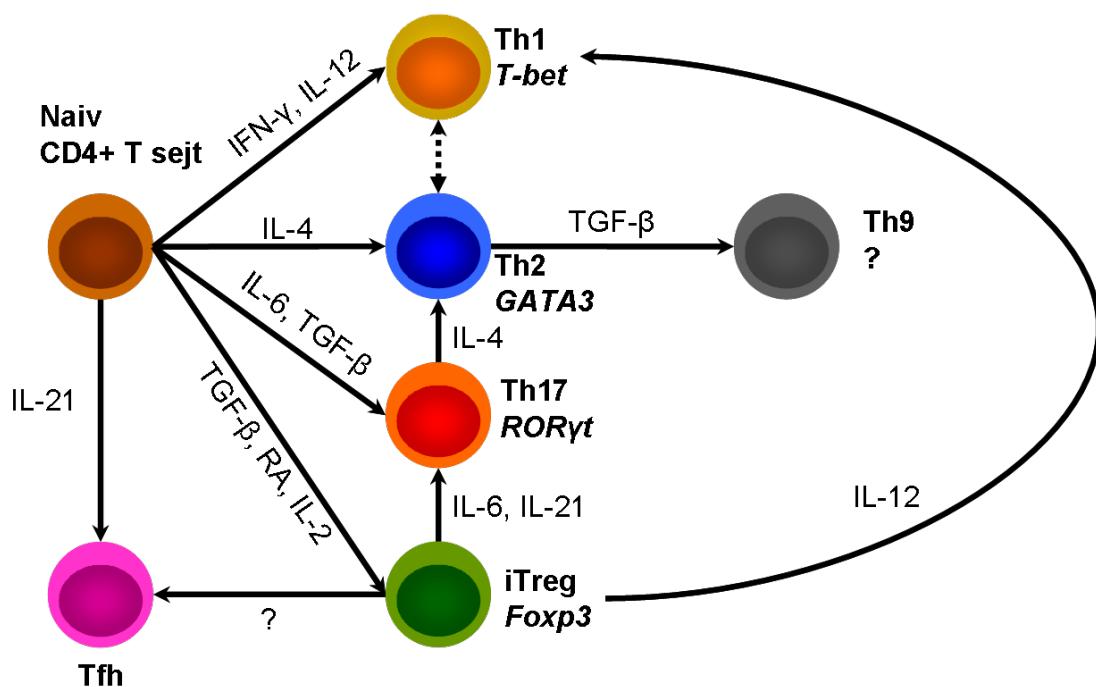
A szelekció és az érési folyamatok befejezése után az SP-sejtek 4-5 napot töltnek a medullában, majd az érésük befejezése után a perifériás nyirokszervekbe vándorolnak.

2.4.3.3 A timocita szelekció affinitásmodellje

A timociták szelekciója nagyban függhet attól, hogy antigénreceptoraikkal milyen erős kapcsolatot létesítnek a strómális sejtekkel, a pozitív szelekció során a cTEC-kel, a negatív szelekció során pedig az mTEC-kel (Klein L., 2009). Az affinitás modell szerint a kötődés erősségektől (az antigénreceptor affinitásától) függően a sejtek apoptózissal elpusztulnak, vagy túlélnek, azaz a TcR ligandhoz való affinitása dönti el a szelektálódó sejt későbbi sorsát. Egy bizonyos küszöbértéknél gyengébben kötődő sejtek mindenkorban elpusztulnak („death by neglect”). Ha az affinitás túl nagy, akkor a kötődő sejt nagy valószínűséggel autoreaktív és apoptózissal elpusztul a negatív szelekcióban. A negatív szelekciós folyamat során FoxP3-at expresszáló, CD4+CD25^{high} természetes regulatórikus T-sejtek (tTreg) is képződnek, amelyeknek nagy szerepe van a periférián az antigénspecifikus immunszuppresszió (tolerancia) fenntartásában (Piccirillo CA., 2004). Az azonban nem teljesen ismert, hogy a TcR kötődés mértéke hogyan befolyásolja a regulatórikus T-sejtek fejlődését a tímuszban (Feuerer M., 2009). Végül, ha a kötődés közepes affinitású, akkor bekövetkezhet a pozitív szelekció és naiv, érett T-sejtek képződnek, amelyek később effektorsejtekké differenciálódhatnak a periférián (13. ábra). A SP sejtek szfingozin-1-foszfát receptort expresszálnak (S1P-R), amely a keringésben magas koncentrációban található szfingozin-1-foszfátot köti meg, így a sejtek kijutnak a keringésbe, ahonnan a perifériás nyirokszervekbe vándorolnak (Matloubian M., 2004).

2.4.4. A PERIFÉRIÁS T-SEJT DIFFERENCIÁLÓDÁS

Az érett, naív (idegen antigénnel még nem találkozott) T-sejtek a perifériás nyirokszervek T-sejt zónáiba jutnak, ahol a számukra bemutatott antigéneket MHC-hez kötve (MHC-restrikció) ismerik fel (részletesen lásd 2.1.3 fejezetben). A sejtek ezt követően aktiválódnak és effektor sejteké differenciálódnak. A CD8+ Tc-sejtek citotoxikus hatásai révén vesznek részt az antigének elpusztításában. A naiv CD4+ helper T-sejtek perifériás differenciálódását főleg az határozza meg, hogy a sejtek milyen citokin miliőben aktiválódnak (Zhou L., 2009). Az effektor Th-sejteket citokin termelésük alapján tovább csoportosíthatjuk. Korábban két fő alpopulációt: a Th1 és Th2 csoportot különítettek el, az előbbiek főleg a celluláris-, az utóbbiak pedig a humorális immunválaszt szabályozzák (Chaplin DD., 2010). Az utóbbi időben az előbbi két csoport mellett elkülönítik még a Th3/Tr1, (indukált regulatórikus T-sejt - iTreg), a Th9, Th17 és a follikuláris T-sejteket (Tfh) is (Zhou L., 2009, Laing KJ, 2011) (**13. ábra**). A Th sejtek plaszticitását jelzi, hogy a mikrokörnyezetből származó citokinek hatására az egyes típusok egymásba alakulhatnak. Antigén hatására az effektor T-sejtek mellett memória T-sejtek is kialakulnak (Bommhardt U., 2004).



13. ábra: A CD4+ Th-sejtek differenciálódása és konverziója.

Az egyes fejlődési irányokat a különböző citokinek és transzkripció faktorok (dőlt betűvel) határozzák meg. (Zhou L., 2009, *Immunity*). RA = retinsav, iTreg=indukált regulátor T-sejt, Tfh = follikuláris T helper sejt. A Th9 fejlődési irányánál még nem ismert a meghatározó transzkripció faktor.

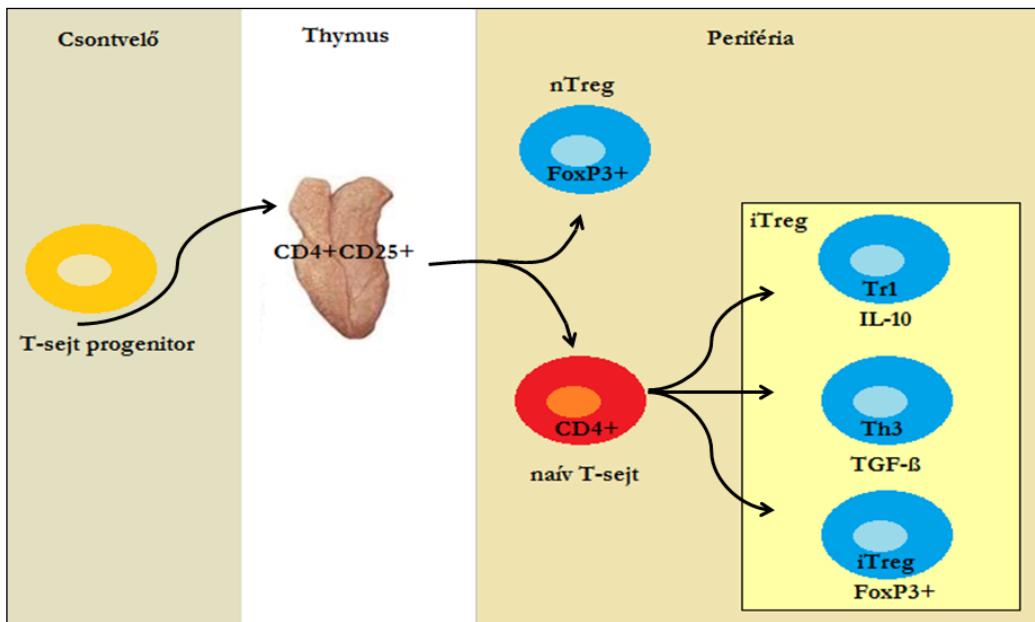
2.5. A REGULATÓRIKUS T-SEJTEK

A 70-es években általánosan elfogadott volt a nézet, miszerint az immunrendszer részét képezik a Tc-k és a Th-k mellett a szuppresszor fenotípusú T-sejtek (Ts) is. A későbbiekben a Ts sejtek létezését az immunológia évtizedekre elvetette, és az immunválasz szabályozását elsősorban a Th1/Th2 sejtek egyensúlyával magyarázták. Csak a közmúltban igazolódott egyértelműen egy külön szabályozó, az immunválaszt gátló funkciójú sejtcsoport létezése, melyet regulatórikus T-sejteknek (Treg) neveztek el (Maggi E., 2005). Az anergiával, ignoranciával és delécióval szemben a szuppresszió egy aktív tolerancia-mechanizmus. A Treg sejtek egy specializált T-sejt alcsoport, amelyek központi szereplői a saját antigénekkel szembeni válaszképtelenség fenntartásának (perifériás tolerancia) (Sakaguchi S., 2008) és az antigén stimuláció után az immunválasz leállításának (Bluestone JA., 2003), amivel hozzájárulnak az immunhomeosztázis fenntartásához és csökkentik az autoimmun betegségek és allergiák kialakulásának kockázatát (Lourenco EV., 2011). Klinikai jelentőségüket bizonyítja szereük a transzplantációt követő szerv kilökődés megakadályozásában és a foetuszal szembeni anyai tolerancia kialakulásában (Kwiatek M., 2015).

A Treg-nek két típusa ismert (Josefowicz SZ., 2009). A természetes Treg sejtek (tTreg vagy nTreg) a negativ szelekció során CD4 egyszeresen pozitív timocitákból alakulnak ki, amelyek IL-2 receptor α -láncot (CD25) hordoznak (Curotto de Lafaille MA., 2009) (**14. ábra**). A tTreg sejtek azonosak az autoreaktiv TcR-t hordozó klonálisan nem deletált, de a negatív szelekciót túlélő timocita csoporttal (Yadav M., 2013). A leginkább ismert és jellemzett Treg-ek CD4 $^{+}$ CD25 $^{\text{high}}$ FoxP3 $^{+}$ sejtek (Ballke C., 2016). Felfedezésükre az a megfigyelés szolgált alapul, hogy a timektomián átesett újszülött egerekben kialakuló súlyos autoimmunitás CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T-sejtek transzferével megelőzhető volt (Sakaguchi, S., 1995). Jellemző rájuk az X kromoszómán kódolt, „Forkhead box” családba tartozó FoxP3 transzkripció faktor konstitutiv expressziója (Brunkow ME. 2001), amely felelős a Treg sejtek szuppresszor funkciójának fenntartásáért. Működőképes FoxP3 hiánya X-kromoszómához kötött immundeficiencia endokrinopátia (IPEX) szindrómához vezet (Le Bras S., 2006, Zheng Y., 2007). A tímusból a perifériára kerülve az effektor sejteket (dendritikus sejt, T és B limfocita) direkt sejt-sejt kapcsolódás és citokin termelés (IL-4, IL-10, TGF β) révén gátolják (Sawant DV., 2014). A Treg-ek exogén IL-2 és megfelelő TcR stimuláció hatására proliferálnak.

Az indukált Treg sejtek (iTreg) a periférián alakulnak ki naív CD4 $^{+}$ sejtekből. Citokin termelésük apján humán Treg sejtek tovább csoporthozhatóak az IL-10 termelő, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{-}$ Tr1; a TGF β termelő, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{-}$ Th3 (orális tolerancia) és a FoxP3 $^{+}$ iTreg sejtekre (Wing JB., 2012). Az effektor sejtek citokin termelésük révén gátolják (Gratz IK., 2014).

A tTreg-ek és az iTreg-ek elkülönítésére az Ikaros családba tartozó transzkripció faktor, a Helios használható (Getnet D., 2010), melynek expressziója a T-limfocita sejtvonalra korlátozódik. Funkcionális szerepe ismeretlen, bár kimutatták, hogy a FOXP3 gén promóterhez kapcsolódva fokozza a FoxP3 expressziót. A Helios expresszió a Treg-ekben korrelál a szuppresszor funkcióval (Serre K., 2011). Újabb irodalmi adatok szerint a Helios nem alkalmas a tímusz eredetű Treg-ek elkülönítésére, mert T-sejt aktiváció és proliferáció során is megjelenik, nyugvó sejtekben pedig csökken az expressziójuk (Akimova T., 2011).



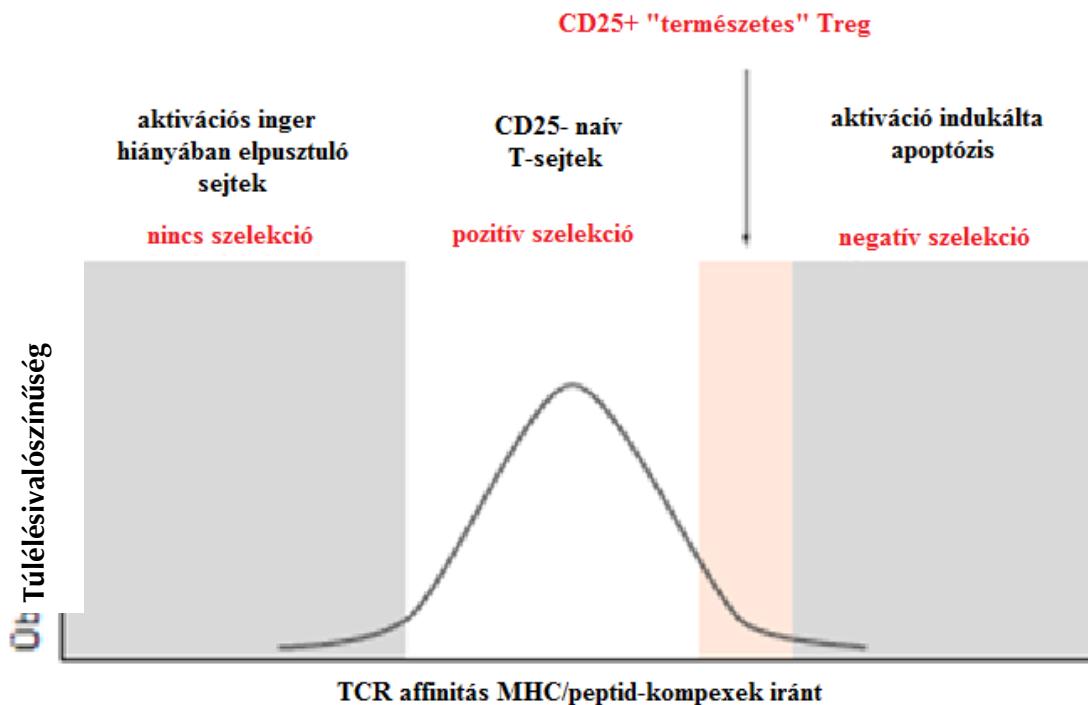
14. ábra: A regulatórikus T-sejtek kialakulása.

Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30, 626–35 alapján.

2.5.1. A REGULATÓRIKUS T-SEJTEK KIALAKULÁSA

A természetes Treg sejtek (tTreg) kialakulására több elmélet is létezik. Az egyik szerint a tímusz kéreg és a velőállomány határán lezajló pozitív szelekció során túlélő sejtek közül aktiváció indukálta apoptózissal elpusztulnak azok a CD4+ T-limfociták, amelyek túl nagy affinitással képesek felismerni a saját MHC és saját fehérjékből álló peptidkombinációkat a mTEC és dendritikus sejtek felszínén. Azokból a T-limfociták, amelyeknek nagy az affinitása, de a negatív szelekció értelmében még nem pusztulnak el apoptózissal, természetes regulatórikus T-sejtek képződnek (tTreg) (**15. ábra**) két lépéssben (Lio C.J. 2008). Egyrészt a TcR aktiváció CD25 upregulációt eredményez, amely növeli a sejtek IL-2 érzékenységét, amely a jelenlegi elgondolások szerint FoxP3 transzkripciót indukál (Bluestone JA., 2003) STAT5 jelátviteli útvonallal, amely megakadályozza a FoxP3 proapoptotikus hatását (Curotto de Lafaille MA., 2009).

Perifériás eredetű iTreg sejtek naiv CD4+T-sejt előalakokból alakulnak ki a perifériás nyirok-szervekben. Létrejöttük függ az antigén koncentrációjától, a ko-stimulációs mechanizmusoktól és a különböző citokinek koncentrációjától. Létejöttüknek kedvez a magas TGF β és IL-2 koncentráció, a szuboptimális dendritikus sejt aktiváció, a ko-stimuláció hiánya, ill. alacsony dózisú antitest-peptid fúziós fehérje jelenléte (Yadav M., 2013). Habár a TcR aktiváció elengedhetetlen a kialakulásukhoz, egy erősebb TcR/MHC interakció és ko-stimuláció esetén magasabb koncentrációjú toleranciát indukáló citokin jelenlétére (Burchill MA., 2008), vagyis TGF β and IL-2 stimuláció szükséges a regulatórikus fenotípus létrejöttéhez, ellenkező esetben Th17 fenotípus keletkezik (Zheng SG., 2008). A jelenség oka, hogy a TGF β magas koncentrációban downreguláló hatású az IL-6 receptorra (Wan S., 2007). A gyulladásos mikrokörnyezet, így az IL-6 önmagában is gátolja a Treg funkciót és expanziót és gátolja a TGF β aktivitást Smad7 indukció révén (Dominitzki SM., 2007).



15. ábra: A tTreg sejtek kialakulása a negatív szelekció során

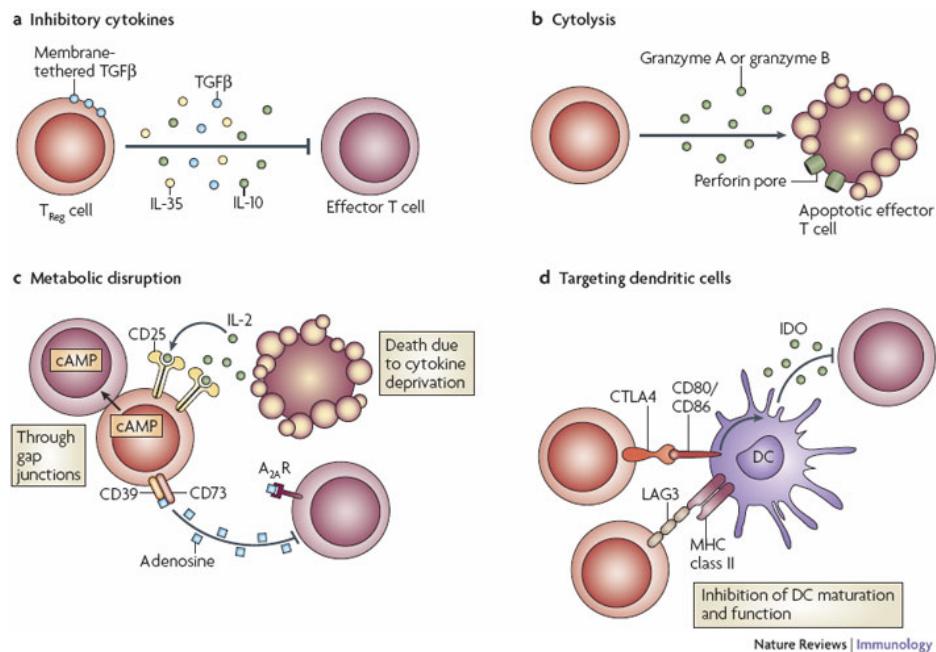
Módosítva Schütt és Bröker (2011) után

2.5.2. TREG SEJTEK MŰKÖDÉSE

Számos szuppressziós mechanizmus ismert, ahogy a Treg sejtek gátolják a T effektor sejtek működését. Ezek a kontakt-függő, a független és az IL-2 konzumpció mechanizmusok (Vignali DA. 2008, Corthay A. 2009).

2.5.2.1 Kontakt-dependens mechanizmusok

A Treg sejtek közvetlen kapcsolat kialakításával gátolják a T effektor -és dendritikus sejtek működését. Egyszerűt szolublis inhibitorokat termelnek, mint a granzyme A, granzyme B és perforin és ezzel okoznak apoptótist az effektor T-sejtben, vagy sejtfelszíni galectin-1 expresszió révén fejtik ki immunszuppresszív hatásukat. Ezen felül a direkt kapcsolódás a membrán-kötött TGF β révén is gátolja az effektor T-sejt kialakulást. A T effektor sejtekre gyakorolt direkt hatáson kívül a Treg a dendritikus sejtek gátlásával is képes a T effektor sejtek kialakulását indirekt módon gátolni a cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) és a lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) expressziójukkal. A Treg CTLA-4 nemcsak gátolja a CD80/86 (B7) kapcsolódást az effektor sejtekhez, de transzendocítózissal azok expresszióját is meggyalolja. A LAG-3 kapcsolódása az MHC-II molekulához azok downregulációját és így az antigén prezentációt gátolják a DC-en. A kontakt-dependens mechanizmusok főleg a tímusz eredetű tTreg sejtekre jellemzőek (Dario A. 2008) (**16. ábra**).



16. ábra: Treg sejt szuppressziós mechanizmusok

a. Kontakt independens mechanizmus, citokin szekrécióval, b. kontakt-dependens T effektor sejtpusztítás és d. dendritikus sejt gátlás valamint a sejtek metabolikus gátlásával IL-2 depriváció vagy adenozin révén gátolják az immunválaszt. (Dario A. 2008)

2.5.2.2 Kontakt-independens (citokin-mediált) szuppressziós mechanizmusok

A másik lehetőség, hogy a Treg sejtek ciktokinek termelése révén fejtik ki hatásukat, mint a TGF β ₁, IL-10 vagy IL-35, melyek gátolják a limfociták és makrofágok aktivációját. Ez az un. kontakt-independens mechanizmus, ami jellemzőbb a perifériás, indukált Treg-ek működésére, mint a tímusz eredetűekre (Sawant DV., 2014).

A TGF β család 3 tagja a TGF β ₁, - β ₂, és - β ₃, pleiotrop élettani hatásúak különböző sejttípuson. Az immunrendszerben a TGF β ₁ a domináns izoforma és főképp regulátoros szerepe van. A TGF β ₁ számos mechanizmussal hat a T-sejtekken a körös immunválasz gátlására, többek között stimulálja a FoxP3 transzkripció faktor expressziót, és gátolja az effektor T-sejt funkciót (Stary G. 2011). Ezen felül a TGF β ₁ serkenti a CD25, CD39, CD73, CTLA4, CD103, neuropilin, perforin és IL-10, valamint áttelesen a CD39 és CD73-en keresztül az adenozin, egy hatékony anti-inflammatorikus molekula termelődését (Wing JB, 2012).

A másik gátló Treg citokin az IL-10, amely az antigen bemutató sejt és a T-sejt kapcsolat gátlása révén a T-sejt anergia és válaszképtelenség kialakulását eredményezi.

Az IL-35 egy legutóbb felfedezett gyulladásgátló citokin, amely IL-12 α láncból és az Epstein-Barr virus induced 3 (EBI3) láncból álló heterodimer. Egér Treg sejtekben leírták gátló hatását *in vivo* és *in vitro* is, de humán vonatkozásban hatása kétséges (Olson BM, 2013).

A Treg sejtek saját működésükhez is elengedhetetlen citokin az IL-2, de képesek a környezetükben is az IL-2 konzumcióra és ezáltal gátolják az effektor T-sejt aktivációját. A Treg-ek ugyan minimális IL-2-t termelnek, de a konstitutiv CD25 expressziójuk vagyis a nagy-affinitású IL-2 receptoruk révén az IL-2-t hatékonyan kötik, így elvonják az IL-2-t a válaszoló

sejtek elől, vagyis kompetíciót folytatnak az IL-2-ért. Kétségtelen, hogy ezen Treg szuppresszor funkciók egymás mellett és egymással kombinálódva hatnak (Liston A. 2014.)

2.5.3. TREG SEJTEK SZEREPE PATHOLÓGIÁS FOLYAMATOKBAN

A funkcionális Treg sejtek jelentőségét támasztja alá az, hogy a megfelelő arányuk és a citokin termelésük nélkülözhetetlen az immun homeosztázis egyensúlyának fenntartásához az egészséges szervezetben. Ellenkező esetben hiányuk, vagy funkcionális zavaruk számos pathológiás folyamatot eredményez. Sakaguchi S. már 1995-ben leírta, hogy amikor tímuszhiányos egeret CD25 depletált limfocitákkal transzplantáltak, autoimmun betegségek sora alakult ki az állatokban, többek között thyroiditis, gastritis, insulitis, sialoadenitis, adrenalitis, oophoritis, glomerulonephritis és polyarthritis. Immun dysreguláció, polyendocrinopátia, enteropátia, X-kromoszómához kötött recesszív szindróma (IPEX) az első autoimmun betegség, amelyet az X-kromoszómán kódolt FOXP+ gén mutációjával hoztak összefüggésbe (Bennet CL., 2001). Férfiakban autoimmun enteropátia, psoriasis-szerű vagy ekcematózus dermatitis, köröm disztrófia, alopecia, bullous pemphigoid és autoimmun endocrinopátia (leggyakrabban az inzulin-dependens diabetes mellitus) együttesen a kezeletlen betegek túlélési esélyét 2 év alattira csökkentik (Otsubo K., 2011).

Szklerózis multiplex (SM) esetén a Treg sejtek csökkent számát és funkcionális deficitjét írták le (Viglietta V., 2004). Az SM egér modelljében a Treg sejtek „kivédi” a betegséget azáltal, hogy az autoreaktív Th1-sejtek proliferációját és pro-inflammatórikus citokin termelését elnyomják (Kohm AP., 2002). 1-es típusú diabeteses betegek Treg sejtjeinél is funkcionális deficitet találtak (Lindley S., 2005). Gyulladásos bélbetegségben szenvédőknél a csökkent perifériás Treg szám korrelál a betegség aktivitásával (remisszióban emelkedik, aktív szakaszban csökken) (Maul J., 2005). Az SLE egy szisztemás autoimmun betegség, ami több szervet érint, úgymint bőr, ízületek, vesék és központi idegrendszer. Kimutatták, hogy a betegség fellángolásakor a Treg sejtek mennyisége csökken (Mellor-Pita S., 2006). A kollagén-indukált arthritis modellben a Treg-ek depléciója felgyorsítja/rontja a szisztemás ízületi gyulladást, míg a Treg-ek bevitele „kivédi” a betegséget (Chavele KM., 2011). Daganatos betegek perifériás vérében és a tumorban a FoxP3+ Treg-ek felhalmozódnak, és az anti-tumor immunválasz elnyomása révén a tumor növekedését elősegítik, így rossz prognózist jeleznek. Colorektális carcinómában a FoxP3+ Treg-ek mennyisége a tumort drenáló nyirokcsomóban sokkal nagyobb, mint a perifériás vérben, vagy a tumorban, és pozitív korrelációt mutat a betegség stádiumával (Deng L., 2010). A Treg sejteket célzó immunterápia tumoros betegekben ígéretes lehetőség bár a megjelenő autoimmunitással számolni kell (Nishikawa H., 2014). Az utóbbi időben áttörést jelentett a tumorterápiában az anti-CTLA-4 és anti-PD1 terápiás ellenanyag protokollok alkalmazása melanomás és kissejtes tüdőrák esetén (Weber J., 2010).

2.6. A T-SEJT AKTIVÁCIÓ JELÁTVITELI FOLYAMATAI

A megfelelő antigénnel történő találkozást követően a T-sejtekben számos jelátviteli folyamat megy végre, ami a T-sejtek aktivációjához és másodlagos differenciálódásához vezet. A TcR csak MHC molekulák által bemutatott peptideket - az antigén proteolitikusan hasított

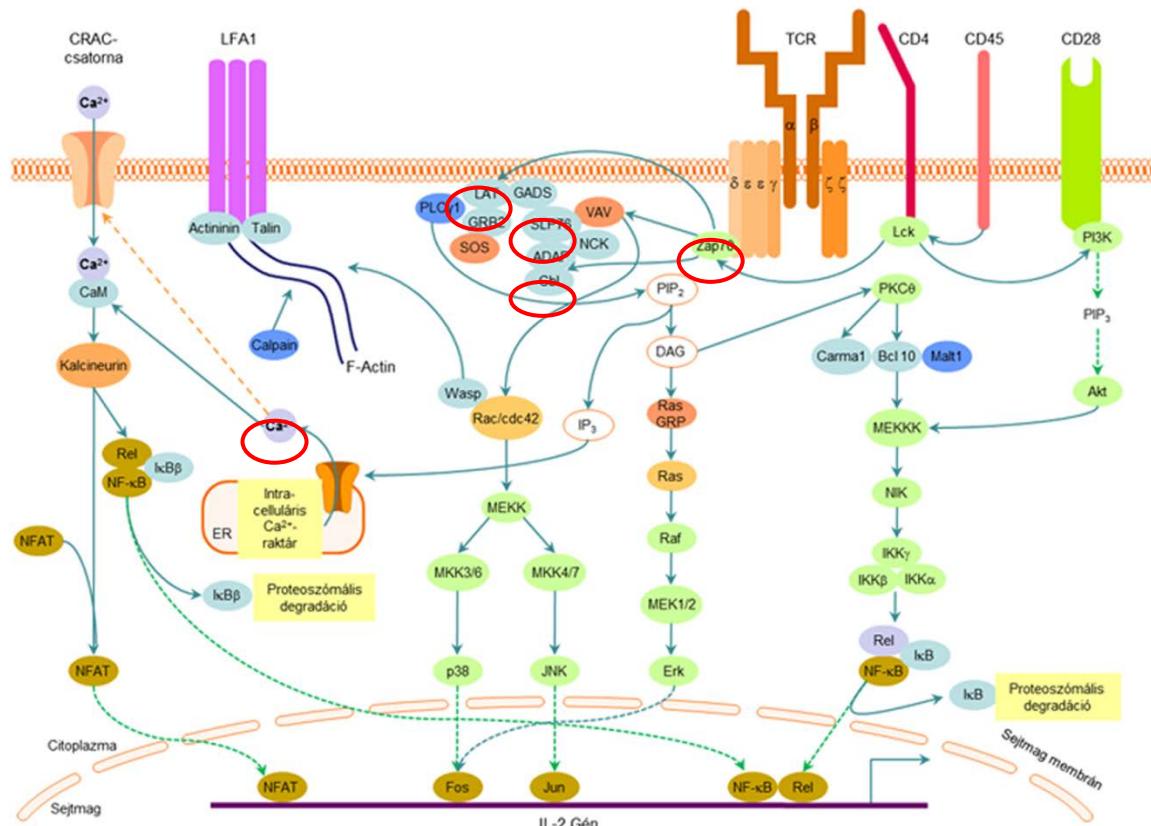
darabjait - képes felismerni. A folyamat szigorúan szabályozott: az intracelluláris peptideket a sejtmaggal rendelkező sejtek és a trombociták mutatják be MHCI-en keresztül a CD8+ Tc-sejteknek, míg az extracelluláris antigéneket a professzionális antigén prezentáló sejtek - B-sejtek, makrofágok, dendritikus sejtek – MHC-II segítségével mutatják be a CD4+ Th-sejteknek. Ezt a jelenséget MHC restrikciót nevezzük (Doherty PC., 1975). A TcR MHC-peptid komplexhez való kötődése még nem elegendő a T-sejt aktiváció elindításához. Szükséges még, hogy a CD4/8 az MHC molekulák konstans részéhez kapcsolódjon (Miceli MC., 1991), valamint, hogy a CD28 és CD80/86, a CD40-CD40L és további adhéziós molekula-párok között ko-stimuláció jöjjön létre (Huppa JB., 2003).

A TcR láncainak intracelluláris doménjei önmagukban nem képesek arra, hogy aktivációs jelet közvetítsenek a sejt belsejébe (Marrack P., 1983), a sejten belüli jel elindításában a TcR-hoz asszociálódó CD3 komplex játszik nélkülözhetetlen szerepet. A CD3 komplex γ , δ és ϵ láncokból áll, amikhez egy $\zeta\zeta$ homodimer vagy $\zeta\eta$ heterodimer találhatók, melyek tirozinjai a T-sejt aktiváció kezdeti lépései során foszforilálódnak és fontos szerepet töltnek be a jeltovábbításban (Kuhns MS., 2006).

A T-sejt aktiváció kezdeti lépései foszforilációs események sorozatából állnak. Elsőként, a valamennyi leukocitán expresszálódó CD45 molekula – egy foszftirozin-foszfatáz – defoszforilálja az Lck 505-ös pozícióban található gátló tirozinját (Barber EK., 1989) (**17. ábra**). Az Lck az Src nem-receptor tirozin kináz család tagja, ami a CD4/8 molekulákkal is asszociálódik. Az Src molekulacsalád másik tagja, a Fyn, szintén szerepet játszik a korai T-sejt aktivációs folyamatokban. Az Lck gátló foszfát csoportjának lehasítását követően, a TcR komplex aktivációjának hatására a 394-es tirozinon foszforilálódik és ezáltal aktiválódik (Palacios EH., 2004). Az aktivált Lck ezt követően a CD3 komplex ITAM-jainak tirozinjait foszforilálja (Fodor S., 2006). A foszforilált CD3 ζ lánc dokkoló helyül szolgál a Syk családba tartozó ZAP-70 kináz számára. A ZAP-70 kináz az Lck foszforilálja, a foszforilált ZAP-70 pedig a T-sejt aktiváció egyik központi molekulája (Chan AC., 1992). A kináz két fő célmolekulája a LAT és az SLP-76 adapter fehérjék (Sommers CL., 2004, Koretzky GA., 2006). A ZAP-70 kapcsolódik (asszociál) a negatív regulátor Cbl-lel is, ami a kináz foszforilációját szabályozza (Rao N., 2002).

Az adapter molekulák foszforilációja egy multimolekuláris komplex kialakulásához vezet, melyben a GRB2, Itk, GADS, Nck és Vav molekulák vesznek részt és együttesen aktiválják a PLC γ 1-et (Braiman A., 2006). A PLC γ 1 a PIP₂-t hasítja, a hasítás során két másodlagos hírvivő molekula, az IP₃ és a DAG képződik. A DAG két fő jelátviteli út, a Ras és a PKC θ útvonalak aktivációjához vezet. A Ras a MAP-kináz kaszkád közvetítette jelátviteli folyamatokat indítja el, ami végül az AP-1 transzkripció faktor aktivációjához vezet. A PKC θ az NF κ B útvonalat aktiválja, ami szintén transzkripció folyamatokat szabályoz (Smith-Garvin JE., 2009). Az IP₃ az endoplazmatikus retikulumban (ER) raktározódó (intracelluláris Ca²⁺ raktár) Ca²⁺ felszabadulását indukálja, amit a plazma membrán Ca²⁺-csatornáinak megnyílása követ (kapacitativ influx). A megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ szint a kalcineurint, a kalmodulint, végül az NFAT transzkripció faktort aktiválja (Oh-hora M., 2008). A T-sejt aktiváció jelátviteli útjai végül számos transzkripció faktort pl. AP-1, NFAT, NF κ B aktiválnak, ami komplex génexpressziós változásokhoz vezet a T-sejtekben. Az immunválasz beadításában kiemelkedő fontosságú két géntermék: az IL-2 citokin, valamint az IL-2 receptor α lánc (CD25). Az IL-2 az aktivált T-sejteken megjelenő α , β és γ láncokból felépülő nagy

affinitású receptorához kötődik, autokrinmechanizmusok révén szabályozza a T-sejt aktivációt, illetve indukálja a környező T-sejtek növekedését is (Savignac M., 2007).



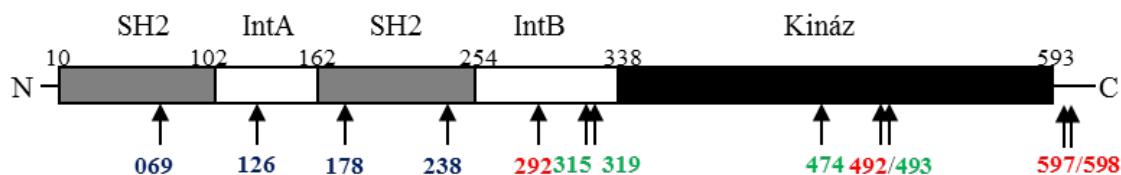
17. ábra: A T-sejt aktiváció jelátviteli útvonalai.

Részleteket lásd a szövegben. Átvéve: <http://www.cellsignal.com/pathways/lymphocyte.jsp>- Cell Signaling

2.6.1. A ZAP-70 KINÁZ

A ZAP-70 kináz a Syk nem-receptor tirozin kináz család tagja, T-sejtekben, NK-sejtekben és bazofil granulocitákban expresszálódik. A molekula két N-terminális SH2 doménből és egy C-terminális kináz doménből épül fel, melyeket az interdomén A és B választanak el egymástól (**18. ábra**). A kinázt az Lck foszforilálja, de a molekulában autofoszforiláció is végbe megy. A ZAP-70 31 tirozin (Y) maradéka közül tömegspektrometriás mérések eredményei alapján 11-nek tulajdonítanak szerepet a T-sejt aktivációban (Au-Yeung BB., 2009). Ezek között találhatók olyanok, melyek ismert aktivációs, vagy gátló helyek, illetve olyanok is, amelyek funkciója még ismeretlen. Keveset tudunk az SH2 doménben és az interdomén A-ban található Y069, Y126, Y178 és Y238-ról, bár a Y126 feltehetően szerepet játszik a kináz autofoszforilációjában (Watts JD. 1994). Az interdomén B-ben 3 tirozin található a 292, 315 és 319-es pozícióban. A Y292 gátló szerepet tölt be a T-sejt aktivációban és dokkoló helyként szolgál a Cbl számára (Lupher ML., 1997). A Y315-höz a Vav és a CrkII kötődik, ez a tirozin maradék pozitív és negatív szabályozó szerepet is betölt a T-sejt aktivációban (Wu J., 1997). A Y319 egy pozitív szabályozó tirozin és fontos szerepet játszik a PLC- γ 1 és a Ras közvetítette jelátviteli utakban, valamint asszociálódik az Lck-val. Az interdomén B-ben található tirozinok a tímuszban zajló pozitív és negatív szelekciót is befolyásolják (Kong G.,

1996). A kináz doménben 3 tirozin maradéknak tulajdonítanak szerepet a T-sejt aktivációban. A Y474-hez az Shc kötődik. A Y492 gátló, míg a Y493 aktivációs szerepet tölt be a T-sejt jelátviteli folyamatokban. A Y597 és a Y598 negatív szabályozó helyek (Szabo M., 2012).



18. ábra: A ZAP-70 kináz szerkezete és a T-sejt aktivációban részt vevő tirozin maradékai.

Pirossal a gátló, zölddel az aktivációs, kékkel a még ismeretlen funkciójú tirozinokat jelöltük. In: Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87..

A ZAP-70 kináz fontos szerepét bizonyítja, hogy a molekula hiányában, emberben súlyos kombinált immundeficiencia, SCID alakul ki. A betegek Tc-sejtjei csaknem teljesen hiányoznak, míg a Th-sejtek száma normális, vagy emelkedett, de a jelátvitel bennük is zavart szenved (Elder ME., 1995). A ZAP-70 deficiens P116 sejtekben aktiváció hatására nem alakul ki az intracelluláris Ca^{2+} -jel és számos foszforilációs folyamat gátlódik. A ZAP-70 KO egerekben a T-sejt érés és a T-sejt aktiváció is zavart szenved (Au-Yeung BB., 2009).

A ZAP-70-et kódoló gén missense mutációja figyelhető meg az SKG egérben. A mutáció egy W163C csere a C-terminális SH2 doménben. Ezekben az egerekben spontán alakul ki autoimmun arthritisz. A mutáció következtében a ZAP-70 kináz nem tud a TcR ζ láncához kötni, csökken az intracelluláris Ca^{2+} -jel, a LAT és a PLC γ foszforilációja. Ez az egérmodell felhívja a figyelmet arra, hogy a ZAP-70 kináz mutációja autoimmun betegségek kialakulásában is szerepet játszhat (Sakaguchi N., 2003).

A ZAP-70 megjelenik B-sejtes leukémiában is (normál B-sejtek a Syk molekulát expresszálják). A B-CLL-t a CD19+, CD5+, CD23+ B-sejtek klonális felszaporodása jellemzi. A betegség lefolyása heterogén, ezért számos kísérletsorozatot végeznek olyan faktorok felkutatására, amik a betegség lefolyását előre jelezhetik. A CD38 expresszió és az Ig nehéz lánc variabilis régiójának mutációs állapota mellett a sejtek ZAP-70 pozitivitása is a betegség rossz prognózisára utalhat (Mougalian SS., 2011).

2.7. A GC-K HATÁSA T-SEJTEKEN ÉS A TÍMUSZBAN

A GC-k egyik régóta ismert hatása, hogy a tímusz involúcióját és a perifériás T-sejtek, illetve a timociták apoptózisát okozzák (Blomgren H., 1970). Újabb adatok szerint, a terápiásan széles körben alkalmazott immunszuppressív szerek (cyclophosphamide, cyclosporine A), valamint a GC-analóg Dexamethasone (DX) blokkolják a tímusz epítésejtek funkcióját is (Fletcher AL., 2009). Így tehát a GC therápia által kiváltott tímusz involúcióban valószínűleg mind a timociták pusztulása, mind pedig az epítésejtek funkciójának megváltozása szerepet játszhat.

A GR jelátviteli utak tanulmányozása több egérmodellben is lehetséges. GR knockout kiméra kísérletek eredményei, illetve az Ick promoter alatt Cre-lox rendszerben csak a T-sejtekben GR deficiens egérben kapott eredmények nem utaltak arra, hogy a tímusz működéséhez és a T-sejtek fejlődéséhez a GR jelenléte nélkülözhetetlen lenne (Herold MJ., 2006). A GR teljes hiánya klasszikus KO egérben letális fenotípust eredményez, a surfactans termelés elügtelensége miatt kialakuló tüdőproblémák miatt, ezért ilyen egerek sejtjeivel csak ki-méra kísérletek végezhetők (Jondal M., 2004).

Érdekes ugyanakkor, hogy GC hormont lokálisan a tímuszban a strómaállományt alkotó epitheliális sejtek is szekretálják, sőt a legújabb kutatások szerint maguk a timociták is tudják termelni (Qiao S., 2009). Az utóbbi évek saját eredményei és más laboratóriumoké egyaránt azt mutatták, hogy a GC-k nemcsak a timociták apoptózisát okozhatják, hanem bizonyos körülmények között a túlélésükhez is hozzájárulhatnak („kölcsönös antagonizmus modell”) (Vacchio MS., 2000), amely azt jelzi, hogy a GC hormon komplex a szelekciós szabályozási mechanizmusok szereplője lehet a tímuszban. A „kölcsönös antagonizmus” elmélet szerint, ha a T-sejt egyszerre kap szignált a GR-en és a TcR-en keresztül, akkor túlél, szemben azzal, amikor külön a GR, illetve a TcR aktiválódik, mert annak eredménye apoptózis lesz. A „kölcsönös antagonizmus” modellt munkacsoporthunk *in vivo* adatokkal támasztotta alá (Pálinkas L., 2008). T-sejt receptor transzgenikus egérmodellben, magas dózisú GC és antigén egyidejű expozíciója a DP-sejtek szignifikánsan fokozott mértékű túlélését eredményezte a tímuszban. Továbbá, alacsony dózisú GC-ok önmagukban is *in vivo* a pozitív szelekciónak irányába tolták el a T-sejt érést TcR transzgenikus egérmodellben, fokozva a DP-sejtekben a CD69-expressziót (Boldizsar F., 2003).

Érdekes, hogy a timocita alcsoportok közül a DP-sejtek a legérzékenyebbek a GC-indukálta apoptózisra, annak ellenére, hogy ezek a sejtek expresszálják a GR-t a legalacsonyabb mértékben, mind fehérje (áramlási citometriás adatok), mind mRNS-szinten (Berki et al. 2002), és a GC okozta GR downreguláció is defektív ezekben a sejtekben (Wang D., 2006). Továbbra sem ismert, hogy mi állhat ennek a fokozott GC-érzékenységnek a hátterében. Korábbi munkánk alapján, T-sejt receptor transzgenikus egérben a DP timociták GC-indukálta apoptózisa már 4 órán belül mérhető a mitokondriális membránpotenciál csökkenésével, az Annexin V pozitivitás fokozódásával. A túlélő DP-sejtekben pedig az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje jelentősen emelkedett expresszióját találtuk (Pálinkás L., 2008). Azonban a GR intracelluláris eloszlása és módosulásai a timocitákban ezen folyamatok során még ismeretlen volt (Herold MJ., 2006).

A GC-indukált apoptózis során különböző sejtekben (így timocitákban is) több biokémiai változást azonosítottak: ezek a Ca²⁺-mobilizáció, az Src- és a Cdk2-kinázok aktivációja, majd ceramidképződés a foszfatidilinositol-specifikus foszfolipáz C és a savanyú szfingomielináz aktivációjával. Továbbá, a jelátviteli kaszkád későbbi mediátorai (pl. kaszpázok) szerepéiről is sok adat gyűlt össze a GC-indukálta apoptózisra vonatkozóan (Cifone MG., 1999).

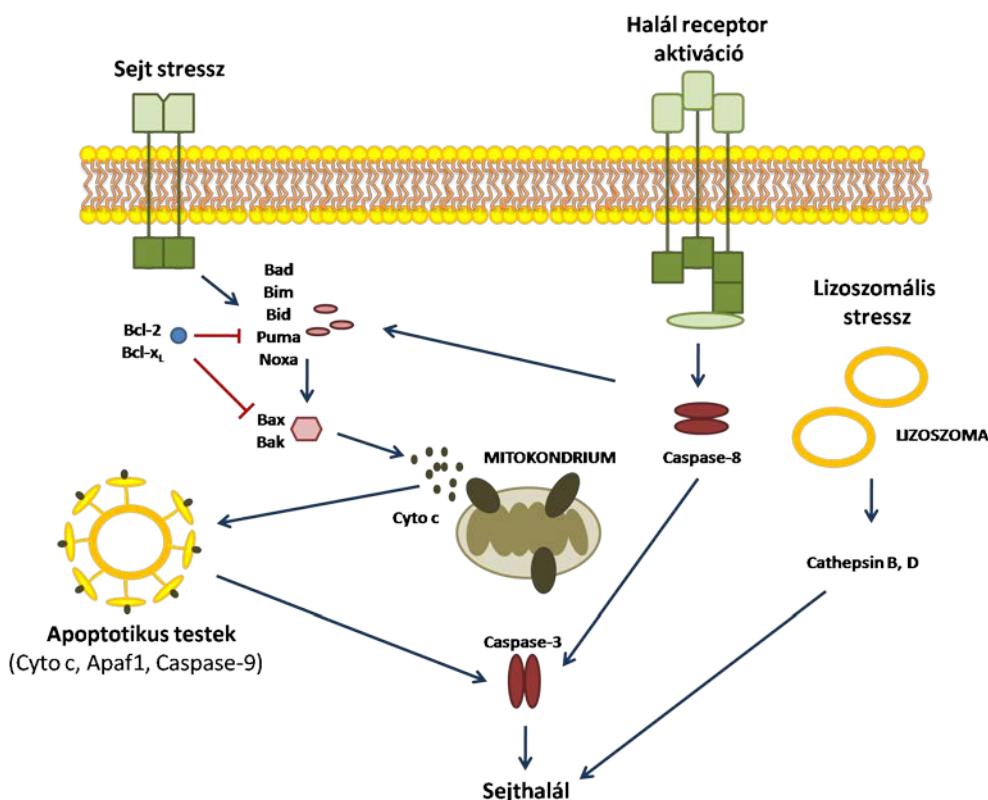
Az előbb említett, más munkacsoporthoz származó számos irodalmi adat, valamint a mi korábbi munkáink eredményei alapján felmerült, hogy alternatív GR-jelátviteli útvonalak (fehérje-fehérje kapcsolódások, illetve más nemgenomikus hatások, pl. a mitokondriális

membránpotenciál szabályozása) és a Bcl-2 fehérje érintettsége miatt a mitokondrális útvonal is aktívan részt vehetnek a DP-timociták GC-indukálta apoptózisában.

2.8. TIMOCITÁK APOPTÓZISA

A tímuszban a T-sejt fejlődés során a nem funkcionális T-sejt receptorral rendelkező, illetve a potenciálisan autoreaktív timociták nem kerülhetnek ki a perifériára, ezért még a csecsemőmirigyben eliminálódnak. A periférián az érett, naiv T-sejtek a megfelelő antigén felismérése után klonális aktivációval és expanzió mennek keresztül. Amint a felismert antigént sikeresen kiüríteni a szervezetből, a felesleges limfociták az ún. aktiváció indukálta sejthalál (AICD) folyamat során távolítódnak el. Tehát mind a T-sejt fejlődésben, mind a T-sejt mediált immunfolyamatokban nagyon fontos szerepe van a programozott sejthalálnak, vagy más néven apoptózisnak (Opferman JT., 2008).

Az apoptózis egy olyan szigorúan szabályozott folyamat, amely proteolítikus folyamatok sorozatából áll, a sejtek jellegzetes morfológiai elváltozásai kísérik, és végső soron a sejt halálához vezet. A limfocitákban a programozott sejthalál több útvonalon keresztül vezethet a sejtek halálához (**19. ábra**). Az ún. intrinsic útvonalnál a sejtet érő stressz vagy hormonális hatások a kiváltó ok. A folyamatban a Bcl-2 család pro- és anti-apoptotikus fehérjéi vesznek részt, melyek végső soron a mitokondriumok külső membránjának átjárhatóságát és Cytochrome C kiáramlást okoznak.



19. ábra: A limfociták apoptózisának főbb útvonalai

Herold MJ et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2006. alapján

A stimuláló jeleket a pro-apoptotikus BH3-only fehérjék, mint pl. a Bim, Bid, Bad, Puma és Noxa közvetítik a multidoménes családba tartozó Bax és Bak fehérjéken keresztül a mitokondriumhoz. A fenti folyamatot gátolja az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérje azáltal, hogy a megfelelő pro-apoptotikus párhuzamhoz kötődik és neutralizálja. A mitokondrium külső membránjában a Bax és Bak fehérjék pórusokat alkotnak, melyen keresztül Cytochrom C kiáramlást válthatnak ki, amely apoptotikus testek kialakulásához vezet. Ez egy multimer komplex, amely aktivált Caspase-9-et és Apaf 1-et is tartalmaz. Az apoptotikus testek Caspase-3 aktivációval vezetnek a sejt halálához (Green DR., 2004).

Az apoptózis extrinsic útvonalát halál receptorok (mint pl. a Fas) ligációja, oligomerizációja és aktivációja indítja el (Bernhart BC., 2003)). Ennek következtében Caspase-8 aktiváció figyelhető meg, amely sejtítpustól függően direkt, vagy a pro-apoptotikus Bid aktivációját és mitokondrium funkciókárosítást magába foglaló erősítés után vezet Caspase-3 aktivációhoz és sejthalálhoz (Pozzesi N., 2014).

A fenti két útvonallal lehet magyarázni a különböző sejtípusokban megfigyelhető apoptotikus folyamatok zömét, azonban alternatív útvonalak létezését is egyre több információ támasztja alá. Az egyik ilyen alternatív apoptotikus útvonal például a lizoszómák membrán destabilizációján keresztül Cathepsin B és D citoplazmába történő kiáramlását jelenti. Ez nem csak generalizált proteolízist okoz a citoplazmában, de mitokondriumok külső membránját is károsíthatja és Caspase-3 aktivációhoz is vezethet (Boya P., 2008). Egy másik ilyen nem konvencionális útvonalat jelenti a mitokondriumokból felszabaduló halál-induláló faktorok (mint pl. AIF, és endonukleáz G), amelyek kaszpáz independens módon tudnak sejthalált okozni (Kroemer G., 2005).

2.8.1. T-SEJT RECEPTOR MEDIÁLTA APOPTÓZIS

A TcR komplexen keresztüli aktiváció naiv T-sejteknél a sejt aktivációjához vezet, ugyanakkor ez a stimuláció timocitákban és aktivált érett T-sejteknél apoptótist okoz. Irodalmi adatok alapján a pozitív és a negatív szelekció eltérő jelátviteli útvonalakkal jellemezhető (Alberola-Illa J., 1996). A TcR-k pozitív szelekciót eredményező alacsony affinitású ligand kötése részleges LAT foszforilációt vált ki, amely a PLC γ 1–Gads/Slp76/Itk komplexen át a PLC γ 1 aktivációjához és következményes DAG képződéshez, illetve Ca²⁺ felszabaduláshoz vezet. Ezzel ellentétben a TcR-ok negatív szelekciót kiváltó magas-affinitású ligandkötés hatására a LAT teljes mértékben foszforilálódik, ami azután a Grb2/SOS1 kapcsolódáson át a MAP kináz kaszkádon halad tovább (Kane LP., 1996)). Ras/MEK-1 kettős mutáns egértörzsekkel végzett kísérletek szerint a MAP kináz kaszkád funkcionálása létfontosságú a timociták túlélésében, de nem szükséges az apoptózisukhoz (Vasquez NJ., 1994).

A TcR aktivációt követő azonnali-korai transzkripció faktor aktivációt a tumor necrosis factor (TNF) receptor családba tartozó számos membránfehérje expressziója követi. Több, ebbe a családba tartozó fehérjéről (Fas, TNF receptor I típus, CD30) gondolják, hogy részt vesz a timociták apoptózisában (Winoto A. 1997).

2.8.2. GLUKOKORTIKOID HORMON INDUKÁLTA APOPTÓZIS

A XIX. század vége óta ismert, hogy mellékvesekéreg-elégtelenségben szenvedő vagy adrenalectomián átesett állatok tímusza hypertrophiás, illetve a stressz vagy gyógyszer előidézte tímusz involúciót meg lehet előzni adrenalectomiával. Később rájöttek, hogy ACTH adással egérnél jelentős tímusz- és nyirokcsomótömeg csökkenést lehet elérni. Az erőteljes kutatások ellenére a GC hormon apoptózist kiváltó mechanizmusai még ma is jórészt ismeretlenek. A jelenlegi modell szerint a glukokortikoidok apoptózist kiváltó hatásához szükséges a funkcionáló GR és annak genomikus transzaktiváló hatása (Ashwell JD., 2000) néhány jelenség azonban nem-genomikus GR hatást is feltételez.

A DP timociták érzékenyek a GC-mediálta apoptózisra, amelyet jelez, hogy hosszantartó stresszhelyzetben az emelkedett GC szint elég a programozott sejthalál kiváltására (Savino V., 2016). A nyugvó perifériás T-sejtek azonban összehasonlíthatóan rezisztensebbek a GC indukálta sejthalálra. Az eltérő viselkedés okának a Bcl-2 expressziójában való különbözőség tűnik: az egyszeresen pozitív timocitákban és a perifériás T-sejtekben megtalálható, míg az előalakokban alacsonyabb a Bcl-2 expresszió.

A glukokortikoidok és más szteroid hormonok, illetve a tiroid hormon receptorát számos sejtípusban ki tudták mutatni a mitokondriumokban is (Psarra AM., 2008). Eredményeik szerint a mitokondriumba transzlokálódó GR-nek szerepe lehet a GC által indukált apoptózis kialakulásában. A mitokondriumokat alkotó fehérjék egy része eltérő az egyes sejtípusokban, és ezen a különbségen múlik, hogy a mitokondriumokat érő számos endogén és exogén szignál apoptózist vagy a sejt túlélését fogja jelenteni (King LB., 1994). A GCk az epitheliális eredetű sejteket például az emlő mirigyejtjeit, a májsejteket megvédi az apoptózistól, míg a haematopoetikus sejteknel általában apoptózist okoznak (Johnson DT., 2007). Különböző T-sejt vonalakkal végzett kísérletekben Sionov és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a szteroid rezisztens sejtvonalakban a GR nem transzlokálódott a mitokondriumokba, míg az érzékenyekben igen, sőt a GR mitokondriális lokalizációs szekvenciával történő összekapcsolása apoptózishoz vezetett (Sionov RV., 2006).

Az utóbbi irodalmi adatok alapján megfelelő szintű GR expresszió szükséges a sejtbén ahhoz, hogy a GC hatás apoptózishoz vezessen. Ha GC kezelés hatására a sejt GR expressziója változatlan, vagy inkább emelkedik, akkor az eredmény apoptózis. Ez a jelenség jellemző timocitákban és bizonyos T-sejtes limfomákban. Ezzel szemben, ha a GC hatásra a sejt a GR downregulációjával válaszol, akkor megmenekül az apoptotikus hatás alól (Schlossmacher G. 2011)

2.8.3. A GC ÉS TCR JELÁTVITELI ÚTVONALAK KOMMUNIKÁCIÓJA: „RECEPTOR CROSS-TALK”

A tímuszban zajló timocita szelekció az egyik legintenzívebben vizsgált GC indukálta apoptózis folyamat (Talabér G., 2015). Napjainkban a legelfogadottabb modellje ennek az un. kölcsönös antagonizmus teória, amely szerint a GC indukálta jelátviteli útvonal módosítja a TcR jelátviteli útvonalat és ezzel a két jel összekapcsolódása megakadályozza a sejtbén létrejövő apoptózist (Stephen GL, 2003). Azok a DP timociták, amelyek nem kapnak vagy küszöbérték alatti TcR szignált kapnak, deléciót szenvednek, (“death by neglect”) (Szondy

Zs, 2012.), feltételezés szerint cTEC által termelt GC indukálta apoptózissal (Vacchio MS, 1999). A nagyon erős affinitású TcR kötődés az MHC saját peptid komplexhez potenciális autoreaktiv T-sejtet eredményezne. Ezt a túl erős TcR szignált a GC-ok nem tudják anatgonizálni, így ezek a klónok elpusztulnak a negatív szelekcióban a TcR indukálta apoptózissal. (Zacharchuk CM 1990). A GR szerepe a timocita szelekcióban a mai napig ellentmondásos, mert GR deficiens egerekben a timocita érés zavartalan (Purton JF, 2000). Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a tímuszban a CD4+CD8+ DP sejtek a legérzékenyebbek a GC indukálta apoptózisra, bár a legelacsonyabb a GR expresszió ezekben a sejtekben (Boldizsár F., 2003). GR antagonista adagolása nem befolyásolja a GC hatását a szelekciós lépésekre, ami azt támasztja alá, hogy ez a klasszikus GR hatástól eltérő folyamat, ami felveti nem-genomikus jelátviteli útvonalak szerepét a timocita szelekcióban.

Érett perifériás T-sejtek antigen felismerés után a környezeti egyéb hatások által módosítva aktivációval vagy anergiával/apoptózissal válaszolnak (Germain RN., 1999). Számos kísérleti eredmény is alátámasztja, hogy a TcR nem egy egyszerű be/ki kapcsoló. A TcR-hez különböző affinitással kötődő MHC-peptid ligandok eltérő foszforilációs programot indítanak el a T-sejtekben (Sloan-Lancaster J, 1996). Nagy affinitású TcR ligand hatására a CD3 ζ -lánc foszforilációja teljes lesz (pp23 isoforma dominál), és az ahhoz dokkolódó foszforilált ZAP-70-é is, valamint telített lesz a foszforilációja a LAT adapter fehérjének is. Ha a TcR-t alacsony affinitású ligand aktiválja, akkor a pp21 ζ -isoforma dominál és ZAP-70 foszforiláció nem jön létre. Más munkacsoportok (Van Leathem F., 2001) szerint erős agonista liganddal történő TcR stimuláció GC jelenlétében hasonló foszforilációs mintázatot eredményez a T-sejtből, mint egy gyenge ligand. Beszámolnak arról, hogy Dexamethasone (DX) kezelés meggyüntette a TcR stimuláció után bekövetkező foszforilációs jelet. Miután a DX kezelés nem befolyásolta a src-kinázok expresszióját és aktivitását, azt feltételezik, hogy a DX megváltoztatta a fő jelátviteli molekulák membrán kompartmentalizációját. A hatás okát abban látják, hogy a GC kezelés gátolta a jelleátvivő molekulák palmitoylációját és ezzel gátolta azok raft-asszociációját (Van Leathem F., 2003.). Mindezen megfigyelések a TcR és GC indukálta jelátviteli útvonalak összekapcsolódását az un. „receptor cross-talk” meglétét támasztják alá.

3. CÉLKITÚZÉSEK

I. TIMOCITA ALCSOPORTOK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA ÉS ANNAK HATÁSA A SEJTEK GR EXPRESSZIÓJÁRA

1. Az *in vivo* GC kezelés hatását és időbeli lefutását egér modelleken vizsgáltuk: BALB/c egérben GC és anti-CD3, AND TcR transzgenikus egértörzsben GC és antigén kombinált kezelések hatására.
2. GC antagonista előkezelés és GC hormon szintézis gátló szerek hatásának tesztelése.
3. Az *in vivo* GC kezelés és a TcR aktiváció együttes hatásának tisztázása a timociták apoptózisára (caspase 3 aktiváció, Bcl-2 expresszió) és a mitokondrium-funkcióra.
4. Az egyes timocita alcsoportok GR expressziója és annak változása T-sejt aktiváció, GC hatás, illetve GC antagonista kezelések után.

II. A DP TIMOCITÁK APOPTÓZIS MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

1. Az *in vitro* nagydózisú GC kezelés mitokondriális funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálata.
2. A GR celluláris eloszlása/morfológiája timocita alcsoportokon.
3. A ligand indukált GR mitokondriális transzlokációjának vizsgálata DP timocitákban azok szubcelluláris frakcióiban.
4. A mitokondriális apoptózis útvonala timocitákban *in vitro* GC kezelés hatására létrejövő caspase aktiváció, citokróm C felszabadulás nyomon követése és a GR Bcl-2 család fehérjéivel történő asszociációjának vizsgálata.

III. NAGYDÓZISÚ GC KEZELÉS GYORS, NEM GENOMIKUS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A TCR JELÁTVITELI ÚTVONALRA *IN VITRO* T-SEJT MODELLEN

1. A nagydózisú GC kezelés hogy befolyásolja a T-sejtek tirozin foszforilációs mintázatát és a ZAP-70 kináz foszforilációját?
2. A GR szerepének vizsgálata a ZAP-70 foszforilációban. Közvetlen fizikai kapcsolatuk vizsgálata konfokális mikroszkópiával és immunprecipitációval.
3. A ZAP-70 tirozin foszforilációs helyek szerepének vizsgálata a T-sejt aktivációban és a gyors GC hatásokban ZAP-70 tirozin pontmutáns T-sejt vonalakon.
4. Tanulmányoztam, hogy ZAP-70 azon tirozin maradékai, amelyek a nem-genomikus GC hatásokat közvetítik, befolyásolják-e a ZAP-70 szubsztrátjainak - (SLP-76, LAT, Cbl) foszforilációját.

IV. A GC HORMON HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TERMÉSZETES ÉS INDUKÁLT REGULATÓRIKUS T-SEJTEKRE ÉS AZOK CITOKIN TERMELÉSÉRE VALAMINT AZOK *IN VITRO* EXPANZIÓJA

1. Egér modelleben vizsgáltuk a Treg sejtek előfordulási gyakoriságát a vérben és nyirok-szervekben és azok GC érzékenységét.
2. Vizsgálni kívántuk a különböző Treg alcsoportok IL-10 és TGF β citokin expresszióját fehérje és mRNS szinten és az *in vivo* GC kezelés hatását
3. Tímusz és lép eredetű CD4+ T-sejtekből *in vitro* különböző stimuláló körülmények között expandálni Treg sejteket és azok funkcióját követni időben.
4. Meghatározni a GR és FoxP3 transzkripció faktor szinergizmus molekuláris alapjait.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Munkánk során 3-4 hetes BALB/c egereket és 4 hetes B10.Cg-TgN (Tcr AND 53Hed) galamb cytochrome C (PCC peptid KAERADLIAYLKQATAK) specifikus I-E^k (MHC-II) restrikcióval rendelkező V β 3/V α 11 T-sejt receptor transzgenikus egereket (TcR AND) (Dr. Szondi Zsuzsanna, DE ajándéka) használtunk (Kaye et al., 1992). Mindkét egértörzsnél az egerek átlagos testtömege 8-10g körül volt. Kísérleti állatainkat a kereskedelmi forgalomban kapható egértáppal etettük és megfelelő mennyiségű vízzel láttuk el. A kísérletes munkák megfelelnek a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága által megállapított szabályoknak (BA 02/2000-2/2006)

4.2. SEJTVONALAK

Sp-2 egér myeloma és RBL2H3 patkány bazofil leukémia sejtvonalakat használtuk munkánk során. A sejteket hagyományos 10% FCS tartalmú DMEM médiumban tenyészítettük, penicillin (10 U/ml) és streptomycin (10 U/ml) antibiotikum kombináció jelenlétében.

A GR-TcR jelátviteli útvonalak vizsgálatához Jurkat (human akut T-sejt leukémia ATCC) sejteket és annak p56-lck és ZAP-70 deficiens szubklónjait (JCaM1.6 és P116) használtuk (Prof. Monostori Éva (MTA SZBK) bocsátotta rendelkezésünkre). A P116 sejtek lentivirális vektorral transzfektált variánsai vad típusú (WT) ZAP-70-et vagy különböző aminosav pozíciókban Y-F pontmutációkat tartalmazó (**4. táblázat**) ZAP-70-et expresszáló (intézetünkben előállított) sejtvonalakat (Szabó M, 2012) a szokásos körülmények között (37°C, megfelelő páratartalom, 5% CO₂) tenyészítettük. A tenyésztéshez 10% FCS (Gibco) tartalmú médiumot használtunk, amit nátrium-piruváttal (1mM), glükózzal (4,5g/l), penicillinnel és streptomycinnel egészítettünk ki.

4. táblázat: A kísérletekben használt primerek összefoglalása.

Név	Szekvencia (5' > 3')	Funkció/rendeltetés
P1	cggatccggccATGccagacccgcggcgacc	ZAP-70 klónozás, Forw, Start
P2	agcacacagaaggctgaggctgcctgtgccTGAgcgtcgacgtc	ZAP-70 klónozás, Rev, Stop
P069	cggcaatggcaaaagggtgccg	F069 mutáció
P126	ctggcgcacaaagtacgc	F126 mutáció
P178	gtctcgccccagaaaaaggttgc	F178 mutáció
P238	cagttcagaaactccaccag	F238 mutáció

Név	Szekvencia (5' > 3')	Funkció/rendeltetés
P292	ctcaggggtaaatccatctgag	F292 mutáció
P315	cga gcgtgtttga gagccctac	F315 mutáció
P492	gac gacagctttt acactgcccg	F492 mutáció
P493	gac gacagctactttactgccccg	F493 mutáció
S1	ccggcagagctctgcgagtt	szekvenálás 1 (421-439)
S2	ctgcctgaaggaggcctgcc	szekvenálás 2 (927-946)
S3	cgtgacctggcgcccgcaac	szekvenálás 3 (1561-1581)

A ZAP-70 klónozására használt P1 és P2 primerek BamH1 és Sal1 restrikciós helyeket tartalmaznak (aláhúzva), a start és a stop kodonok nagy betűvel vannak jelölve. A számok azt az aminosav pozíciót jelölik, ahol a pontmutáció történt. Zárójelben megadtuk a szekvenáló primerek pontos cDNS kötőhelyét. In: Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87. [60].

4.3. VEGYSZEREK

A kísérletekhez a vegyszereket a Sigma Aldrich Kft-től rendeltük. A máshonnan rendelt termékeket jelezzük. Az állatok oltásához a következő vegyszereket használtuk: glukokortikoid agonistaként Dexamethasone-t (Oradexon, Organon Oss Holland, 4mg/ml törzsoldat), RU486 (Mifepristone) és RU43044 glukokortikoid antagonistákat (Prof. Szekeres Barthó Júlia PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástan Intézet ajándéka), a glukokortikoid szintézis gátlására Methyrapone-t használtunk. Antigénként galamb citokróm C-t (PCC) alkalmaztunk. Az állatok oltásakor a vegyszerek hígításához, az eltávolított timociták mosásához phosphate buffered saline-t (PBS) illetve az RU486 és RU43044 hígításához szezámolajat használtunk. Az apoptózis korai detektálását FITC konjugált Annexin V-tel (BD Pharmingen, CA) és propidium iodiddal (PI) végeztük. Mitokondriumok jelölésére CMX-Ros (chloromethyl-X-rosamine)(Invitrogen) mitokondriális indikátort használtunk.

4.4. ELLENANYAGOK

Kísérleteinkben aktiváló hatású hörcsög anti-egér CD3 (NIH 145.2C11) antitesttel *in vivo* oltottuk egereinket (i.v. 50µg/állat 100µl PBS-ben).

A timociták *in vitro* jelölésére **áramlási citometriához** a következő monoklonális antitesteket használtuk: patkány anti-egér CD4-PE (L3T4, BD Pharmingen, CA) vagy anti-CD4-FITC (YTS191.1), anti-egér CD8-CyC (Ly-2, BD Pharmingen, CA), hörcsög anti-egér CD69-FITC (HI.2F3, Serotec), egér anti-GR-FITC (5E4B1, PTE, IBI) (Berki T. 1998) hörcsög anti-egér Bcl-2-FITC (3F11 BD Pharmingen, CA) nyál anti-(humán, egér) aktív Caspase-3-FITC (C92-605 BD Pharmingen, CA).

Apoptózis detektálására a DP sejtekben anti-CD4-PECy5 (RM4-5) és anti-CD8-PE (53-6.7BD Pharmingen) és aktivált (cleaved form) kaszpázok elleni nyúl antitesteket használtunk: anti-caspase-3 (5A1E), anti-caspase-8 (D5B2) és anti-caspase-9 (valamennyi a Cell Signaling Technology-tól) valamint anti-nyúl IgG-FITC (Sigma-Aldrich) másodlagos antitestet.

A Treg sejtek azonosítására anti-CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Cat. #558107; Clone: RM4-5) vagyanti-CD4-FITC vagy anti-CD4-AlexaFluoro647 (PTE IBI) anti-CD25 PE-Cy7 (BD Biosciences, Cat. #552880; Clone: PC61), anti-CD8-FITC (PTE IBI; Clone: IBL-3/25) és anti-LAP-PerCP-Cy5.5 (TGF β 1) (BioLegend, Cat. #141410; Clone: TW7-16B4)) sejtfelszíni antitesteket, illetve anti-FoxP3-PE (Exbio, Klón: 3G3) anti-Helios-APC (BioLegend) és anti-GR-FITC (Klón: 5E4/B1, PTE IBI) intracelluláris antitesteket használtunk.

A DP-sejtek **mágneses szeparálása** során a-CD4-FITC (YTS 191.1 klón), és a-CD8-PE (53-6.7 klón, eBioscience) antitesteket használtunk.

A timociták **konfokális mikroszkópos** jelölésére a-CD4-Pacific blue-t (RM4-5 klón, BD Biosciences) és a-CD8-Alexa647 (53-6.7 klón, BD Biosciences) ill. anti-CD8-Pacific Orange (5H10, Life Technologies) antitesteket alkalmaztunk. Intracelluláris jelölésre egér a-GR-FITC (5E4-B1 PTE IBI), anti-ZAP-70-PE (eBioscience, clone 1E7.2), nyúl anti-Bak, anti-Bax, anti-Bcl-x_L(Santa Cruz Biotechnology) és anti-Bim (C34C5, Cell Signaling Technology) antitesteket és kecske anti-nyúl-IgG-Cy3 vagy kecske anti-nyúl IgG-FITC másodlagos antitestet használtunk (Sigma-Aldrich). Izotípus kontrollként IgG1-FITC és PE jelölt antitesteket (DakoCytomation) használtunk.

Western-blothoz a timocita szubcelluláris frakcióiban az aktivált (hasított kaszpázok elleni antitesteket használtuk): nyúl anti-caspase-3, -8, -9 és -12 (Cell Signaling Technology). A pro-apoptotikus fehérjék detektálására egér anti-Cytochrome-C (7H8.2C12, BD Biosciences), nyúl anti-Bax, anti-Bak (Santa Cruz Biotechnology) az immunoprecipitációhoz anti-GR (8E9 PTE IBI) monoklonális antitestet használtunk. A precipitált mintákból a Western-blot analízist nyúl anti-Bak és anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology) és nyúl anti-Bcl-x_L (BD Pharmingen) és anti-Bim (Cell Signaling Technology) valamint anti-GR (5E4 PTE IBI) használtuk. Peroxidáz enzimmel (HRPO) jelölt anti-egér -vagy anti-nyúl-IgG-t (Dako) használtunk másodlagos antritestként.

A TcR-GR jelátviteli út vizsgálatához Jurkat és P116 sejt variánsokat egér monoklonális anti-humán CD3 antitesttel (OKT-3, 2,5 mg/ml törzsoldatból) aktiváltuk. A jelátviteli útvonalak vizsgálatához egér monoklonális a-GR (5E4 PTE IBI), anti-foszfotirozin (PY20, BD Pharmingen); anti-ZAP-70 (29/ZAP-70 kináz, BD Pharmingen), anti- β -aktin (AC-74, Sigma); nyúl poliklonális anti-SLP76, anti-LAT, anti-Cbl és anti-histone H1 (Santa Cruz Biotechnology) és egér monoklonális anti-citokróm-C (BD Biosciences) antitesteket alkalmaztunk. Másodlagos antitestként HRPO konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000, Hunnavix) vagy anti-nyúl IgG (1:1000, Pierce) antitesteket használtunk.

Az immunprecipitációkat egér monoklonális anti-SLP76 (klón F-7, 2 μ g / minta, Santa Cruz Biotechnology); anti-LAT (klón 11B.12, 2 μ g / minta, Santa Cruz Biotechnology); anti-Cbl (klón A-9, 2 μ g / minta, Santa Cruz Biotechnology) és nyúl poliklonális anti-ZAP-70 (Prof. Monostori Éva, MTA SZBK) és egér monoklonális anti-GR (8E9, PTE IBI) antitestekkel végeztük. Az alkalmazott anti-ZAP-70 antitestek a kináz 2 különböző epitópját ismerik fel. Az egér

anti-ZAP-70-FITC (klón 2F3.2, Upstate Biotechnology) az 1-254 AA közötti epitóphoz, míg az egér anti-ZAP-70-PE (klón 1E7.2, eBioscience) a 282-307AA közötti epitóphoz kötődik. A Foszfo-Flow módszerrel végzett mérésekhez foszfospecifikus PE-konjugált egér anti-SLP-76 pY128 (klón J141-668.36.58, BD Biosciences) és egér anti-LAT pY171 (klón I58-1169, BD Biosciences) antitesteket használtunk

4.5. ÁLLATOK *IN VIVO* KEZELÉSE, SEJTPREPARÁLÁS

In vivo, a kísérleti egereknek 20 mg/kg (nagydózis) 2 mg/kg (közepes) és 0,2 mg/kg (alacsony dózisú) glukokortikoid-analóg Dexamethasone-t (DX) (Organon, Oradexon) adtunk (PBS-ben oldva) intraperitoneálisan (i.p.) 1-4 napon keresztül, a kontroll állatoknak pedig PBS-t.

A GR antagonista RU486 vagy RU43044 vegyületeket 1 mg/kg dózisban szezámolajban hígítva alkalmaztuk i.p. Az AND egereket 2 napig oltottuk naponta i.p. 10 mg/kg PBS-ben hígított PCC-vel. A Balb/c egerek i.v. kaptak 5 vagy 50 µg/állat (magas dózisú) aktiváló hatású anti-CD3 monoklonális antitestet önállóan vagy kombinációban DX-al. Az állatokat 24 órával a kezelések után áldoztuk fel gyors dekapitálással, majd a tímuszokat, lépet, vagy nyirokcsomókat eltávolítottuk és hideg steril PBS vagy RPMI oldatba helyeztük. A szerveket üveg-üveg homogenizátorral homogenizáltuk és a szuszpenziót nylon vattán átszűrtük. A sejteket megmostuk PBS-ben vagy RPMI-ben és az élő sejtszámot Bürker kamrában meghatároztuk Trypán kék festékkizáros teszt segítségével.

4.6. A SEJTEK KEZELÉSE

A DP-sejteket mágnesesen Easysep anti-PE (StemCell Technologies) szelekciós koktéllal, pozitív szelekcióval izoláltuk, a-CD4-FITC és a-CD8-PE antitest koktéllal történő kettős jelölés után.

Western blot vizsgálatokhoz 5×10^7 timocitát szérummentes RPMI-ben kezeltünk 37°C-on CO₂ termosztátban tartva 10⁻⁶M DX-al (Sigma; 10⁻² M stock dissolved in DMSO) 30 ill. 60 percig, 30 percig konfokális mikroszkópiához és 30, 60, 120 és 180 percig áramlási citometriához. A kontrol sejteket ugyanilyen körülmények között tartottuk a tápfolyadékban, ill. az oldószerekben. A kezeléseket jéghideg steril PBS/0.1% NaN₃ pufferrel állítottuk le.

Kezelés előtt a Jurkat és P116 ZAP-70 variánsait expresszáló sejteket RPMI médiumban vetük fel. A TcR/CD3 útvonal vizsgálatára a sejteket anti-humán-CD3 (klón OKT-3; ATCC CRL-8001, 1 mg/ml törzsoldat) antitesttel inkubáltuk 5µl/ 10⁶ sejt koncentrációban 2 percig. A nem-genomikus glukokortikoid hatások kiváltására a sejteket 10⁻⁵M DX-al inkubáltuk 2-5 percig. Ez a koncentráció megfelel a klinikumban alkalmazott nagy dózisú szteroid kezelésnek. Kombinált kezelés esetén 2 perces DX előkezelést további 2 perces anti-CD3 aktiváció követett. A kezeléseket 37°C-on, állandó keverés mellett Thermo Mixer (Eppendorf) készüléken végeztük. A Western blothoz a reakciót folyékony nitrogénben, a Foszfo-Flow mérésekhez 4% PFA-ban állítottuk le. Az intracelluláris Ca²⁺-jel vizsgálatakor a kombinált kezelés esetén a sejteket 10 percig 10⁻⁵ M DX-al kezeltük elő.

Geldanamycin előkezeléshez 10^8 /ml Jurkat sejtet komplett RPMI-ben $1,78\mu M$ Geldanamycinnel vagy oldószerével (DMSO) inkubáltuk. Glukokortikoid antagonista kezelést incomplett RPMI-ben végeztük RU486 (Mifeprisone) jelenlétében 4h inkubálással. Ezután a sejteket mostuk incomplett RPMI-ben és $10^{-6}M$ DX-al kezeltük 5 percig, majd a reakciót a minták folyékony nitrogénbe helyezésével állítottuk le a Western blot vizsgálatok előtt.

A Treg sejtek citokin termelésének meghatározására a lépből és timuszból eltávolított limfocitákat stimuláltuk 24 órán keresztül *in vitro* RPMI + 10% FCS, 1% Pen+Strep médiumban. Mintánként 10^6 sejtet inkubáltunk $37^\circ C$ -on 5% CO₂tartalommal termosztátban 25ng/ml PMA (SIGMA Cat. #P8139-1MG), 1 μg /ml Ionomycin (SIGMA Cat. #I0634-1MG) és/vagy 10 μg /ml Brefeldin-A (SIGMA Cat. #B7651-5MG)jelenlétében. A sejteket másnap 2x 2mL PBS-el mostuk, majd áramlási citometriás jelölést végeztünk.

4.7. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

A sejtfelszíni jelölésekhez 1 millió élő timocitából indultunk ki, melyeket 100 μl jelölő pufferben (PBS 0,1% BSA/NaN3) 30 percig inkubáltuk jágen 1 μg /ml koncentrációjú anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr, anti-CD69-FITC fluoreszcens monoklonális antitestekkel. Az inkubáció után 2-szer mostuk a PBS pufferben, majd 500 μl fixáló pufferben (0,1% PFA in PBS) vettük fel a sejteket (Current protocols in Immunology chapter 5.4).

Az **intracelluláris jelölésekhez** a sejtfelszíni jelölések után fixáló oldatban (4% paraformaledehid (PFA) tartalmú PBS) 20 percig fixáltuk a sejteket. Ezután kétszer megmostuk a timocitákat PBS-ben majd 100 μl PBS/0,1%NaN3/0,1% Saponin tartalmú permeabilizáló pufferben felvettük a sejteket és fénytől elzárva, jágen 30 percig végeztük az anti-Bcl-2-FITC, anti-aktivált Caspase-3-FITC, anti-GR-FITC, vagy anti-ZAP-70 fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel a jelöléseket. Az inkubáció végén kétszer mostuk a sejteket permeabilizáló pufferben, majd egyszer kötő pufferben. A jelölés végén 500 μl fixáló pufferben vettük fel a sejteket és a mérés kivitelezéséig abban tároltuk azokat (Current Protocols in Immunology chapter 5.6).

Az **apoptózis** korai jeleinek meghatározásához 10^5 timocitát 100 μl Annexin-kötő pufferben 1 μg /ml végkoncentrációjú FITC-el konjugált Annexin V-tel és 0,5 μg Propidium Jodiddal (PI) 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.

A **Treg sejtek és citokinjei** jelölésére 10^6 sejt/minta sejtfelszíni jelölése után a mintákat mostuk 2mL jelölő pufferben. Az intracelluláris jelöléshez a FoxP3/ Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience Cat. #00-5523-00) jelölő kitet használtuk. A sejteket 30 percig fixáltuk és permeabilizáltuk sötétben, jágen 1ml fixáló/permeabilizáló pufferrel (Fixation/Permeabilization Concentrate 4x; Cat. #00-5123; Fixation/Permeabilization Diluent (Cat. #00-5223)). A fixálást követően 2 x 2mL előzőleg meghígított permeabilizáló pufferrel mostuk a sejteket (Permeabilization Buffer (10X) Cat. #00-8333). Az intracelluláris jelöléshez anti-Foxp3-PE a citokinekhez anti-IL-10-APC , anti-IL-4-FITC, anti-IL-17A-PerCP-Cyanine5.5 és anti-IFN γ -APC monoklonális antitesteket használtunk. Az inkubáció végén kétszer mostuk a

sejteket permeabilizáló pufferben. A jelölés végén 500µl FACSFix (0,5% PFA PBS-ben) pufferben vettük fel a sejteket és a mérés kivitelezéséig abban tároltuk azokat. A jelölést a kitben meghatározott leírás alapján végeztük.

A mérést FACSCalibur vagy FACSCanto (BectonDickinson, San Jose CA) áramlási citométeren, az analízist pedig az FCS Express 4 Flow Research Edition programmal végeztük. Mintánként 10000 eseményt mértünk a limfocita kapuból, majd a CD4⁺ limfocitákon belül mértük a Treg alcsoportokat és azok anti-GR-FITC átlag fluoreszcencia intenzitását.

4.8. MITOKONDRIÁLIS CMX-ROS FELTÖLTÉS, SEJTFELSZÍNI ÉS INTRACELLULÁRIS JELÖLÉSEK

A mitokondriumok jelölésére és a mitokondriális funkció mérésére a CMX-Ros (chloromethyl-X-rosamine)(Invitrogen) mitokondriális indikátort használtuk 1 µg/ml-es koncentrációban (Pendergrass W. 2004). A festéket az intakt mitokondriumok felhalmozzák, ahol fluoreszcens festékké alakul át. A vörös csatornában detektálható (áramlási cytometriával FL2-ben, ex: 579 nm, em: 599 nm). A feltöltést 37°C-on végeztük, 30 percig, szérummentes RPMI médiumban, a DX-kezeléssel párhuzamosan. A sejtfelszíni a-CD4-Pacific blue és a-CD8-Alexa647 jelölést (ill. anti-CD4-PE, valamint anti-CD8-CyCfluorokró-mokkal áramlási cytometriára) jégen, jelölőpufferben 30 percig végeztük. Ezután jelölőpufferrel mostuk a sejteket, majd 20 percig 4%-os PFA fixálás következett, mely után az Intézetünkben kifejlesztett monoklonális a-GR antitesttel (5E4-B1 PTE IBI) vagyanti-Bak és Bax elsődleges antitestekkel és anti-nyúl IgG-FITC antitesttel jelöltük a sejteket intracellulárisan 0,1% szaponin tartalmú jelölőpufferben. A sejteket végül cytocentrifugával tárgylemezre centrifugáltuk, vagy FACSFix (0,5% PFA PBS-ben) oldatban tartottuk a flow cytometriás mérésig. PromoFluorAntifade Reagens-t használtunk a konfokális mikroszkópos vizsgálathoz a sejtek lefedésére, a fluorofór bleaching megakadályozására.

Az áramlási cytometriás analízist a CellQuest programmal végeztük, 10.000 eseményt rögzítettünk, a törmeléket és az elpusztult sejteket morfológiájuk alapján kizártuk az analízisből, a timocita alcsoportot pedig a sejtfelszíni CD4 és CD8 expresszió alapján különítettük el. A timocita alcsoportok CMX-Ros átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) hisztogramokon ábrázoltuk.

4.9. KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA

Az Olympus Fluoview 300 konfokális mikroszkópot és az Olympus Fluoview FV1000S-IX81 fotórendszerét használtuk munkánkhoz. A jeleket négy különböző csatornában detektáltuk: DIC (differenciál interferencia kontraszt), a CD4-et UV közeli csatornában, a GR-t a FITC (zöld) csatornában, a CMX-Rost a vörös csatornában, a CD8-at pedig a távoli vörösen. Egy másik kísérletben ugyancsak a távoli vörösen detektáltuk az anti-FoxP3-Alexa647 jelölést. Szekvenciális pásztázási módot, valamint Kalman zajszűrést használtunk, hogy a spektrális átfedést a csatornák között elkerüljük. A jeleket 3-3 látótérben gyűjtöttünk és a CMX-Ros és a GR valamint a Foxp3 és GR közötti morfológiai kapcsolatot (kolokalizáció) elemeztük.

A GR és Bcl-2 család fehérjéinek közelségét hasonlóképpen vizsgáltuk, CD4 és CD8 jelet UV-ban, a GR jelét a FITC, a Bak, Bax, Bcl-x_L és Bim vagy a mitokondrium festést a piros csatornában detektáltuk, amikor a Bak és Bax jelét a FITC-nél. A jeleket 3-3- látótérben detektáltuk és a Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim-GR és CMX-Ros-Bak, -Bax morfológiai asszociációt analizáltuk. A képeket egymásra helyeztük és az ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) segítségével analizáltuk a kolokalizációt 100-DP sejtet analizálva mintánként.

4.10. DIGITÁLIS KÉPELEMZÉS, KVANTITATÍV MIKROSKÓPIA

100 kontroll és 100 DX-kezelt DP sejtből elemeztük a GR - CMX-Ros és GR-FoxP3 kolokalizáció mértékét. Az ImageJ szoftvert (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) használtuk a kolokalizációs kiegészítő modullal (plugginnal). A szoftver a GR – CMX-Ros ill. a GR-FoxP3 kolokalizált pontokat egy külön képen fehér pontokként jelenítette meg, amely pixeleket megszámoltuk majd ábrázoltuk.

4.11. A TIMOCITÁK SZUBCELLULÁRIS FRAKCIONÁLÁSA

A mitokondrium frakciók izolálásához Mitokondrium Izoláló kitet (Pierce) használtunk a gyári előírásokat követve, kisebb módosításokkal (Stasik I., 2009). Az oldószerrel- és DX-kezelt timocitákat megmostuk jéghideg PBS-ben, majd a sejteket lizáltuk. 800g-vel való centrifugálás után a magfrakciókat háromszor 0,5% NP-40 detergenst tartalmazó TBS pufferrel mostuk, majd a pelletet 10%-os merkaptoetanolt is tartalmazó SDS-mintapufferben (125 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0,006% Brómfenolkék) vettük fel és megfőztük. A poszt-nukleáris szupernatánst egyszer 3000g-vel 15 percig, majd 12000g-vel 5 percig centrifugáltuk. A mitokondriumot is tartalmazó pelletet 10% merkaptoetanolt tartalmazó SDS-mintapufferben felvettük, majd megfőztük vagy immunprecipitációra használtuk. Citoplazma frakcióként a 3000g utáni centrifugálási lépés szupernatánsát használtuk fel.

Immunoprecipitációhoz a mitokondriumot tartalmazó pelleted lizáltuk TEGM lízis pufferben (10mM Tris base, 4mM EDTA, 50mM sodium chloride, 20mM sodium molibdate, 10% glycerol, frissen kiegészítve proteáz inhibitor koktéllal és Na-ortho vanadáttal (pH 7.6). A mintákat 5x fagysztottuk és olvasztottuk folyékony nitrogénben, majd inkubáltuk jégen 30 percig és centrifugáltuk 13,000 rpm-el 10 percig majd a supernatánt használtuk.

4.12. A MITOKONDRIÁLIS GR - BCL-2 FEHÉRJE CSALÁD ASSZOCIÁCIÓ VIZSGÁLATA WESTERN BLOT ÉS DENZITOMETRIA

Immunoprecipitációhoz a mag, a citoszólikus és mitokondriális frakciókat 1 éjszakán keresztül rotálva inkubáltuk a megfelelő precipitáló antitesttel blokkoló pufferben (10 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7.4, 10% BSA-val) majd Protein-G-t (Santa Cruz Biotechnology) adtunk a mintákhoz további 2 órára. Végül a mintákat mostuk 5x PBS-ben és az immunkomplexeket SDS mintapufferben történő főzéssel távolítottuk el a Protein-G-ről.

A sejtfrekciókat megfőztük és 7, 10 vagy 15%-os poliakrilamid gélen futtattuk meg. A géleket egy éjszakán át blottoltuk nitrocellulóz membránra a Bio-Rad Trans-Blot rendszer segítségével. A blottolás után a membránokat 2%-os BSA – vagy 1% tejpor tartalmú pufferrel (2% BSA, 10 mM Tris, 100 mM NaCl és 0.1% Tween 20, pH 7.4) telítettük. A blotokat anti-GR, anti- β -aktin, anti-citokróm c egér monoklonális antitestekkel, anti-hiszton-H1 nyúl poliklonális antitesttel inkubáltuk, majd a megfelelő anti-egér-HRPO és anti-nyúl-HRPO másodlagos ellenanyagokkal hívtunk elő és enhanced chemiluminescens módszerrel vizualizáltuk a gyári leírás szerint (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Pierce, Rockford, IL, USA). A kemiluminescens szignált Fujifilm LAS 4000 blot documentary system-el detektáltuk. A blotokat denzitometriával analizáltuk, a GR relatív denzitásokat a megfelelő frakciókban az aktin, citokróm c, hiszton H1 csíkok denzitásához normalizáltuk. A denzitometriás méréseket a BioRad Quantityone szoftvercsomaggal végeztük el.

4.13. AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUM SZINT MÉRÉSE ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

A szabad intracelluláris kalcium szint méréséhez a Jurkat és P116 ZAP-70 variánsait expresszáló sejtek Fluo-3AM (Invitrogen) kalcium szelektív indikátor festékkel töltöttük föl Minta és munkatársainak protokollja szerint (Minta A. 1989). Az áramlási citometriás méréseket és az eredmények analízisét a FACSCalibur áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük. Kezeletlen vagy DX előkezelt sejtekben 50 másodpercig mértük az alap kalcium szintet, majd hozzáadtuk az anti-CD3-antitestet és így vizsgáltuk tovább az intracelluláris kalcium szint változását. Az FL1 intenzitásban észlelt változások arányosak az intracelluláris kalcium szintjével.

4.14. AZ ANTI-CD3 INDUKÁLT FOSZFORILÁCIÓ VÁLTOZÁSOK MÉRÉSE FOSZFO-FLOW TECHNIKÁVAL

A nyugvó vagy anti-CD3 kezelt Jurkat és P116 sejteket 4% PFA-ban fixáltuk 37°C-on 10 percig, majd Phosflow Perm Buffer III-ban (BD Biosciences) 30 percig, jégen permeabilizáltuk. A mintákat PBS/0,1% BSA/0,1% NaN₃-ban mostuk, majd anti-SLP-76 pY128 vagy anti-LAT pY171 antitestekkel 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően ismét mostuk, majd PBS-ben vettük fela sejteket. Az áramlási citometriás mérést és analízist a FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométeren a CellQuest software segítségével végeztük

4.15. TCR-GR JELÁTVITELI ÚT IN VITRO VIZSGÁLATA IMMUNPRECIPITÁCIÓVAL

A TcR/CD3 útvonal és a GC kezelés azonnali hatásának vizsgálatára a Jurkat vagy P116 mutáns kontroll vagy kezelt mintákat 2 perc után Triton X lízis pufferben (50mM HEPES, 10mM nátrium-pirofoszfát, 10mM EDTA, 100mM nátrium-fluorid, 10% glicerol és 1% Triton X-

100, pH 7,3 frissen kiegészítve proteáz gátlóval és Na-ortovanadáttal) lizáltuk 30 percig jégen, majd 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. A felülúszót SDS mintapufferben (125mM Tris, 4% SDS, 10 % glicerol, 0,006% Bromo-fenol-kék és 10% merkaptoetanol) főztük 10 percig, vagy immunprecipitációhoz használtuk tovább.

Immunprecipitácó során a sejtek lizátumát, a blokkoló puffert (TBS, 10% BSA és 0,1% NaN₃) és a megfelelő mennyiségű antitestet (Id. 4.5 fejezet) éjszakán át, majd Protein-G-vel (GE Healthcare) további 2 órán keresztül inkubáltuk. A mintákat 5-ször mostuk WB-mosóval (10mM Tris, 100mM nátrium-klorid és 0,1%Tween-20, pH 7,4), majd az immunkomplexeket SDS mintapufferben 10 perces forralás során választottuk le a Protein-G-ről.

A lizátumokat és a precipitátumokat 7,5% vagy 10%-os SDS-poliakrilamid gélben választottuk el a MiniProtean rendszerben (Bio-Rad), majd éjszakán át nitrocellulóz membránra blottoltuk a Trans-Blot (Bio-Rad) készülékben. Blottolást követően a membránokat blokkoló pufferben (2% BSA vagy 5% NFDM (Bio-Rad), 10mM Tris, 100mM nátrium-klorid, 0,1% Tween-20, pH 7,4) telítettük egy órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően a megfelelően hígított elsődleges antitestekkel (Id. 4.5 fejezet) inkubáltuk a blotokat 2 órán át szintén szobahőmérsékleten. A membránokat WB-mosóval mostuk, majd mosást követően HRPO konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Újabb mosást követően a blotokat Super Signal West Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) hívtuk elő. A jeleket a Fuji LAS4000 készülékkel detektáltuk. Az elsődleges és másodlagos antitesteket Restore Western Blot Stripping pufferrel (Pierce) távolítottuk el a membránról és blokkolást követően további antitestekkel hívtuk elő őket. A kapott jeleket denzitometriás méréssel kvantifikáltuk, amit Scion Image software (Scion Corporation) segítségével végeztünk.

4.16. TREG SEJTEK IN VITRO EXPANZIÓJA

A CD4+ T-sejteket a frissen izolált lép és tímusz sejtekből negatív szelekcióval nyertük az EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Enrichment Kit-et (Stemcell Technologies, Cat. #19752, #19772) használva. A szelekciót a gyári leírás szerint végeztük az EasySep Mágnes (Stemcell Technologies, Cat. #18000) használva. A szelekció végén a CD4+ T-sejtpopuláció tisztaságát anti-CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Cat. #558107; Clone: RM4-5) jelöléssel ellenőriztük és 98% fölötti tisztaságú mintából indultunk ki a Treg expanzióhoz.

A CD4+ T-sejteket *in vitro* RPMI/10% FCS (+Pen/Strep) high glukóztartalmú médiumban tenyésztettük *in vitro* 2-14 napig Dynabeads CD3/CD28 T-sejt aktiváló mikrogyöngyök (2:1, gyöngy:sejtarányban) (Gibco, Cat. #11452D) segítségével, 30 U/mL rekombináns IL-2 (eBioscience, Cat.#34-8021-82) ± 40 pg/mL rekombináns TGF beta 1 (eBioscience, Cat.#34-8342-82) ± 10⁻⁶ mol/l DX (SIGMA, Cat. #D4902) jelenlétében 24-lyukú lemezen (1000µL/lyuk) 37°C-on 5% CO₂ tartalommal. Amennyiben szükséges volt, a sejteket friss trápfolyadékban tenyésztettük tovább. A tenyésztést követően a sejteket összegyűjtöttük, a stimuláló mikrogyöngyöket eltávolítottuk az EasySep Mágnes (Stemcell Technologies, Cat. #18000) segítségével, majd PBS-ben történő mosás után az élő sejtszámot Bürker kamrában meghatároztuk Trypán kék festékkizáras teszt segítségével. A sejtekből RNS-t izoláltunk NucleoSpin RNA XS (MACHEREY-NAGEL, Cat. #740902.50) kit segítségével, ill. flouresz-

cens jelölést követően áramlási citometriás méréseket végeztünk a CD4+CD25+FoxP3+ sejt arány meghatározására.

4.17. TREG SEJT SZEPARÁLÁSA FACS MÓDSZERREL ÉS STIMULÁLÁSUK CITOKIN TERMELÉSHEZ

Kontrol és 2 napig *in vivo* 20 mg/kg DX-al kezelt állatok timuszából és lépéből sterilen 10⁸/ml sejteket jelöltünk RPMI/10% FCS-ben anti-CD4-FITC anti CD25-PE-Cy7 antitestekkel, majd a CD4+/CD25^{high+} sejteket kijelöltük és szeparáltuk FACS Aria (Becton Dickinson) sejt szeparáló készülékkel. A kapott sejtek 95%-nál nagyobb tisztaságúak voltak. Ezután a sejteket 4 órán keresztül aktiváltuk PMA/ionomycinnel.

4.18. REAL-TIME PCR

A stimulálást követően RNeasy mini kit (Qiagen) segítségével RNS-t izoláltunk, majd DNase (Sigma) emésztés után „High Capacity RNA to cDNA Kit” (Applied Biosystems) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. A qRT-PCR reakciót az „Sybrgreen master mix” vagy „Taqman master mix” (mindkettő Applied Biosystems) segítségével végeztük. A felhasznált primerek szekvenciái a következők voltak:

β-ACTINForward 5'- GGG AGG GTG AGG GAC TTC C -3',
 β-ACTINReverse 5'- TGG GCG CTT TTG ACT CAG GA -3',
 Ebi3 Forward 5'- AGC AGCAGC CTC CTA GCC T -3',
 Ebi3 Reverse 5'- ACG CCT TCC GGA GGG TC -3',
 IL-12α Forward 5'- TCG CTA CTA GAG AGA CTT CTT CCA CCA -3',
 IL-12α Reverse 5'- GCA CAG GGT CAT CAA AGA C -3',
 IL-10 Forward 5'- GTG AAG ACT TTC TTT CAA ACA AAG -3',
 IL-10 Reverse 5'- CTG CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT -3', ,
 Foxp3 Forward 5'- TAC TTC AGA AAC CAC CCC GC -3',
 Foxp3 Reverse 5'- GTC CAC ACT GCT CCC TTC TC -3'

4.19. STATISZTIKAI ANALÍZIS

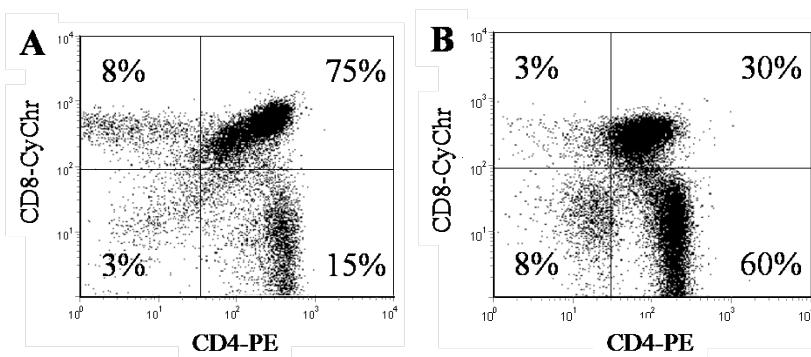
Munkánk során a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai analízise SPSS 11.0 szoftver segítségével történt. Az adatok kiértékeléséhez a Student-féle t-tesztet használtuk, és a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) és $P < 0,001$ (***) értéknél fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

I. TIMOCITÁK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGE ÉS GR EXPRESSZIÓJUK

5.1. BALB/C ÉS AND EGÉR TÍMUSZÁNAK SEJTES ÖSSZETÉTELE

A tímuszt alkotó limfoid sejtek különböző fejlődési stádiumban lévő timociták, melyeket a CD4 és CD8 antigének sejtfelszíni expressziójával négy csoportba tudunk sorolni. A DN sejtek a legéretlenebbek, melyek osztódás után a CD4 és CD8 antigének egyidejű expressziója, illetve a TcR gének átrendeződésével és a molekula-komplex sejtfelszíni kifejezésével a DP stádiumba jutnak. Pozitív és negatív szelekció során a DP sejtek körülbelül 99%-a apoptózissal elpusztul, a túlélő érett SP sejtek pedig elhagyják a tímuszt.



20. ábra: BALB/c (A) és AND (B) egér tímuszának sejtes összetétele CD4-PE (x-tengely) és CD8-CyChr (y-tengely) fluoreszcens jelölés után áramlási citometriás analízissel.

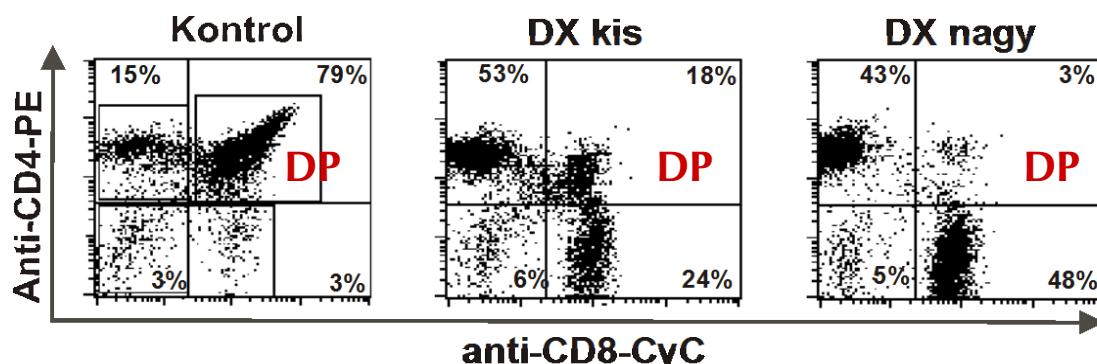
A háromhetes BALB/c egerek tímuszát jellemzően 1-3% DN, 70-80% DP, 10-15% CD4 SP és 5-8% CD8 SP tiomcita alkotja. (20. ábra A) Az AND TcR transzgenikus egerek tímuszában a TcR transzgén domináló hatása miatt más arányban fordulnak elő az egyes timocita alcsoportok (20. ábra B): a DP populáció kevesebb és dominálnak az érett CD4 SP sejtek antigén jelenléte nélkül is. A kezeletlen AND TcR transzgenikus egér tímusza $8 \pm 2,2\%$ DN, $28,3 \pm 6,7\%$ DP, $61 \pm 3,2\%$ CD4 SP és $2,6 \pm 2,3\%$ CD8 SP sejtot tartalmaz. A sejtes összetétel eltérése a genetikai módosításnak köszönhető: a timociták több mint 99%-a a V β 3 láncot tartalmazó transzgenikus TcR-t hordoz, amely az MHC-II + PCC antigénre specifikus.

5.2. BALB/C EGÉR TÍMUSZÁNAK SEJTES ÖSSZETÉTELE DX KEZELÉS HATÁSÁRA

Régóta ismert, hogy a glukokortikoid hormon analóg kezelés jelentősen csökkenti a tímusz méretét a T-sejt előalakok depléciójá miatt.

5.2.1. AZ IN VIVO ISMÉTELT GC KEZELÉS DÓZIS FÜGGÉSE

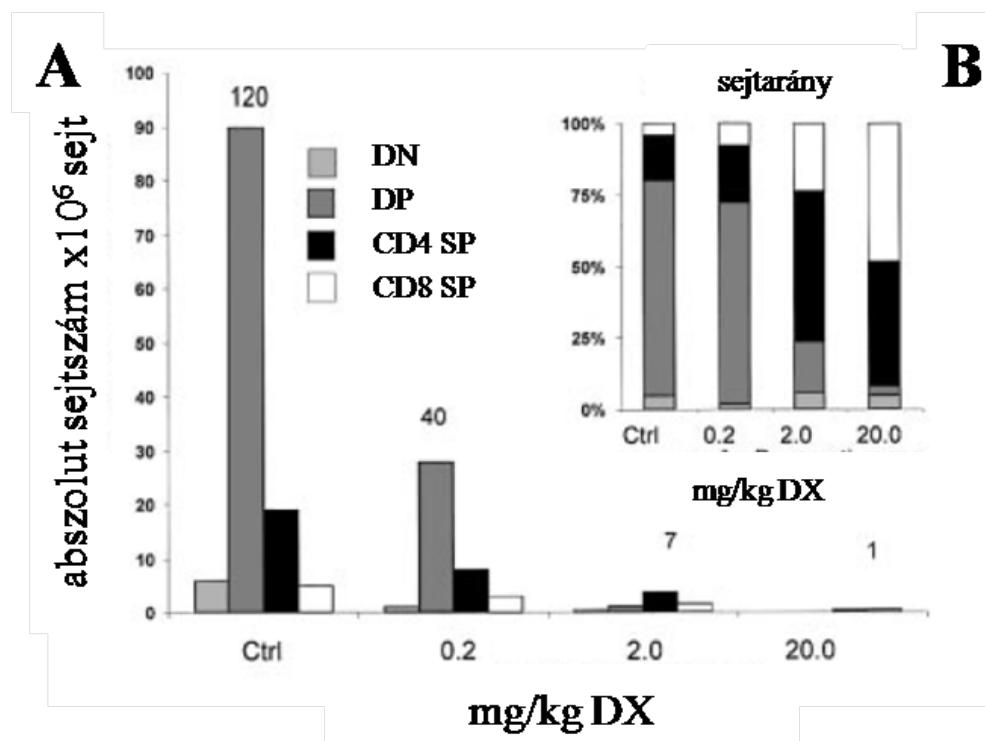
A fiziológiai és farmakológiai dózisú glukokortikoid hormon hatás vizsgálatához 3-4 hetes BALB/c egereket 4 napon keresztül 24 óránként 20,0, 2,0, illetve 0,2 mg/kg DX-al kezeltük in vivo. 24 órával az utolsó kezelés után eltávolítottuk az állatok tímuszát és először meghatároztuk a teljes timocita számot. Az ismételt DX kezelések koncentráció dependens csökkenést okoztak a teljes timocita számban. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (120 millió sejt/tímusz) az ismételt 20,0 mg/kg DX kezelés több mint 100-szoros redukciót okozott a timocita számban (1 millió sejt/tímusz), (22. ábra A).



21. ábra: Tímusz sejtes összetételének változása különböző dózisú (20,0, 2,0 mg/ttkg) ismételt DX kezelések után.

A dot-plotok sejtfelszíni anti-CD4-PE és anti-CD8 CyChr jelölést követő áramlási citometriás analízis eredményei. A diagramok három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatják. Berki T., Pálinkás L., Boldizsár F., Németh P. Int. Immunol., 2002.

A tímusz sejtes összetétele szintén megváltozott az in vivo DX kezelések hatására (21. ábra). Irodalmi adat, hogy a DP timociták a legérzékenyebbek a glukokortikoid kezelésre (Wiegers GJ., 2001). A rezisztensebb érett CD4 SP és CD8 SP, illetve éretlen DN populáció mellett egy kisszámú DX rezisztens DP sejtcsoport azonban mindvégig megmaradt a tímuszban, még a magas (20,0 mg/kg) dózisú DX kezelés során is. Az érett SP sejtek között a CD8 pozitívak ellenállóbbak voltak a glukokortikoid kezeléssel szemben, mivel a CD4/CD8 arány csökkent az emelkedő dózisú DX kezelésekben (22. ábra B).



22. ábra: Tímusz abszolút sejtszám (A) és sejtes összetétel (B) *in vivo* DX kezelt BALB/c egerekben.

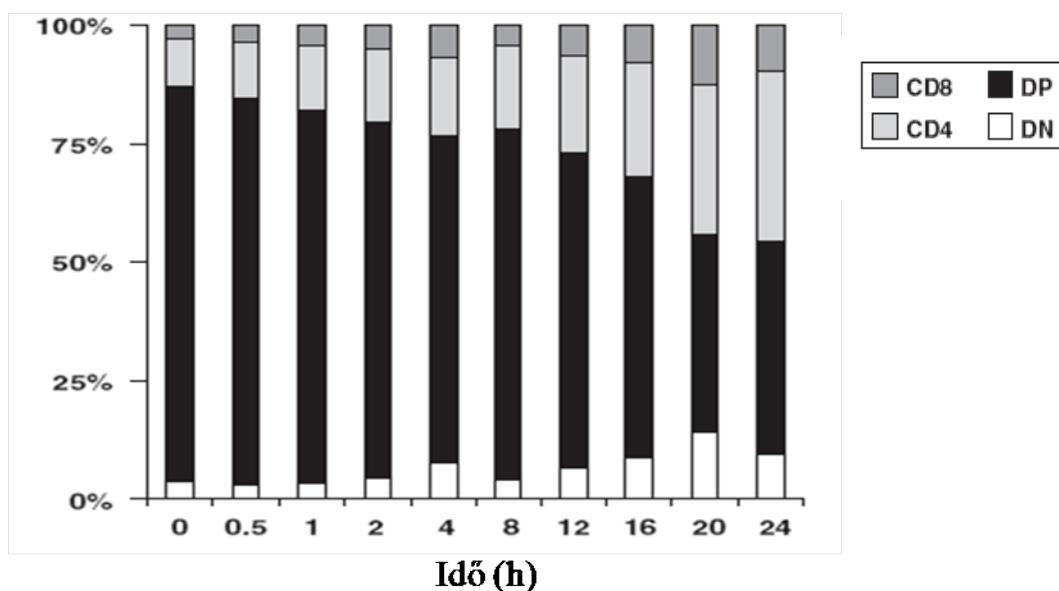
Az egereket 4 napon át ismételten kezeltük különböző koncentrációjú DX-al, majd meghatároztuk a tímuszok sejtszámát és sejtfelszíni anti-CD4-PE / anti-CD8-CyChr jelölést végeztünk. Az oszlopok az egyes timocita alcsoportba tartozó sejtek abszolút számát (A) és relatív arányát (B) mutatják.

Berki T., Pálinkás L., Boldizsár F., Németh P. *Int. Immunol.*, 2002.

5.2.2. EGYSZERI, NAGY DÓZISÚ IN VIVO DX KEZELÉS HATÁSÁNAK IDŐFÜGGÉSE

Ugyan a glukokortikoidok által indukált apoptózisra a DP sejtek a legérzékenyebbek, a sejtszám csökkenés és tímusz összetétel változásának időbeli lefolyásáról azonban még kevés az információ. Ezért megvizsgáltuk az egyszeri nagy dózisú (10,0 mg/kg) DX kezelés hatásának időbeli lefutását. Ehhez BALB/c egér oltása után 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 és 24 órával meghatároztuk a timociták abszolút számát (**5. táblázat**) és sejtfelszíni kettős fluoreszcens jelölést (anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr) követően az egyes timocita alcsoportok arányát (**23. ábra**).

Egyszeri 10,0 mg/kg dózisú DX kezelés hatására 24 óra alatt a DP timociták aránya jelentősen csökken (83,2%-ról 44,9%-ra), mialatt az érett CD4 SP és CD8 SP populáció relatív dominanciája alakul ki (CD4 SP: 10%-ról 36,1%; CD8 SP: 3,1%-ról 9,8%-ra).



23. ábra: Egyszeri 10,0 mg/kg dózisú DX kezelés tímusz sejtes összetételére gyakorolt hatásának időbeli lefutása.

Az oszlopok három független kísérletben meghatározott átlagos timocita populációarányt jelölnek.

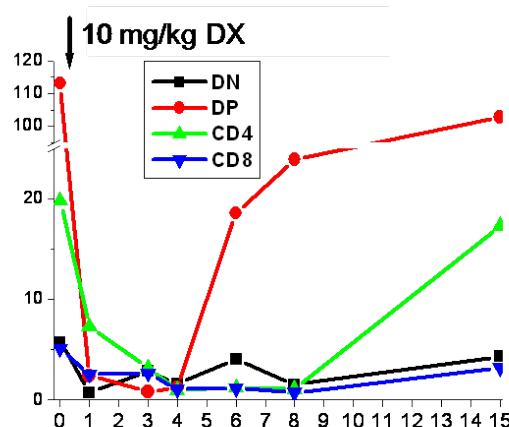
5. Táblázat. Egyszeri magas dózisú (10,0 mg/kg) DX kezelés total timocita sejtszámára gyakorolt hatásának időbeli lefutása.

Idő	Ctrl	0,5h	1h	2h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
DX 10,0 mg/kg (10 ⁶ sejt/tímusz)	142,8	144	148	102,8	113,4	59,2	37,8	31,6	29,4	26,8

Az értékek 10⁶ sejtet jelentenek és három független kísérletben meghatározott átlagos abszolút timocita sejtszámot jelölnek.

Az abszolút tímusz sejtszámot is meghatároztuk minden időpontban. 24 órával a nagy dózisú DX kezelést követően az átlagos sejtszám 142,8 millióról 26,8 millióra csökkent (**5. táblázat**). Megállapíthatjuk, hogy az egyszeri nagy dózisú DX kezelés sejtszám csökkentő hatása már 2 órával a beadás után megfigyelhető, és 24 óra elteltével még mindig nem emelkedik a tímusz össz sejtszáma.

Az egyszeri nagy dózisú DX hatás vizsgálatára ezért egy másik kísérletet is végeztünk, amelyben 15 napig követtük az egyes timocita populációk nagyságának alakulását az *in vivo* 10 mg/kg DX kezelést követően (**24. ábra**).



24. ábra: Egyszeri 10mg/kg DX kezelés hatása az egyes timocita alcsoportok abszolút számára.

Vízszintes tengelyen a napok, a függőlegesen a sejtszám $\times 10^6$ került ábrázolásra. Az ábrán 3 párhuzamos mérésnek egy reprezentatív kísérleti eredményit ábrázoltuk.

Az előző kísérlet eredményeivel egyezően minden timocita populációban nagymértékű sejtszám csökkenés következett be. A legnagyobb sejtszám depléciót a 4. napon tapasztaltuk. Ezt követően kezdődött a tímusz repopulációja, mely a 15. napra szinte teljesen végbe ment és a kiindulási állapothoz képest már nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést egyik sejtcsoportban sem.

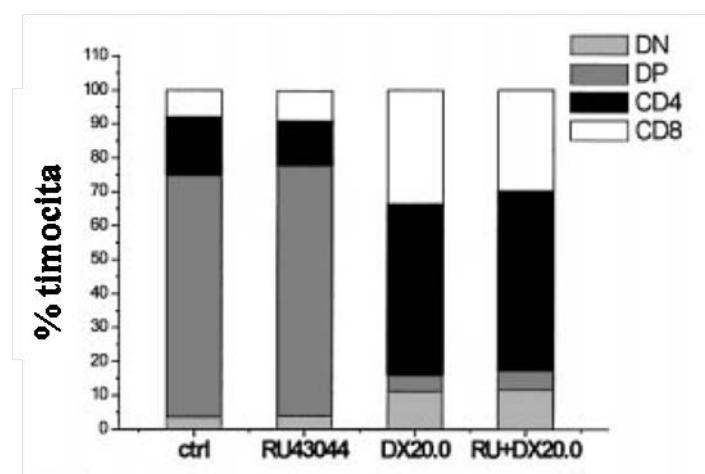
5.3. A GC HATÁS GÁTLÁSA TIMOCITÁKON

5.3.1. IN VIVO GR ANTAGONISTA KEZELÉS HATÁSA A TIMUSZ SEJTES ÖSSZETÉTELÉRE

A GC-k és GC analógok által indukált tímusz involúció a sejtek apoptózisa miatt következik be. Ennek pontos molekuláris mechanizmusa nem tisztázott. A GC-k hatása konvencionálisan a citoszolban található GR-on keresztül érvényesül. Ezek a receptorok blokkolhatók antagonistákkal. A receptor közvetítette GC hatást kísérleteinkben a nem specifikus RU486 és a GC specifikus RU43044 antagonistákkal blokkoltuk. A RU486 hatása ugyanis abban nyilvánul meg, hogy megakadályozza a GR ligand kötödést követő transzlokációját a sejtmagba (Distelhorst CW., 1990).

A genomikus konvencionális GC jelátviteli út megakadályozására BALB/c egereket 2 napon át 12 óránként oltottunk 1 mg/kg RU43044 glukokortikoid receptor antagonistával önmagában, illetve kombinációban 20 mg/kg DX-al. A kezelések után 24 órával sejtfelszíni fluoreszcens jelöléssel és áramlási citometriás analízissel meghatároztuk a tímuszok sejtszámát és az egyes timocita alcsoportok arányát. Az előzőekben már részletezett hatása volt a DX kezelésnek mind a sejtszámra (Kontroll: 110 millió, DX 20mg: 10 millió timocita), mind a sejtes összetételre, melyet nem befolyásolt az egyidejűleg adott glukokortikoid antagonista

kezelés (DX 20mg + RU43044: 7 millió timocita). Az RU43044 kezelésnek nem volt hatása sem az abszolút sejtszámra (RU43044: 106 millió timocita), sem az egyes timocita populációk arányára (**25. ábra**). Önmagában az *in vivo* RU486 kezelésnek sem volt hatása sem a tímuszok abszolút sejtszámára, sem a sejtes összetételre (nem ábrázolt eredmény). Ezek alapján a GC-ok pro-apoptotikus hatása, a DP sejtekben, függetlenek tűnik az aktivált GR sejtmagba történő transzlokációjától, mely felveti a lehetőséget a nem-genomikus jelátviteli folyamatoknak ezekben a sejtekben.



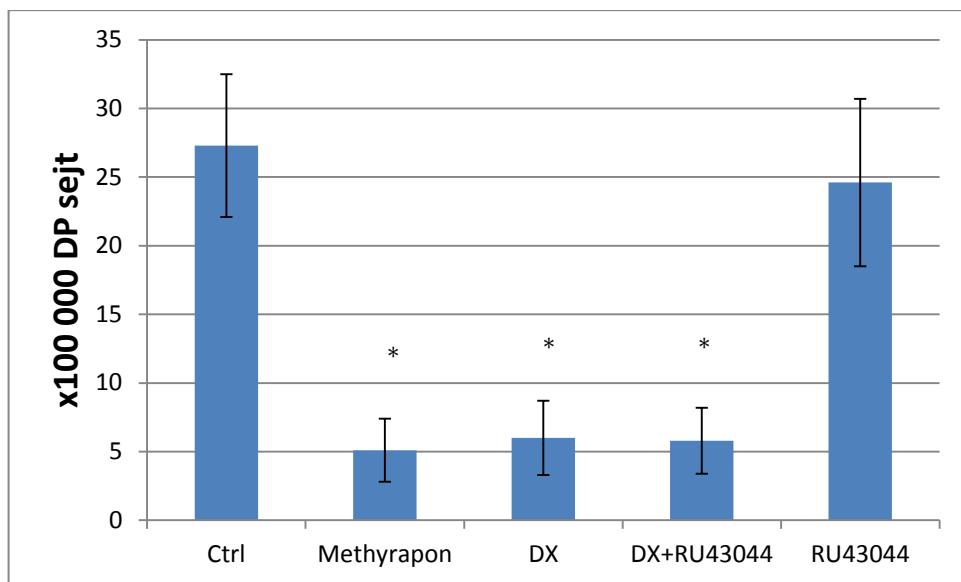
25. ábra: Az egyes timocita alcsoportok arányának változása RU43044, 20mg/ttkg DX, illetve kombinált kezelés hatására.

Az oszlopok a timocita populációk átlagos százalékos arányát mutatják, az értékek három független kísérlet átlag eredményei.

5.3.2. GR ANTAGONISTA HATÁSÁNAK ÉS A GC SZINTÉZIS GÁTLÁSÁNAK IN VITRO VIZSGÁLATA

A továbbiakban kíváncsiak voltunk, hogy milyen szerepe van a cTEC által lokálisan termelt GC-nak a DP timociták túlélésében. A lokális GC szintézis gátlását 1-2 napos BALB/c egerek tímusz lebeny szövetkultúráján viszgáltuk *in vitro*, melyeket 24 órán át kezeltünk 10^{-7} mol/l DX-al, RU43044 GR antagonistával, a kettő kombinációjával vagy a kortisol szintézis gátló Methyraponnal.

Eredményeink szerint a DP sejtek esetében mind a DX kezelés, mind a lokális GC szintézis hiánya (Methyrapon) szignifikáns abszolút sejtszám csökkenést okozott a kontroll állapothoz viszonyítva (Ctrl: $27,3 \pm 5,2 \times 10^5$ DP sejt, Methyrapon: $5,1 \pm 2,3 \times 10^5$ DP sejt, DX: $6,0 \pm 2,7 \times 10^5$ DP sejt). Az RU43044 GR antagonistának önmagában nem volt szignifikáns hatása a DP sejtszámra ($24,6 \pm 6,1 \times 10^5$ DP sejt), és kombinált kezelésnél nem gátolta a DX hatást ($5,8 \pm 2,4 \times 10^5$ DP sejt) (**26. ábra**).



26. ábra: 24 órán át *in vitro* inkubált tímusz szövet kultúrában a túlélő DP sejtek számának alakulása DX, GC szintézis gátló (Methyrapon) és GR antagonista (RU43044) kezelések hatására.

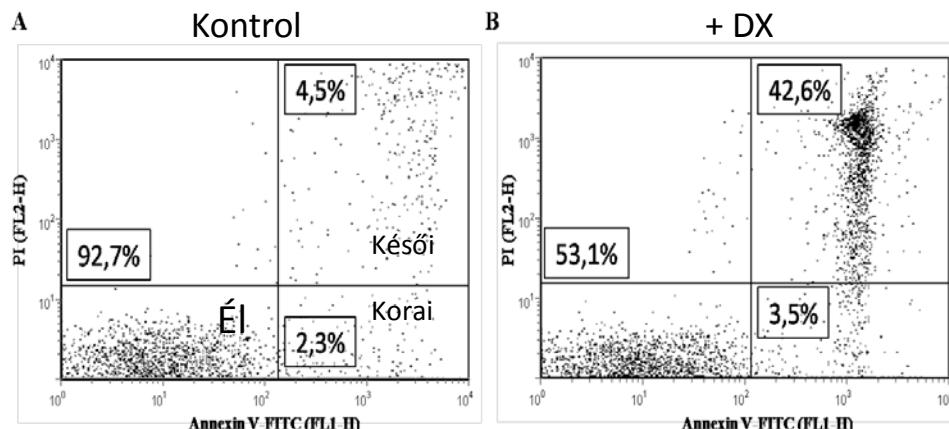
(* $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva).

Ezzel *in vitro* szövetkultúrán is bizonyítottuk, hogy a GC-ok timocitákra gyakorolt proapoptotikus hatása nem függeszthető fel a receptor sejtmagba történő tranzlokáció gátlásával, vagyis a GC jelátvitel nem a klasszikus genomikus útvonalon zajlik, valamint azt is, hogy ugyanakkor az endogén GC hormon jelenléte szükséges a DP timociták pozitív szelekciója során a sejtek túléléséhez.

5.3.3. A KÖLCSÖNÖS ANTAGONIZMUS VIZSGÁLATA: GC ÉS TcR AKTIVÁCIÓ EGYÜTTES HATÁSA A TIMOCITÁKON

A továbbiakban azt szerettük volna vizsgálni, hogy a TcR aktiváció hogyan befolyásolja az *in vivo* GC kezelés timocita sejtpusztító hatását. A kettős antagonizmus modell szerint a tímusz kéregállományában a cTEC sejtek által termelt GC szükséges a DP timociták TcR indukálta apoptotikus hatásának megakadályozására. Önmagában minden két jelátviteli útvonal aktivációja a sejtek apoptózisát okozza, de a két jelátviteli útvonal összekapcsolódása a sejtek túlélését eredményezi.

Az apoptózis megindulásának egy korai jele a sejtmembrán aszimmetriájának megváltozása, és a foszfatidil szerin (PS) molekulák áthelyeződése a sejtmembrán belső oldaláról a sejt külső felszínére. Ezt Annexin-V, egy foszfolipid kötő fehérje segítségével jelölhetjük, amely szelktíven a kötődik a korai apoptotikus sejtek felszínén megjelenő PS-hez. Az apoptotikus folyamat előrehaladása során a sejtek membrán integritása is sérül, áteresztővé válik. Az ilyen késői apoptotikus sejtek detektálásra a propidium jodid (PI) molekulát használtuk, amely szabadon átdiffundálva a sejtmembránon intracelluláris nukleinsavakhoz kötődve narancsvörös színben (FL-2) fluoreszkál. Ily módon 4 sejtcsoportot tudunk elkülöníteni: élő (Annexin-V- / PI-), korai apoptotikus (Annexin-V+ / PI-), késői apoptotikus (Annexin-V+ / PI+) és nekrotikus sejteket (Annexin-V- / PI+) (**27. ábra**).

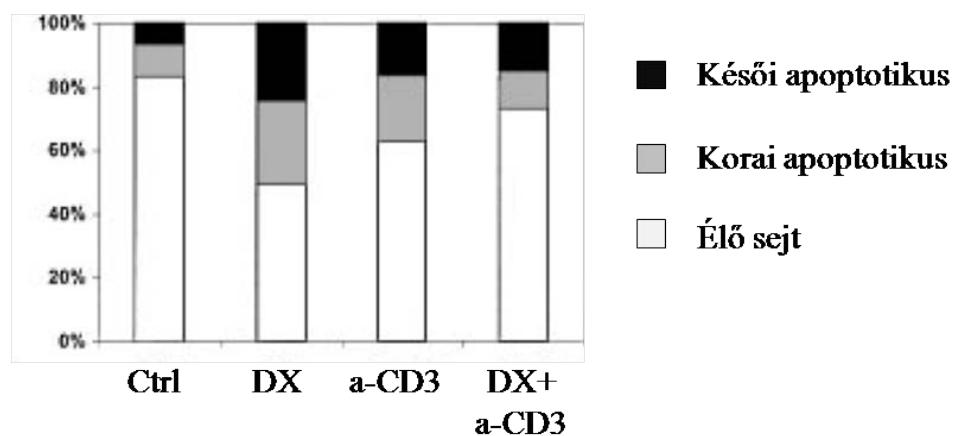


27. ábra: Korai és késői apoptotikus sejtek vizsgálata Annexin V-FITC / PI jelöléssel kontrol (A) és DX kezelt tímocita mintákon (B).

(A) Kezeletlen állat tímuszában is találhatóak Annexin V pozitív (korai apoptotikus) sejtek (2,3%), és késői apoptotikus (Annexin V és PI kettős pozitív) sejtek (4,5%). (B) 10 mg/kg DX kezelést követően 24 órával végzett Annexin V / PI jelölés eredménye: 3,5 % korai és 42,6 % késői apoptotikus sejt detektálható. Az ábra egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja.

5.3.4. DX ÉS ANTI-CD3 KEZELÉS HATÁSA BALB/C EGÉR TIMOCITÁINAK APOPTÓZISÁRA

A GC és TcR jelátviteli útvonal aktivációját *in vivo* alacsony dózisú (0,2 mg/kg) DX és anti-CD3 (5 µg/egér) kezeléssel modeleztük, majd vizsgáltuk az apoptotikus markerek megjelenését BALB/c egerek tímuszában, csak anti-CD3, csak DX és kombinált anti-CD3 + DX kezelés után 24 órával. Mindhárom kezelés hatására mind a korai, mind a késői apoptotikus sejtek aránya megnőtt a kontrol mintákhoz képest (**28. ábra**).



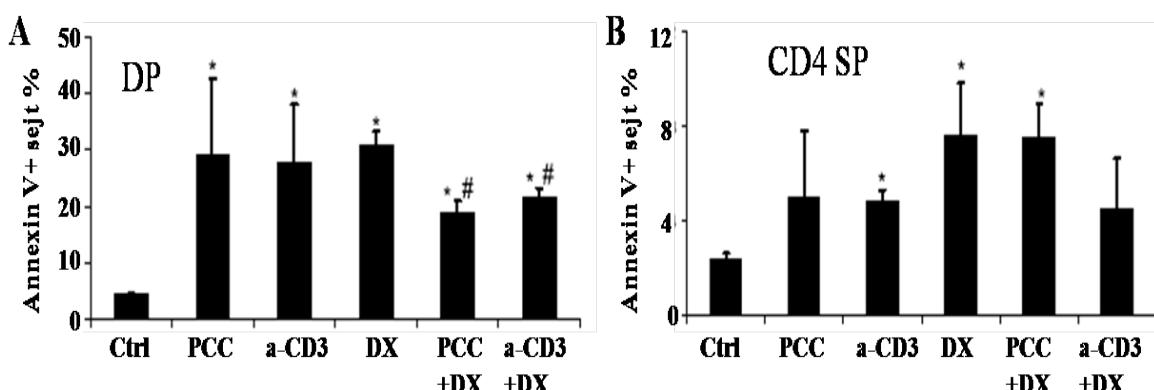
28. ábra: Egyszeri 0,2 mg/kg dózisú DX, anti-CD3 és kombinált *in vivo* kezelés hatása BALB/c egerek timocitáinak apoptózisára.

A csak DX (28% korai, 22% késői) illetve csak anti-CD3 kezelés hatására megfigyelhető apoptotikus sejtarányokhoz (21% korai, 18% késői) viszonyítva a kombinált kezelés hatására

kisebb mértékű apoptózist találtunk (7% korai, 17% késői apoptotikus sejt). Tehát a kombinált kezelés együtt kivédte a DX, illetve az anti-CD3 antitest apoptózist indukáló hatását. Ez a két jelátviteli út összekapcsolódását jelzi, mely megfelel a kölcsönös antagonizmus modellnek.

5.3.5. ANTIGÉN ÉS DX EGYÜTTES HATÁSA TcR TRANSZGENIKUS EGÉR TIMOCITÁINAK KORAI APOPTOTIKUS FOLYAMATAIRÁ

A GC és TcR aktiváció apoptózist kiváltó hatását vizsgáltuk az AND TcR transzgenikus egérmodellünkön is. *In vivo* nagy dózisú (10,0 mg/kg) DX kezelés mellett önállóan és kombinációban anti-CD3 és PCC kezelést alkalmaztunk az egereknél a fentebb már említett protokollnak megfelelően. Eredményeink értékelésénél csak az Annexin V pozitivitást vizsgáltuk az AND transzgenikus egér két legnagyobb timocita csoportjában, a DP és CD4 SP populációban.



29. ábra: TcR aktiváció és DX kezelés együttes hatása a DP és CD4 SP timociták apoptózisára.

Az oszlopdiagramok az átlagos Annexin V pozitív sejtek arányát \pm S.D. mutatják *in vivo* PCC, anti-CD3, DX, illetve kombinált kezelések után a DP (A) és a CD4 SP (B) populációban. Az eredmények három független kísérletből számított értékek. * $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva, # $p < 0,05$ a magas (10,0 mg/kg) dózisú DX kezeléshez viszonyítva. Boldízsár F. et al. *Immunology Letters*, 2003.

A kezeletlen AND TcR-TG egerek tímuszában a DP timociták $4.45 \pm 0.64\%$ -a korai apoptotikus (Annexin-V pozitív), amely arány szignifikánsan megnőtt mind a PCC antigén ($29.18 \pm 13.37\%$), mind az anti-CD3 ($27.63 \pm 10.28\%$) és a 10,0 mg/kg DX kezelés után ($30.76 \pm 2.38\%$). A kombinációs kezelések bizonyos mértékig kivédték a GC és TcR aktiváció okozta apoptózist, amely ugyan kontrollhoz képest szintén szignifikánsan magasabb volt, de az önálló kezelésekhez viszonyítva csökkent: DX + PCC ($18.86 \pm 2.05\%$) illetve a DX + anti-CD3 antitest együttes adagolására ($21.59 \pm 1.66\%$) volt (29. ábra A).

Az érett CD4 SP sejtek $2.38 \pm 0.26\%$ -a volt Annexin V pozitív a kontroll, kezeletlen TcR transzgenikus AND egértörzsben. Szignifikánsan magasabb arányú Annexin V pozitív CD4 SP sejtet találtunk DX ($7.56 \pm 2.25\%$) és kombinált PCC és DX ($7.47 \pm 1.42\%$) kezelés után. Kevésbé emelkedett a korai apoptotikus CD4 SP sejtek aránya anti-CD3 ($4.85 \pm 0.43\%$) és

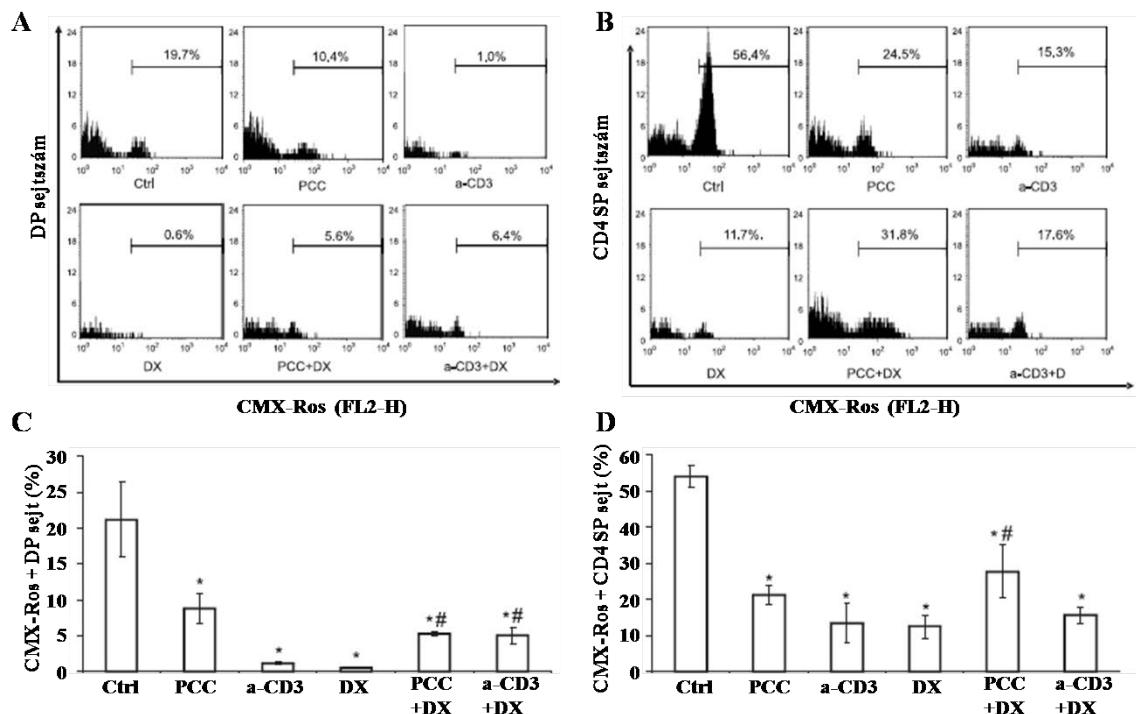
PCC antigén ($5.00 \pm 2.77\%$) kezelések hatására, illetve anti-CD3 és DX kombinált kezelés után ($4.49 \pm 2.13\%$) (**29. ábra B**).

Tehát a TcR transzgenikus AND egértörzsben a TcR aktiváció és GC hatás együttesen kivédte egymás apoptotikus hatását a DP timocitákban, ami alátámasztja a DP túlélésének kettős antagonizmus modelljét.

5.3.6. ANTIGÉN ÉS DX EGYÜTTES HATÁSA A TIMOCITÁK KÉSŐI APOPTOTIKUS FOLYAMATAIRA

A mitokondriumok funkciójában bekövetkező változások az intrinsic apoptózis útvonal folyamatában egy olyan pontot jelentenek, ahonnan már irreverzibilissé válik a folyamat. A mitokondriumok funkcionális aktivitásának vizsgálatára jól alkalmazható a CMX-Ros festék, melyet az intakt mitokondriumok fluoreszkáló molekulává alakítják (Poot M., 1996). Az AND TcR transzgenikus egértörzsben az előző pontban említett kezelések után vizsgáltuk a DP és CD4 SP timociták mitokondriális funkcióját.

A kezelések után CMX-Ros festékkel inkubálva az állatok timocitáit, azt találtuk, hogy a kontroll állatokban $21.18 \pm 5.2\%$ DP timocita volt CMX-Ros pozitív (intakt mitokondriummal rendelkező). Ehhez viszonyítva minden kezelés szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette az intakt mitokondriális membrán potenciállal rendelkező sejtek arányát. A legkevesebb funkcionáló mitokondriummal rendelkező DP sejtet az anti-CD3 ($1.11 \pm 0.21\%$) és a $10,0 \text{ mg/kg}$ dózisú DX kezelés ($0.55 \pm 0.11\%$) után találtunk. Kombinált kezelések hatására (PCC+DX: 5.3 ± 0.2 ; a-CD3+DX: $5.0 \pm 1.1\%$ DP sejt) növekedett az intakt mitokondriummal rendelkező DP sejtek aránya (**30. ábra A, C**).

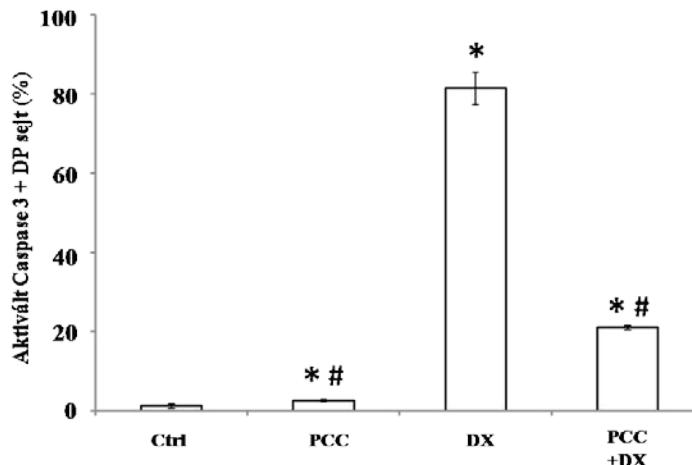


30. ábra: Mitokondriális funkció vizsgálata AND egér timocitáiban antigén, DX vagy kombinált kezelések hatására.

Az áramlási citometriás hisztogramok a DP (A) és a CD4 SP (B) timociták CMX-Ros fluoreszcencia intenzitását mutatják. minden diagramon feltűntettük az intakt mitokondriummal bíró timociták arányát. Az oszlopok a magas CMX-Ros fluoreszcencia intenzitású (intakt mitokondriummal rendelkező) timociták átlagos arányát mutatják a DP (C) és a CD4 SP (D) populációkban. Az eredmények három független kísérletből számított értékek. A két populációban különböző skáláról az y tengely! * p < 0,5 a kontrollhoz viszonyítva, # p < 0,05 a magas dózisú DX kezeléshez viszonyítva.

A CD4 SP sejtpopulációban minden kezelés szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette az intakt mitokondriális membrán potenciállal rendelkező sejtek arányát a kezeletlen kontrollhoz ($54 \pm 3\% \text{ CD4 SP sejt}$) viszonyítva. PCC kezelés után $21,2 \pm 2,7\%$, anti-CD3 kezelés után $13.5 \pm 5.6\%$, $10,0 \text{ mg/kg}$ dózisú DX kezelés után pedig $12.1 \pm 3.2\%$ volt az intakt mitokondriummal bíró, érett sejtek aránya. A PCC + DX kombinált kezelés szignifikáns mértékben tudta kivédeni a DX kezelés mitokondrium károsító hatását ($27.7 \pm 7.4\%$), míg az anti-CD3 adásának nem volt ilyen mértékű a védő hatása a DX kezeléssel kombinálva a CD4 SP sejteknél ($15.6 \pm 2.3\%$) (**30. ábra B, D**).

Az apoptózis effektor fázisát jelzi az aktivált Caspase-3 megjelenése, melyet FITC-el konjugált, csak a hasítás után kialakuló formára specifikus monoklonális antitesttel vizsgáltuk áramlási citometriával. Az AND TcR transzgenikus egérmóddalon *in vivo* antigén (PCC) és DX valamint kombinált kezelések után 24 órával. CD4/CD8 sejtfelszíni jelölésekkel csak a DP populációban található aktivált Caspase-3 szintet határoztuk meg.



31. ábra: Caspase-3 aktiváció AND TcR transzgenikus egér DP sejtjeiben PCC, 10,0 mg/kg dózisú DX és kombinált kezelés után.

Az oszlopok három független kísérletből számolt átlagos Caspase-3 pozitív DP sejtek arányát és S.D. értékeit mutatják. * $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva, # $p < 0,05$ a 10,0 mg/kg dózisú DX kezeléshez viszonyítva Pálinkás L. et al. Immunobiology 2008..

Kontroll DP timociták $1,31 \pm 0,55$ %-ban találtunk aktivált Caspase-3 fehérjét. PCC kezelés hatására $2,59 \pm 0,25$, % volt a pozitív sejtek aránya, amely nem volt szignifikáns növekedés. 10,0 mg/kg DX kezelés hatására az aktív Caspase-3 pozitív sejtek aránya szignifikánsan nőt ($81,46 \pm 4,12\%$), míg a kombinált PCC és DX kezelés esetében mind a kontroll állapothoz képest ugyan szignifikánsan nőtt, de a DX kezeléshez képest szignifikánsan alacsonyabb arányú aktivált Caspase-3 pozitív DP sejtarányt kaptunk ($21,08 \pm 0,54\%$). Tehát a kombinált PCC és DX kezelés megakadályozta a DX kezelés Caspase-3 aktiváló, azaz apoptózist indukáló hatását. (31. ábra).

Nem mutatjuk ábrán, de vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a kombinált kezelés, vagyis a sejtek GC és TcR jelátviteli útvonalon történő aktivációja növeli a sejtek CD69 expresszióját (Berki et al. 2002) és a Bcl-2 pozitív DP és CD4 SP sejtek arányát és abszolút számát is (Pálinkás et al. 2008), vagyis a kettős szignál hatására aktiválódnak a sejtek és növekszik a túlélő sejtek aránya és azok Bcl-2 upreguláció révén kerülnek ki az apoptózist.

5.4. A GR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A TIMOCITA APOPTÓZISBAN

Az egyes timocita alcsoportok eltérő GC érzékenységének hátterét kutatva elsőként kívánccsíak voltunk az egyes timocita alcsoportokban található GR fehérje expresszió mértékére, mivel az összefüggésbe hozható a sejtek GC hormon érzékenységével.

5.4.1. AZ INTÉZETBEN ELŐÁLLÍTOTT ANTI-GR MONOKLONÁLIS ANTITESTEK JELLEMZÉSE

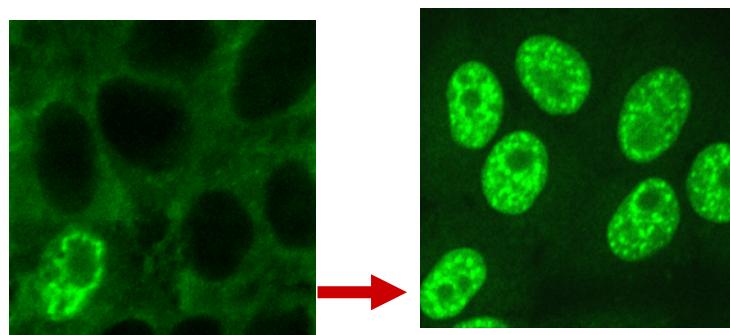
Intracelluláris GR jelölésekhez a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben kifejlesztett anti-GR monoklonális antitesteket használtunk (Berki et al., 1998), melyek a receptor

regulátoros doménjében elhelyezkedő a GR-re jellemző és más szteroid receptorben nem szereplő 26 aminosav hosszúságú szekvenciában elhelyezkedő epitópokat ismerik fel (APTEK 26). A használt IgG1 izotípusú klónok (8E9 és 5E4) mind a ligand kötött, mind a szabad receptort képesek felismerni a citoplazmában és sejtmagban egyaránt (**6. táblázat**, **32. ábra**).

6. táblázat: Az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben előállított monoklonális ellenanyagok jellemzése

anti-GR mAb klón	ELISA APTEK26	ELISA NP1-BSA	ELISA NP2-BSA	Western blot	Immun citokémia	Áramlási citometria	Izotípus
8E9	+++	-	++	+	+	+	IgG1
5E4	+++	-	-	+	++	+++	IgG1
3C8	++	+	+	+	++	++	IgM

Berki et al. JIM 1998.



32. ábra: Az anti-GR-FITC 8E9 ellenanyag reakciója a citoplazmatikus és sejtmagi GR-al.

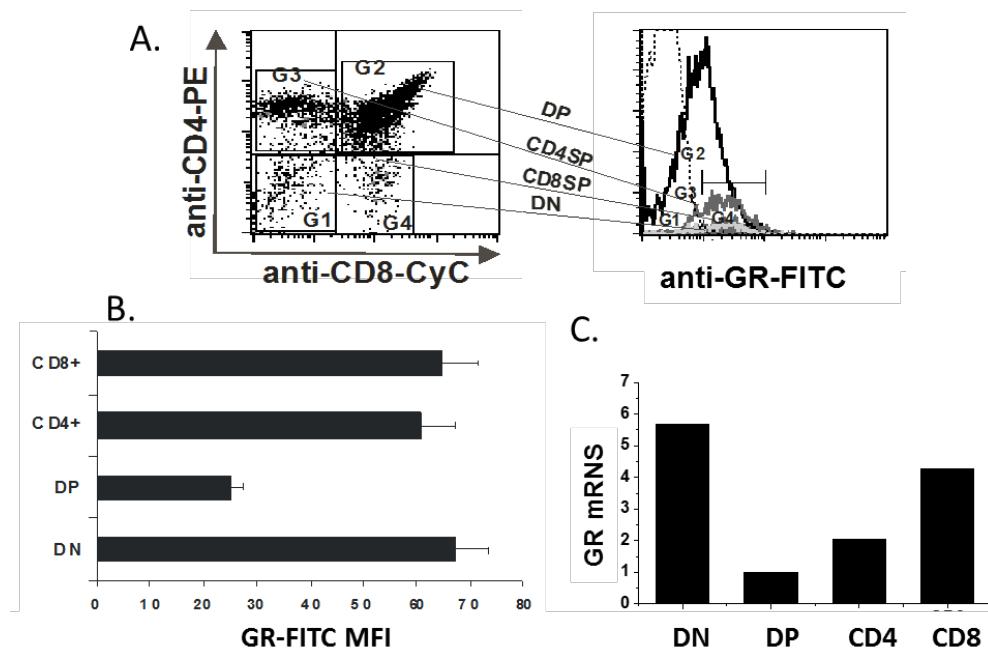
Az első kép a kezeletlen, a második 30 percig DX-al kezelt (piros nyíl) HEPG-2 sejtek GR jelölődését mutatják (Berki et al. JIM 1998.)

5.4.2. GR EXPRESSZIÓ A KÜLÖNBÖZŐ TIMOCITA ALCSOPORTOKBAN

Sejtfelszíni és intracelluláris jelöléssel előzetes szeparálás nélkül tudtuk a négy különböző érettségű timocita alcsoporthoz (DN, DP, CD4 és CD8 SP) GR expresszióját vizsgálni áramlási citométerrel. Ehhez sejtfelszíni anti-CD4-PE és anti-CD8-CyChr, valamint intracelluláris anti-GR-FITC jelölést végeztünk. A sejteket áramlási citométer segítségével analizáltuk: a sejtfelszíni jelölésekkel azonosított egyes timocita alcsoporthoz az FL-1 fluoreszcencia intenzitásból határozott meg az átlagos GR expressziót.

A GR expresszió RT-PCR vizsgálatát FACS Vantage készülékkel szeparált a CD4/CD8 jelöléssel elkülönített DN, DP és CD4 ill. CD8 SP 98%-nál nagyobb tisztaságú timocita alcsoporthoz végeztük.

Eredményeink szerint fiatal (3-4 hetes) BALB/c egerek timocita alcsoporthoz eltérő mértékben expresszálódik a GR (**33. ábra**). Az érett CD4 SP sejtek mérsékelten kevesebb GR-t találtunk, mint a CD8 SP sejtekben, melyet alátámasztanak humán perifériás vér mintán elvégzett vizsgálataink eredményei is (nem ábrázolt eredmény).



33. ábra: GR expresszió BALB/c egér timocita alcsoporthajban. (A, B)

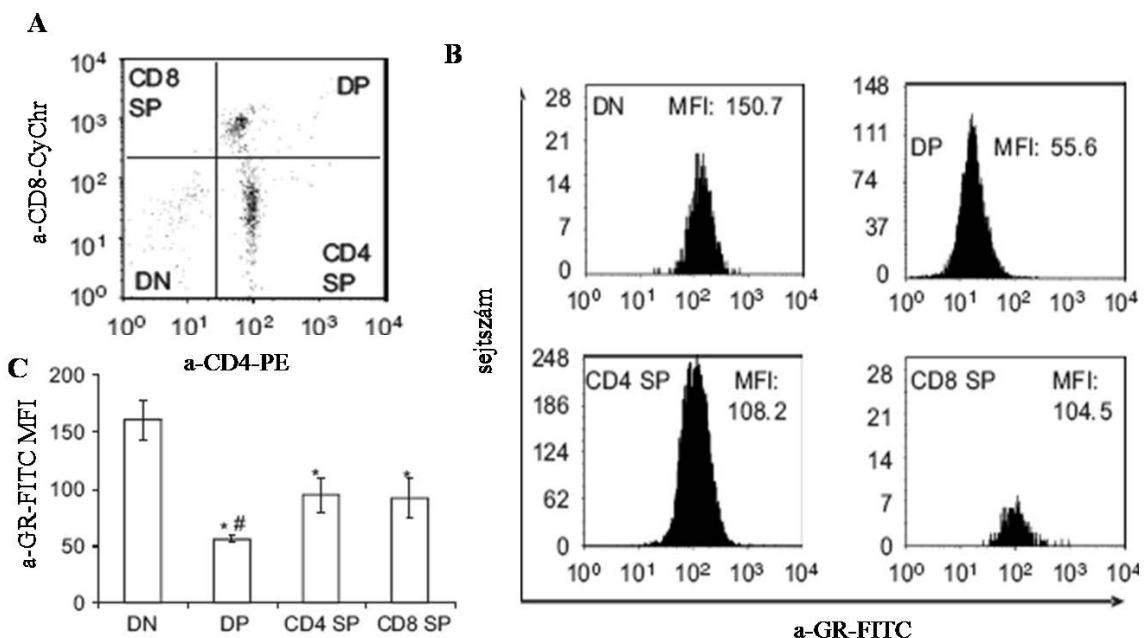
Áramlási citometriás anti-GR-FITC jelöléssel a 4 timocita alcsoporthoz vizsgáltuk a GR átlagos fluoreszcencia intenzitását, amely arányos a GR fehérje mennyiségével, (C) mRNS szinten az egyes timocita alcsoporthoz szeparálását követően határoztuk meg a GR expressziót. A GR MFI értékek három független kísérlet átlagát jelentik. * $p < 0,05$, míg az RT-PCR egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja.

A CD4+CD8+ (DP) timociták a többi populációhoz képest szignifikánsan alacsonyabb mértekben expresszálják a GR-t (**33. A és B ábra**). Azonos eredményeket kaptunk RT-PCR mérésekkel is a GR mRNS szintű expresszióját vizsgálva (**33.C. ábra**).

5.4.3. AND TRANSZGENIKUS EGÉR TIMOCITA ALCSOPORTJAINAK GR EXPRESSZIÓJA

AND TcR transzgenikus egérmodellen is vizsgáltuk a GR expressziót a különböző timocita alcsoporthoz intracelluláris jelölést követő áramlási citometriás analízis segítségével.

A BALB/c egérmodellen kapott eredményeinkhez hasonlóan a DN sejtekben volt a legmagasabb ($160,5 \pm 17,7$ MFI), míg a DP sejtekben a legalacsonyabb ($55,9 \pm 2,8$ MFI) a GR expresszió. A BALB/c egerekhez képest azonban a transzgenikus AND egerek érett timocitái az éretlen DN sejtekhez képest szignifikánsan kevesebb GR-t expresszáltak (CD4 SP sejtek: $94,6 \pm 15,1$ MFI, CD8 SP sejtek: $91,8 \pm 17,2$ MFI) (**34. ábra**).



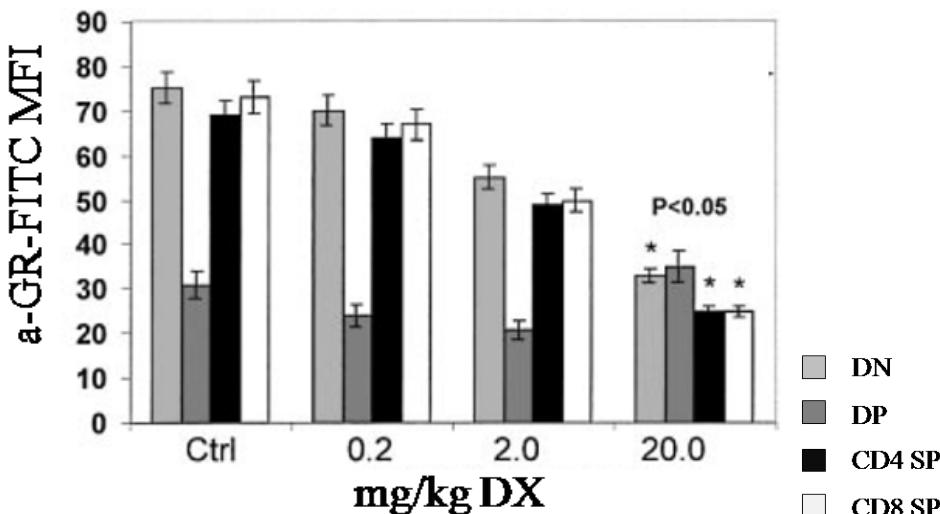
34. ábra: GR expresszió AND transzgenikus egér timocita alcsoporthajban.

(A) A négy fő timocita alcsoporthoz megoszlása kezeletlen AND egér tímuszában. (B) Az áramlási citometriás hisztogramok az egyes alcsoporthoz megfigyelhető anti-GR-FITC átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) mutatják. Az egyes hisztogramokon feltűntetettük a három függetlenül elvégzett kísérlet egy reprezentatív eredményét. (C) Az oszlopok három független kísérlet eredményeiből számolt átlagos GCR expressziót (MFI) ± S.D. mutatják az egyes timocita alcsoporthoz viszonyítva (* p < 0,05 a DN populációhoz viszonyítva; # p < 0,05 a CD4 SP és CD8 SP populációkhöz viszonyítva)

5.4.4. ISMÉTELT IN VIVO DX KEZELÉS HATÁSA A TIMOCITA ALCSOPORTOK GR EXPRESSZIÓJÁRA

A tímusz sejtes összetétele mellett az egyes timocita alcsoporthoz átlagos GR expressziója is változott a különböző dózisú *in vivo* DX kezelések hatására BALB/c egérben. A kísérleti állatokat 4 napon keresztül oltottuk 20,0, 2,0, illetve 0,2 mg/kg DX-al, majd a fent említett jelölési kombináció és áramlási citometriás analízis segítségével az egyes timocita alcsoporthoz meghatároztuk az átlagos GR expressziót.

Mint azt már bemutattuk előző kísérleteink alapján, a DX kezelés hatására nagymértékben csökkent a tímusz össz sejtszáma és az egyes populációk aránya is megváltozott. A túlélő CD4 SP, CD8 SP és DN sejtek eredetileg magasabb GR expressziója 4 napos kezelés végére dózis-függő mértékben jelentősen lecsökkent. Ugyanakkor a DP sejtekben, ahol a kiindulásnál is alacsonyabb GR expresszió mérhető az ismételt DX kezelés a túlélő DP sejtekben nem okozott szignifikáns GR expresszió változást.(35. ábra).

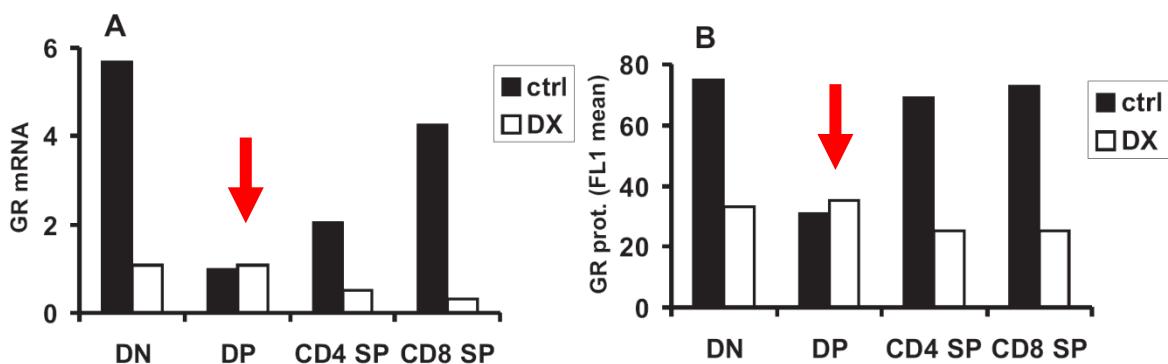


35. ábra: A GR expresszió változása timocita alcsoportokban különböző dózisú DX kezelés után 24 órával.

Szétfelszíni és intracelluláris jelöléssel meghatározott GR átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) az egyes timocita alcsoporthoz. Az értékek három független kísérlet átlag eredményei. * $p < 0,05$.

5.4.5. EGYSZERI NAGY DÓZISÚ DX KEZELÉS HATÁSA A GR EXPRESSZIÓRA

Ugyancsak vizsgáltuk egyszeri nagydózisú (20 mg/kg) *in vivo* GC kezelés után 24 órával a timocita alcsoporthoz a ligand indukálta GR expresszió változást mind fehérje, minden mRNS szinten. Az előbbihez a sejteket CD4/CD8 szétfelszíni jelölést követően intracellulárisan jelöltük anti-GR-FITC ellenanyaggal és a GR átlag fluoreszcencia intenzitásokat hasonlítottuk össze az egyes timocita alcsoporthoz. Az RT-PCR vizsgálathoz a 4 timocita sejtcsoportot CD4/CD8 jelölés alapján szeparáltuk FACS Vantage sejt sorterrel és az így kapott sejtekből vizsgáltuk a GR mRNS mennyiséget. Mind fehérje, minden RNS szinten vizsgálva jól megfigyelhető a DN és CD4/CD8 SP sejtekben a GR ligand indukálta homológ downregulációja, míg a DP sejtekben ez hiányzik (36. ábra).



36. ábra: A GR expresszió változása timocita alcsoporthoz nagydózisú DX kezelés után 24 órával. (A)

Szepárolt timocita alcsoporthoz GR mRNS expressziója. **(B)** Szétfelszíni és intracelluláris jelöléssel meghatározott GR átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) az egyes timocita alcsoporthoz. Az értékek három független kísérlet egy reprezentatív eredményét ábrázolják.

Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a tímuszban található DP timociták a lokális GC termelő cTEC sejtek környezetében differenciálódnak. Feltételezhető, hogy ez az oka, hogy a többi timocita sejtcsoportoz képest bennük a legalacsonyabb a GR expresszió, mégis ebben differenciálódási stádiumban érzékenyebbek a GC indukált apoptózisra (Berki T., 2002). Ezt erősíti azon megfigyelésünk is, hogy ebben a sejtcsoportban magas a Dig2 (DX-indukált gén) és alacsony a Bcl-2 expressziója (Boldizsár F.. 2006) (Eredményeket nem mutatjuk).

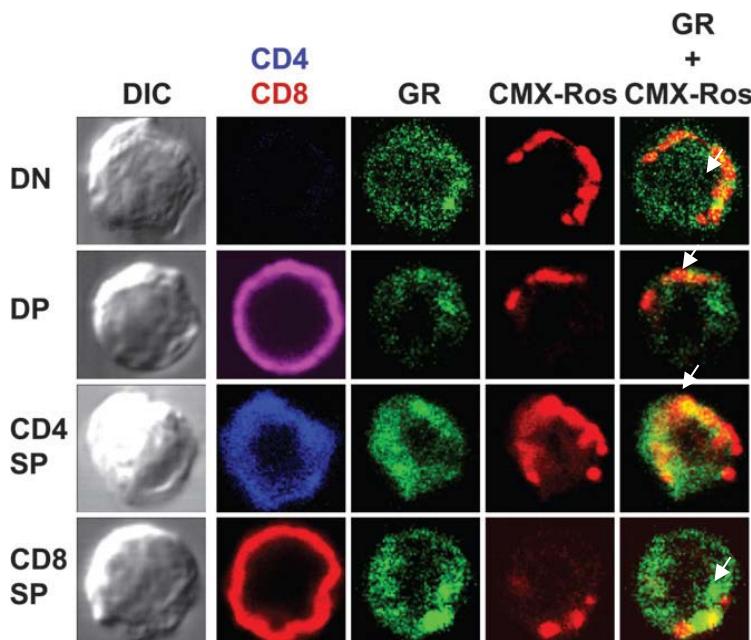
II. A DP TIMOCITÁK GR JELÁTVITELI ÚTVONALA ÉS APOPTÓZIS MECHANIZMUSA

5.5. A GR LIGAND INDUKÁLT LOKALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA DP SEJTEKBEN

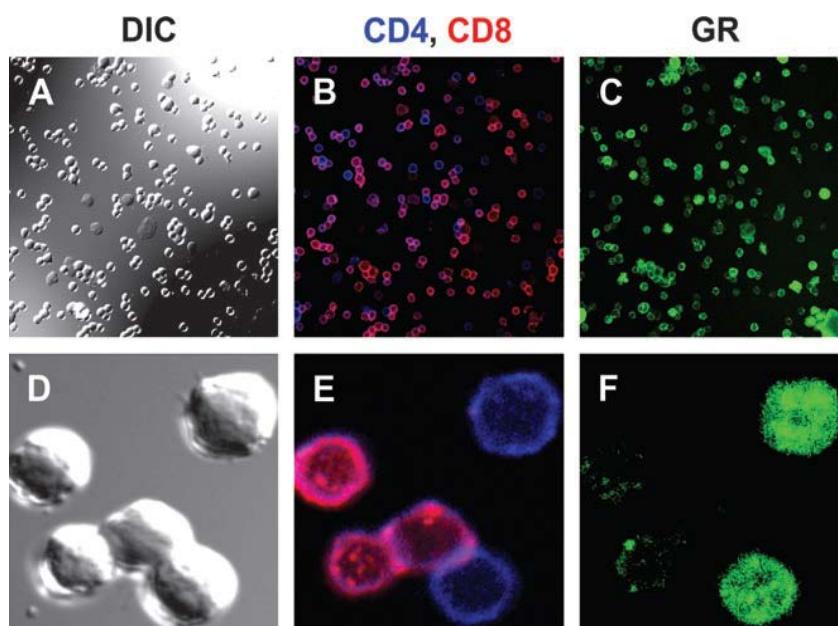
Korábbi munkánk során flow cytometriás mérésekkel és kvantitatív PCR-al is igazoltuk, hogy a DP-sejtek expresszálják a GR-t a legalacsonyabb szinten, ami látszólag ellentmondásban van nagy GC érzékenységükkel. A GC indukált GR downreguláció hiánya ebben a sejtcsoportban, valamint a GR antagonistá hatásának az elmaradása a DP timocita apoptózisában ugyancsak felveti a GC nem-genomikus hatásmechanizmusát ezeken a sejteken. Ezért első-ként vizsgálni kívántuk a GR szubcelluláris megoszlását a DP sejtekben.

5.5.1. A GR SEJTEN BELÜLI ELOSZLÁSÁNAK/MORFOLÓGIÁJÁNAK JELLEMZÉSE A TIMOCITA ALCSOPORTOKON KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIÁVAL

A GR intracelluláris eloszlásának vizsgálatához a CD4/CD8 sejtfelszíni jelöléssel elkülönített négy timocita alcsoportban elsőként a GR-FITC és CMX-ROS mitokondriális festődését vizsgáltuk (**37. ábra**). Áramlási cytometriával, valamint RT-PCR-ral kapott eredményeinkhez hasonlóan, a konfokális mikroszkópos vizsgálattal is megerősíthetjük, hogy a DP-sejtekben (magenta) expresszálódik a legkevesebb GR az éretlen DN és az érett CD4 (kék), valamint a CD8⁺ SP (vörös) sejtekhez viszonyítva. Emellett eltérő festődési mintázatot is találtunk. Összehasonlítottuk a két legnagyobb timocita alcsoport, a DP-sejtek (70-80%) (magenta) és a CD4⁺ SP-sejtek (10-15%) (kék) GR expressziójának morfológiáját is (**38. ábra**). Az ábra **E** és **F** részén látható, hogy a DP sejtek sokkal kevesebb GR-t tartalmaznak, mint a CD4⁺ SP-sejtek, valamint a DP-sejtekben a GR eloszlása granulárisabb, a CD4⁺ SP-sejtekében pedig homogénebb. A DP-sejtek granulárisabb jellegű festődési mintázata utalhat arra, hogy a GR ezekben a sejtekben mitokondriális elhelyezkedésű lehet. A CMX-Ros mitokondriális festék és a GR közötti átfedést minden a 4 timocita alcsoportban megvizsgáltuk és minden sejtcsoportban találtunk bizonyos szintű kolokalizációt (**37. ábra**).



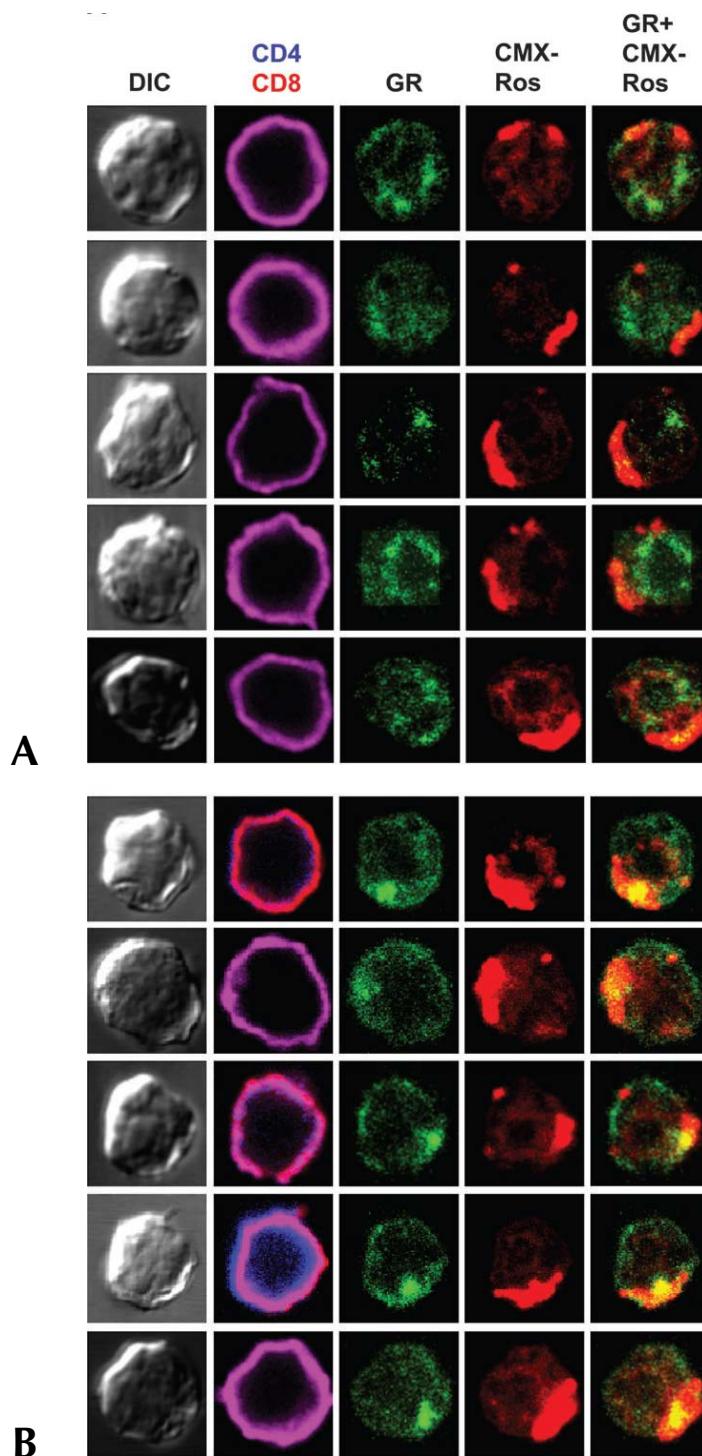
37. ábra: A négy timocita alcsoporthoz - DIC (differenciál interferencia kontraszt), CD4 és CD8 sejtfelszíni festődés alapján DN, DP (magenta), CD4 SP (kék), CD8 SP (piros) GR expressziója (zöld) és CMX-Ros festődése (narancs), illetve az összegzett képeken (5. oszlop paneljei) a CMX-Ros – GR kolokalizáció látható, amely sárga színnel ábrázolódik (fehér nyilakkal jelöltük). Talabér et al. *Int Immunol.* 2009.



38. ábra. DP és CD4 SP sejtek GR-expressziójának morfológiai jellemzése konfokális mikroszkópiával.

Egy látótér átnézeti képe (A-C), melyből reprezentatív sejteket ábrázoltunk (D-F). A magenta színű DP (E) sejtekben összehasonlíthatóan kevesebb a GR expresszió (F), mint a kékkel ábrázolódó CD4 SP sejtekben, valamint bennük homogénebb mintázat figyelhető meg.

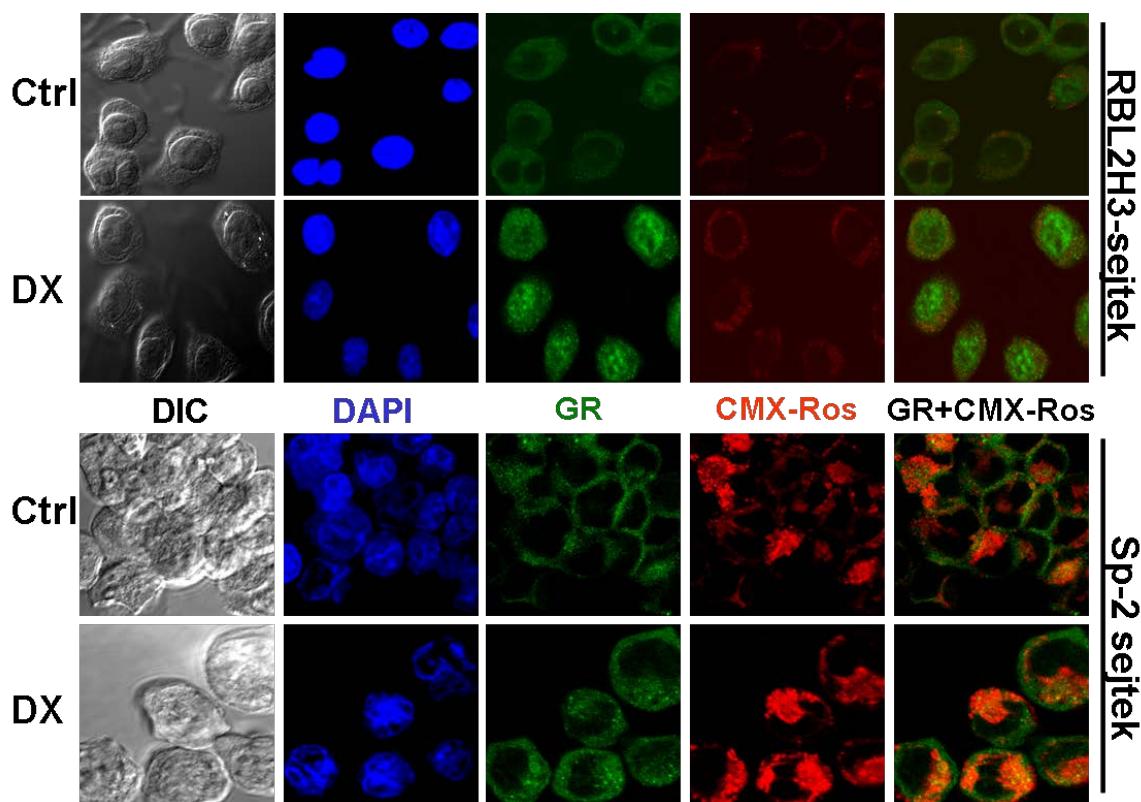
5.5.2. DP SEJTEKBEN RÖVID IDEJŰ DX KEZELÉS HATÁSÁRA A GR A MITOKONDRIUMBA TRANSZLOKÁLÓDIK



38. ábra: DP-sejtek GR és CMX-Ros kolokalizációja kezelés nélkül (A) és *in vitro* DX kezelés után (B).

5 kontroll és 5 DX-kezelt reprezentatív DP sejtet ábrázoltunk. A GR DX-kezelés hatására a mitokondriumba transzlokálódik, azonban a magban nem jelenik meg DP sejtekben. A GR-mitokondrium kolokalizáció sárga színnel ábrázolódik (fehér nyilakkal jelöltük). Talabér et al. Int. Immunol. 2009.

A DP sejtekben tovább analizáltuk a CMX-Ros és a GR közötti morfológiai kapcsolatot és érdekes módon azt találtuk, hogy *in vitro* 30 perces DX kezelés hatására a GR főleg a mitokondriumba, nem pedig a sejtmagba transzlokálódott (**38. ábra**). Az ábrán 5 kontroll (A) és 5 DX-kezelt (B) DP-sejtről készített felvétel látható. A CMX-Ros és GR kolokalizált területeket sárga szín jelzi.



39. ábra: A GR magi és mitokondriális transzlokációjának vizsgálata RBL2H3- és Sp2-sejtekben.

Az RBL2H3-sejtekben már 10 perc után megfigyelhető volt a GR magi transzlokációja néhány sejtből (nem ábrázoltuk), amely 30 perc után a sejtek közel 100 %-ában látható volt. Az Sp-2 sejtekben a GR 30 perc után sem transzlokálódott a sejtmagba. A sejteket morfológiai kontrollként használtuk.

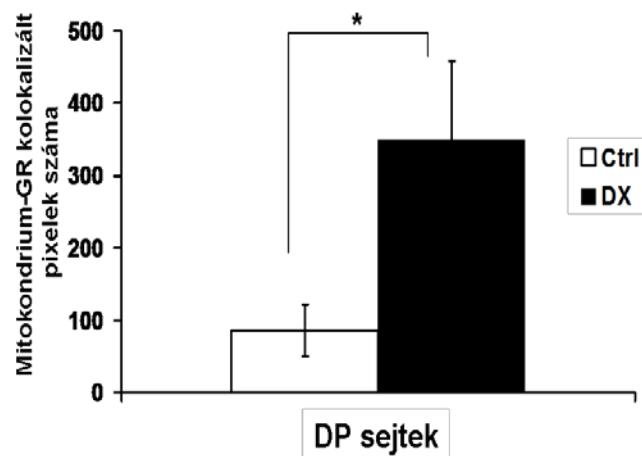
Mivel a GR a DP-sejtekben nem transzlokálódott a sejtmagba, ezért morfológiai (és mód-szertani) kontrollként ugyanazon protokoll szerint elvégeztük a jelöléseket két sejtvonalon is: Sp-2 egér myeloma- és RBL2H3-patkány leukémia sejtvonalakon (**39. ábra**). Az Sp-2 sejtvonalban a GR nem transzlokálódott a magba 30 perces DX-kezelés hatására. Az RBL2H3-sejtvonalban a GR már 10 perces DX exposíció után a sejtmagba transzlokálódott, ez 30 perces exposíció után már teljes volt, tehát módszerünk alkalmas a GR transzlokáció szubcelluláris morfológiai vizsgálatára.

5.5.3. A GR MITOKONDRIÁLIS TRANSZLOKÁCIÓJÁNAK KVANTIFIKÁLÁSA DP SEJTEKBEN

Ahhoz, hogy a GR mitokondriális transzlokációjának változását kvantitatív módon követni tudjuk, több látótérben véletlenszerűen kiválasztott 100 kontroll és 100 DX-kezelt DP-

sejtbén a CMX-Ros és a GR csatornában is detektálható, kolokalizált pixeleket meghatároztuk az ImageJ szoftvercsomag kolokalizációs pluginje segítségével (**40. ábra**).

Érdekes, hogy a kontroll sejtekben is megfigyelhető volt bizonyos mitokondriális GR kolokalizáció, amely valószínűleg azzal magyarázható, hogy a timociták a tímuszban egy GC-gazdag mikrokörnyezetben találhatóak, ami már *in vivo* mitokondriális GR lokalizációt eredményezhet. Egy másik lehetséges magyarázat az lehet, hogy egy GR frakció eredendően a mitokondriumban is megtalálható, mint ahogy azt egyes sejtazonalakban is leírták (Scheller K., 2000).



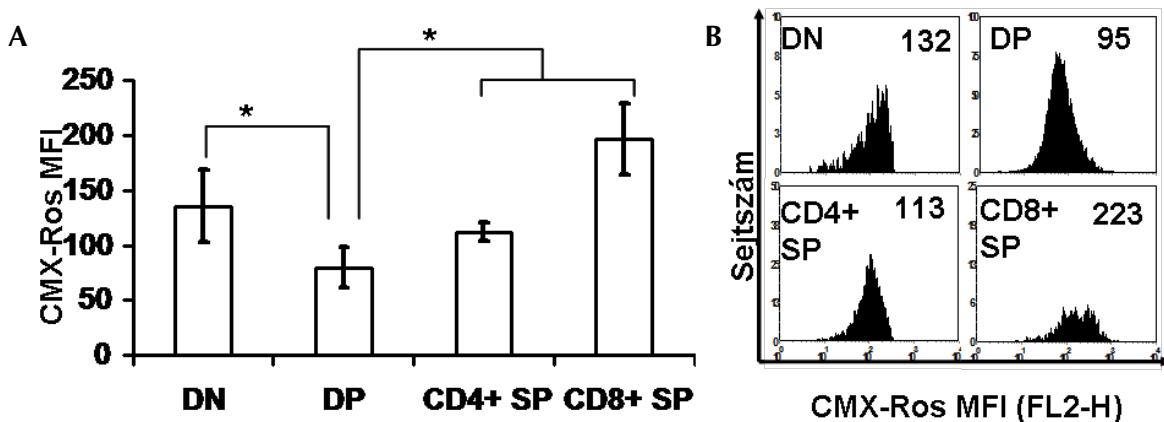
40. ábra: Az oszlopdiagramok a DP sejtekben konfokális mikroszkóppal észlelt mitokondrium (CMX-Ros) –GR kolokalizált pixelek abszolút számának átlagát \pm SD mutatják.

Az oldószerrel kezelt sejtekben is találtunk alapszintű kolokalizációt, amely *in vitro* DX kezelés hatására szignifikánsan nőtt (*, $p<0,05$) Talabér G., et al. 2008.

5.5.4. A TIMOCITA ALCSOPORTOK MITOKONDRIÁLIS FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA CMX-ROS FESTÉSSEL

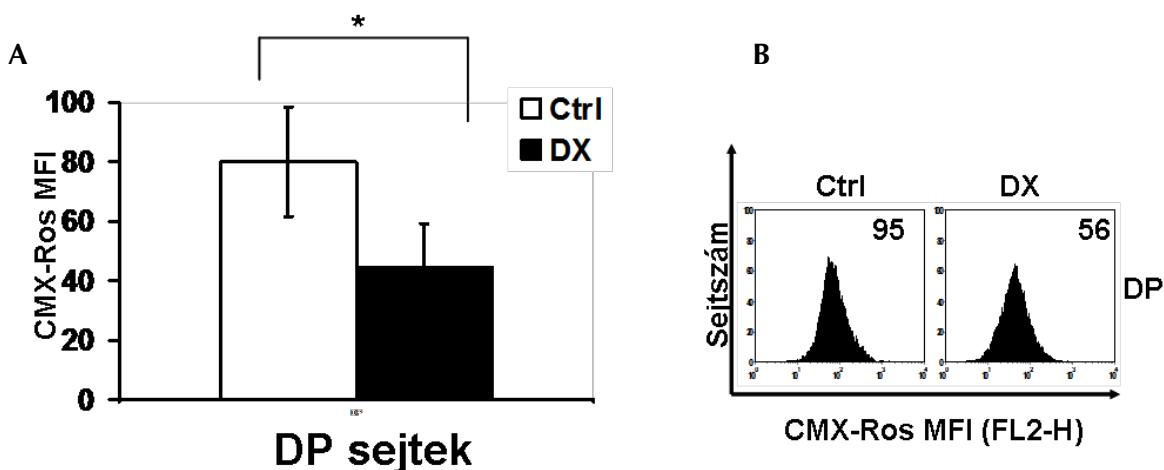
A CMX-Ros áramlási cytometriás mérésre is használható, hiszen a fluoreszcencia intenzitás (MFI) a mitokondriális membránpotenciáltól függ. Sejtelszíni jelölésekkel kombinálva meghatároztuk az egyes timocita alcsoportokban a CMX-Ros átlag fluoreszcencia intenzitást, amely a DP sejtekben bizonyult a legalacsonyabbnak összehasonlítva a DN, valamint a CD4⁺ és a CD8⁺ SP sejtekkel (**41. ábra A és B**).

Mivel a DP sejtek a legérzékenyebbek a GC kiváltott apoptosisra, ezért vizsgáltuk a CMX-Ros MFI változásokat a DP-sejtekben DX hatására (**42. ábra A és B**). Harminc perc DX-kezelés hatására szignifikáns CMX-Ros MFI csökkenést tapasztaltunk a DP-sejtekben, ami valószínűleg a mitokondriális funkció romlásának egyik korai indikátora.



41. ábra: Timocita alcsoportok CMX-Ros jelölődése.

A timocita alcsoportok közül a DP sejtekben a legalacsonyabb a CMX-Ros átlag fluoreszcencia intenzitás (MFI) az éretlen DN és az érett CD4⁺ SP és CD8⁺ SP sejtekéhez viszonyítva. Az oszlopdiagramok az A panelen 3 független kísérlet átlagát ± szórását mutatják, a szignifikáns különbségeket *-gal jelöltük ($p<0,05$). A B panelen egy-egy kísérlet reprezentatív hisztogramjai a timocita alcsoportok CMX-Ros jelölődését mutatják.



42. ábra: A DP sejtekben 30 perces *in vitro* DX kezelés hatására csökken a CMX-Ros átlag fluoreszcencia intenzitás (MFI).

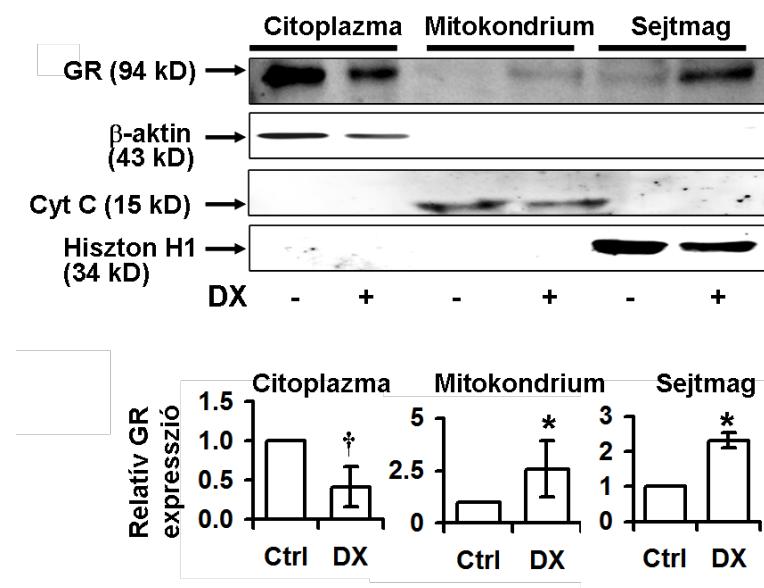
Az A panelen az oszlopdiagramok 3 kísérlet átlagát ± szórását mutatják, a B panelen pedig egy kísérlet reprezentatív hisztogramjai láthatóak. A szignifikáns különbséget csillaggal jelöltük ($p<0,05$).

5.5.5. A GR MITOKONDRIÁLIS TRANSZLOKÁCIÓJÁNAK MEGERŐSÍTÉSE SZUBCELLULÁRIS FRAKCIONÁLLÁSSAL ÉS WESTERN BLOTTAL

Ahhoz, hogy a morfológiai eredményeket Western-blottal is alátámasszuk, a timocitákból citoplazma, mitokondrium és sejtmag frakciót izoláltunk. A szubcelluláris frakcionálást elvégeztük mind teljes timocita szuszpenzióban (minden alcsoport benne van), illetve később tisztított DP-sejtekben is. 3-4 hetes BALB/c egérben a timociták kb. 80%-a DP-sejt. A szeparálatlan sejtekben DX-kezelés hatására a GR szintje a citoplazmában szignifikánsan lecsökkent, míg egy határozott frakció vált detektálhatóvá a mitokondriumban és a sejtmagban (**43. ábra**). Az erős GR-reaktivitás a sejtmagban valószínűleg azzal magyarázható, hogy a többi

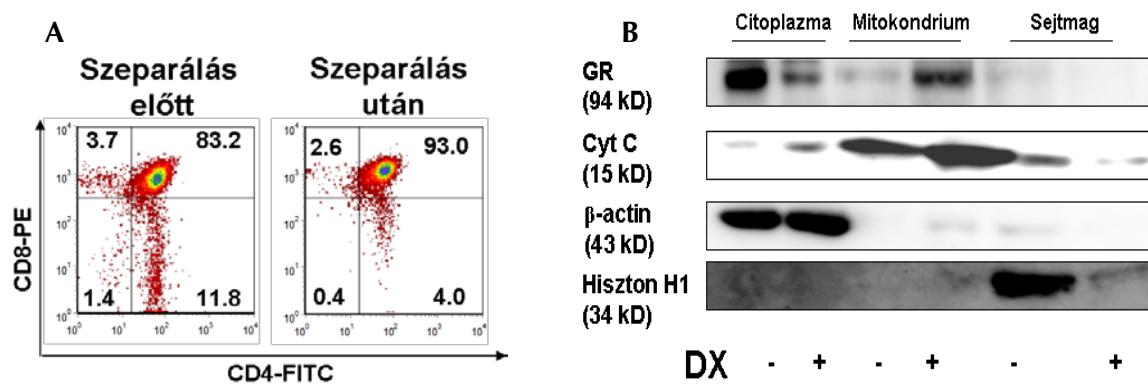
timocita alcsoporthan (DN, SP) jóval magasabb a GR-expresszió, amely szignifikánsan hozzájárulhat a kapott magi reaktivitáshoz.

A szubcelluláris frakcionálást megismételtük mágneses sejtszeparálással tisztított DP-sejtekben is a sejtek tisztaságát áramlási cytometriás méréssel ellenőriztük (**44. A. ábra**). Sikerült igazolnunk, hogy a DP sejtekben a GR valóban csak a mitokondriumba transzlokálódik, a sejtmagba nem (**44. B . ábra**).



43. ábra: A GR intracelluláris eloszlását szubcelluláris frakcionálás után Western-blottal is megvizsgáltuk teljes timocita frakcióban.

A frakciók tisztaságának ellenőrzésére, illetve töltéskontrollként a citoplazma marker β -aktint, a mitokondrium marker citokróm c-t, illetve a sejtmagi marker hiszton H1-öt alkalmaztuk. A képek egy reprezentatív Western-blotot, az oszlopdiagramok pedig a denzitometriás adatok 3 kísérlet átlag \pm szórását mutatják. A szignifikáns csökkenést †-al, a növekedést pedig *-al jelöltük.



44. ábra: A szubcelluláris frakcionálást megismételtük pozitívan szelektált DP-sejtekben.

A tisztított sejtek 93%-a volt DP-sejt (**A**), sejtfrekcionálás utáni Western-blot eredménye a **B** panelen látható. DP sejtekben DX kezelés hatására a GR csak a mitokondriumba transzlokálódott, a sejtmagba nem.

5.6. A TIMOCITÁK GC INDUKÁLT MITOKONDRIÁLIS APOPTÓZIS ÚTVONALÁNAK VIZSGÁLATA

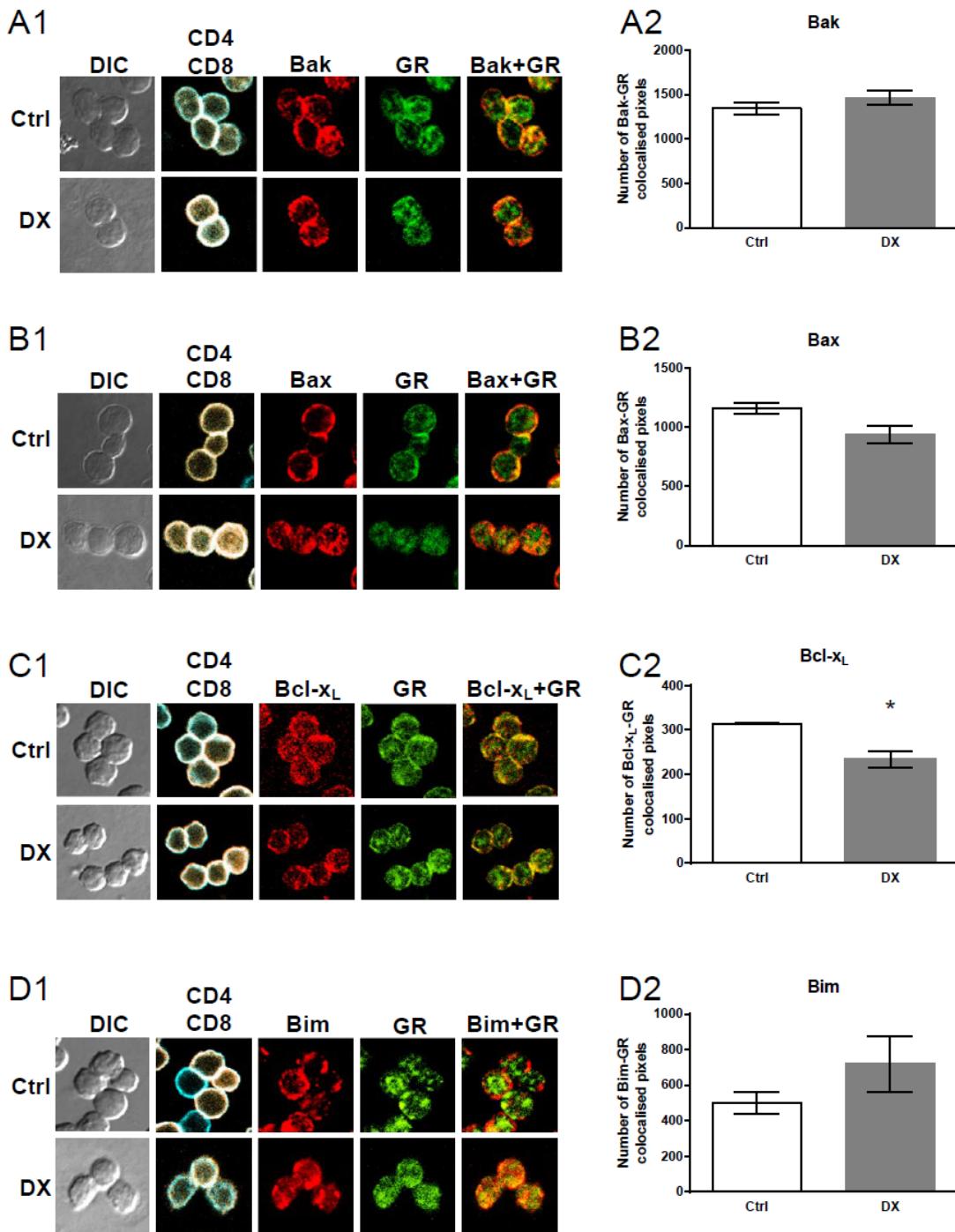
Miután több módszerrel is bizonyítottuk, hogy DP timocitákban a ligand kötés után rövid idővel a GR a mitokondriumban akkumulálódik, kíváncsiak voltunk, hogy a citoplazmatikus fehérjekomplexből felszabaduló GR kacsolódik-e a mitokondriális apoptotózis útvonal elindításáért vagy gátlásáért felelős Bcl-2 fehérjék valamelyikével, ill. vizsgálni kívántuk, hogy az apoptotikus kaszkád mely útvonalai aktiválódnak rövid idővel a DX kezelés után timocitákban?

5.6.1. A GR ASZOCIÁCIÓJA A BCL-2 FEHÉRJEC SALÁD TAGJAIVAL

Mivel feltételeztük, hogy a GR a mitokondriumban az apoptózis kaszkádot proapoptotikus fehérjéken keresztül aktiválhatja, valamint ligandkötés után citoplazmatikus partneréről, a Hsp-90 fehérjéről leválva, esetleg másik fehérjékkel kapcsolódik, ezért a további munkánkban a GR mitokondriális transzlokációja során lehetséges mitokondriális fehérje célpontként a Bcl-2 fehérjecsalád tagjai közül a Bak és a Bax proapoptotikus fehérjéket, az anti-apoptotikus Bcl-x_L és a BH3-only fehérjék közül a Bim viszonyát vizsgáltuk a GR-hez.

Elsőként megvizsgáltuk konfokális mikroszkóppal CD4/CD8 sejtfelszíni jelölt DP sejtekben a GR-FITC (zöld) és a Bak, Bax, Bim, ill. a Bcl-x_L (vörös) kolokalizáció mértékét kezeletlen és 30 percig *in vitro* DX kezelt mintákban. Mintánként 100-100 sejtből a vörös-zöld színek kolokalizált pixeljeit számoltuk és abrázoltuk oszlopdiagramon a konfokális mikroszkópos képek mellett (**45. ábra**). A DX kezelés nem okozott kolokalizáció változást a DP sejtekben GR-Bax és GR-Bak esetében. Ugyanakkor fokozódott a GR-Bim és csökkent a GR-Bcl-x_L kolokalizáció mértéke a DX kezelt mintákban.

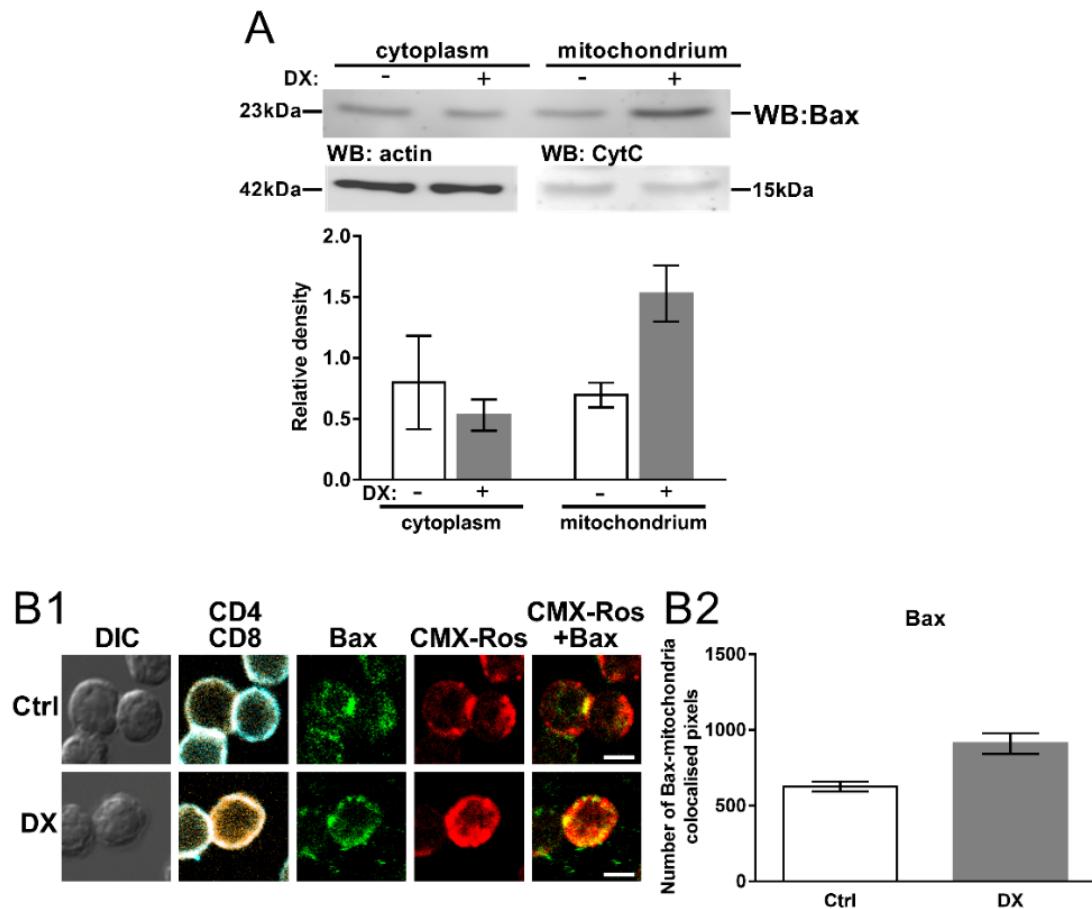
A kolokalizációval két molekula közelségét tudjuk csak vizsgálni, de nem ad információt azok valódi molekuláris interakciójáról. Ezért a továbbiakban a GR közvetlen kapcsolódását a Bcl-2 család egyes fehérjéivel immunprecipitációs kísérletekben ellenőriztük, mégpedig a timocitákból izolált citoplazma és mitokondriális sejtfrekciókban egyaránt a kontrol és 30 percig DX-al kezelt mintákban egyaránt (**47. ábra**). Az anti-GR ellenanyaggal precipitált mintákban közvetlen molekuláris asszociációt találtunk a GR és Bak, Bim és Bcl-x_L molekulákkal mind a citoplazma, mind a mitokondriális frakcióban. A 30 percig DX kezelt mintákban a GR-Bak és GR-Bcl-x_L interakció a citoplazma frakcióban növekedett, a mitokondriumban csökkent, míg a GR-Bim molekuláris interakció a mitokondriális frakcióban emelkedett. Közvetlen GR-Bax molekuláris interakció nem volt megfigyelhető a timociták szubcelluláris frakcióiban. Ugyanakkor a 30 perces DX kezelés hatására a Bax mitokondriális akkumulációját figyeltük meg a szubcelluláris frakciók western blot analizisével és konfokális mikroszkóppal egyránt, a Bax-CMX-Ros kolokalizáció emelkedésével (**46. ábra**).



45. ábra: GR és Bcl-2 család fehérjéinek, Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim kolokalizációja DP timocitákban.

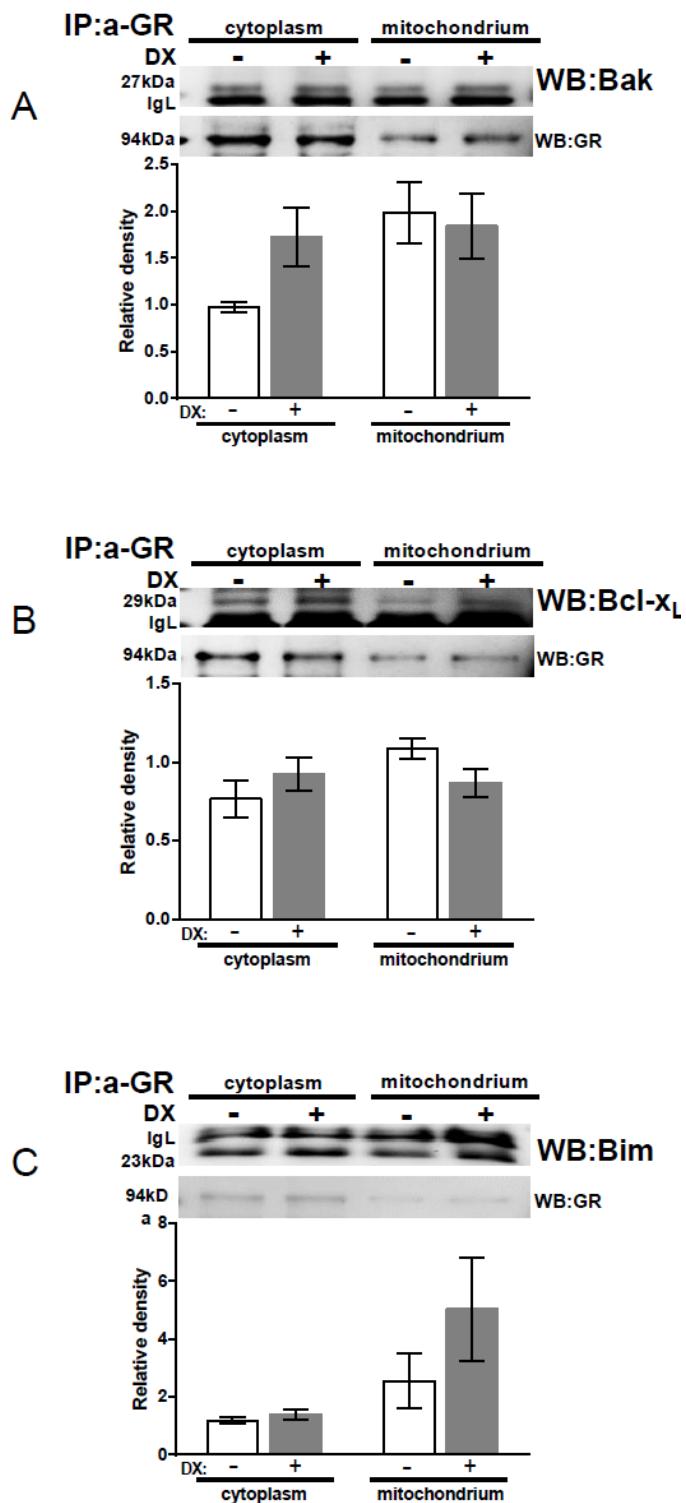
Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek 3 független kísérletből, amelyek a GR - Bak (A1), GR - Bax (B1), GR - Bcl-x_L (C1) és GR - Bim (D1) ko-lokalizációt mutatják control (ctrl) és 30 perces DX kezelt sejtekben. DIC, CD4/CD8 egymásra helyezett (kék) intracelluláris GR (zöld) és Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim (vörös) színekben. A GR (zöld) és a Bak, Bax, Bcl-x_L és Bim (piros) ko-lokalizációt sárga szín jelzi.

A kolokalizáció mértékét pixelekben a képek melletti diagramokon tüntettük föl a GR - Bak (A2), GR - Bax (B2), GR - Bcl-x_L (C2) and GR - Bim (D2) a control és DX kezelt mintákban 100 DP sejtben mért pixelek átlag \pm SEM értékeit (* $P < 0.05$). Prenek L. et al. Apoptosis 2016. közlés alatt



46. ábra: GC kezelés hatására a Bax jelentős mitokondriális akkumulációja figyelhető meg DP timocitákban.

(A), A Bax megjelenése a citoplazma és mitokondriális frakcióban DX kezeléssel és anélkül. A relatív denzitásokat aktin és citokróm C -hez normalizáltuk. (B1, B2) A DX kezelés hatására fokozódik a Bax - CMX-Ros (mitokondriális) kolokalizáció. Prenek L. et al. Apoptosis 2016. közlés alatt



47. ábra: A GR és a Bcl-2 fehérje család tagjainak asszociációja timociták citoplazma és mitokondriális frakcióiban kontrol és DX kezelt mintákban.

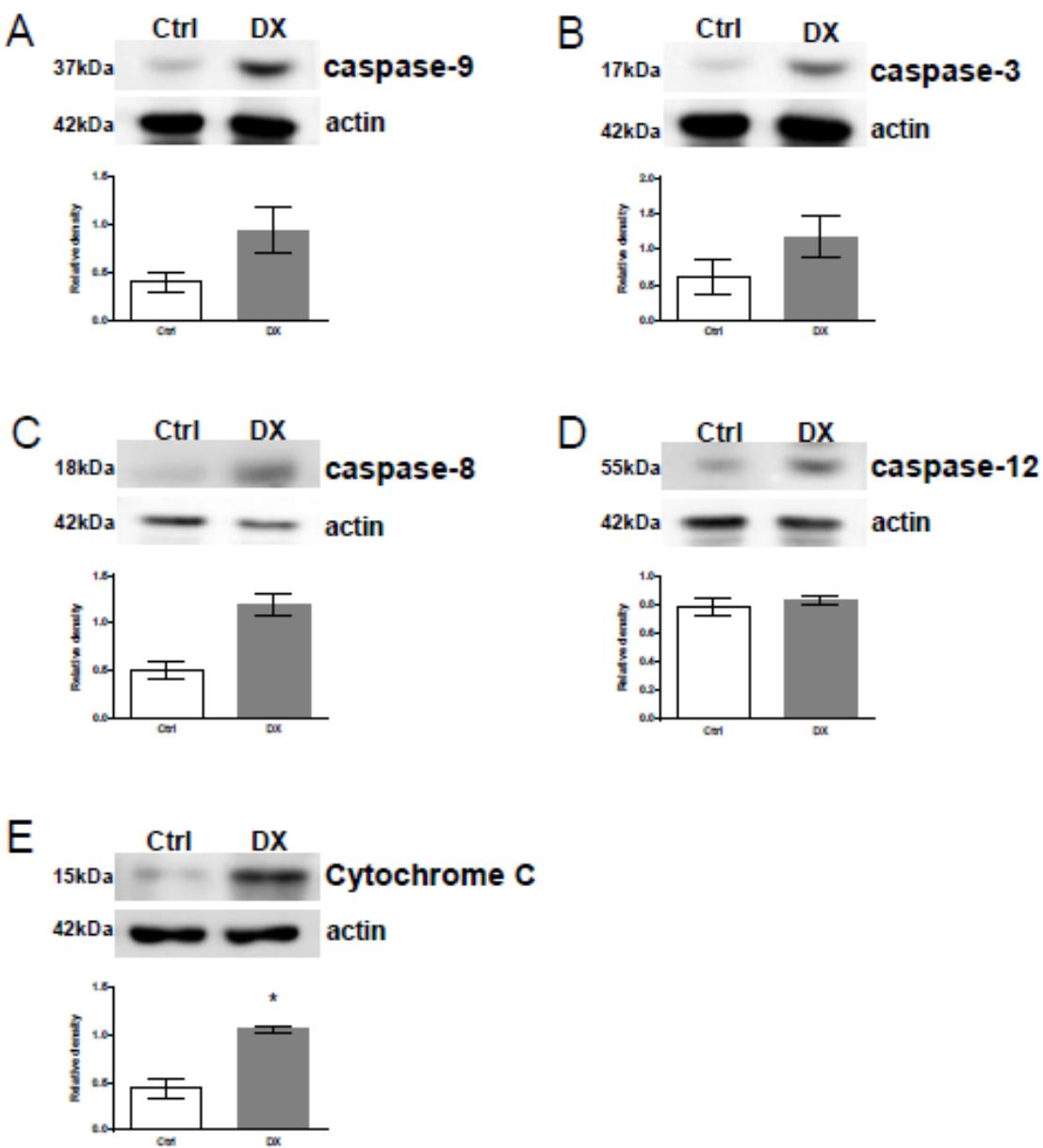
Anti-Bak (A), anti-Bcl-x_L (B) és anti-Bim (C) jelölés anti-GR immunprecipitált citoplazma és mitokondriális frakcióban DX kezeléssel és anélkül (ctrl). A blotokat anti-GR ellenanyaggal is újrahibítuk. Az ábra 3 kísérleből 1 reprezentatív eredményeit mutatja. A diagramok a blotok alatt a Bak, Bcl-xL és Bim relatív denzitását mutatják a GR-re normalizálva (átlag ± SEM) Prenek L. et al. Apoptosis 2016. közlés alatt

5.6.2. A GC INDUKÁLTA KASZPÁZ AKTIVÁCIÓ ÚTVONALÁNAK VIZSGÁLATA

Ezután megvizsgáltuk, hogy timocitákban nagydózisú *in vitro* DX kezelés után 1 órával mely kaszpázok aktiválódnak, ill. a mitokondriális útvonal aktivációját jelző Citokróm C felszabdalás kimutatható-e a sejtek citoplazma frakciójában. Ehhez a kezelés után a sejteket lizáltuk és aktívált (hasított) kaszpáz-8, 9, 12 specifikus ellenanyagokkal és az aktivált effektor kaszpáz-3, valamint Citokróm C elleni ellenanyaggal vizsgáltuk a mintákat (**48. ábra**).

Meglepésünkre azt találtuk, hogy a nem-fakcionált teljes timocita lizátumban a GC kezelés után 1 órával a kontrolhoz képest a hasított kaszpáz 9, és enyhébb mértékben, de a kaszpáz 8 hasított formája is emelkedést mutatott. Ez azt jelenti, hogy nem csak az intrinsic, mitokondriális útvonal aktiválódik GC kezelés hatására. Az endoplazmatikus útvonal aktivációját jelző kaszpáz 12 hasítás nem változott DX kezelés hatására a kontrolhoz képest. Az apoptózis egy későbbi lépéseknek aktivációját jelzi a mitokondriumból kiszabaduló Citokróm C mennyiségek emelkedése és az effektor kaszpáz 3 hasítása is. Mindkettő emelkedett 1 órával a GC kezelés után.

A kaszpáz aktivációt áramlási citometriás módszerrel is ellenőriztük, ahol CD4/CD8 sejtfel-színi jelöléssel a DP sejtcsoportban tudtuk vizsgálni a hasított kaszpázok időbeni megjelenését. Hasonlóan a Western blotnál kapott eredményekhez a kaszpáz 9 és 8 aktiváció egyránt kimutatható volt a DX kezelés után 1-3 órában vizsgálva (nem mutatjuk az ábrát). Az effektor kaszpáz 3 aktív formája szintén jelentősen emelkedett a DP timocitákban. Ezen eredmények azt jelzik, hogy 1 óra *in vitro* DX kezelés hatására aktiválódik az intrinsic apoptózis útvonal, de kismértékben kimutatható az extrinszk iniciátor kaszpáz 8 aktivációja is. Mindez jelentős citokróm C felszabadulást és az effektor kaszpáz aktivációját okozza.



48. ábra: Aktivált kaszpáz-3,-8,-9,-12 képződés és Citokróm C felszabadulás rövid idejű *in vitro* DX kezelés hatására timociták citoplazmájában.

Aktív (hasított)-kaszpáz-9 (A), -3 (B), -8 (C), -12 (D) és Citokróm C (E) megjelenését hasonlítottuk össze a kezeletlen és DX kezelt mintákban Western-blot módszerrel. A blotokat anti-β-aktin antitesttel, mint töltéssel normalizáltuk. Az ábrán 3 független kísérlet egy reprezentatív adatait ábrázoltuk. A blot-ök alatti diagramok a kaszpáz-3,-8,-9,-12 és Citokróm C relatív expresszióját mutatják (β -aktin-ra normalizálva). Az oszlopok a control és DX kezelt minták átlag \pm SEM of relativ denzitásiat mutatják (* $P < 0.05$). Prenek L. et al. Apoptosis 2016. közlés alatt

III. A GC GYORS NEM-GENOMIKUS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A TcR JELÁTVITELI ÚTVONALRA

5.7. A GC ÉS A TcR JELÁTVITELI ÚTVONAL AKTIVÁCIÓJÁNAK KORAI ESEMÉNYEI

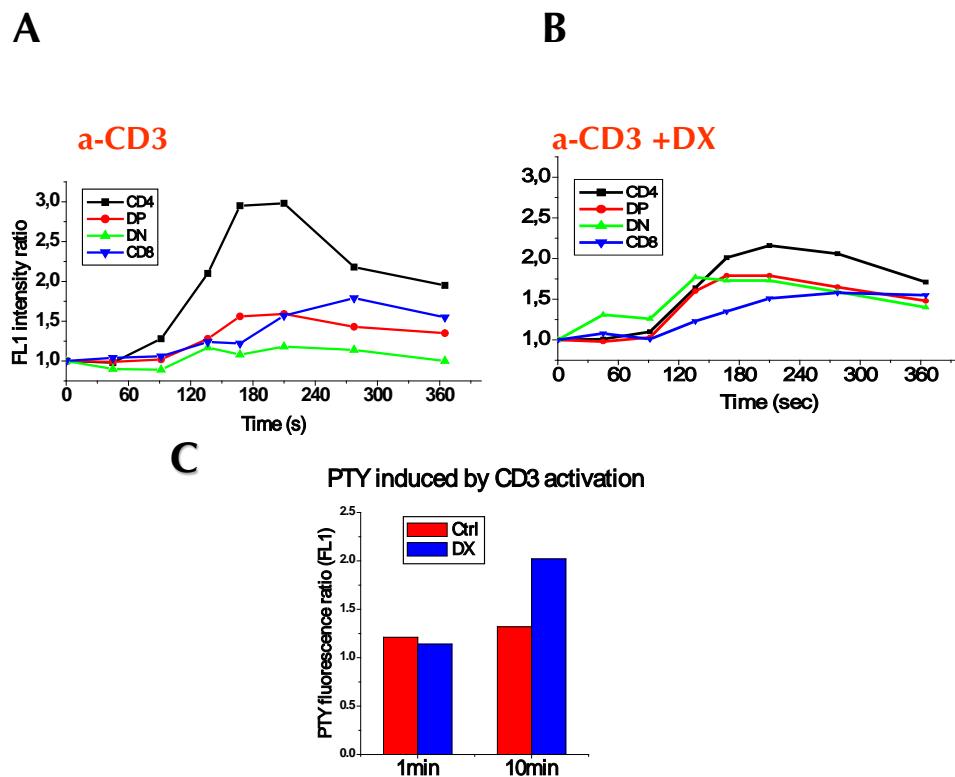
Korábbi vizsgálataink alapján a GC hormon és a TcR stimuláció következtében elinduló T-sejt aktiváció együtt a DP timociták túlélését eredményezi, ami a két jelátviteli útvonal összekapcsolódását jelzi.

5.7.1. TIMOCIÁK Ca^{++} JELE ÉS TIROZIN-FOSZFORILÁCIÓJA *IN VITRO* TcR AKTIVÁCIÓ HATÁSÁRA DX JELENLÉTÉBEN

A GC és TcR jelátviteli út kapcsolatának további bizonyítására vizsgáltuk a timocita alcsoportok (DN, DP, CD4 és CD8 SP) TcR-en keresztül történő aktivációját rövid ideig tartó *in vitro* DX előkezeléssel és anélkül. Az intracelluláris szabad Ca^{++} jel követésére áramlási citometriás időkinetika vizsgálatot végeztünk az anti-CD3 kezelést követő 360 másodpercen (6 perc) keresztül. A 4 sejtcsoportot CD4/CD8 sejtfelszíni jelölés alapján különítettük el, és vizsgáltuk mindegyik sejtcsoportban a Ca^{++} szignál változást Fluo-3-AM Ca^{++} szenzitív fluoresszcens festék segítségével (**49. A. B. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy a DX előkezelt mintákban csökken a Ca^{++} jel az érett sejtekben, míg a DN és DP éretlen sejtek szabad intracelluláris Ca^{++} jele fokozódik.

Megvizsgáltuk DX kezelt és kontrol timocita mintákon az anti-CD3 kezelés hatását a sejtek tirozin-foszforilációjára is anti-foszfotirozin antitesttel történő jelölést követően áramlási citometriával a sejtek anti-PTY fluorszcencia intenzitásianak detektálásával (**49.C. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy DX előkezelt timociták tirozin foszforilációja 10 perccel az anti-CD3 kezelés után magasabb volt a kontrol mintákhoz képest, vagyis a CD3 stimuláció és DX kezelés additiv hatású a sejtek tirozin foszforilációjára.

A folyamat molekuláris mechanizmusának tisztázására a primer timociták kevéssé alkalmasak, ezért helyettük egy stabil T-sejtvonalat (Jurkat) választottunk, amelyen reprodukálható módon vizsgálható a TcR aktiváció molekuláris folyamata, valamint rendelkezésre állnak a TcR jelátviteli molekuláiban, mint a p56-lck és ZAP-70 deficiens szubklónjai (JCaM1.6 és P116). Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy a GC hormon hogy befolyásolja a TcR jelátviteli útvonal korai eseményeit, és van-e a két jelátviteli útvonal molekulái között direkt kapcsolat? A gyors GC hatások vizsgálatához nagydózisú rövid ideig tartó *in vitro* GC kezeléseket alkalmaztunk a TcR aktivációt pedig anti-CD3 kezelésekkel modeleztük.



49. ábra: Timociták TcR aktivációra bekövetkező Ca^{++} szignál (A, B) és tirozin-foszforiláció (C) változása DX jelenlétében és nélkül.

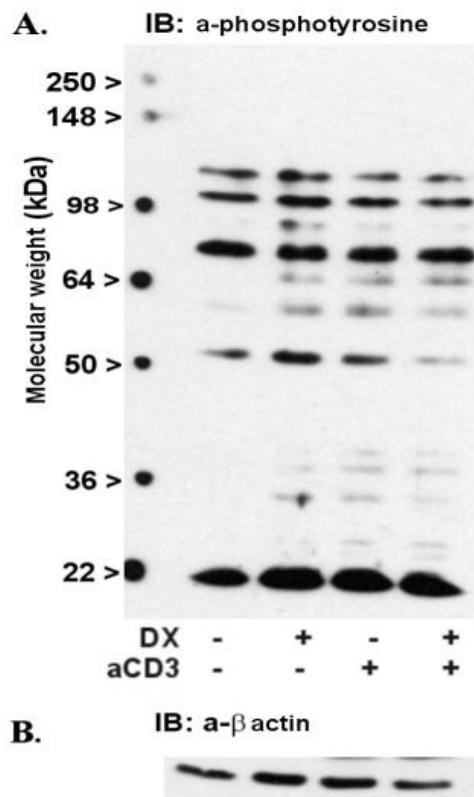
A szabad intracelluláris Ca vizsgálatához Fluo-3-AM festékkel töltöttük föl a sejteket, majd a timocita alcsoportok elkülönítéséhez anti-CD4/CD8 jelölést végeztünk. majd áramlási citométerben felvettük az alap Ca^{++} jelet és anti-CD3 antitest hozzáadásával stimuláltuk a sejteket DX jelenlétében (B) és nélkül (A). A tirozin foszforiláció vizsgálatát a timociták anti-PTY jelölésével és a minták MFI értékeinek összehasonlításával végeztük (C). Berki T et al. Cytometry 2002. Suppl. 11. p.91

5.7.2. AZONNALI FOSZFORILÁCIÓS VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA GC ÉS ANTI-CD3 KEZELÉS HATÁSÁRA

A nagydózisú GC azonnali hatását a T-sejt aktivációra okozhatja a szteroid hormon nemspecifikus direkt membrán hatása, amely befolyásolja a signalosoma létrejöttét, de létrejöhet közvetlen molekuláris interakció is a ligand kötött GR és a TcR jelátviteli fehérjéi között. Ezen utóbbi mechanizmusra példa Löwenberg által leírt GC indukált GR-Lck interakció.

Vizsgálatainkhoz *in vitro* tenyészített model sejtvonalakat használtunk, melyek alkalmasak a GC indukálta korai jelátviteli események pl. foszforilációs változások nyomon követésére. Elsőként kíváncsiak voltunk arra, hogy a GC önmagában okoz-e tirozin foszforilációs változásokat a T-sejtekben, ill. a TcR jelátviteli út aktivációja mennyire befolyásolja azt? Azt láttuk, hogy az 5 perc DX kezelés önmagában is számos fehérje tirozin foszforilációs változását okozta (**50. ábra**). A TcR aktiváció önmagában szintén számos fehérje tirozin foszforilációját okozta, de a 34 és 70 KD fehérjék közösek voltak. 2 perc DX előkezelés meggyalolta az anti-CD3 okozta tirozin foszforilációját a 34, 38, 40, 52, 59, és 90 kDa-os fehérjéknek. Ezek alap-

ján felmerült, hogy a TcR és GC okozta tirozin foszforiláció a 70 kDa-os fehérje esetén vajon nem a ZAP-70 molekule-e, a TcR szignál központi szereplője?



50. ábra: 2 perc Dexamethasone és/vagy anti-CD3 kezelés hatása a Jurkat sejtek tirozin foszforilációjára.

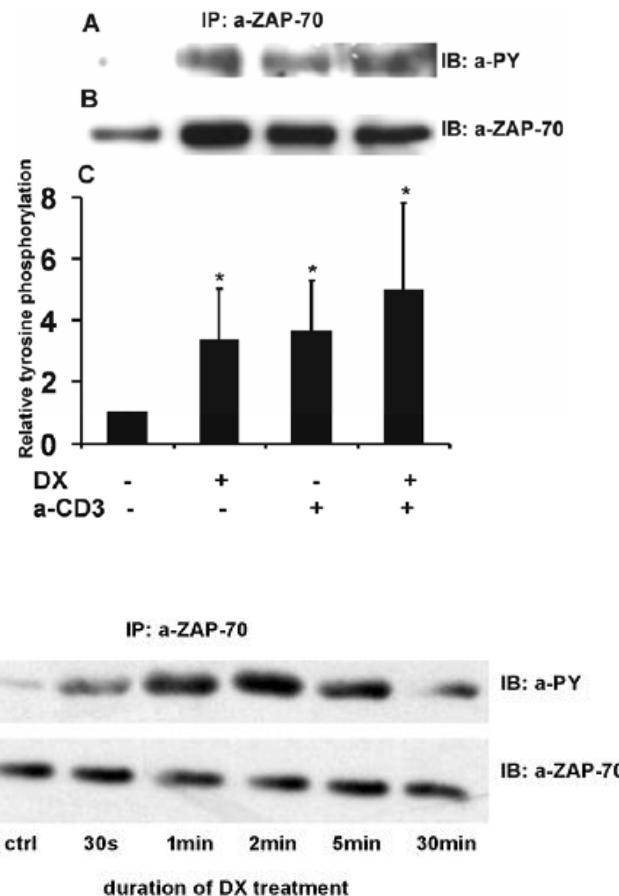
A teljes Jurkat sejt lizátumot anti-foszftirozin monoklonális ellenanyaggal hívtuk elő, majd a töltéskontrol anti-beta aktin ellenanyaghoz hasonlítottuk. A molekulású standardok az ábra bal oldalán vannak feltüntetve.

Az ábrán 3 megismételt kísérlet egy reprezentatív eredményét mutatja.

5.7.3. A ZAP-70 KINÁZ GR DEPENDENS FOSZFORILÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A ZAP-70 központi szerepet játszik a TcR jelátviteli útvonalban, számos szubsztrátot foszforilálva és önmaga is számos tirozin molekulán foszforilálódik. Ezért vizsgáltuk a ZAP-70 tirozin-foszforilációját DX és/vagy anti-CD3 kezelés után. 5 perc 10 μ M DX kezelés átlagosan 4-szeres ($3.32 + 1.72$) foszforiláció emelkedést okozott a ZAP-70 kinázon az anti-ZAP-70 precipitált mintán (**51. A, B ábra**). Anti-CD3 kezelés önmagában szintén 4-szeres ($3.59 + 1.69$) tirozin foszforiláció emelkedést okozott a precipitált ZAP-70-en. Kombinált DX + anti-CD3 kezelés hatására tovább emelkedett a ZAP-70 tirozin foszforilációja 5-szörösére. ($4.98 + 2.83$). Mindhárom esetben szignifikáns foszforiláció emelkedés volt megfigyelhető a csak oldószerrel kezelt mintához képest (Student's t-test, $P < 0.05$).

Megvizsgáltuk a DX kezelés hatására bekövetkező ZAP-70 tirozin foszforiláció idő-kinetikáját és azt láttuk (**51. D. ábra**), hogy a tirozin foszforiláció maximumát a 2. percben éri el, majd 5 perc után már csökkenés (defoszforiláció) figyelhető meg.



51. ábra: DX és anti-CD3 kezelés hatása a T-sejtek ZAP-70 tirozin foszforilációjára.

A Western-blot-ot anti-ZAP-70 ellenanyaggal immunprecipitált minták anti-foszfotirozin (a-PY) antitesttel történő előhívásával végeztük (A). A blotokat anti-ZAP-70 ellenanyaggal, mint töltés kontrollal ellenőriztük (B).

Az oszlopdiagramon (C) a ZAP-70 relatív tirozin foszforilációt (átlag + SD) ábrázoltuk. * $P > 0,0,5$

D. A ZAP-70 tirozin foszforiláció idő-kinetikája 0,5-30 perces DX kezelés hatására.

Ismert, hogy a ZAP-70 autofoszforiláció mellett a molekula szubsztrátja a p56-lck-nak is, egy T-sejt specifikus src-kináz-nak. Ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy a DX indukált gyors ZAP-70 tirozin foszforiláció p56-lck dependens-e? Ehhez JCaM1.6 sejtekkel, egy p56-lck deficiens Jurkat szubklónt kezeltünk nagydózisú DX-al és azt láttuk, hogy a sejtekben nem jön létre a ZAP-70-en tirozin foszforiláció emelkedés, vagyis a folyamat p56-lck-dependens. Ugyanakkor anti-CD3 aktiváció hatására nagymértékben fokozódott a JCaM1.6 sejtek ZAP-70 tirozin foszforilációja. Kombinált DX + anti-CD3 kezelés nem befolyásolta ezt a folyamatot (ábra Bartis et al. 2006).

Annak tisztázására, hogy a GC ezen gyors T-sejt tirozin-foszforiláció változást előidéző nem-genomikus hatása GR függő folyamat-e, megvizsgáltuk a jelenséget glukokortikoid receptor antagonista RU486 (Mifepristone) előkezelt Jurkat T-sejtekben is. DX önmagában jelentős tirozin foszforilációt okozott a ZAP-70 molekulán, míg 4 órás RU486 előkezelés hatására gátlódott a nagydózisú DX hatásra létrejövő gyors ZAP-70 foszforiláció. RU486 kezelés önmagában nem okozott tirozin-foszforiláció változást (ábra Bartis et al. 2006).

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a DX indukálta ZAP-70 tirozin foszforiláció p56-lck és GR dependens folyamat. Ennek ismeretében felvetődik, hogy van-e közvetlen molekuláris kapcsolat a GR és a ZAP-70 között?

5.7.4. A GR - ZAP-70 KINÁZ ASSZOCIÁCIÓ VIZSGÁLATA

Annak bizonyítására, hogy van-e fizikai kapcsolat a citoplazmatikus GR és ZAP-70 molekula között, immunprecipitációt végeztünk a DX-al vagy oldószerével kezelt Jurkat sejt lizátumain mind anti-ZAP-70 mind anti-GR antitestekkel. Az anti-GR antitesttel precipitált mintákban a ZAP-70 jelölés erősödése figyelhető meg a DX kezelés hatására. A GR jel változatlan volt, a kontrolhoz hasonlítva. Fordítva, ha az immunprecipitációt az anti-ZAP-70 antitesttel végeztük, a GR jel erősödése volt megfigyelhető a DX kezelt mintákban, míg a ZAP-70 változatlan volt. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a DX kezelt Jurkat sejtekben a GR co-precipitálódott a ZAP-70 molekulával és *vica versa*. A két molekula kapcsolódása a DX kezelt mintákban fokozódott. (**52.A. ábra**).



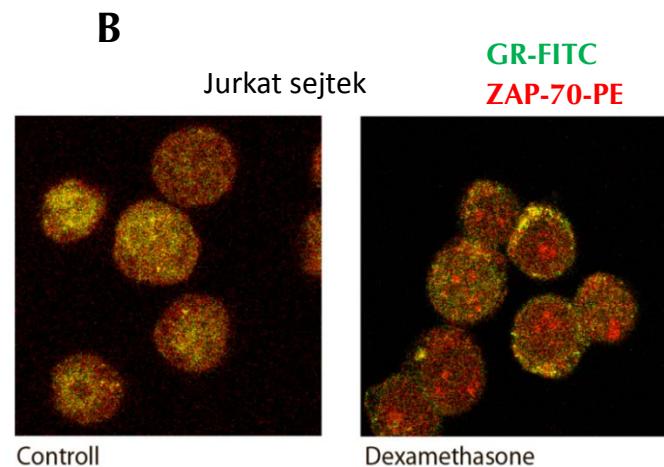
52. A. ábra: A ligand-kötött GR és a ZAP-70 ko-precipitációja Jurkat sejtekben.

Anti-GR ellenanyaggal végzett immunprecipitációnál (IP: a-GR), azonos mennyiségű GR precipitálódott (Blot: a-GR), de ZAP-70 koprecipitáció csak DX jelenlétében látszik. (Blot: a-ZAP-70)

Hasonlóan, ha anti-ZAP-70 volt a precipitáló ellenanyag, (IP: a-ZAP-70) azonos mennyiségű ZAP-70 mutatható ki a kontrol és DX kezelt mintában egyaránt, de a GR csak a DX kezelt mintában ko-precipitálódott.

Bartis D et al. 2007.

A ZAP-70 és GR molekulák elhelyezkedésének és viszonyának további tisztázására fluoreszcens festékkel jelölt ellenanyagokkal kettős jelölt mintákon konfokális mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. A kontrol, nyugvó Jurkat sejtekben a GR és ZAP-70 diffúz, citoplazmatikus jelölődést mutatott, kevés kolokalizációval. Nagydózisú DX kezelés után 5 perccel a két molekula membrán-közeli elhelyezkedést vett föl megnövekedett kolokalizációval, ami alátámasztja az immunprecipitációval kapott eredményeinket (**52. B ábra**).



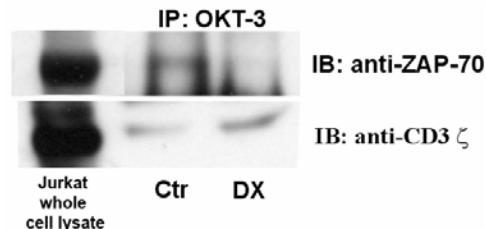
52.B. ábra: A GR és ZAP-70 kolokalizáció vizsgálata Jurkat sejtek konfokális mikroszkópos analízisével.

A sejteket fixálás után α -GR-FITC (zöld csatorna) és α -ZAP-70-PE (vörös csatorna) ellenanyaggal jelöltük, majd tárgylemezre ülepítve vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal. A DX kezelt mintában a GR és ZAP-70 is membrán közeli szoros kolokalizáció figyelhető meg, amely hiányzik a kezeletlen kontrolökben.

A GR és ZAP-70 molekula viszonyának tisztázására elvégeztük az immunprecipitációt Geldanamycin (GA) előkezelést követően is. Azt tapasztaltuk, hogy a Hsp-90 inhibitor GA jelenlétében gátlódik a GR - ZAP-70 kacsolódás, míg a DX-al kezelt mintákban a GA kezelés nem befolyásolta a GR - ZAP interakcióját. Érdekes volt az a megfigyelésünk is, hogy a ZAP-70-el nemcsak a GR precipitálódott, hanem a Hsp-90 is a DX kezelt és kezeletlen mintákban egyaránt. Ezt az asszociációt minden esetben gátolta a GA jelenléte. (Bartis D. et al. 2007).

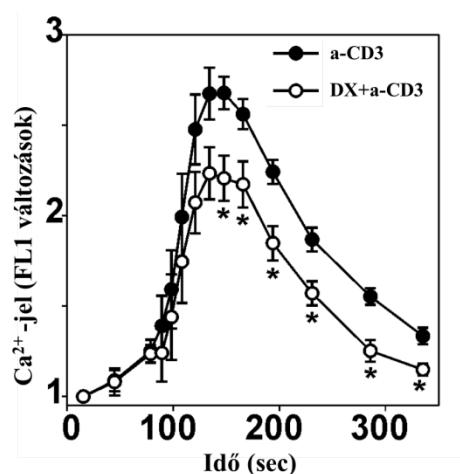
5.7.5. NAGYDÓZISÚ DX KEZELÉS GÁTOLJA A ZAP-70 ASSZOCIÁCIÓJÁT A CD3 KOMPLEXHEZ ÉS A CA⁺⁺ JELET JURKAT SEJTEKBEN

A ZAP-70 központi szerepet játszik a TcR-CD3 komplexből kiinduló jelátviteli folyamatokban. A TcR kapcsolódása a peptid-MHC komplexhez vagy anti-CD3 antitest keresztkötés tirozin foszforilációs eseményeket indít el. Miután a ZAP-70 molekula foszforilálódik (autofoszforiláció és src-kináz hatására) tandem SH2 doménjével az ITAM-tirozinjaihoz aszszociálódik. Ez a lépés döntő a további aktivációs lépésekhez. Eredményeink azt bizonyítják, hogy nagydózisú DX jelenlétében a ZAP-70 asszociációja a CD3 komplexhez gátlódik, miután a DX kezelt mintákban nem jött létre a két molekula koprecipitációja (**53. A. ábra**).



53. A. ábra: Nagydózisú DX kezelés gátolja a ZAP-70 CD3 komplex kapcsolat kialakulását Jurkat sejtekben.

A CD3 komplex és azzal asszociált molekulákat anti-CD3-al aktivált (OKT-3) Jurkat sejtek lizátumából precipitáltuk (IP: OKT-3). A blotokat (IB) mind anti-ZAP-70 mind anti-CD3- ζ antitestekkel hívtuk elő. A kontrol mintákban több ZAP-70 asszociálódott a CD3-komplexhez mint a DX kezelt mintákban (DX.).



53. B. ábra. Az anti-CD3 indukálta Ca²⁺- jel kialakulását a DX részlegesen gátolja Jurkat sejtekben.

A 10 percig DX-al előkezelt, majd anti-CD3 által aktivált mintákban kialakuló Ca²⁺-jelet (üres pont) a csak anti-CD3-mal kezelt mintákhoz viszonyítottuk (fekete pontok). 50 másodpercig mértük az alap Ca²⁺ szintet, majd hozzáadtuk az anti-CD3-at a mintákhoz, és további 5 percig folytattuk a mérést. A diagram 5 független mérés eredményének átlagát és a \pm SEM értékeket mutatja. A szignifikáns ($P \leq 0,05$) különbségeket jelöltük (*).

Az intracelluláris Ca²⁺-jel kialakulása a T-sejt aktiváció további fontos eseménye. Kísérleteink során megvizsgáltuk azt is, hogy rövid idejű (10 perces) DX előkezelés hogyan befolyásolja az anti-CD3 kiváltotta Ca²⁺-jelet. Az intracelluláris Ca²⁺-jelben bekövetkező változások vizsgálatához a sejteket Fluo-3AM indikátorral töltöttük föl, majd áramlási citometriás méréseket végeztünk. Az FL-1 intenzitásban bekövetkező változást (arányos az intracelluláris Ca²⁺-jellel, y-tengely) az idő függvényében vizsgáltuk. 10⁻⁵M DX előkezelés az intracelluláris Ca²⁺ szint szignifikáns csökkenéséhez vezetett a csak anti-CD3-mal kezelt mintához viszonyítva (53.B. ábra).

5.8. A ZAP-70 TIROZIN FOSZFORILÁCIÓS HELYEK SZEREPE A NEM-GENOMIKUS GC HATÁSOKBAN

Klinikai szempontból a TcR/CD3 és a nem-genomikus GC hatások által kiváltott jelátviteli utak kapcsolódási pontjai különösen fontosak, mivel feltételezhetően ezen mechanizmusok állnak a gyors immunszuppresszív hatások kialakításának hátterében. Ennek modellezésére kombinált kezelést (DX+anti-CD3) alkalmaztunk. A kísérleteink során használt DX koncentráció megfelel a klinikumban alkalmazott nagy dózisú szteroid kezelésnek. A ZAP-70 kináz mind anti-CD3, mind DX kezelés hatására foszforilálódik. Mivel a ZAP-70 aktivációs és gátló tirozin maradékokat is tartalmaz, így felmerül, hogy a különböző kezelések során más-más funkciójú tirozinok foszforilálódnak és közvetítenek eltérő jeleket a downstream molekuláknak.

A ZAP-70 kináz egyes tirozinjainak vizsgálatára olyan transzgénikus Jurkat sejteket hoztunk létre, amelyek stabilan expresszálnak tirozin-fenilalanin (Y-F) pontmutáns ZAP-70-et. Ehhez P116 sejteket transzfektáltunk lentivirális vektorral, ami WT vagy Y-F pontmutáns ZAP-70-et kódol. A pontmutáns sejtekben a 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 és 493 pozícióban lévő Y maradékokat cserélük F-ra. Az egyes pontmutáns sejtvonalak ZAP-70 expresszióját Western bloton és intracelluláris jelölést követően áramlási citometriás mérésekkel ellenőriztük. (Szabó M., 2012)

5.8.1. A ZAP-70 KINÁZ TIROZINJAINAK PONTMUTÁCIÓJA MEGVÁLTOZTATJA A DX INDUKÁLT JELÁTVITELI FOLYAMATOKAT

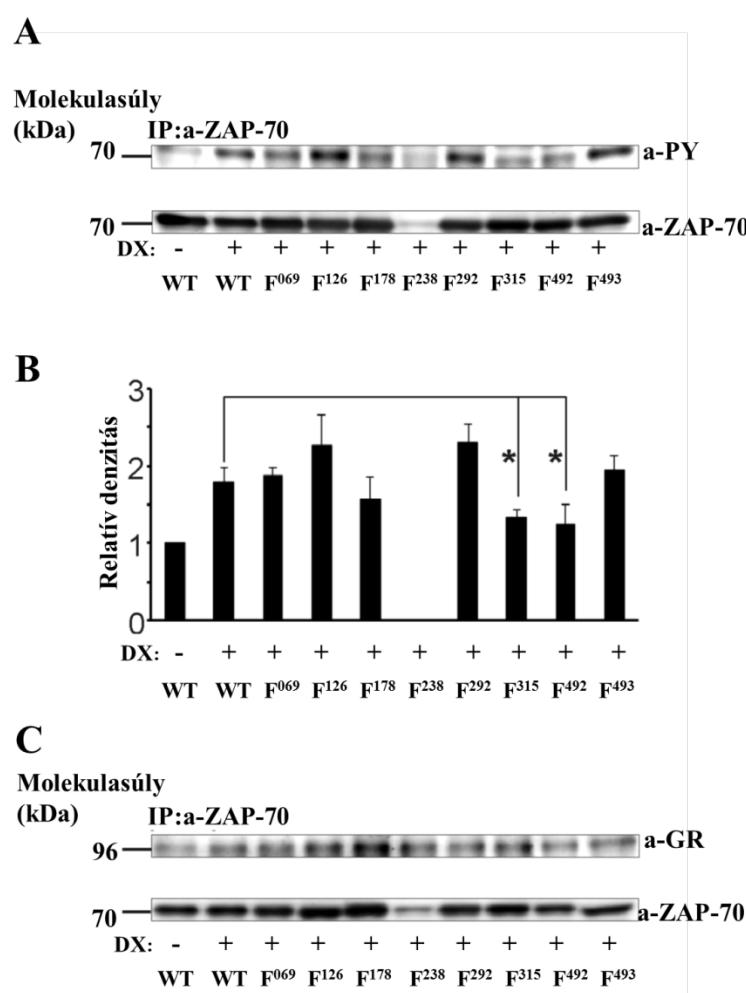
Korábbi eredményeink szerint rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatására számos jelátviteli molekula mutat emelkedett foszforilációt Jurkat sejtekben (**50. ábra**). Jelen kísérleteinkben Western bloton vizsgáltuk, hogy a ZAP-70 kinázban létrehozott Y-F (tirozin-fenilalanin) aminosavcsere hogyan változtatja meg 2 perces DX kezelést követően az egyes sejtvonalak foszforilációs mintázatát. Az F069-, F126-, F178- és F238-ZAP-70-et expresszáló sejtek csak mérsékelt foszforiláció emelkedést mutattak DX kezelés hatására és a foszforiláció mintázat molekulasúly szerinti eloszlása is eltérő volt az egyes sejtvonalakban. A 315 és 492 pozíciókban létrehozott aminosavcsere általános hiperfoszforilációt eredményezett a WT-ZAP-70-et expresszáló DX kezelt sejtekhez viszonyítva (Szabó M. et al. 2012). Ezért tovább vizsgáltuk a ZAP-70 kináz tirozin maradékainak a szerepét a DX kezelés hatására elinduló jelátviteli folyamatokban.

5.8.2. A ZAP-70 KINÁZ Y315 ÉS Y492 MARADÉKAI VESZNEK RÉSZT A NEM-GENOMIKUS GC HATÁSOK KIALAKÍTÁSBAN

Korábbi eredményeink szerint 2 perces, nagy dózisú DX kezelés a ZAP-70 kináz foszforilációjához és GR asszociációjához vezet. Jelen kísérleteinkben anti-ZAP-70 antitesttel végzett immunprecipitációt követően azt vizsgáltuk, hogy a kináz egyes tirozinjainak pontmutációja befolyásolja-e a GC-analóg kiváltotta foszforilációt és a ZAP-70-GR asszociációt. A WT DX kezelt mintához viszonyítva, szignifikáns foszforiláció csökkenést kaptunk azokban a sejtvonalakban, amelyekben az aminosavcsere a 315 és 492 pozíciókban történt

(54. A, B ábra), így feltételezzük, hogy a nem-genomikus GC hatások közvetítésében a ZAP-70 ezen két tirozin maradéka vesz részt.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a fent leírt foszforiláció változások megváltoztatják-e a ZAP-70-GR ko-precipitációt. Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés a WT és valamennyi pontmutáns sejtvonalban növekedett ZAP-70-GR asszociációt eredményezett. Az F315 és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a 2 perces DX kezeléskor kapott csökkent tirozin foszforiláció ellenére nem változott meg a ZAP-70-GR asszociáció (**54. C. ábra**), ami arra utal, hogy a Y maradékok nem vesznek részt direkt módon a 2 molekula fizikai kapcsolatának szabályozásában



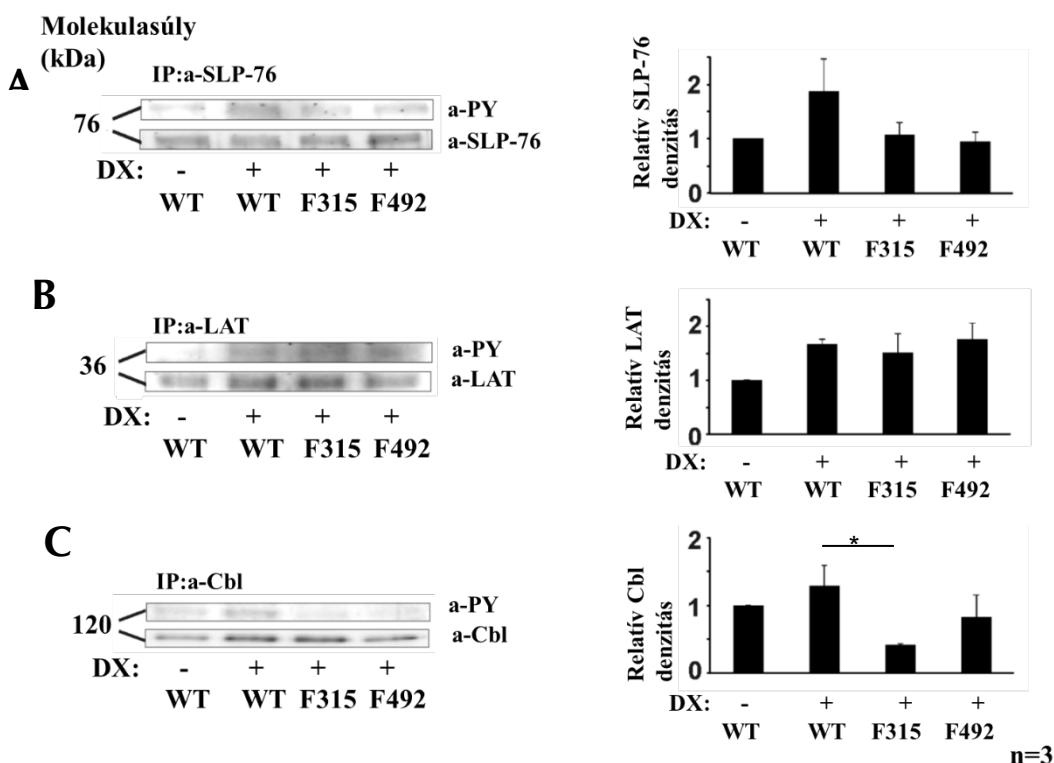
54. ábra: Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés indukálta ZAP-70 foszforiláció és GR asszociáció a pontmutáns sejtekben. A.

Anti-ZAP-70-el végzett immunprecipitációt követően a Western blotot anti-foszfotirozin (felső panel), majd anti-ZAP-70 (alsó panel) antitestekkel hívtuk elő. **B.** A diagram a ZAP-70 kináz relatív foszforiláció változásait mutatja. Az átlag \pm SEM értékeket 3 független blot denzitometriás eredményéből számítottuk, a szignifikáns ($P \leq 0,05$) változást jelöltük (*). **C.** A Western blotok a ZAP-70-GR ko-precipitáció eredményeit mutatják pontmutáns sejtekben. ZAP-70 precipitációt követően a blotot anti-GR (felső panel), majd anti-ZAP-70 (alsó panel) antitesttel hívtuk elő.

5.8.3. A ZAP-70 Y-F PONTMUTÁCIÓJA A 315 ÉS 492 POZÍCIÓKBAN MEGGÁTOLJA A RÖVID IDEJŰ, NAGY DÓZISÚ DX KEZELÉS INDUKÁLTA SLP-76 ÉS CBL FOSZFORILÁCIÓT

A Jurkat sejtek lizátumából készített Western blotokon látható, hogy a ZAP-70 kináz mellett további molekulák foszforilációja is megváltozik rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatására. A T-sejt aktiváció során a ZAP-70 szubsztrátjai az SLP-76, a LAT és a Cbl molekulák. Kíváncsiak voltunk, hogy ezen molekulák foszforilációja megváltozik-e 2 perces DX kezelés hatására és azt tapasztaltuk, hogy növekedett mind az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációja is. Kombinált DX + anti-CD3 kezelésnél a DX részben gátolta az SLP-76 és Cbl anti-CD3 indukálta foszforiláció növekedését. A LAT esetében a kombinált kezelés nagyobb mértékű tirozin foszforilációt eredményezett, mint akár a DX vagy az anti-CD3 kezelések önmagában.

Annak megerősítésére, hogy a ZAP-70 315 és 492 tirozinjai valóban részt vesznek a nem-genomikus GC hatások továbbításában, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, LAT és Cbl foszforilációját 2 perces DX kezelést követően. Az Y-F aminosavcsere a ZAP-70 315 és 492 pozíciójában gátolta az SLP-76 és a Cbl DX indukálta foszforilációját. A LAT esetében egyik pontmutáció sem befolyásolta a DX indukálta foszforiláció növekedést (**55. ábra**). Ez arra utal, hogy a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik. A LAT-ot a ZAP-70-en kívül az Itk és az Lck is foszforilálja, így feltehetően a LAT-on megfigyelt nem-genomikus GC hatásokat ezek a molekulák idézik elő.



55. ábra: A ZAP-70 Y315 és Y492 pontmutációi befolyásolják az SLP-76 és Cbl DX indukálta foszforiláció növekedést.

Kezeletlen WT-, valamint DX kezelt WT-, F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtek lizátumából immunprecipitációt végeztünk anti-SLP-76 (A), anti-LAT (B) és anti-Cbl (C) antitestekkel. A blotokat anti-foszfotirozin (felső panelek), majd strippinget követően anti-SLP-76, anti-LAT vagy anti-Cbl (alsó panelek) antitestekkel hívtuk elő. A diagramok a megfelelő molekulák relatív foszforiláció változásait mutatják három független kísérlet denzitometriás eredményei alapján. Az oszlopokon az átlag \pm SEM értékeket ábrázoltuk, a szignifikáns ($P \leq 0,05$) változásokat jelöltük (*).

IV. GC HORMON HATÁSA A REGULATÓRIKUS T SEJTEK IN VIVO ÉS IN VITRO DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRA ÉS FUNKCIÓIRA

5.9. A TERMÉSZETES ÉS INDUKÁLT REGULATÓRIKUS T-SEJTEK ELOSZLÁSA ÉS GC ÉRZÉKENYSÉGE

A regulatórikus T-sejtek (Treg) kulcsfontosságú tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Ezért alapvető kérdés, hogy az immunszuppresszív hatásáért széleskörben alkalmazott GC hormon analógok hogyan hatnak a szintén szuppresszor hatású Treg sejtek előfordulására és funkcióira. Ismert, hogy a természetes Treg sejtek a tímuszban differenciálódnak. Ezért különösen érdekes volt számunkra, hogy a korábban tapasztalt GC indukált tímusz involúció és a DP sejtek fokozott GC érzékenysége mellett a Treg sejtek GC jelenlétében, hogy érnek ki a tímuszban, ill. hogy viselkednek a

perifériás nyirokszervekben? Ezért munkánk célja elsőként a perifériás és centrális nyirokszervekben a természetes és indukált Treg-ek arányának és GC érzékenységének valamint glukokortikoid receptor (GR) expressziójuk változásának nyomon követése volt.

5.9.1. TREG SEJTEK ELŐFORDULÁSA A LIMFOID SZERVEKBEN

Megvizsgáltuk először 4 hetes Balb/c egérben, hogy a kezeletlen állatok primer és szekunder nyirokszerveiben milyen a természetes (tTreg) és indukált Treg-ek (iTreg) megoszlása. Ehhez a limloid szervekből izolált sejteket CD4/CD25 sejtfelszíni és intracelluláris FoxP3 transzkripció faktorra specifikus monoklonális ellenanyagokkal jelöltük. Bizonyos irodalmi adatok alapján a tTreg sejtekre egy másik transzkripció faktor, a Helios is jellemző, míg az iTreg sejtek erre negatívák, így a molekula jelölése alkalmas a két sejtcsoport elkülönítésére.

A CD4+ sejteken belül vizsgálva a CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg arányt a tímuszban ez 3% körüli, míg a perifériás nyirokszervekben ez az arány lényegesen magasabb: a lépben és a nyirokcsomókban 10% körüli, a Peyer-plakkban a legkevesebb 6-7% a FoxP3⁺Treg sejtek aránya (**7. táblázat**).

Megvizsgáltuk a Helios pozitivitás alapján a tTreg:iTreg arányt a különböző nyirokszervekben és meglepetésünkre a kezeletlen állatok tímuszában aTreg-ek 87%-a volt csak Helios pozitív. Ez vagy azt jelenti, hogy a tTreg differenciálódás helyszínén, a tímuszban vannak iTreg sejtek is 13%-ban, vagy a Helios nem alkalmas a két sejtcsoport elkülönítésére. A perifériás nyirokszervek közül a lépben 65%, a nyirokcsomóban 53%, a Peyer-plakkban pedig 48% a Helios+ tTreg aránya (**7. táblázat**).

7. táblázat. Természetes (tTreg) és indukált (iTreg) regulatórikus T-sejtek aránya a limloid szervekben

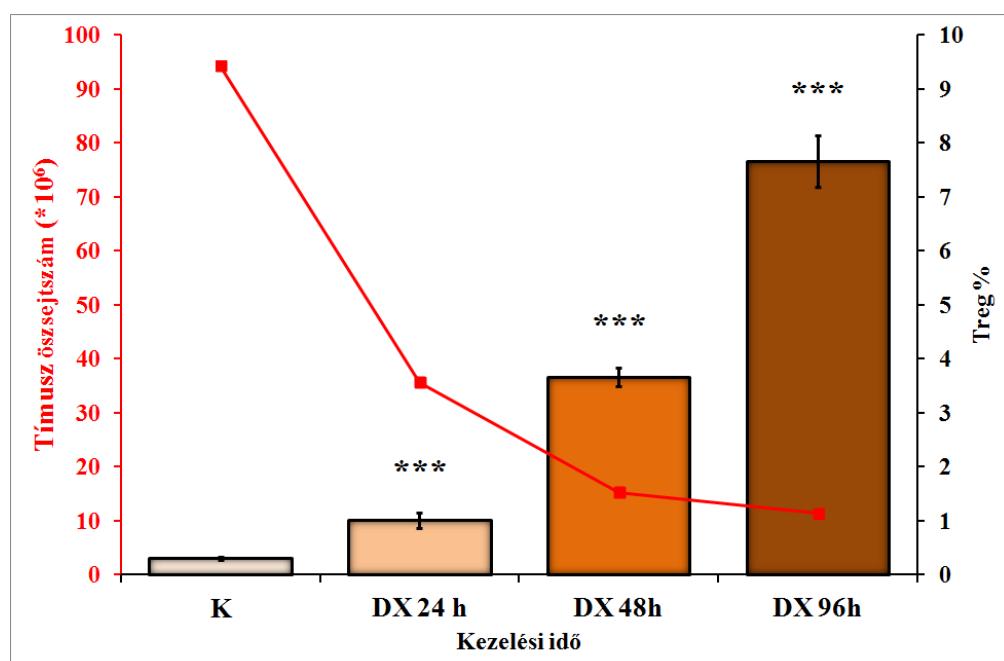
Treg % (áttag \pm SEM)	Tímusz	Lép	Nyirokcsomó	Peyer plakk
Összes Treg	2,81 \pm 0,46	9,65 \pm 0,82	10,10 \pm 0,61	6,78 \pm 0,51
tTreg	2,44 \pm 0,06	6,27 \pm 0,28	5,38 \pm 0,29	3,30 \pm 0,24
tTreg : iTreg arány	87 : 13	65 : 35	53 : 47	48 : 52

5.9.2. IN VIVO DX KEZELÉS HATÁSA A TREG SEJTEKRE

Megvizsgáltuk a nagy dózisú (20 mg/kg) *in vivo* DX kezelések hatását a különböző nyirokszervekben előforduló Treg-ek arányára és abszolút sejtszámra is. 4 napos ismételt DX kezelés után 24 órával a tímuszban a Treg-ek aránya szignifikánsan emelkedett (**56. ábra**). Ez a változás a DP, GC érzékeny, éretlen timociták jelentős pusztulásának a következtében kialakuló relatív sejtarány emelkedésnek köszönhető. Ha meghatározzuk az abszolút Treg sejtszámot a 2 napig DX kezelt állatokban 24 órával az utolsó oltás után, akkor enyhe, de nem

szignifikáns Treg sejtszám növekedést látunk (**8. táblázat**), ami azt bizonyítja, hogy a tímuszban a Treg-ek rezisztensek a DX indukálta apoptózisra.

A perifériás nyirokszervek közül a lépben tapasztaltunk enyhe, de szignifikáns Treg arány csökkenést a GC kezelt állatokban, ugyanakkor sem a nyirokcsomóban sem a PP-ben a Treg arány nem változott. Ugyanakkor a perifériás nyirokszervekben GC kezelés hatására az összlimfocita szám és ezzel együtt a Treg sejtszám is szignifikánsan lecsökkent (**8. táblázat**), ami a szervek méretének látványos kisebbedésével is járt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a perifériás nyirokszervekben az érett T-sejtek és a Treg-ek hasonló GC érzékenységet mutatnak.



56. ábra: A tímuszban a Treg sejt arány emelkedése GC kezelés hatására az össz tímocita szám csökkenésének következménye.

Ugor et al. Immunológiai Szemle 2014.

8. táblázat. Treg sejtszámok a limloid szervekben 2 napos nagydózisú DX kezelés után

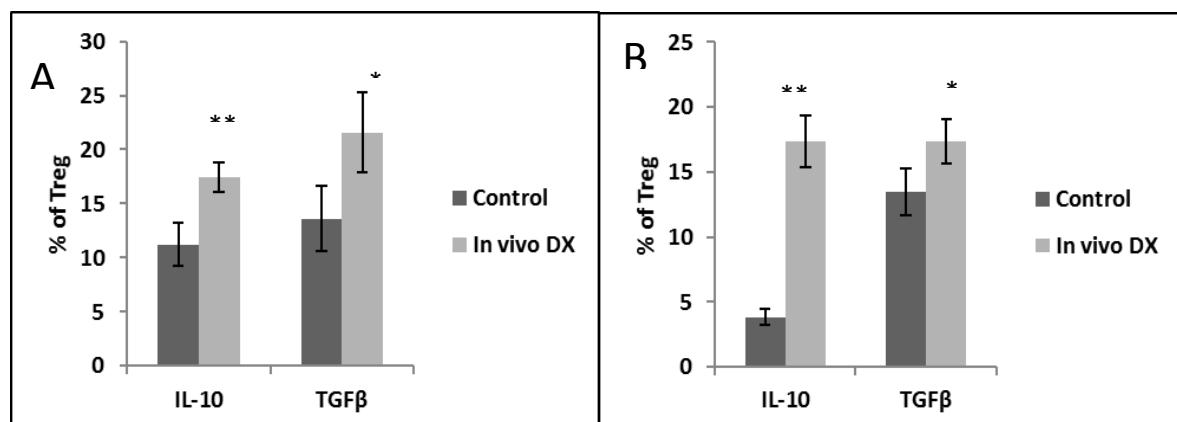
Treg sejtszám x 10 ⁵ (átlag ± SEM)	Tímusz	Lép	Nyirokcsomó	Peyer plakk
Kezeletlen	4,24±0,92	83,92±16,72	4,42±0,11	0,48±0,07
Dexamethasone 20mg/kg	5,05±1,35	26,93±5,13**	2,24±0,39***	0,23±0,06*

2 napos nagy dózisú (20 mg/kg) Dexamethasone kezelés hatására a perifériás nyirokszervekben szignifikánsan csökkent a Treg sejtszám (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) míg a tímuszban inkább enyhe, de nem szignifikáns Treg sejtszám emelkedés volt megfigyelhető

5.9.3. IN VIVO DX KEZELÉS HATÁSA A TREG SEJTEK CITOKIN TERMELÉSÉRE

Megvizsgáltuk a Treg sejtek jellemző szupresszor hatású citokinjeinek az IL-10 és TGF β valamint az utóbbi időben leírt IL-35 citokin termelésének változását 2 napos *in vivo* DX kezelést követően. Miután előző kísérleteink alapján a perifériás nyirokszervekben található Treg sejtek hasonló összetételt és változásokat mutattak DX kezelés hatására, a továbbiakban csak a lép és tímusz eltávolított limfoid sejtjeit vizsgáltuk. A kezelt és kezeletlen állatok timocitáit és lépsejtjeit *in vitro* PMA/ionomycin stimulációnak vetettük alá 1 éjszakán át, amely a már elkötelezett sejtekben a citokinek teremlődését fokozza és Brefeldin jelenlétében a Golgi apparátusban történő akkumulációját okozza.

Áramlási citometriás vizsgálathoz a Treg sejteket a szokásos jelölések mellett intracelluláris anti-IL-10 és anti-TGF β ellenanyagokkal jelöltük (egér IL-35 specifikus fluoreszcens antitest nem állt rendelkezésre). Ezzel a citkon termelés vizsgálhatóvá válik fehérje szinten. Összehasonlítottuk a kontrol és DX előkezelt tímusz (57.A. ábra) és lép (57.B. ábra) mintákban a citokin termelő CD4/CD25/FoxP3+ Treg sejt arányát. Azt tapasztaltuk, hogy a DX kezelt egerekben szignifikánsan emelkedett mindenkit citokin termelő Treg sejtek aránya. Mindkét szervben az IL-10 termelő Treg sejtek aránya emelkedett nagyobb mértékben.



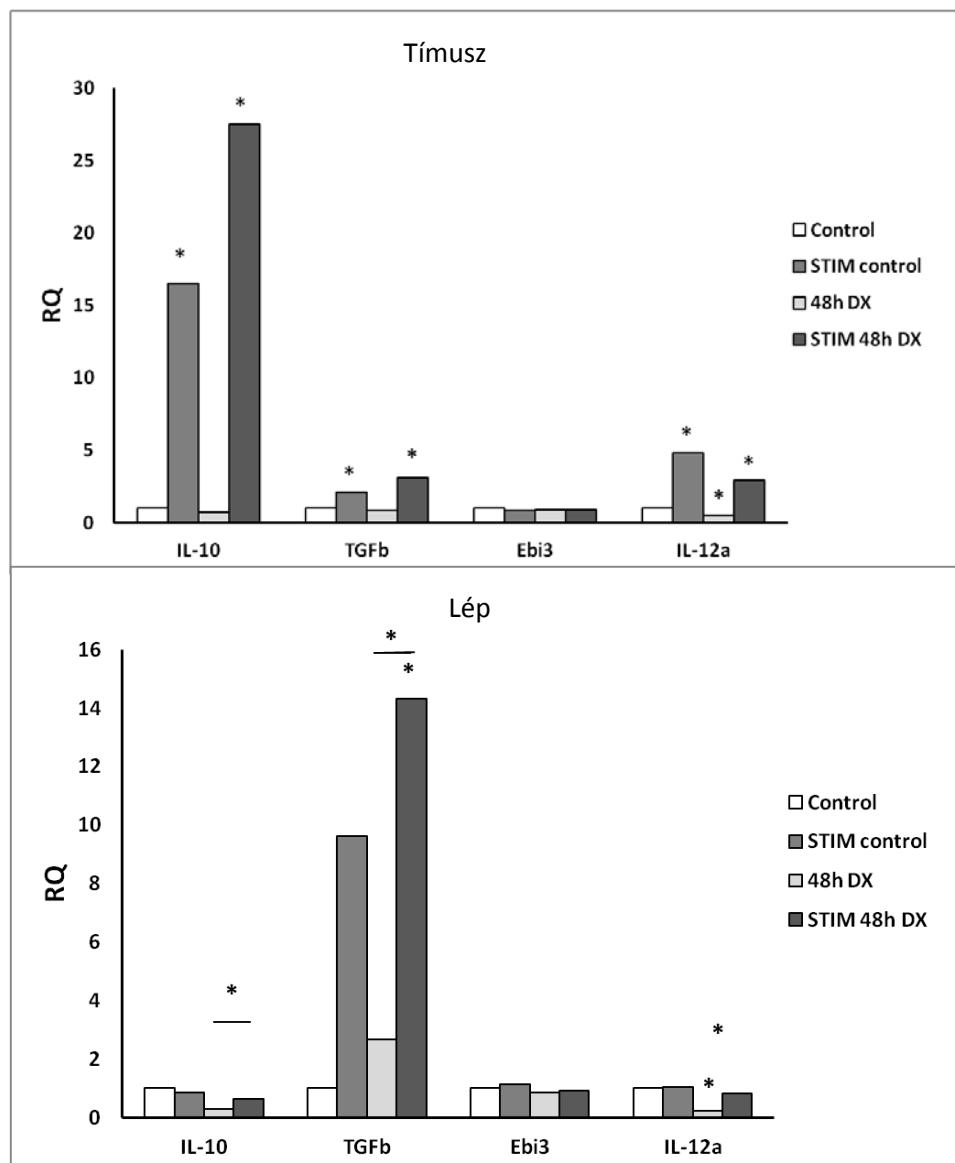
57. ábra: 2 napos DX kezelés után a citokin termelő Treg sejtek aránya emelkedik a tímuszban (A) és lépben (B) egyaránt.

Az izolált sejteket *in vitro* kezeltük PMA/ionomycin/Brefeldinnel 1 éjszakán át, majd áramlási citométerrel vizsgáltuk a Treg sejteken belül az IL-10 és TGF β pozitív Treg sejtek arányát.

Az eredmények 10 mérés átlagát mutatják (átlag \pm SEM)

(*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Megvizsgáltuk a Treg sejtek citokin termelését mRNS szinten is. Ehhez a DX kezelt és kontrol állatok tímuszából és lépéből CD4+CD25^{high+} Treg sejteket szeparáltunk FACSaria készülékkel, majd 4 órán keresztül *in vitro* PMA/ionomycinnel stimuláltuk (STIM) és ezután mindenkit mintából mRNS-t izoláltunk, cDNS-t írtunk és qRT-PCR-al vizsgáltuk az IL-10, TGF β és az IL-35 2 láncának (Ebi3 és IL-12 α) relativ expresszió változását (RQ) (58. ábra).



58. ábra: DX kezelt állatok tímuszából és lépéből izolált Treg sejtek citokin mRNS expresszió relatív változása.

Az állatokat 2 napig kezeltük DX-al (48h DX) majd *in vitro* PMA/ionomycinnel stimuláltuk (STIM) a citokin mRNS expresszió vizsgálatához. Az ábrán a relatív mRNS expresszió változást ábrázoltuk (RQ) 3 független kísérlet eredményeinek átlagából. Emelkedett az expresszió ha RQ>2.

A tímuszban az IL-10 és a TGF β expresszió is emelkedett (RQ>2) a DX kezelt *in vitro* stimulált (STIM) mintákban, de az IL-10 mRNS mennyisége a kezeletlen mintákban is magasabb volt és a DX hatásra bekövetkező emelkedés is sokkal látványosabb volt, mint a TGF β -é. Az IL-35 Ebi3 lánca nem mutatott változást, míg az IL-12 α lánc expresszió inkább csökkent a DX kezelt mintákban. A lépben található Treg sejtekben ellenkezőleg a TGF β mRNS szint volt magasabb és annak DX indukált emelkedése volt jelentős, míg az IL-10 és IL-35 láncai inkább kissé csökkent expressziót mutattak a DX kezelés hatására.

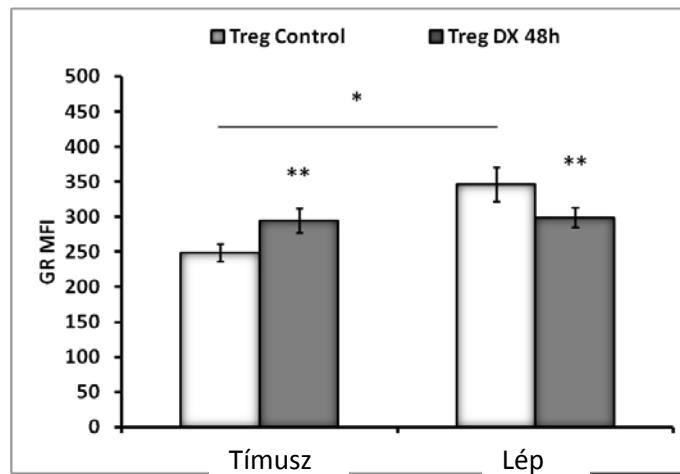
5.10. TREG SEJTEK GR ÉS FOXP3 EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

5.10.1. A GR ÉS FOXP3 EXPRESSZIÓ TREG SEJTEKBEN 2 NAPOS DX KEZELÉS UTÁN

Egy sejt GC érzékenységét jelentősen meghatározza, hogy milyen mértékben expresszálják a GR-t. Ezért a továbbiakban a Treg-re jellemző viszonylagos szteroid-rezisztencia, valamint a GR expresszió közötti összefüggést kerestük. Ehhez az intézetünkben már korábban is alkalmazott intracelluláris áramlási citometriás GR jelölést használtuk, amely korrelál a sejtek GR tartalmával mind fehérje, mind RNS szinten (Berki T., 2002).

Eredményeink szerint a kezeletlen állatok tímuszában alacsonyabb a GR fehérje szinje (MFI), mint a perifériás nyirokszervekben (lép) található Teg-ek GR szintje (MFI: átlag fluoreszcencia intenzitás) (**59. ábra**). Kétszeri, nagy dózisú, *in vivo* DX kezelés után a tímuszban túlélő (GC rezisztens) Treg-ek GR expressziója a kontrolhoz képest növekedett. Ezzel szemben a perifériás nyirokszervekben a korábbi humán vizsgálatainkban is tapasztalt GR MFI csökkenés volt megfigyelhető a DX kezelést követően. Ez a változás csak a lépben volt szignifikáns. Ezek alapján úgy tűnik, hogy DX kezelés hatására a tímuszban a túlélő GC rezisztens Treg-ekben az eredetileg alacsony GR szint emelkedik, a lépben pedig az érett T-sejtekre jellemző GR downreguláció figyelhető meg.

Megvizsgáltuk ugyanezen áramlási citometriás jelöléssel a tímusz és lép Treg sejtekben a FoxP3 expressziót is a FoxP3 fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékeit összehasonlítva, de fehérje szinten nem tudtunk szignifikáns expresszió változást kimutatni DX kezelés hatására. Ugyanakkor a szeparált tímusz és lép Treg sejtekből (CD4/CD25^{high+} expresszió alapján) izolált relatív mRNS génexpresszió qRT-PCR-al történő meghatározásakor a lépben a DX kezelt mintákban emelkedett a FoxP3 relatív expressziója ($RQ > 2$). A PMA/ionomycinnel kezelt mintákban a kontrolhoz képest emelkedett FoxP3 RQ értékeit mértük (**60. ábra**), de ezek nem mutattak eltétést a DX kezelt mintákban. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a tímuszban stabil a tTreg sejtek FoxP3 expressziója, míg a lépben DX kezelés hatására indukálható a CD4+CD25^{high+} sejtekben a FoxP3 expresszió, ami a perifériás Treg sejtek nagyobb plaszticitását jelzi.

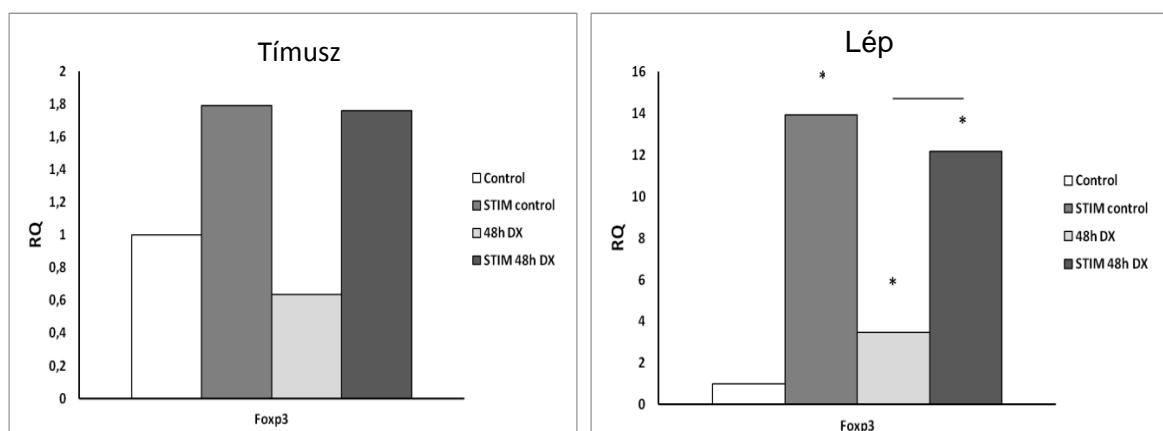


59. ábra: DX kezelés hatása a tímusz és lép Treg sejtjeinek GR expressziójára.

Az állatokat 2 napig (48h) kezeltük DX-al, majd 24 óra múlva a CD4/CD25/Foxp3+ Treg sejtekben intracelluláris GR-FITC antitest jelölést végeztünk és összehasonlítottuk a GR MFI értékeket.

Az ábrán 3 kísérlet ($n=9$) átlag (átlag \pm SEM) eredményeit ábrázoltuk

(* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)



60. ábra: Relatív Foxp3 génexpresszió értékek (RQ) a tímusz és lép CD4+CD25^{high+} sejtjeiben *in vivo* DX kezelés és *in vitro* PMA/ionomycin stimulálás (STIM) hatására.

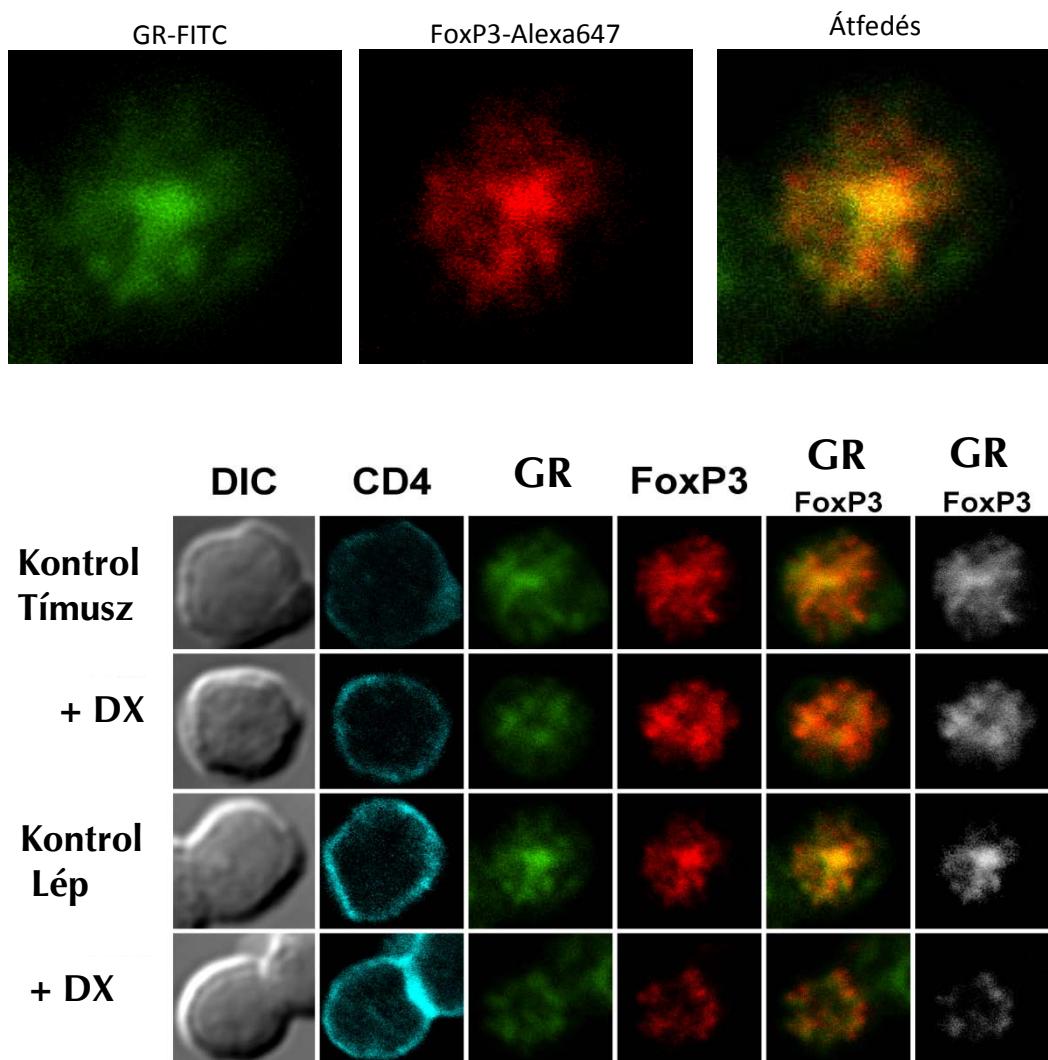
A sejteket a citokin mérésnél leírtak szintű kezelték. Az ábrán a relatív mRNS expresszió változást tüntettük föl (RQ) 3 független kísérlet eredményeinek átlagából. Emelkedett az experszió ha $RQ>2$.

5.10.2. A GR ÉS FOXP3 FEHÉRJÉK LOKALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA TREG SEJTEKBEN

Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy a tTreg sejtek rezisztensek a GC kezelésre, vagyis nem indul el bennük a mitokondriális apoptózis útvonal, ugyanakkor fokozódik a sejtek szuppresszor hatása, amelyet a citokin termelésük fokozódása és a lépből a FoxP3 expresszió növekedése is jelez. Ez alapján feltételezzük, hogy a Treg sejtekben a GC elsősorban a genomikus jelátviteli útvonalon fejti ki hatását.

Ennek bizonyítására megvizsgáltuk a Treg sejtekben a GR és FoxP3 celluláris lokalizációját konfokális mikroszkóppal. Ehhez a tímusból és lépből CD4+ sejteket izoláltunk EasySep

mágneses negatív szelekcióval és jelöltük CD4/CD25/FoxP3/GR specifikus fluoreszcens jelölt ellenanyagokkal.

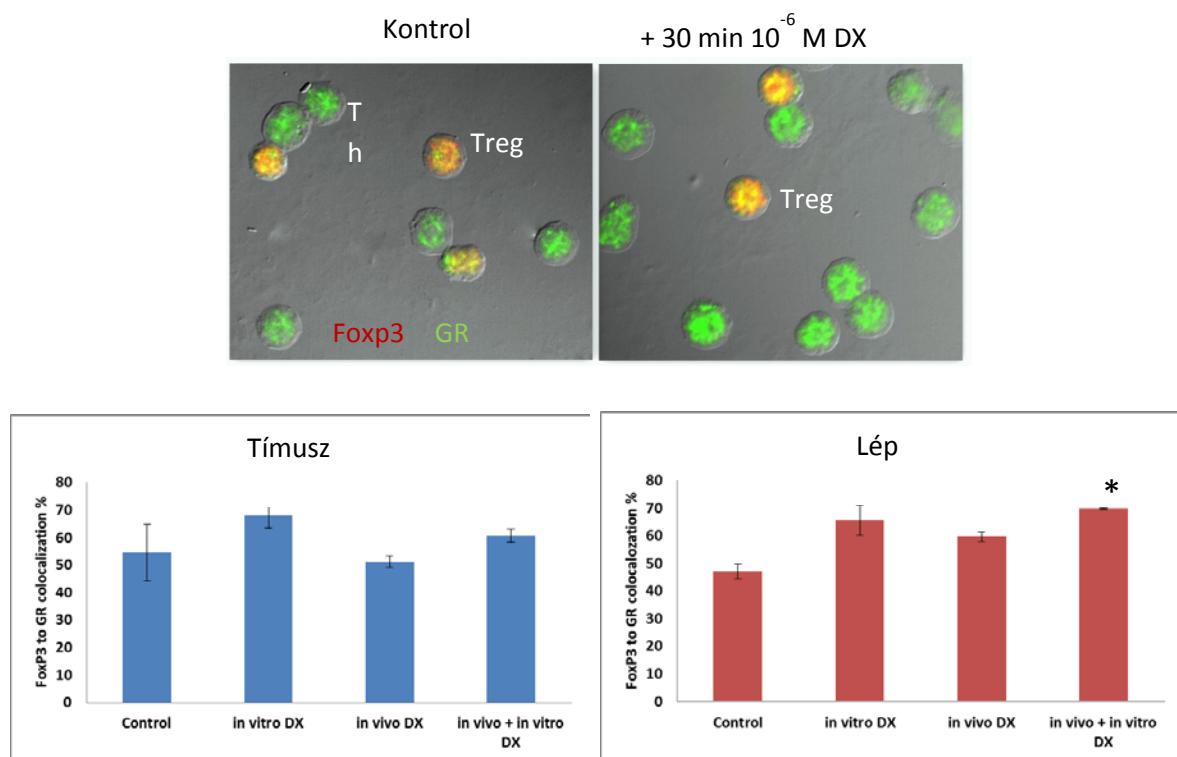


61. ábra: A GR és FoxP3 fehérje sejtmagi eoszlása és szoros kolokalizációja figyelhető meg a kezeletlen Treg sejtekben, ami kismértékben változik 30 perces *in vitro* DX kezelés hatására.

A kezeletlen állatok lépéből és timuszából CD4+ sejteket izoláltunk, majd jelöltük CD4 CD25 (kék) GR (zöld) és FoxP3 (vörös) fluoreszcens ellenanyagokkal. A GR-FoxP3 kolokalizációt a sárga szín jelzi.

A CD4/CD25/FoxP3+ sejtekben vizsgáltuk a GR és FoxP3 jelölődés mintázatát és a két molekula közelségét, amit a két fluoreszcens jel átfedő pixeljeinek (sárga) a mérésével követünk. Azt láttuk, hogy a kezeletlen mintákban a tímusz és lép Treg sejtekben is a GR és Foxp3 nagyon hasonló foltos, sejtmagi lokalizációjú jelölődést mutat (**61. ábra**). Az *in vitro* GC kezelés (+DX) hatására minden molekula magbeli csomós elhelyezkedése megváltozott és koszorú alakot öltött. Ezután megvizsgáltuk a két molekula közelségét a kolokalizációt jelző pixelek kvantitatív analízisével mintánként 100-100 sejtben (**62. ábra**). Már a kezeletlen Treg sejtekben is magas arányú, 50% körüli GR - FoxP3 kolokalizációt figyeltünk meg a lép és tímusz mintákban egyaránt. *In vivo* GC kezelés nem okozott változást a GR és FoxP3

kolokalizációban, de 30 perces *in vitro* DX kezelés fokozta a GR-FoxP3 kolokalizációt a tímuszban és lépben egyaránt. Ez alapján úgy tűnik, hogy a FoxP3+ sejtekben a GR ligand nélkül is nagyrészt a sejtmagban lokalizálódik (GR β ?), amely hasonló eloszlást mutat, mint a FoxP3 fehérjé. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a ligand-kötött GR és a Foxp3 két transzkripció faktorként egymás közelégeben helyezkednek el a sejtmagban és feltételezhetően szinergista hatásúak. Ennek bizonyítására további kísérleteket tervezünk.



62. ábra: A GR-FoxP3 kolokalizáció kvantitatív mérése Treg sejtekben.

A kezeletlen állatok lépéből és timuszából CD4+ sejteket izoláltunk, majd jelöltük CD4 CD25 (kék) GR (zöld) és FoxP3 (vörös) fluorszcens ellenanyagokkal. A GR-FoxP3 kolokalizációt (sárga) 100-100 sejtből mértük a tímusz és a lép *in vivo* és *in vitro* DX kezelt mintáin a GR-FoxP3 kolokalizált pixelek %-os értékétábrázoltuk.

5.11. IN VITRO TREG EXPANZIÓ LÉP ÉS TÍMUSZ CD4+ SEJTEKBŐL

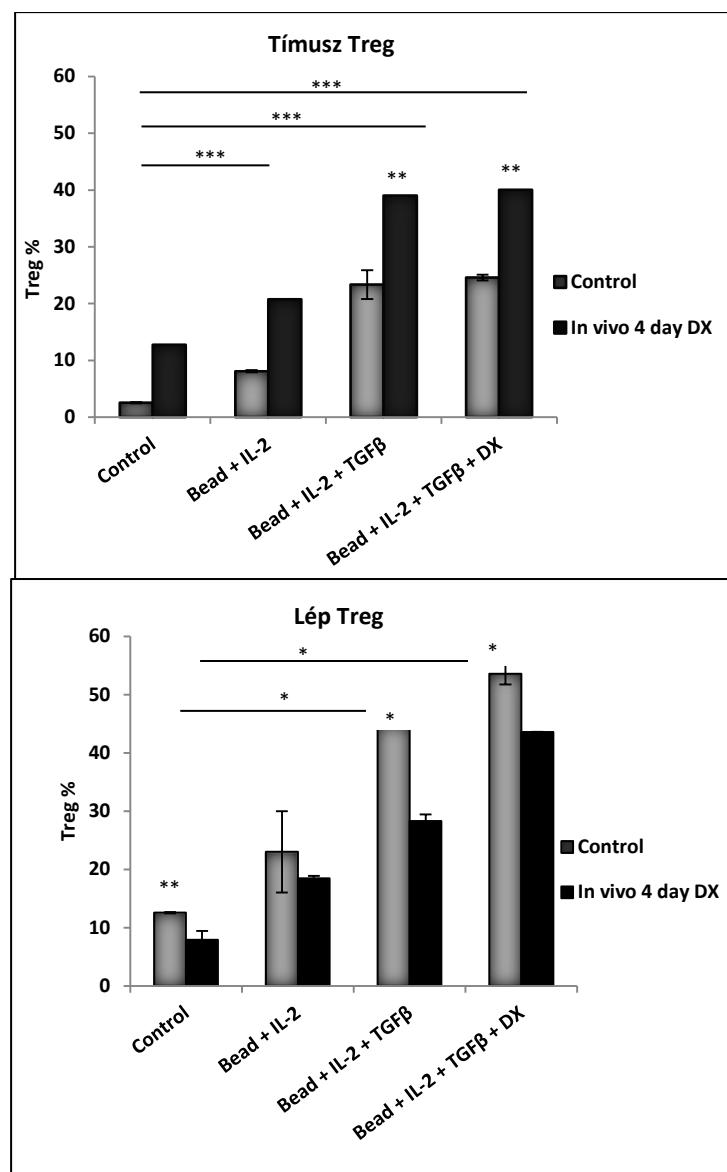
Számos területen folynak próbálkozások a Treg sejtek terápiás alkalmazására immunszuppresszív hatásaik miatt, mint pl. transplantáció vagy autoimmun kórképek gyógyítása. Az *in vivo* alkalmazáshoz a szervezetben előforduló kisszámú Treg sejt *in vitro* expanziójára van szükség. A Treg sejtek egyrészt citokinjeik révén, másrészt közvetlen sejt-sejt interakcióval fejtik ki gátló hatásukat a limfocitákra és az antigén bemutató sejtekre egyaránt. Jelen munkánk távoli célkitűzése, hogy egy proteoglyan indukált egér arthritis modellben megvizsgáljuk a tímusból és a lépből differenciált Treg sejtek hatékonyságát a betegség kialakulására és lefolyására. Ehhez kezdtünk előkísérleteket végezni Treg sejtek különböző *in vitro* történő legoptimálisabb differenciáltatási körülményeinek kidolgozására, ill. a sejtek funkcionális aktivitásának ellenőrzésére.

5.11.1. AZ *IN VITRO* TREG EXPANZIÓ MIKROKÖRNYEZETÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

Először lépből és tímusból izolálát CD4+ T-sejtek *in vitro* aktivációs körülményeit optimalizáltuk. A kezeletlen vagy 4 napig DX-al előkezelt állatok lépből és tímusból CD4+ T-sejtet izoláltunk negatív szelekcióval EasySep mágneses kit segítségével. A sejtek tisztaságát CD4 jelöléssel ellenőriztük és 97%-nál magasabb tisztaságú mintából indultunk ki. Mintánként 5×10^5 sejtet stimuláltunk *in vitro* 1ml RPMI-FCS médiumban 2-4 napig anti-CD3/CD28 mikrogyöngyök (bead) (2:1, gyöngy:sejt arányban) segítségével, rekombináns IL-2 \pm TGF β \pm 10^{-6} mol/l DX jelenlétében. Különböző időpontokban vizsgáltuk a sejtek életképességét és a CD4/CD25/FoxP3+ Treg sejtek %-os megoszlását.

Az *in vitro* stimulációs körülményeket összehasonlítva a CD3/CD28 bead és IL-2 jelenlétében 3 napos tenyésztés után a tímusz CD4+ sejteinek 8%-a tTreg, a lépből 24% iTreg differenciálódott. Mindkét szervből nagyobb arányban differenciálódtak Treg sejtek, ha TGF β is jelen volt (20% tTreg 45% iTreg). Ugyanakkor az *in vitro* DX jelenléte a tápfolyadékban csak a lépből differenciálódó iTreg arányt növelte (55% iTreg), a tímusz CD4+ sejtekből a tTreg differenciálódásra hatástalan volt (**63. ábra**). Megvizsgáltuk azt is, hogy az *in vivo* DX előkezelt lépből és timusból milyen hatékonysággal lehet *in vitro* Treg sejtet differenciáltatni. A tTreg differenciálódás az *in vivo* DX-al előkezelt tímusból hatékonyabb volt (38% tTreg), mint az kezeletlen tímuszokból, de itt is a TGF β jelenléte szükséges volt (**63. ábra**). Ennek egyik magyarázata, hogy a 4 napos DX kezelés eleve emelte a CD4+ sejtekben belüli Treg sejt arányt a tímuszban (3%-ról 8%-ra), így a kiindulási Treg arány magasabb volt. Ezzel szemben a 4 napos DX előkezelés a lépben a CD4+ T-sejtek és Treg sejtek számát is csökkenti, ezért volt hatékonyabb a kezeletlen lépből az *in vitro* Treg differenciálódás.

Ezek alapján a Treg expanzió a perifériás nyirokszervből izolált CD4+ sejtekből hatékonynak bizonyult, ami az iTreg expanzió nagyobb plaszticitását bizonyítja. A 4 napos DX kezelés olyan nagymérvű tímusz involúciót okoz, hogy nehézségeket okozott több állat tímusból kinyerni a szükséges mennyiségű CD4+ T-sejtet. Ezért a továbbiakban 4 napos *in vivo* DX előkezelés után csak a lépet vizsgáltuk.

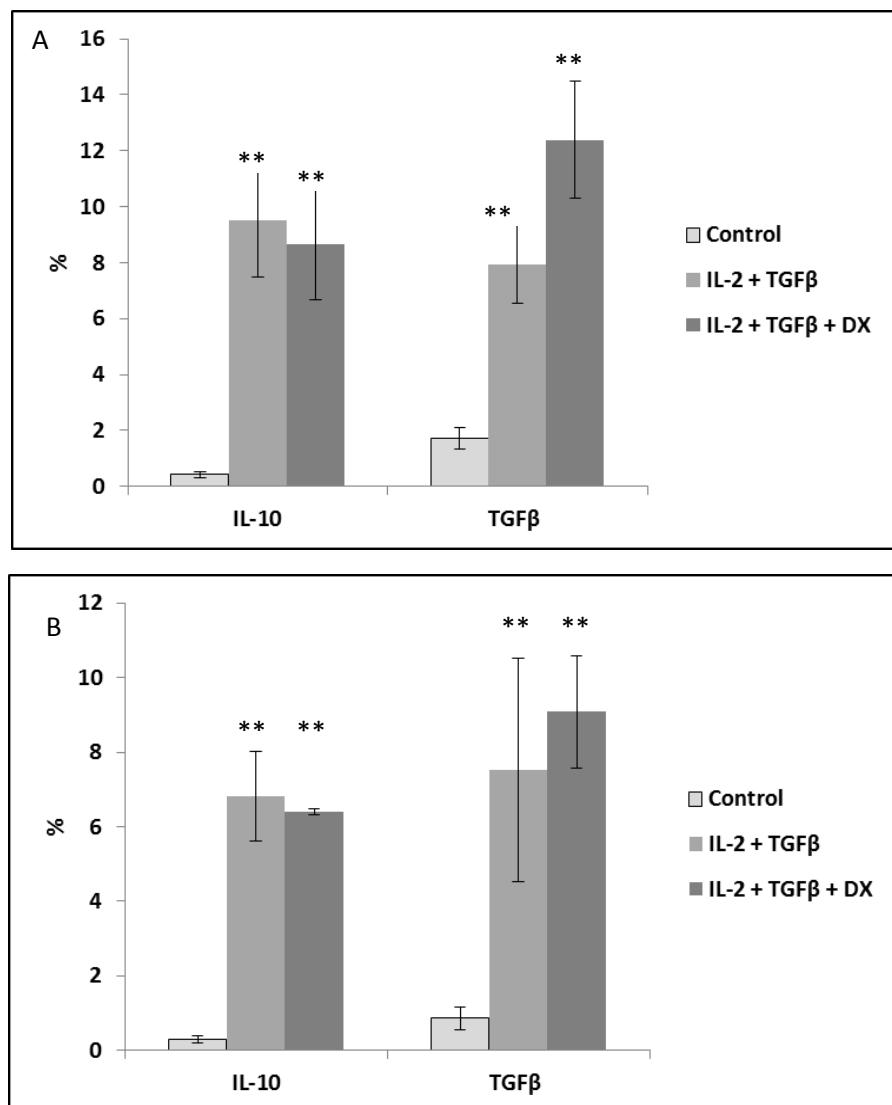


63. ábra: *In vitro* Treg expanzió tímuszból és lépből izolált CD4+ sejtekből.

Kontrol és 4 napig DX-al előkezelésű állatok tímuszából és lépéből CD4+ T-sejteket izoláltunk, majd anti-CD3/antiCD28 bead segítségével stimuláltuk a sejteket *in vitro* rekombináns IL-2, TGF β és DX hozzáadásával. Az ábrán 3 kísérletből származó minták ($n=9$) eredményeinek átlagát ábrázoltuk (átlag \pm SEM) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

5.11.2. IN VITRO DIFFERENCIÁLTATOTT TREG SEJTEK CITOKIN TERMELÉSE

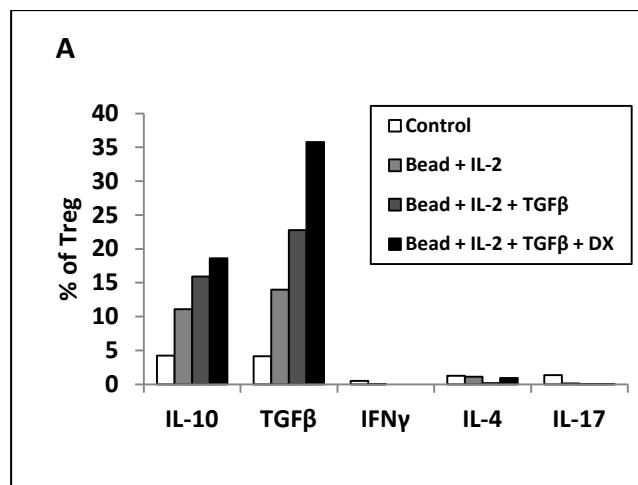
Az *in vitro* Treg expanzió hatékonyságát nemcsak a sejtszám növekedése, de a sejtek funkcionális aktivitása is jelzi. A Treg sejtek szupresszor funkcióját az általuk termelt IL-10 és TGF β citokinek biztosítják. Ezért megvizsgáltuk a tenyészett sejtek citokin termelését a 3. napon. Mind a tímusz, mind a lép eredetű Treg sejtek legnagyobb arányban a CD3/C28 microbead, IL-2 és TGF β jelenlétében termeltek szupresszor hatású citokint. A tímusz eredetű TGF β termelő Treg-ek megoszlása tovább emelkedett *in vitro* DX hozzáadása esetén (64. ábra).



64. ábra: *In vitro* differenciálódó tímusz (A) és lép (B) eredetű Treg sejtek citokin termelése DX jelenlétében és nélkül.

A tímusz és lép eredetű CD4+ T-sejteket 3 napig expandáltuk CD3/CD28 bead (control), IL-2 + TGF β citokinek jelenlétében \pm DX hozzáadásával. Mindkét szervből differenciáltatott Treg sejtek TGF β termelése emelkedett DX jelenlétében. Az ábrán 3 kísérletből származó minták ($n=9$) eredményeinek átlagát ábrázoltuk (átlag \pm SEM) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

Megvizsgáltuk a lép eredetű perifériás CD4+ T-sejtekből differenciáltatott iTreg-sejtek citokin mintázatát is, az IL-10, TGF β mellett az IL-4, IFN γ és IL-17 termelő sejtek megoszlását detektálva (65. A ábra). Azt tapasztaltuk, hogy 4 nap Treg exponzió (stimuláció) hatására tovább fokozódik az IL-10 (18%) és TGF β (36%) termelő Treg sejtek aránya, a többi citokin 0-1%-ban mutatható ki a sejtekben.



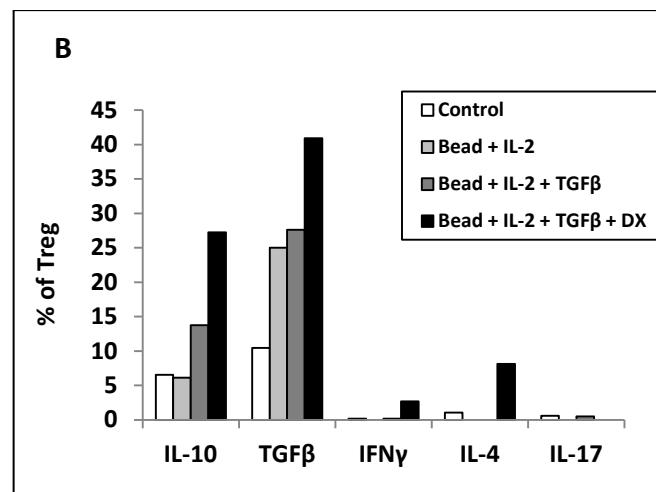
% of Treg	IL-10	TGFβ	IFNγ	IL-4	IL-17
Control	4,265	4,145	0,51	1,275	1,34
Bead + IL-2	11,115	13,96	0,055	1,145	0,13
Bead + IL-2 + TGFβ	15,915	22,775	0	0,2	0,02
Bead + IL-2 + TGFβ + DX	18,605	35,77	0	0,945	0,055

65. A. ábra: *In vitro* differenciálódó lép eredetű Treg sejtek citokin mintázata.

CD4+ T-sejteket aktiváltunk, majd a 4. napon vizsgáltuk a citokinek mintázatát intarcelluláris áramlási citometriás jelöléssel. Az ábrán 3 kísérlet egy reprezentatív eredményét tüntettük föl.

A táblázat a citokin termelő Treg sejtek %-os arányát mutatja-

Érdekes megfigyelésünk, hogy a 4 napos DX előkezelt lépből differenciáltatott Treg sejtek 27%-a IL-10-et, 41%-a TGFβ-t termel, de a sejtek 2,7%-ban kimutatható IFNγ és 8%-ban IL-4 is (65. B. ábra). Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy a lép CD4+ T-sejtjeiből nagyobb mennyiségben differenciáltatható szupresszor funkciójú CD4+/CD25+/FoxP3+ Treg sejt. *In vivo* 4 napig DX előkezelt lépből differenciáltatott Treg sejtekben az *in vitro* DX hatás nem-csak a szupresszor hatású citokinek szekrécióját emelte, de megfigyelhetővé vált IL-4 és IFNγ citokin termelés is, ami további vizsgálatokat igényel. Ezek alapján a kezeletlen lépből kiindulva az általunk optimalizált *in vitro* mikrokörnyezetben egyértelműen szupresszor hatású citokineket termelő iTreg sejtek differenciáltathatók.



% of Treg	IL-10	TGFβ	IFNγ	IL-4	IL-17
Control	6,55	10,44	0,15	1,04	0,59
Bead + II-2	6,11	25	0	0	0
Bead + II-2 + TGFβ	13,75	27,61	0,17	0	0,5
Bead + II-2 + TGFβ + DX	27,27	40,91	2,7	8,11	0

65. B. ábra. *In vitro* differenciálódó 4 napos DX előkezelt lép CD4+ sejtjeiből származó Treg sejtek citokin mintázata.

Az egereket 4 napig kezeltük DX-al, majd a lépből CD4+ T-sejteket izoláltunk és aktiváltunk 4 napig. Ezután vizsgáltuk a citokinek mintázatát a Treg sejtekben intarcelluláris áramlási citometriás jelöléssel. Az ábrán és a táblázatban 3 kísérlet egy reprezentatív eredményét tüntettük föl.

dc_1343_16

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MEGBESZÉLÉS

Munkánk célja a GC hormon terápiás alkalmazásakor tapasztalt immunszuppresszív hatások sejtszintű és molekuláris szintű vizsgálata volt. Ugyan a fiziológiai GC hormon termelés és a stresszhelyzetben megemelkedett GC homonszint valamint a terápiás GC adagolás is számos szerv és sejtípus működését befolyásolja célunk a specifikus immunválaszt szabályozó T limfociták jelátviteli útvonalaiiban bekövetkezett változások vizsgálata volt.

Ehhez eszközökkel szolgált az intézetünkben a világban elsőként előállított glukokortikoid receptor specifikus monoklonális ellenanyag család (anti-GR), amelyek a molekula konzervált regulatórikus doménjében elhelyezkedő APTEK26 szekvencia epitópait ismerik fel. (Az ellenanyag előállítását Falus András Professzor szorgalmazta és a specifikus szekvencia kiválasztását is Ő végezte el.) Az ellenanyagok jellemzése után kidolgoztunk egy áramlási citometriás eljárást a GR expresszió fehérje szintű vizsgálatára, amely lehetőséget ad a klinikumban oly sokszor előforduló GC rezisztencia mögött álló GR downreguláció nyomon követésére (Berki T., 1998). Vizsgáltuk nephrosis szindrómás gyerekeknek és vese transzplantált betegeknek adott nagydózisú GC lökésterápia hatására bekövetkező GR expresszió változásokat (Visy M, 2002., Berki T., 2002.). Ugyancsak kollaborációban vizsgáltuk a hosszantartó poszt-traumás stressz hatásait (szerb-horvát háborúban harcoló katonák mintáin) a limfociták GR expressziójára (Gotovac. K. et al. 2003). Szintén kollaborációs munkában vizsgáltuk egy ultra-szenzitív liposzóma-anti-GR mAb konstrukcióval végzett áramlási citometriás eljárással a membrán-GR megjelenését és szerepét reumatoid arthritis (RA) betegek mononukleáris sejtjein, elsősorban a monocitákon és B limfocitákon (Bartholome B. et al. 2004). Ezen klinikai vizsgálatokkal párhuzamosan, ahol a hosszantartó GC kezelés genomikus hatásaira kaptunk információt a perifériás vérben található limfocita alcsoportokban, továbbra is kérdésként merült fel a GC kezelés T-sejt jelátvitelre gyakorolt hatása. Kíváncsiak voltunk, hogy a tímuszban zajló elsődleges T-sejt differenciálódás kezdeti lépései-től a perifériás effektor sejtéig érésig tartó folyamatban hogyan változik a sejtek GC érzékenysége, milyen jelátviteli útvonalak indulnak el a GC hatásra önmagában és a TcR stimulációval egyidőben. Ezen folyamatok vizsgálata humán primer sejtekben nagyon nehéz, ezért modell állatokat és *in vitro* tenyészített folyamatos T limfocita eredetű sejtvonalakat használtunk.

I. TIMOCITÁK GC HORMON ÉRZÉKENYSÉGE ÉS GR EXPRESSZIÓJUK

Elsőként a GC hormon primer T-sejt differenciálódásában játszott szerepét vizsgáltuk a tímuszban a 4 timocita alcsoport összetételének és abszolút sejtszámnak mérésével. Ismert, hogy hosszantartó stressz, vagy GC adagolás a tímusz atrófiáját eredményezi. Eredményeink szerint a hosszantartó GC kezelés a kettős pozitív (DP) timociták dózis-függő deplécióját okozza (Berki et al. 2002) mind Balb/c mind az AND TcR transzgenikus egértörzsben vizsgálva (Pálinkás et al. 2008). A többi timocita altcsoport GC érzékenységében a következő sorrendet állíthatjuk föl: DP > DN > CD4 SP > CD8 SP. Vagyis több napos GC kezelés után a

DP timociták pusztulása miatt a SP sejtek dominanciája áll elő és tímuszra jellemző SP sejt arány CD4 : CD8=3:1 megfordul és a CD8+ sejtek kerülnek többségbe (CD4: 43% : CD8: 48% = 1:1), ami az jelzi, hogy a CD8+ citotoxikus T-sejtek a legrezisztensebbek a GC indukált apoptózisra. Humán vizsgálati adataink szerint is a perifériás vérben található CD8+ T-sejtek és B limfocitákban jelentkezik a legerőteljesebb GC indukálta homológ GR downreguláció, ami a sejtek GC rezisztenciájával mutat összefüggést (Berki et al. 2002). Nyomon követtük a GC kezelés felfüggesztése után a timocita alcsoportok regenerálódását is és azt tapasztaltuk, hogy a kezelés után még 4 napig alacsony a timocita sejtszám, majd a 6. napon új DP sejtek jelennek meg és a 15. napra visszaáll a tímusz eredeti sejtes összetétele. Ebből arra következtethetünk, hogy fiatal egerekben még teljes a tímusz regenerációs képessége.

Ismert tény, hogy a cTEC sejtek lokálisan is termelnek GC-t a tímuszban, amely a kölcsönös antagonizmus modell szerint szerepet játszik a DP sejtek pozitív szelekciójában. Kísérleteinkkel bizonyítani tudtuk, hogy a TcR stimuláció (anti-CD3 kezeléssel vagy PCC antigén adagolással) és egyidejű GC kezelés mind *in vivo*, mint *in vitro* szövetkultúrában a DP sejtek túlélését eredményezi, vagyis a két jelátviteli útvonal összekapcsolódik a DP sejtekben. Ezt jelzi a túlélő DP és CD4 SP sejtek fokozott CD69 expressziója valamint a DP sejtek emelkedett Bcl-2 expressziója és megtartott mitokondriális funkciója is (Boldizsár et al. 2006). Ha *in vitro* szövetkultúrában gátoltuk az endogén cTEC-ek GC szintézisét (Methyrapon előkezeléssel), akkor a sejtek fokozott apoptózát figyeltük meg, vagyis az intakt szövetkultúrában a cTEC - timocita interakció a TcR jelátviteli útvonal dominanciáját és a sejtek pusztulását okozza. Ez azt támasztja alá, hogy a DP sejtek pozitív szelekciója során szükség van a TcR jel mellett a lokális GC hormon jelenlétére, vagyis a DP timocita akkor tud a tímuszban tovább differenciálódni, ha mind a TcR mind a GC indukálta jelátviteli útvonal aktiválódik.

Miután eddigi eredményeink azt mutatták, hogy a DP sejtek a legérzékenyebben a GC hormon apoptotikus hatására, valamint ez a TcR egyidejű aktivációjával felfüggeszthető, megvizsgáltuk a különböző timocita alcsoportokban a GR expressziót. Meglepetésünkre azt látunk, hogy a GC-ra legérzékenyebb DP sejtekben a legalacsonyabb a GR expresszió mind fehérje, mind mRNS szinten (Berki T., 2002.). Áramlási cytometriával, valamint real-time PCR-ral kapott eredményeinkhez hasonlóan konfokális mikroszkópos módszerrel vizsgálva a DP-sejtekben expresszálódik a legkevesebb GR az éretlen DN és az érett CD4+, valamint a CD8+ SP sejtekhez viszonyítva. Emellett eltérő festődési mintázatot is találtunk. A DP-sejtekben a GR eloszlása granuláris, míg a CD4+ SP sejtekben homogén. A DP-sejtek domináns granuláris festődési mintázata utalt arra, hogy a GR ezekben a sejtekben mitokondriális elhelyezkedésű lehet. A GR eltérő működését jelzi a DP timocitákban az a megfigyelésünk is, hogy GC kezelés ezekben a sejtekben nem okoz GR downregulációt szemben az összes többi, GC-ra kevésbé érzékeny DN és SP sejtcsoporttal, ahol a GR downregulációja figyelhető (Boldizsár et al. 2006). Ugyanakkor a GC ligand indukált GR funkciót, vagyis az apoptózist nem tudtuk felfüggeszteni a GR magi transzlokációját blokkoló kezelésekkel (RU48044, RU 486). Ez azt jelenti, hogy a timocita apoptózis nem a klasszikus genomikus GR jelátviteli útvonalon, hanem valamelyik nem-genomikus mechanizmussal történik. A DP timocitákban a mitokondriális funkció romlása és a Bcl-2 upreguláció számunkra azt jelezte, hogy a sejtekben a mitokondriális apoptózis útvonal aktiválódott GC kezelés hatására (Pálinkás L., 2008). Irodalmi adatok szerint a GC-indukált apoptózisra érzékeny limfoid eredetű

tumorsejt-vonalakban a GR a mitokondriumba is transzlokálódik ligandkötés hatására (Sionov RV., 2006). Ezért a továbbiakban vizsgáltuk a GR szubcelluláris lokalizációját a timocitákban.

II. A DP TIMOCITÁK MITOKONDRIÁLIS GR JELÁTVITELI ÚTVONALA ÉS APOPTÓZIS MECHANIZMUSA

Ligand nélkül a GR a citoplazmában a Hsp-90 fehérjét is tartalmazó multimolekuláris komplexhez kötődik, majd ligandkötés hatására arról leválva további jelátviteli eseményeket indít el (lásd Bevezetés 2.3. A glukokortikoid receptor jelátviteli útvonalak áttekintése), ezek egyike a mitokondriális transzlokáció. Eredményeink szerint a DP-timocitákban rövididejű, nagydőzisú *in vitro* GC kezelés hatására a GR főleg a mitokondriumba transzlokálódik (Talabér G. 2009). Továbbra sem ismert azonban annak a mechanizmusa, hogy milyen módon transzportálódik a GR a mitokondriumba. A GR ligandkötő doménjében (az 558-580 aminosavak között) leírtak olyan motívumokat, melyek hasonlóak a citokróm C oxidáz szekvenciájában található mitokondriális lokalizációs szignál szekvenciához (2.3.2.4 A GR mitokondriális transzlokációja, 8. ábra). Továbbá, GR-t nem expresszáló sejtvonalakba ilyen mitokondriális lokalizációs szignált is tartalmazó GR-t kódoló plazmidokat transzfektáltak, amelyekben az expresszálódó GR csak a mitokondriumba képes transzlokálódni, a sejtmagba viszont nem (Sionov RV., 2006.2). Ezek a GR-variánsok ligandkötés hatására kivétel nélkül apoptózist okoztak. A GR pontosabb elhelyezkedését vizsgálva, GC-érzékeny sejtvonalakban a GR a mitokondriális belső membránból kimutatható volt (Sionov RV., 2006.1). Meglepő módon, kezeletlen DP-sejtekben is megfigyelhető volt konfokális mikroszkópiával alacsony szintű GR-mitokondrium kolokalizáció, melyet már a DP-sejtek granuláris GR-festődési mintázata is felvetett. Ezek alapján a GR akár ligand-independens módon is jelen lehet a mitokondriumban (Scheller K., 2000), vagy mivel a DP sejtek a tímuszban GC-gazdag mikrokörnyezetben helyezkednek el (Wang D., 2006, Talabér G., 2013), ez szintén hozzájárulhat a GR downregulációjához és a mitokondriális lokalizációhoz.

A mitokondriumok fontos szerepet töltenek be az apoptotikus jelátviteli események során a jelek fogadásában és a sejthalál végső fázisának a lebonyolításában (Goldenthal MJ., 2004). A GC-indukált apoptosis során eddig irodalmi adatok alapján a mitokondriumnak is fontos szerepe lehet (Herold MJ., 2006) (*Id. Bevezetés 2.6. fejezete: A GC-k hatása T-sejtekben és a tímuszban*). Ezt alátámasztja az az eredményünk is, hogy magas dózisú DX a túlélő DP-sejtekben megnövelte az antiapoptikus Bcl-2 szintjét (Pálinkás L., 2008). Kísérleteink szerint a GR ligandkötést követően 30 perc alatt transzlokálódott a mitokondriumba DP-sejtekben és ennek következményeként nem-genomikus úton lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált. Rövid idejű, nagy dózisú methylprednisolone szintén csökkentette a mitokondriális funkciót concanavalin A-val stimulált patkány timocitákon (Buttgereit F., 1994), így lehetséges, hogy a GC-k ugyanazon a nemgenomikus módon hatnak a legtöbb GC-érzékeny sejtvonalra. Neuronokban (az idegszövetet érzékenyen érinti a stresszreguláció, így a GC-k is) a közelmúltban írták le, hogy a GR a citoplazmában asszociálódik a Bcl-2-vel, majd ez a komplex ligandkötés hatására a mitokondriumba

transzlokálódik (Du J., 2009). A Nur77 magreceptor, amelynek jelátvitele fontos szerepet játszik a timociták negatív szelekciója során (Sohn SJ., 2007), mitokondriális transzlokációja szintén képes apoptózist kiváltani úgy, hogy a Bcl-2 fehérjét proapoptotikus fehérjévé konvertálja (Thompson J., 2008). Feltételeztük, hogy hasonló mechanizmussal, a Bcl-2 fehérjecsalád tagjaival való kapcsolódáson keresztül okoz apoptózist timocitákban a mitokondriális GR is. Azt találtuk, hogy a GR közvetlen fizikai kapcsolatban van a timociták mitokondriumában és citoplasmájában egyaránt a Bak, Bim és Bcl-xL fehérjékkel. GC kezelés hatására a mitokondriális GR - Bcl-xL asszociáció csökkent, a GR - Bim interakció fokozódott, amelyet a Bax mitokondriális akkumulációja kísért. A GR és Bax között nem tudtunk direkt fizikai kapcsolódást kimutatni (Prenek L., 2016.)

További lehetséges fehérje partner a GR mitokondriális transzlokációja során valamelyik hősokkfehérje lehet, hiszen a GR a citoplazmában a Hsp-90 és egyéb más hősokkfehérjékhez kötődik, ligandkötés hatására azokról disszociálódik. A mitokondriumban is történhet ilyen asszociáció valamely másik hősokkfehérjével (Hsp-60, Hsp-70). Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a GR a mitokondriumban a Hsp-60 hősokkfehérjével kapcsolódik össze, de ez még további megerősítést igényel. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a mitokondriális GR által elindított jelátviteli folyamatokban tehát feltehetőleg mind a Bcl-2 fehérjecsalád tagjainak, mind a hősokkfehérjéknek fontos szerepe lehet. A mitokondriumban található hősokkfehérjék közül a Hsp-60 a mitokondrium belső membránjában található és a mitokondriumba történő fehérjeimportban segédkezik (Deocaris CC 2006). A Hsp-60 a legújabb adatok szerint egy Janus-arcú hősokkfehérje, mivel viselkedhet pro- és antiapoptotikus mediátorként is az apoptotikus stimulustól és sejtíppustól függően (Chandra D., 2007). A cardiomiyocytákat például úgy védi a programozott sejthaláltól, hogy komplexet képez a proapoptotikus Bax fehérjével és meggátolja annak áthelyeződését a mitokondrium külső membránjába (Kirchhoff SR., 2002). További kísérletek elvégzését tervezzük annak kiderítésére, hogy a Hsp-60 milyen hatást fejt ki a GC-indukálta apoptózis során DP-timocitákban.

A fenti fehérje interakciók mellett a GR a klasszikus sejtmagi hatásmechanizmusához hasonlóan a mitokondriumba transzlokálódva kötődhet a DNS-hez ligand aktivált transzkripció faktorként, illetve más transzkripció faktorokhoz (pl.NF-κB) is. A mitokondriális genomban leírtak a GRE-hez hasonló szekvenciákat (Demonacos CV., 1996), illetve a magi transzkripció faktorok közül néhányat (NFAT, NF-κB) különböző sejtvonalak mitokondriumában is azonosítottak (*Bevezetés a 2.3.2.4. a GR mitokondriális transzlokációja fejezete*) (Psarra AM., 2008). Nemrég leírták, hogy HEK-293 sejtvonalban a mitokondriális GR összekapcsolódik a thioredoxin-2 fehérjével (Psarra AM., 2009). A kapcsolódás következményeképp fokozódik a mitokondriális oxidatív foszforilációt irányító enzimek génjeinek átírása és a légzési lánc funkciója. Ebben a kísérletsorozatban a GR az NF-κB transzkripció faktorhoz is kötődött a mitokondriumban, mert az NF-κB eredetileg gátolja a mitokondriális oxidatív foszforilációt. Mivel a DP-timocitákban kb. 30 perc alatt már jelentős mértékű mitokondriális GR-transzlokáció látszik, illetve a membránpotenciál is lecsökken, így kevésbé valószínű, hogy a GR a mitokondriális DNS-hez kötődve fejtené ki proapoptotikus hatását.

A GR-nek, ahogy a bevezetésben részletesebben bemutatásra került, több tirozin és szerin foszforilációs helye is van. A GR megfelelő szerinmaradékokon történő foszforilációja szin-

tén szerepet játszhat abban, hogy bizonyos sejttípusokban, így a DP timocitákban a GR csak a mitokondriumba és nem a sejtmagba transzlokálódik. Hasonló jelenséget figyeltek meg az előbb is említett Nur77 esetében, melyet a timocita, illetve T-sejt apoptózis során a megfelelő szerinmaradékon történő foszforiláció irányít a mitokondriumba (Wang A., 2009). Előzőleg patkányagyszövetben (prefrontális agykéreg és hippocampus) pontosan jellemezték a GR-foszfoizoformák eloszlását az intracelluláris kompartmentekben különböző stressz ingerek hatására. Krónikus izoláció hatására a GR a 232-es szerinen foszforilálódott (ezen a szerinmaradékon a GR-t a ciklin-dependens kinázok foszforilálják, viszont az egér, a patkány és a humán foszforilációs helyek különböznek) és a mitokondriumba transzlokálódott, valamint ott a citokróm oxidáz gének expresszióját modulálta (Adzic M., 2009). Jelenleg timocitákban nem ismert a GR szerin-foszfoizoformák eloszlása.

Újabb, a mitokondriumok és a T-sejt jelátvitel összefonódására utaló érdekes eredmény, hogy a T-sejt aktiváció során a mitokondriumok T-sejtekben az immunológiai szinapszis köré csoportosulnak (Schwindling C., 2010). Ez a transzlokáció kalcium-beáramlás dependens módon történik, de nem függ a kalcium-beáramlás pontos helyétől a membránban (Quintana A., 2007). Az apoptotikus stimulusok során az endoplazmatikus retikulumból kiáramló kalciumot nagyrészt a mitokondrium veszi fel, ez mitokondriális duzzadást, valamint az átmenetileg permeabilitást biztosító pórus (permeability transition pore-PTP) megnyitását eredményezi (Giacomello M., 2007), amely végül beindítja az apoptotikus kaszkádot. Nem ismert, hogy a rövididejű, nagy dózisú DX-kezelés befolyásolja-e a mitokondriumok polarizációját a T-sejt receptor körül, illetve arról sincs adat, hogy a DX hogyan hat timocitákban a mitokondriális kalcium-homeosztázsra rövid és hosszú távon. Azt azonban sikerült kimutatnunk, hogy DP timocitákban a ligand-kötött GR a mitokondriális membrán-potenciál csökkenését majd citokróm C felszabadulást és kaszpáz 9 aktivációt, majd kaszpáz 3 aktivációt okoz. Arra nézve kevés információ van, hogy mi lehet az oka, hogy a DX kezelt mintákban emelkedik a kaszpáz 8 aktív forma is, ami az intrinsic és extrinsic apoptózis útvonal aktiváció közti átkapcsolást jelezheti. De felmerül az is, hogy a nagydózisú GC hatásra bekövetkező gyors változások mögött a GC direkt membránhatása áll aminek a következménye a már szelektálódó DP timociták extrinsic apoptózis útvonalának az aktivációja. Tekintettel arra, hogy a timociták DX-indukálta apoptózis molekuláris mediátorairól sok, részben ellentmondásos adat gyűlt össze, melyek szinte kivétel nélkül a teljes timocita populációkon (kb. 75-80%-a DP-sejt, 10-15%-a CD4⁺ SP-sejt vad-típusú egérben) végzett vizsgálatokból származnak, ezért különösen fontosnak tarjuk, hogy jelen munkában az egyes timocita alcsoportokat elkülönítve vizsgáltuk. Ugyancsak újdonság, hogy szubcelluláris frakciókban elkülönítve vizsgáltuk a GR lokalizációt és a GR -Bcl-2 család fehérjéivel történő aszociációt.

Munkánk első részének eredményeit összefoglalva, adataink új információt nyújtanak az éretlen DP-timociták fokozott GC-érzékenységéről, melynek hátterében az egyik tényező a GR mitokondriális transzlokációja, amely egy új alternatív GR-jelátviteli útként különösen fontos a GC-indukálta apoptózis mechanizmusának részletesebb megismerése és így a DP timociták szelekciós folyamatainak megértése terén.

III. A GC GYORS NEM-GENOMIKUS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A TCR JELÁTVITELI ÚTVONALRA

Munkánk további szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy a timociták túlélését jelentő TcR és GR jelátviteli útvonalak milyen pontokon találkoznak. A timuszban elhelyezkedő sejtek különböző érési stádiumban vannak, így azokon nehéz a jelátviteli útvonalak molekuláris szintű vizsgálata. Ezért a továbbiakban Jurkat T-sejteket használtunk, amely elfogadott *in vitro* modellje a T-sejt aktiváció vizsgálatának. További segítséget jelentett, hogy a TcR legfontosabb jelátviteli molekuláit már azonosították, és egyre több olyan Jurkat sejt mutáns T-sejt vonal is rendelkezésre áll, amelyekben valamelyik molekula hiányzik, például az Lck deficiens JCAM1A vagy a ZAP-70 deficiens P116. Más munkacsoportok (Van Leathem et al., 2001) is foglalkoztak a GC-ok immunszuppresszív hatásai mögött álló tirozin foszforilációs változásokkal, de azok a vizsgálatok hosszabb idejű (6-16 órás) 1 µM DX GC kezelés után történtek. A szerzők csökkent TcR CD3 ζ-lánc, ZAP-70 és LAT foszforilációt találtak és azzal magyarázzák, hogy a DX megváltoztatja fontos lipid-raft asszociált molekula elhelyezkedését és acylációját (Van Laetehm F., 2003). Az általunk vizsgált GC hatások 10 µM DX kezelés perceken belüli eseményeit rögzítik, melyek kétséget kizároan nem-genomikus mechanizmust jelentenek. Azt találtuk, hogy DX kezelés önmagában perceken belül foszforilációs eseményeket indít el Jurkat sejtekben, míg a DX előkezelés felfüggésztette számos fehérje anti-CD3 kezelés hatására bekövetkező foszforilációját.

A ZAP-70 kináz központi szerepet játszik a TcR-CD3 komplexből elinduló jelátviteli folyamatban (Smith-Garvin JE/, 2009), ahol az aktiváció első lépéseinél a src-kinázok által foszforilált CD3 zeta láncok ITAM motívumaihoz kapcsolódik (dokklódás) (Mustelin T., 2003). Ez egyrészt a ZAP-70 molekula autofoszforilációját másrészt a src-kinázok általi foszforilációját eredményezi, majd a molekula további adapter fehérjéket foszforilál pl. a LAT, SLP-76, Cbl. Megvizsgáltuk, hogy a DX kezelés hogyan befolyásolja a ZAP-70 foszforilációját és azt találtuk, hogy önmagában is növeli a foszfotirozin tartalmat hasonlóképpen, mint az anti-CD3 kezelés önmagában. Ugyanakkor a kombinált DX + anti-CD3 antitest hatására tovább emelkedik a ZAP-70 tirozin foszforiláció, ami arra utal, hogy a kétféle kezelésre más tirozin maradékok foszforilálódnak. A tirozin foszforiláció a jelátviteli útvonalak egy fontos aktivációs szabályozó mechanizmusa. A humán ZAP-70 619 aminosavból áll és 31 tirozint tartalmaz, amelyből eddig 11-et azonosítottak, mint foszforilációs helyet. Ezek közül bizonyos tirozinok foszforilációja aktiváló, míg mások gátló hatással vannak a molekula kináz aktivitására (Wange RL., 1995). Más ZAP-70 tirozin maradékok foszforilációja szabályozó fehérjék kapcsolódási helyéül szolgál, amely újabb funkcionális következményekkel jár (Di Bartolo V., 2002). Néhány tirozin foszforilációs hely funkciója még nem ismert.

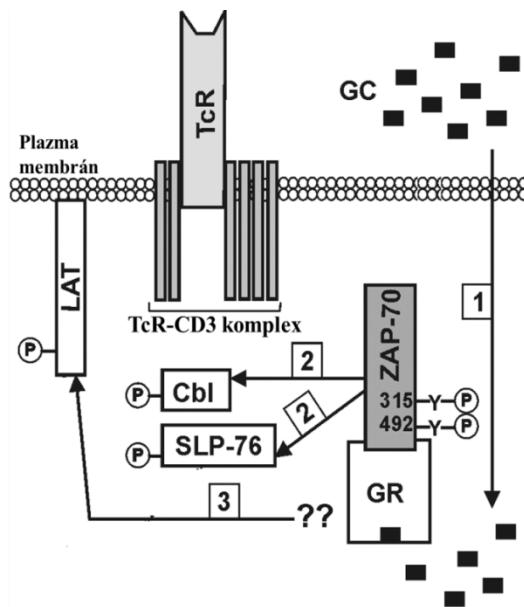
A ZAP-70 tirozinjainak szerepét a továbbiakban Boldizsár és mtsai által intézetünkben előállított Y-F pontmutáns ZAP-70 variánsokat stabilan expresszáló sejtvonalakon vizsgáltuk. A sejtvonalak jellemzése után vizsgáltuk az egyes tirozinmaradékok szerepét a nagy dózisú GC-ok direkt ZAP-70 foszforilációt előidéző hatásában és a T-sejt jelátviteli útvonalat módosító hatásában (Szabó M., 2012). Elemeztük, hogy a ZAP-70 kináz mely tirozin maradéka vesznek részt a nem-genomikus GC hatások kialakításában, valamint azt, hogy a kialakult

jelet mely downstream célmolekulák közvetíthatik. Rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés csökkent ZAP-70 foszforilációhoz vezetett az F315- és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben, ami azt mutatja, hogy a ZAP-70 ezen 2 tirozin maradéka vehet részt a nem-genomikus GC jelátvitelben. Érdemes megjegyezni, hogy ezen két tirozin ellentétes szerepet tölt be a T-sejt aktivációban, az Y315 aktivációs, míg a Y492 gátló funkciójú tirozin. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy finom különbségek figyelhetők meg a ZAP-70 foszforilációs mintázatában a nem-genomikus GC és a TcR/CD3 jelátvitel során. Korábbi kísérleteink során GC indukálta ZAP-70-GR asszociációt figyeltünk meg, így a fenti foszforiláció csökkenés magyarázatául szolgált volna, ha a Y-F aminosavcsere hatására a ZAP-70-GR asszociáció is megváltozik (Bartis D., 2007). Nem találtunk azonban különbséget a pontmutáns sejtek ZAP-70-GR asszociációjában, ami további alternatív mechanizmusokra pl.: a ZAP-70 kináz aktivitásának lehetséges csökkenésére, vagy a T-sejt jelátviteli kaszkád során a ZAP-70-től proximálisan elhelyezkedő molekulák (pl.: Lck) szerepére hívja fel a figyelmet.

Vizsgáltuk továbbá a ZAP-70 kináz közvetlen szubsztrátjainak szerepét a nem-genomikus GC jelátvitelben. A LAT és az SLP-76 adaptereken kívül különös figyelmet fordítottunk a Cbl molekulára, mivel negatív regulátorként fontos szerepet játszhat az immunszuppresszív folyamatok szabályozásában (Rao N., 2002, Paolino M., 2010). Mindhárom molekula foszforilációja emelkedett rövid idejű, nagy dózisú DX kezelés hatására, tehát valamennyien szerepet játszhatnak a nem-genomikus GC hatások közvetítésében. Megvizsgáltuk azt is, hogy a F315 és F492-ZAP-70-et expresszáló sejtekben a mutáció hogyan befolyásolja a LAT, SLP-76 és Cbl foszforiláció növekedését. A Cbl és SLP-76 esetében a mutációk meggátolták a DX indukálta foszforiláció növekedést, míg a LAT foszforilációját nem befolyásolták.

Ez arra utal, hogy a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik. A LAT-ot a ZAP-70-en kívül az Itk és az Lck is foszforilálja, így feltehetően a LAT-on megfigyelt nem-genomikus GC hatásokat ezek a molekulák idézik elő (Perez-Villar JJ., 2002).

Megvizsgáltuk a ZAP-70 foszforiláció idő-kinetikáját is annak tisztázására, hogy más munkacsoportok által leírt néhány órás DX kezelés utáni csökkent ZAP-70 foszforilációval való ellentmondást tisztázzuk. Azt találtuk, hogy az általunk alkalmazott dózisú DX gyors, tranziens ZAP-70 foszforiláció emelkedést okozott, ami 5 perc után már csökken. Az azonnali foszforilációs jelenségek membrán-közeli molekulák részvételére utalnak. A ZAP-70 a p56-lck egyik fő szubsztrátja, ami a membrán lipid-raftok komponense. Az a megfigyelésünk, hogy a DX indukált ZAP-70 foszforiláció hiányzik a p56-lck deficiens JCaM1.6 sejtekben egyértelműen alátámasztja a p56-lck szerepét a folyamatban. Ezzel ellentétben a ZAP-70 foszforiláció zavartalan a CD3 keresztkötés után JCaM1.6 sejtekben. Ez az anti-CD3 aktivációkor belépő más src-kinázok, így a p59-lck kompenzatórikus hatásának tudható be és megerősíti azt a feltételezésünket, hogy az anti-CD3 és DX kezelés hatására a ZAP-70-en más tirozin molekulák foszforilációja történik.



66. ábra: Nem-genomikus GC hatások feltételezett mechanizmusai a TcR jelátvitel általunk vizsgált molekuláira.

A GC-ok a plazma membránon történő diffúziót követően kötődnek citoplazmatikus receptorukhoz (1. nyíl). A ligand aktivált GR asszociál a ZAP-70 kinázzal, miközben annak Y315 és Y492 maradékai foszforilálódnak. Az SLP-76 és a Cbl tirozinjait a ZAP-70 foszforilálja (2. nyíl), míg a LAT a ZAP-70-től függetlenül (eddig ismeretlen módon, feltehetően upstream szabályozó molekulák révén) foszforilálódik (3. nyíl). (Szabó M., 2012)

Ez arra utal, hogy a ZAP-70 mediálta nem-genomikus GC hatásokat az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik. A LAT-ot a ZAP-70-en kívül az Itk és az Lck is foszforilálja, így feltehetően a LAT-on megfigyelt nem-genomikus GC hatásokat ezek a molekulák idézik elő (Perez-Villar JJ., 2002).

A direkt membrán hatások kizárássára és citoplazmatikus GR szerepének tisztázására a folyamatban megvizsgáltuk a RU486 (Mifepristone,) egy GR antagonista hatását és azt találtuk, hogy a RU486 előkezelés megakadályozza a DX indukálta ZAP-70 foszforilációt. Ez megerősíti a citoplazmatikus GR szerepét a folyamatban, amely a Hsp-90-el asszociálódik inaktív állapotban. Mások leírták a p56-lck és a Hsp-90 (Yablonski D., 2001) asszociációját és szerepét a p56-lck aktív konformációjának kialakításában. Igy adódott a felvetés, hogy a GR, p56-lck mellett a ZAP-70 is tagja a Hsp-90 köré szerveződő makromolekuláris komplexnek. Ezt megerősítette az az eredményünk, hogy a GR koprecipitálódott a ZAP-70-el és vica versa Jurkat sejtekben és egy ZAP-70-el transzfektált transzgenikus HeLa sejtvonában is. Ez a két molekula direkt fizikai kapcsolatát támasztja alá, ami független a p56-lck jelenlétéktől és GR ligand hatására fokozódik az asszociáció. Ez azt sugallja, hogy a DX kezelés hatására elinduló jelátvitel a két molekula direkt fizikai kapcsolata révén valósul meg amely konfokális mikroszkópos vizsgálatok alapján membrán-közeli eseménynek látszik Jurkat sejtek citoplazmájában. Feltételezhető, hogy Jurkat sejtekben a ZAP-70 membrán orientált elhelyezkedésű a TcR-asszociált jelátviteli folyamatban. Elfogadott, hogy ligandkötés után a GR disszociál a Hsp-90 komplexről. Eredményeink szerint ligankötés után a GR asszociálódik a ZAP-70-el, ami nem gátolható geldanamycinnel, ami azt támasztja alá, hogy ez már Hsp-90 független esemény.

Miután részletesen megvizsgáltuk a GC-ok T-sejtekre kifejtett önálló hatását, arra kerestük a választ, hogy a DX kezelés hogyan befolyásolja a T-sejt aktivációt és ezáltal hogyan járulhat hozzá az immunszuppresszív hatásokhoz. Az a tény, hogy a DX kezelés gátolta a ZAP-70 kináz asszociációját a CD3 komplexhez aktivált sejtekben megerősítő azt a feltételezésünket, hogy az általunk leírt nem-genomikus GC jelátviteli mechanizmusok állnak a GC-ok jól ismert T-sejt aktivációt és funkciót gátló hatásai mögött. Ezért GC analóggal előkezelt sejtekben vizsgáltuk az SLP-76, a LAT és a Cbl foszforilációját, valamint az intracelluláris Ca^{2+} -jelet anti-CD3 aktivációt követően. A ZAP-70 kinázban megfigyelt változásokhoz hasonlóan kombinált kezeléskor a LAT és a Cbl tirozin foszforilációja tovább nőtt a csak anti-CD3 kezelt mintákhoz képest, míg az SLP-76 aktiváció indukálta foszforilációját a DX kezelés részben gátolta (Bartis D., 2007). Ez arra utal, hogy a nem-genomikus GC hatás megváltoztatja a TcR/CD3 jelátviteli utak foszforilációját, azaz a két -a TcR/CD3- illetve a nem-genomikus GR-jelpálya között komplex „cross-talk” („párbeszéd”) zajlik.

A foszforiláció változások mellett az intracelluláris Ca^{2+} -jel is a T-sejt aktiváció kulcseseményei közé tartozik. Az anti-CD3 indukálta Ca^{2+} -jel részben gátolható rövid idejű, nagy dózisú DX előkezeléssel, hasonlóan az SLP-76 foszforilációjához. Ez az adat összhangban lehet azzal a megfigyelésünkkel, miszerint a Ca^{2+} -jel kialakulását Jurkat sejtekben inkább az SLP-76 szabályozza. A DX kezelés más módon is befolyásolhatja a Ca^{2+} -jelet, például a membránok ioncsatornáira kifejtett hatáson keresztül. Az intracelluláris Ca^{2+} -jel csökkenésének a kalcineurin-NFAT tengely gátlása lehet a következménye.

Természetesen a korábban bemutatott GC analóg indukált ZAP-70-GR asszociáció felveti annak a lehetőséget is, hogy a nem-genomikus GC hatás fizikailag „kivonja” a ZAP-70-et a TcR/CD3 jelátviteli út proximális komplexéből, így gátolva/csökkentve a TcR/CD3 aktiváció hatékonyságát.

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a TcR/CD3 jelátvitelt a T-sejt aktiváció molekuláinak finom összehangolt működése szabályozza. Az aktiváció kezdeti folyamatainak szabályozásában a ZAP-70 tirozin maradékai kiemelkedő szerepet játszanak, valamint a kináz szubsztrátjai kulcsfontosságúak a nem-genomikus GC hatások kialakításában is. A GC vagy kombinált (anti-CD3+DX) hatások a proximális jelátviteli molekulák finom kölcsönhatásának, komplex szabályozásának köszönhetően, részben eltérő módon továbbítódnak.

IV. GC HORMON HATÁSA A REGULATÓRIKUS T SEJTEK IN VIVO ÉS IN VITRO DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRA ÉS FUNKCIÓIRA

Az allo- és autoantigénekkel szembeni immunválasz gátlásával a Treg sejtek fontos tényezői és terápiás célpontjai az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Gyulladásos betegségek, autoimmun és transzplantált betegek kezelésének egyik legfontosabb eszközei a GC analógok, mégis keveset tudunk a Treg sejtekre kifejtett hatásairól.

Munkánk során a GC kezelés centrális és perifériás nyirokszervekben előforduló tTreg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$) és iTreg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$) sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. Nagy dózisú DX kezelés hatására a tímusz és a lép szerkezete is megváltozott, a lépben a T-sejt zóna diffúzzá vált, ugyanúgy, mint a tímuszban a Treg sejtek eloszlása is (Ugor E., 2014). A tímuszban a tTreg sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, a kezelés hosszával párhuzamosan pedig tovább nőtt, miközben a timociták száma drámaian csökkent – ami a DP, GC érzékeny timociták pusztulásával magyarázható. Eközben a Treg abszolút sejtszám nem változott, így a tapasztalt arány növekedése kizárolag azok túléléséből adódik. Ez arra enged következtetni, hogy a tímuszban többségben jelenlevő tTreg sejtek reziszensek a GC indukálta apoptotikus hatásra.

A perifériás nyirokszervekben sokkal magasabb a Treg-ek aránya, de 45-60%-uk iTreg. Ismételt DX kezelés hatására a lépben és a mLN-ben kismérvű Treg sejtarány csökkenés volt megfigyelhető miközben az össz-sejtszámok is csökkentek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a periférián előforduló iTreg-ek és tTreg-ek másképp reagálnak GC expozícióra. Mivel a tTreg-ek a tímuszban jönnek létre, joggal feltételezhető, hogy előfordulásuk ott a leggyakoribb. A tímuszban a vártnak megfelelően igen magas a Helios pozitivitás a Treg-sejtekben belül. Meglepő azonban, hogy a tímuszban is találtunk Helios negatív Treg sejteket, ill. a perifériás nyirokszervekben a Treg-ek fele Helios pozitív. Ez az eredmény kétséget ébreszt, hogy a Helios jó markerként használható-e a tTreg és iTreg alcsoportok elkülönítésére. Ha a periférián valóban ilyen magas a tTreg előfordulása, akkor az össz-sejtszám csökkenése mellett a Treg aránynak – azok szteroid rezisztenciája miatt – növekednie kellett volna, de ez egyik perifériás nyirokszervben sem történt meg, sőt, a lépben és az mLN-ben még szignifikáns csökkenésüket is tapasztaltuk. Eredményeink inkább azt a megállapítást támasztják alá, hogy a periférián a Helios transzkripció faktos megjelenése T-sejt aktivációs marker, és bár kétségtelen, hogy a tímuszban magasabb a Helios pozitivitás a Treg-eken belül, expressziója mégsem kizárolag a tTreg-re jellemző.

Egy adott sejt GC érzékenysége függ annak GR expressziós szintje mellett a sejtet érő egyéb jelátviteli útvonalak párbeszédétől is. A tímuszban a DP timociták reagálnak legérzékenyebben a GC indukálta apoptózisra, bennük találtuk a legalacsonyabb GR expressziót, amely GC kezelés hatására nem változik. Az érett SP T-sejtekben és a perifériás limfocitákban magasabb a GR fehérje szint, de rezisztensebbek GC analóg adására és bennük a GR szignifikáns down-regulációját figyelhetjük meg (Boldizsár F., 2007). Kísérleteinkben a kezeletlen állatok tímuszában található Treg sejtek GR expressziója alacsonyabb, mint a lépben, ami a lokális mikrokörnyezeti hatások (lokális GC termelés) következménye lehet. GC kezelés hatására a GR expresszió a tímuszban található tTreg sejtekben növekszik, míg a lépben down-reguláció figyelhető meg. Ez összefügghet a tímuszban és perifériás szervekben található Treg sejtek eltérő GC érzékenységével.

A Treg sejtek stabilitását a FoxP3 transzkripció faktor jelenléte jelzi, amely epigenetikai szabályozás alatt áll, amit és tTreg sejtekben a FOXP3 gén enhancer régiójának metilációja jelez (Morkawa H., 2014). Kísérleteink szerint egér centrális (tímusz) és perifériás (lép) Treg sejteiben 2 napos nagydózisú *in vivo* DX kezelés hatására a FoxP3 mRNS expresszió a tTreg sejtekben nem változik, míg a lépben található Treg sejtekben emelkedik. Ez azt sugallja, hogy a tTreg sejtekben a FoxP3 expresszió stabil, míg a perifériás nyirokszervekben a $CD4^+CD25^{high^+}$ sejtekben GC hatásra indukálható. További FoxP3 mRNS génexpresszió

emelkedést okoz 4 órás *in vitro* PMA/ionomycin stimuláció is mind a tímusz, mind a lép eredetű Treg sejtekben, de ezt nem befolyásolja az előzetes *in vivo* GC hatás. Vagyis a Treg sejtekben *in vitro* aktiváció hatására emelkedik a Foxp3 mRNS expresszió. Megvizsgáltuk a FoxP3 lokalizációját a Treg sejtekben és annak viszonyát a ligand-aktivált GR-hez, ami szintén transzkripció faktorként viselkedik a klasszikus genomikus hatás során. Mindkét molekula klasszikus nukleáris mintázatot ad konfokális mikroszkópos felvételeken. Érdekes megfigyelésünk, hogy ligand nélkül is a GR a Treg sejtekben nagyrészt a sejtmagban lokalizálódik igen szoros asszociációt mutatva a FoxP3-al. Ez felveti a magi lokalizációjú, inaktív GR β szerepét és asszociációját a FoxP3-al GC menets közegben a Treg sejtekben. A GR-FoxP3 asszociáció még tovább fokozódik rövid idejű *in vitro* GC hormon kezelést követően, ami a ligand-kötött GR magi transzlokációját támasztja alá. A konfokális mikroszkópban látott szoros ko-lokalizáció nem ad információt a két molekula fizikai kapcsolatára, ezért ennek tiszta zása további vizsgálatokat igényel.

Miután a Treg sejtek és a GC hormon immunszuppresszív hatását egyaránt a citokin teremelés és a sejtaktiváció befolyásolásán keresztül fejti ki, felmerült a kettő szinergizmusának vizsgálata. A Treg sejtek egyrészt szekretált citokinjei révén, másrészt direkt sejt-sejt kapcsolódás útján fejtik ki az immunválaszt gátló hatásait. Vizsgálataink alátámasztják, hogy 2-4 napos GC kezelés mind a tímuszban, mind a lépben növeli az IL-10 és TGF β szekretáló Treg sejtek arányát. Ezt fehérje szinten mindenkit citokin esetében egyértelműen ki tudtuk mutatni, míg szeparált CD4+CD25high+ sejtekben qRT-PCR-al a tímuszban erőteljes IL-10, enyhe fokú TGF β , míg a lépben csak TGF β emelkedés jellemző. A lépben az IL-10 mRNS inkább csökkenést mutatott a GC kezelt mintákban, ami felveti az IL-10 szerepét egér FoxP3+ perifériás Treg sejtekben. Az utóbbi időben leírták az IL-35 citokint is, mint a Treg sejtek immunszuppresszív hatású termékét. Vizsgálataink alapján a két polipeptid láncból felépülő citokin inkább csökkent termelődést mutatott a GC kezelés hatására. Miután a molekula egyik láncra az IL-12 α , egy gyulladásos citokin komponense is, így nem meglepő, hogy GC anti-inflamatórikus hatására ezen molekula inkább csökkent expressziót mutat.

A perifériás nyirokszervekben a naív CD4+ T-sejtek elköteleződése iTreg irányba függ az antigén koncentrációjától, a citokin környezettől, különösen a magas IL-2 és TGF β koncentráció és szuboptimális dendritikus sejt aktiváció és a kostimuláció hiánya kedvez kialakulásuknak (Zheng SG., 2008). Habár a TcR aktiváció elengedhetetlen a Treg differenciálódáshoz, de erősebb TcR - MHC/peptid interakció (Selveraj RK., 2007) és kostimuláció esetén nagyobb mennyiségű tolerancia-indukáló citokin, vagyis TGF β és IL-2 szükséges a Treg fenotípus kialakulásához, mert ellenkező esetben a Th17 fenotípus keletkezhet. Ez a magas TGF β koncentráció IL-6 receptort downreguláló hatásának tudható be. Az IL-6 önmagában gátolja a Treg funkciót (Pasare C., 2003) a Treg expanziót (Wan S., 2007) és akadályozza a TGF β aktivitást Smad7 indukcióval (Dominitzki SM., 2007). Ez alapján a gyulladásos mikrokörnyezet tovább rontja a Treg funkciót, ami az autoimmun betegségekben amúgy is jellemző.

A sajáttal szembeni immunológiai tolerancia és az immunválasz egyensúlyának helyreállítása az autoimmun betegségek kezelésnek a stratégiája. Ennek egyik lehetősége a Treg transzfer, amely citokinjei révén alkalmas lehet az immunológiai egyensúly helyreállítására. Ehhez

összehasonlítottuk tímusz és lép eredetű CD4+ T-sejtek *in vitro* expanziójával nyert Treg-ek funkcionális aktivitását. Azt tapasztaltuk, hogy minden szervből mágneses negatív szelekcióval szeparált CD4+ T-sejtek anti-CD3/CD28 stimuláció valamint IL-2 és TGF β jelenlétében szaporodtak a leginkább. A DX jelenléte a tápfolyadékban csak a lépből differenciálódó Treg sejtek arányát emelte, valamint azok TGF β szekrécióját. 4 napos *in vivo* DX előkezelés a tímusz eredetű tTreg sejtek *in vitro* expanzióját és differenciálódását segítette, de ez azzal is magyarázható, hogy a 4 napos DX kezelés hatására a tímusz CD4+ sejtjeinek sokkal nagyobb hánypota Treg sejt, mint a kezeletlen tímuszban. Ez a sejtek *in vivo* GC rezisztenciájával magyarázható, ugyanakkor újabb bizonyíték a GC jelenlétének fontosságára a Treg elköteleződésben. A sejtek citokin termelését megvizsgálva is azt láttuk, hogy az *in vitro* DX jelenléte a lépben fokozza mind az IL-10+ mind a TGF β + Treg sejtek arányát. Ebben a mikrokörnyezetben a sejtek sem Th1 sem Th2 sem Th17 irányú elköteleződést nem mutatnak. Az *in vivo* GC előkezelt CD4+ lépsejtekből differenciáltatott Treg sejtekben a legmagasabb a szupresszor hatású IL-10 és TGF β termelő sejtek aránya, de megjelentek alacsony %-ban Th1 és Th2 citokin termelő FoxP3+ sejtek. Ez feltételezésünk szerint az *in vivo* már elkötelezett CD4+ T-sejtekből kialakuló az *in vitro* aktiváló mikrokörnyezetben megvalósuló Treg irányú elköteleződés eredménye. Miután ez a jelenség a kezeletlen lépből nem volt kimutatható, *in vivo* Treg transzfert ezekkel a Treg sejtekkel tervezünk agy proteoglycan indukált reumatoid arthritis egér modellen.

7. ÚJ EREDMÉNYEK

1. Leírtuk, BALB/C és AND-TcR transzgenikus egértörzs timocita alcsoportjainak összetételeit és azok eltérő GC érzékenységét.
2. Azt találtuk, hogy a timocita alcsoportokban a GR expresszió nem egyforma: a glukokortikoid hormonra legérzékenyebb DP populációban a legalacsonyabb a GR expresszió.
3. GR antagonisták segítségével leírtuk, hogy a DP timocita apoptózis korai fázisának kiváltásához nem szükséges a GR nukleáris transzlokációja, míg későbbi apoptózis stádiumban már igen.
4. Morfológiaileg jellemztük a GR eloszlását a timocita populációkban és kimutattuk, hogy a DP timocitákban a GR ligandkötés hatására a mitokondriumba nem pedig a sejtmagba transzlokálódik.
5. Kimutattuk a GR asszociációját és direkt kapcsolódását a Bcl-2 család tagjaival, úgy mint a Bim, Bcl-XL és Bax és ennek szerepét a GC indukált mitokondriális apoptózis útvonal aktivációjában DP timociták.
6. Eredményeink szerint a GR és TcR stimuláció együttes magasabb arányú DP timocita túlélést okoz, ami a korai apoptotikus folyamatok gátlásának köszönhető és a két jelátviteli út összekapcsolódását és a kölcsönös antagonizmus modellt támszta alá a timocita szelekció során.
7. Leírtuk a GR-ZAP-70 asszociációt T-sejtekben rövid idejű nagydózisú GC kezelés hatására, valamint bizonyítottuk, hogy eközben gátlódik a ZAP-70 CD3 kacsolódás.
8. Bizonyítottuk, hogy a ZAP-70 Y315 és Y492 vesznek részt a nem-genomikus GC hatások közvetítésében, amelyet az SLP-76 és a Cbl molekulák közvetítik, nem a LAT.
9. Bizonyítottuk a tTreg sejtek GC rezisztenciáját és GC hatásra fokozódó IL-10 és TGFβ citokin termelését.
10. Leírtuk, hogy a perifériás Treg sejtek érzékenyek a GC indukálta apoptózira, de a túlélő sejtekben indukálható a FoxP3 expresszió és citokin termelés, ami a sejtek nagyobb plaszticitását jelzi.
11. Megfigyeltük a GR és FoxP3 nagyfokú kolokalizációját a tímusz és lép Treg sejtek magjában, ami a ligandkötés után tovább fokozódik. Ez a két transzkripció faktor funkcionális hasonlóságára hívja fel a figyelmet Treg sejtekben.

dc_1343_16

8. A DOLGOZAT ALAPJÁT ADÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P.: Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunological Methods.* 1998; 214: 19-27. IF: 1,855
2. Berki T, Pálinkás L, Boldizsár F, Németh P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in timocyte subpopulations. *International Immunology.* 2002; 14(5):463-9. IF: 3,595
3. Boldizsar F, Palinkas L, Bartis D, Nemeth P, Berki T.: Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunology Letters.* 2003; 90: 97-102. IF: 2,114
4. 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
5. Bartis D, Boldizsar F, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P, Berki T.: Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2006;98: 147-154. IF: 2,825
6. Bartis D, Boldizsar F, Kvell K, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P, Monostori E, Berki T.: Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;354: 253-258. IF: 2,749
7. 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
8. Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int. Immunol.* 2009; 21: 1269-1276. IF: 3,403
9. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 2010;215: 521-526. IF: 3,586
10. Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal TcR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells. *Int Immunol.* 2012;24(2):79-87. IF: 3,403
11. Boldizsar F, Szabo M, Kvell K, Czompoly T, Talaber G, Bjorkan J, Bartis D, Nemeth P, Berki T: ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in Jurkat cells. *Mol Immunol.* 2013;53(1-2):111-7. IF: 3,375

12. Prenek L, Ugor E, Papp R, Boldizsár F, Berki T. A glukokortikoid hormon nem-genomikus hatásai T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára. Immunológiai Szemle 2014. VI(3): 4-8.
13. Ugor E, Simon D, Pap R, Kraljik N, Németh P, Boldizsár F, Berki T., Regulatórikus T-sejtek glukokortikoid hormon érzékenységének vizsgálata. Immunológiai Szemle 2014. VI(3): 8-12.
14. Prenek L, Boldizsár F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, NémethP, Berki T. The regulation of mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. Apoptosis 2016. (közlésre elfogadva). IF: 3,592

8.1. A TÉMÁBAN MEGJELENT TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

15. Berki T, Tavakoli A, Kalmar Nagy K, Nagy G, Nemeth P.: Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients. Transplant International 15: 132-138, 2002. IF: 2,520
16. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatic S, Berki T, Dekaris D.: Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD). Clin. Exp. Immunol. 131: 335-339, 2003. IF: 2,347
17. Hajto T, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nagy G, Nemeth P.: Galactoside-specific mistletoe lectin modulate the dexamethasone-induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes. In vivo 17: 163-167, 2003. IF: 0,753
18. Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L.: Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14(+)CD16(+) monocytes. J. Leukoc. Biol. 74: 33-39, 2003. IF: 4,180
19. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuhmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J. 18: 70-80, 2004. IF: 6,820
20. Spies CM, Schaumann DH, Berki T, Mayer K, Jakstadt M, Huscher D, Wunder C, Burmester GR, Radbruch A, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are down- regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1 independent expression pathway. Ann. Rheum. Dis. 65: 1139-1146, 2006. IF: 5,767

21. Tryc AB, Spies CM, Schneider U, Kunkel D, Berki T, Sieper J, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgereit F.: Membrane Glucocorticoid Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis. *J. Rheumatol.* 33: 2249-2253, 2006. IF: 2,940
22. Hajto T, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P.: Effects of mistletoe extract on murine thymocytes *in vivo* and on glucocorticoid-induced cell count reduction. *Forsch. Komplementarmed. (Klas. Naturheilk.)* 13: 22-27, 2006. IF: 1,417
23. Spies CM, Bartholome B, Berki T, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgereit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) on monocytes are up-regulated after vaccination. *Rheumatology (Oxford)* 46: 364-365, 2007. IF: 4,045
24. Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G, Berki T, Pongracz JE.: Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells Against Dexamethasone-Induced Senescence. *Rejuvenation Res.* 14(3): 241-48, 2011 IF: 4,138

A témában megjelent közlemények összesített impakt faktora: 70,177

8.2. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Tudományos folyóiratcikkek száma: 82

Összesített impakt faktor: 175,7

Utolsó 10 év teljes lektorált közleményeinek száma: 47

Impakt faktora: 120,2

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 41,8

Összes hivatkozások száma: 1374

Független hivatkozások száma: 1056

Hirsch index: 21

dc_1343_16

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Támogatás: A munka az OTKA K105962 és a CABCOS II. HUHR/1001/2.1.3/0007 pályázat támogatásával készült

Elsősorban köszönöm minden támogatását és bíztatását férjemnek és munkatársamnak dr. Németh Péternek, aki megszerettette és megtanította játszva elvezni az immunológiai kutatást és oktatást. Köszönöm, hogy hagyott önállóan új utakon járni, és biztosította az anyagi hátteret az egyre növekvő immunológia munkacsoportunk és a létrehozott infrastruktúra számára. Nagy kihívás számomra most ezt működtetni.

Köszönöm munkatársaimnak Melczer Attiláné, Jucinak és Pápa Lászlóné Marikának az alapvető laboratóriumi módszertanok megtanítását, a kitartásukat és lelkesedésüket.

Köszönöm minden régi és új munkatársamnak a segítségét, támogatását! Köszönöm tanítványaimnak, elsősorban dr. Boldizsár Ferencnek hogy kitartottak mellettem és az intézet mellett!

Köszönöm családomnak, szüleimnek és főleg gyermekemnek, hogy sokszor elnézték, amikor nem velük foglalkoztam!

dc_1343_16

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Adzic M, Djordjevic A, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. and Radojcic MB, The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41, 2181-2188.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS one* 2011; 6, e24226.
- Alberola-Illa J, Hogquist KA, Swan KA, Bevan MJ, Perlmutter RM. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med.* 1996; 184:9-18.
- Alt FW, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today.* 1992;13(8):306-14.
- Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(1):31-40.
- Anderson G, Jenkinson WE, Jones T, Parnell SM, Kinsella FA, White AJ, Pongracz JE, Rossi SW. and Jenkinson EJ. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Rev* 2006; 209: 10-27.
- Anderson G, Lane PJ. and Jenkinson EJ. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007;7:954-963.
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C. and Mathis D, Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;298:1395-1401.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:309-45.
- Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev.* 2009;228(1):41-57.
- Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J.* 2012;26(12):4805-20.
- Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, Gill J, Boyd R, Sussman DJ. and Hollander GA. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol.* 2002; 3:1102-1108.
- Ballke C, Gran E, Baekkevold ES, Jansen FL. Characterization of Regulatory T-Cell Markers in CD4+ T Cells of the Upper Airway Mucosa. *PLoS One.* 2016; 11(2): e0148826.
- Barber EK, Dasgupta JD, Schlossman SF, Trevillyan JM, Rudd CE. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(9):3277-81.

Barf, T. Intervention of hepatic glucose production. Small molecule regulators of potential targets for Type 2 diabetes therapy. *Mini Rev Med Chem* 2004;4(8) 897-908,

Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol.* 2003; 15(3):185-93.

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 2004;18(1):70-80.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 2001;27(1): 20-21.

Berdanier CD., Everts HB., Hermoyian C and Mathews CE. Role of vitamin A in mitochondrial gene expression. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;54 Suppl 2: S11-27.

Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E. and Nemeth P. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods* 1998; 214: 19-27.

Berki T, Tavakoli A, Kalmar Nagy K, Nagy G, Nemeth P.: Alterations of glucocorticoid receptor expression during glucocorticoid hormone therapy in renal transplant patients.

Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F. and Nemeth, P., Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 2002;14: 463-469.

Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT and Zuniga-Pflucker JC. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 2007;26: 678-689.

Blomgren H, and Andersson B, Characteristics of the immunocompetent cells in the mouse thymus: cell population changes during cortisone-induced atrophy and subsequent regeneration. *Cell Immunol.* 1970; 1: 545-560.

Bluestone JA, and Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 253–7.

Boldizsar F, Palinkas L, Bartis D, Nemeth P and Berki T, Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunology Letters* 2003; 90, 97-102.

Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P and Berki T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signaling in T cells. *Immunobiology* 2010; 215:521-6.

Bommhardt U, Beyer M, Hüning T, Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(3):263-80.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*, 2nd edition. 2008; page 1300, Elsevier/Saunders

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 2008; 27(50):6434-51.

Braiman A, Barda-Saad M, Sommers CL, Samelson LE. Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *EMBO J.* 2006;25(4):774-84

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 2001;27, 68–73.

Burchill MA, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, Vegoe AL, Hsieh CS, Jenkins MK, Farrar MA. Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T cell Repertoire. *Immunity*, 2008. 28(1):112-121

Buttgereit F, Grant A, Muller M, and Brand MD, The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur J Biochem*. 1994;223,513-519.

Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002;67(6):529-34.

Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(11):3408-17.

Cain DW, Cidlowski JA. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(4):545-56.

Casas F, Daury L, Grandemange S, Busson M, Seyer P, Hatier R, Carazo A, Cabello G and Wrutniak-Cabello C. Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb A alpha1 proteins. *Faseb J* 2003;17:426-436.

Casas F, Domenjoud L, Rochard P, Hatier R, Rodier A, Daury L, Bianchi A, Kremerik-Bouillaud P, Becuwe P, Keller J, Schohn H, Wrutniak-Cabello C, Cabello G. and Dauca M, A 45 kDa protein related to PPARgamma2, induced by peroxisome proliferators, is located in the mitochondrial matrix. *FEBS Lett* 2000; 478: 4-8.

Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TcR zeta chain. *Cell*.1992;71(4):649-62.

Chandra D, Choy G. and Tang DG, Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282, 31289-31301.

Chang CP, Wang SW, Huang ZL, Wang OY, Huang MI, Lu LM, Tarn DC, Chien CH, Chien EJ. Non-genomic rapid inhibition of Na⁺/H⁺-exchange 1 and apoptotic immunosuppression in human T cells by glucocorticoids. *J Cell Physiol.* 2010;223(3):679-86.

Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.

Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 2011; 585: 3603–10.

Chen L, Xiao S, and Manley NR, Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* 2009;113: 567-574.

Chen W, Dang T, Blind RD, Wang Z, Cavasotto CN, Hittelman AB, Rogatsky I, Logan SK, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol.* 2008;22(8):1754-66.

Chien Y, Bonneville M. Gamma delta T cell receptors *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63:2089-94.

Chinenov Y, Gupte R, Dobrovolna J, Flammer JR, Liu B, Michelassi FE, et al. Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(29):11776–81.

Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A. and Riccardi C. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* 1999; 93: 2282-2296.

Cima I, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, Ayuni E, Mueller C. and Brunner T, Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med* 2004; 200: 1635-1646.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K and Schutz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & Development* 1995; 9, 1608-21.

Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? *Scand J Immunol.* 2009;70(4): 326–336.

Curotto de Lafaille MA. and Lafaille JJ. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009; **30:** 626–35.

Dario A, Vignali A, Collison LW and Workman CJ. How regulatory T cells work? *Nature Rev Immunol.* 2008; 8, 523-532.

Demonacos CV, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiriyiotis C, Spandidos DA, Sekeris CE, Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 1996;61: 226-232.

- Deng L, Zhang H, Luan Y, Zhang J, Xing Q, Dong S, Wu X, Liu M, Wang S. Accumulation of Foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16:4105–12.
- Deocaris CC, Kaul SC. and Wadhwa R, On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* 2006;11,116-128.
- Di Bartolo V, Malissen M, Dufour E, Sechet E, Malissen B, Acuto O. Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur J Immunol.* 2002;32(2):568-75.
- Distelhorst CW, Howard KJ. Evidence from pulse-chase labeling studies that the anti glucocorticoid hormone RU486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *J Steroid Biochem.* 1990;36(1-2):25-31.
- Doherty PC., Zinkernagel RM., A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet.* 1975;1(7922):1406-9.
- Dominitzki SM, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, Monteleone G, Rose-John S, Neurath MF, Becker C. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4⁺CD25⁻ T cells. *J. Immunol.*, 2007;179 (4): p. 2041–2045
- Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, Khairova R, Zhou R, Yuan P, Machado-Vieira R, McEwen BS. and Manji HK, Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106,3543-3548.
- Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102(1-5):11-21.
- Egerton M., Scollay R. and Shortman K., Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2579-2582.
- Elder ME, Hope TJ, Parslow TG, Umetsu DT, Wara DW, Cowan MJ. Severe combined immunodeficiency with absence of peripheral blood CD8+ T cells due to ZAP-70 deficiency. *Cell Immunol.* 1995;165(1):110-7.
- Encio IJ. and Detera-Wadleigh SD, The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1991;266:7182-7188.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):513-56.
- Fauci AS, Dale DC, Balow JE, Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med.* 1976; 84(3):304-15.
- Feuerer M, Hill JA, Mathis D and Benoist C, Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol.* 2009; 10: 689-695.

Flammer JR, Rogatsky I, Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol Endocrinol.* 2011;25(7):1075-86.

Fletcher AL, Lowen TE, Sakkal S, Reiseger JJ, Hammett MV, Seach N, Scott HS, Boyd RL, and Chidgey AP, Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment. *J Immunol.* 2009;183: 823-831.

Fodor S, Jakus Z, Mócsai A. ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett.* 2006;104(1-2):29-37.

Freedman LP, Luisi GV. On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *J. Cell. Biochem.* 1993; 51:140-150.

Fukuda S, Mitsuoka H, Schmid-Schönbein GW. Leukocyte fluid shear response in the presence of glucocorticoid. *J Leukoc Biol.* 2004;75(4):664-70.

Galliher-Beckley AJ, and Cidlowski JA. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 2009;61:979-986.

Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids.* 1999; 64(1-2):107-19.

Germain RN and Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annual Review of Immunology.* 1999; 17, 467-522,

Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, Durham NM, Hipkiss EL, Pyle KJ, Wada S, Pan F, Pardoll DM, Drake CG. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Molecular immunology* 2010;47, 1595–600.

Giacomello M, Drago I, Pizzo P, and Pozzan T, Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 2007;14, 1267-1274.

Goldenthal MJ, and Marin-Garcia J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* 2004;262: 1-16.

Gotovac K, Sabioncello A, Rabatic S, Berki T, Dekaris D.: Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD). *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 131, 335-339.

Gotter J, Brors B, Hergenhahn M, and Kyewski B, Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med.* 2004; 199:155-166.

Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 15;275(1-2):2-12.

Gratz IK, and Campbell DJ. Organ-Specific and Memory Treg Cells: Specificity, Development, Function, and Maintenance. *Front Immunol.* 2014; 5: 33

Green DR, Droin N, and Pinkoski M, Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003;193:70-81.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004; 305(5684):626-9.

Grote H, Ioannou I, Voigt J, Sekeris CE. Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: evidence for plasma membrane bound receptor. *Int J Biochem.* 1993; 25(11):1593-9.

Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2002; 8:473-79.

Hale LP. Histologic and molecular assessment of human thymus. *Ann Diagn Pathol* 2004;8:50-60.

Herold MJ, McPherson KG. and Reichardt HM, Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:60-72.

Heyns W, Coolens JL, Physiology of corticosteroid-binding globulin in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;538:122-9.

Hricik DE, Almawi WY, Strom TB., Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation. *Transplantation*. 1994;57(7):979-89.

Hu Z, Lancaster JN, Ehrlich LI. The contribution of chemokines and migration to the induction of central tolerance in the thymus. *Front. Immunol.* 2015; 7:6:398.

Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(1):53-8

Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(12):973-83.

Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Agace WW, Takahama Y, Jenkinson EJ, Anderson G. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol.* 2007;37(8):2090-6

Johnson DT, Harris RA, French S, Blair PV, You J, Bemis KG, Wang M, Balaban RS. Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(2):C689-97.

Jondal M., Pazirandeh A. and Okret S., Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol* 2004;25:595-600.

Josefowicz SZ. and Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009;30:616–25.

Kalinyak JE, Dorin RI, Hoffman AR. and Perlman AJ. Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987;262: 10441-10444.

Kane LP, Hedrick SM. A role for calcium influx in setting the threshold for CD4+CD8+ thymocyte negative selection. *J. Immunol.* 1996; 156:4594-4601.

Kaye J, Vasquez NJ, Hedrick SM Involvement of the same region of the T cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. *J. Immunol.* 1992; 148:3342-3353.

King LB, Vacchio MS, Ashwell JD. To be or not to be: mutually antagonistic death signals regulate thymocyte apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994; 105(4):355-8.

Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GR alpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;381(4):671-5

Kino T, Su YA, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(21):3435-48.

Kirchhoff SR, Gupta S. and Knowlton AA, Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation* 2002;105:2899-2904.

Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G. and Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9:833-844.

Koble C. and Kyewski B., The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med* 2009;206:1505-1513.

Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2002; 169: 4712–6.

Kong G, Dalton M, Bubeck Wardenburg J, Straus D, Kurosaki T, Chan AC. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):5026-35.

Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signaling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):67-78.

Krishnan JA, Davis SQ, Naureckas ET, Gibson P, Rowe BH. An umbrella review: corticosteroid therapy for adults with acute asthma. *Am J Med.* 2009;122(11): 977-91.

Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005;11(7):725-30.

Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TcR/CD3 complex. *Immunity*. 2006;24(2):133-9

Kurobe H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Boyd RL, and Takahama Y. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 2006;24: 165-177.

Kwiatek M, Gęca T, Krzyżanowski A, Malec A, Kwaśniewska A. Peripheral Dendritic Cells and CD4+CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells in the First Trimester of Normal Pregnancy and in Women with Recurrent Miscarriage. *PLoS ONE*, 2015;10(5): e0124747.

Kyewski B. and Derbinski J., Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 688-698.

Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol*. 2006;7(4):338-43.

Laing KJ, Hansen JD. Fish T cells: Recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(12):1282-95.

Laky K, Fowlkes BJ. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20(2):197-202.

Le Bras S, and Geha RS. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *Clin Invest*. 2006;116(6):1473–1475.

Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, Seo DY, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Arch*. 2012;464(6):549-59.

Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGR β) and glucocorticoid resistance. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1069:1–9.

Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective Suppressor Function in CD4+CD25⁺ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: 92–99.

Lio CJ. and Hsieh C. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*, 2008;28(1):100-111

Liston A, & Gray HD. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature Reviews Immunology* 2014;14,154–165.

Lodish H, Berk A, Zipurski LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE, in W.H. Freeman, *Molecular Cell Biology*, 4th Edition 2000;156-58.

Long F, Wang YX, Liu L, Zhou J, Cui RY, Jiang CL. Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids*. 2005;70(1):55-61.

Lourenco EV, La Cava A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity*. 2011; 44: 33–42.

Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood*. 2005;106(5):1703-10.

Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgereit F, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ, Hommes DW. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* 2006;7(10):1023-9.

Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR. and Hommes DW. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* 2007;13:158-163.

Lupher ML Jr, Songyang Z, Shoelson SE, Cantley LC, Band H. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem*. 1997;272(52):33140-4.

Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev*. 2005; 4(8):579-86.

Marrack P, Hannum C, Harris M, Haskins K, Kubo R, Pigeon M, Shimonkevitz R, White J, Kappler J. Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol Rev*. 1983;76:131-45.

Mathis D, and Benoist C., Aire. *Annu Rev Immunol* 2009;27:287-312.

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, and Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004;427: 355-360.

Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+CD25high T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2005;128:1868–1878.

Meijssing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science*. 2009;324(5925):407-10.

Mellor-Pita S, Cidores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, Vargas JA. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2006;65: 553–4.

Melmed S, Polonsky KS, Larsen RP. Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology*: 13th. edition, 2016;. The Adrenal Cortex Page:451, Elsevier

Miceli MC, Parnes JR. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Semin Immunol*. 1991;3(3):133-41.

Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*. 1989;264(14):8171-8.

- Monje P, and Boland R. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem* 2001;82:467-479.
- Morikawa H, and Sakaguchi, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev.* 2014;259:192-205.
- Morrish F, Buroker NE, Ge M, Ning XH, Lopez-Guisa J, Hockenberry D and Portman MA, Thyroid hormone receptor isoforms localize to cardiac mitochondrial matrix with potential for binding to receptor elements on mtDNA. *Mitochondrion* 2006;6:143-148.
- Mougalian SS, O'Brien S. Adverse prognostic features in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology*. 2011;25(8):692-6,
- Murata S, Takahama Y, Tanaka K. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(2):192-6.
- Mustelin T, Taskén K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J.* 2003;371(Pt 1):15-27.
- Nanno M, Shiohara T, Yamamoto H, Kawakami K. and Ishikawa H. The gamma delta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev* 2007;215:103-113.
- Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N. and Klein L, Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 2008;455:396-400.
- Newton R, Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 2000;55(7):603-13.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E, The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010;75(1):1-12.
- Nishikawa H, and Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 2014;27C: 1-7.
- Nitta T, Nitta S, Lei Y, Lipp M. and Takahama Y. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:17129-17133.
- Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(5):1033-44.
- Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3): 250-8.
- Olefsky JM, Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem.* 2001;276(40):36863-4.

Olson BM, Sullivan JA, and Burlingham WJ. Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance. *Front. Immunol.*, 18 October 2013 | <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00315>

Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ.* 2008; 15(2):234-42.

Otsubo K, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Tsuge I, Imaizumi M, Sasahara Y, Hayakawa A, Nozu K, Iijima K, Ito S, Horikawa R, Nagai Y, Takatsu K, Mori H, Ochs HD, Miyawaki T. Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Clin Immunol*, 2011;141(1): 111-120.

Palacios EH., Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 2004;23(48):7990-8000.

Palinkas L, Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, Nemeth P. and Berki T. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology* 2008;213: 39-50.

Paolino M, Penninger JM. Cbl-b in T-cell activation *Semin Immunopathol.* 2010;32(2):137-48.

Pasare C, and Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003;299(5609): p. 1033-1036.

Pendergrass W, Wolf N. and Poot M. Efficacy of MitoTracker Green and CMX rosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 2004; 61: 162-169.

Perez-Villar JJ, Whitney GS, Sitnick MT, Dunn RJ, Venkatesan S, O'Day K, Schieven GL, Lin T A, Kanner SB. Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav. *Biochemistry*. 2002;41(34):10732-40.

Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2004;25(7):374-80.

Pitkänen J, Peterson P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun.* 2003;4(1):12-21.

Poot M, Zhang YZ, Krämer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, Lugade AG, Singer VL, Haugland RP. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(12):1363-72.

Pozzesi N, Fierabracci A, Liberati AM, Martelli MP, Airoldi E, Riccardi C, Delfino DV Role of caspase-8 in thymus function. *Cell Death Differ.* 2014;21(2):226-33.

Psarra AM, Sekeris CE. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 2008. 1783: 1-11.

Psarra AM, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*. 2008; 60(4):210-23.

Psarra AM, Hermann S, Panayotou G, Spyrou G. Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF-kappaB modulates glucocorticoid receptor and NF-kappaB signalling in HEK-293 cells. *Biochem J*. 2009;422:521-531.

Psarra AM, Sekeris CE. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787:431-436.

Purton JF, Boyd RL, Cole TJ and Godfrey DI. Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity* 2000;13:179-81

Qiao S, Okret S. and Jondal M. Thymocyte-synthesized glucocorticoids play a role in thymocyte homeostasis and are down-regulated by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 2009;150:4163-4169.

Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC. and Hoth M.. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104,14418-14423.

Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol*.2004;5(3):247-53.

Rand PW, Lacombe E, Barker ND, Kallechey GL. Effects of methylprednisolone on the physical properties of the human red cell. *J Lab Clin Med*.1977;89(6):1241-50.

Rao N, Dodge I, Band H. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;71(5):753-63

Res P, Spits H. Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol*. 1999; 11(1): 39-46.

Rhen T. and Cidlowski JA. Anti-inflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Me. d* 2005; 353: 1711-1723.

Rodewald HR., Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008;26: 355-388.

Rogatsky I, Ivashkiv LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens*. 2006;68(1):1-12.

Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L, Ziltener HJ. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol*. 2005; 6(6):626-34.

Rothenberg EV, Moore JE. and Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immuno*. 1 2008;8:9-21.

Rothenberg EV. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity* 2007;26:690-702.

Sackey FN, Watson CS, Gametchu B., Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *Am J Physiol.* 1997;273(3):571-83

Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 2003; 426(6965): 454-60.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155: 1151-64

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T & Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775-87.

Samarasinghe RA, Di Maio R, Volonte D, Galbiati F, Lewis M, Romero G, et al. Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16657-62

Samarasinghe RA, Witchell SF, DeFranco DB. Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. *Cell Cycle*. 2012;11(15):2819-27

Savignac M, Mellström B, Naranjo JR. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch*. 2007;454(4):523-33.

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(2):77-89.

Sawant DV, and Vignali DA, Once a Treg, always a Treg? *Immunol Rev*. 2014; 259(1): 173–191.

Scheller K, Sekeris CE, Krohne G, Hock R, Hansen IA and Scheer U. Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur J Cell Biol* 2000. **79**: 299-307.

Schlossmacher G, Stevens A, White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *Endocrinol*. 2011;211(1):17-25.

Schoneveld OJ, Gaemers IC. and Lamers WH. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* 2004;1680:114-128.

Schütt C, and Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag: München, 2011. 225.

- Schwindling C, Quintana A, Krause E. and Hoth M, Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *J Immunol.* 2010;184:184-190.
- Selvaraj RK. and Geiger TL, A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol,* 2007;178 (12):7667-7677.
- Serre K, Bénézech C, Desanti G, Bobat S, Toellner KM, Bird R, Chan S, Kastner P, Cunningham AF, Maclennan IC, Mohr E. Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells *in vivo* independently of Foxp3 expression. *PloS one* 2011;6, e20731
- Shah DK, Zuniga-Pflucker JC.. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol.* 2014;192:4017–23.
- Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 2006;203:189-201.
- Sionov RV, Kfir S, Zafrir E, Cohen O, Zilberman Y, Yefenof E. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle.* 2006;5(10):1017-26.
- Sloan-Lancaster J. and Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: Molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annual Review of Immunology* 1996;14, 1-27.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619.
- Smoak KA, Cidlowski JA, Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 2004;125:697-706.
- Sohn SJ, Thompson J. and Winoto A, Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr Opin Immunol.* 2007. 19: 510-515.
- Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, and Sekeris CE, Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005;20: 3481-3487.
- Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 2003;144(4):1164–74.
- Sommers CL, Samelson LE, Love PE. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays.* 2004;26(1):61-7.
- Staal FJ, Luis TC. and Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 2008;8:581-593.

Stahn C., Lowenberg M., Hommes DW and Buttgereit,F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275: 71-78.

Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*.2003; 21: 139-76.

Stary G, Klein I, Bauer W, Kosziket F, Reininger B, Kohlhofer S, Gruber K, Skvara H, Jung T, Stingl S. Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF β and expand regulatory T cells. *J. Immunol.* 2011;186: 103–12.

Stasik I, Rapak A, Ziolo E. and Strzadala L, The mitochondrial localization of RelB and NFATx in immature T cells. *Cell Mol Biol Lett* 2008. 13: 493-501.

Stavreva DA, Wench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, Johnson TA, Voss TC, Lightman SL, Hager GL. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol* 2009;11:1093-1102.

Steinmann GG, Klaus B. and Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 1985;22:563-575.

Stephen GL, Ashwell JD and Ignatowicz L. Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire. *Int. Immunol.* 2003;15, 623-632.,

Stolte EH, van Kemenade BM, Savelkoul HF, Flik G. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *J Endocrinol* 2006;190:17-28.

Strehl C, Gaber T, Löwenberg M, Hommes DW, Verhaar AP, Schellmann S, Hahne M, Fangradt M, Wagegg M, Hoff P, Scheffold A, Spies CM, Burmester GR, Buttgereit F. Membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3779-88.

Szabo M, Czömpöly T, Kvell K, Talabér G, Bartis D, Németh P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 2012;24(2):79-87.

Szondy Z, Garabuczi É, Tóth K, Kiss B, Köröskényi K. Thymocyte death by neglect: contribution of engulfing macrophages. *Eur J Immunol.* 2012;42(7):1662-7.

Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA. and Rothenberg EV. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 2006;24:53-64.

TakahamaY, Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 2006;6:127-135.

Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis.

Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;380(1-2):89-98.

Talabér G, Tuckermann JP, Okret S. ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids. *FASEB J.* 2015;29(6):2526-34..

Terszowski G, Muller SM, Bleul CC, Blum C, Schirmbeck R, Reimann J, Pasquier LD, Amaga T, Boehm T. and Rodewald HR, Evidence for a functional second thymus in mice. *Science* 2006;312: 284-287.

Thompson J. and Winoto A., During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J Exp Med.* 2008;205:1029-1036.

Tliba O, Damera G, Banerjee A, Gu S, Baidouri H, Kelsacy S, Amrani Y. Cytokines induce an early steroid resistance in airway smooth muscle cells: novel role of interferon regulatory factor-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(4):463-72.

Tryc, AB, Spies CM, Schneider U, Kunkel D, Berki T, Sieper J, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A. and Buttgereit F., Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2006;33: 2249-2253.

Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TcR-mediated thymocyte activation. *J Immunol.* 1999; 163(3):1327-33.

Vacchio MS., and Ashwell, JD., Glucocorticoids and thymocyte development. *Semin Immunol* 2000;12:475-485.

Van Bömmel T, Marsen T, Bojar H. Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res.* 1987;7(6):1217-23.

Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D and Leo O. Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling *J.Exp. Med.* 2001;193,803-814.

Van Laethem F, Liang X, Andris F, Urbain J, Vandenbranden M, Ruysschaert JM, Resh MD, Stulning TM. and Leo O. Glucocorticoids Alter the Lipid and Protein Composition of Membrane Rafts of a Murine T Cell Hybridoma *J Immunol.* 2003;170, 2932-2939.

Vasquez NJ, Kane LP, Hedrick SM. Intracellular signals that mediate thymic negative selection. *Immunity* 1994;1:45-52.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 2004;199: 971-9.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 2008;8, 523-532.

Visy M, Ujhelyi E, Berki T, Lustyik Gy, Grama L, Falus A.: Steroid Responsiveness in Nephrotic Syndrome: Related to the Elevated Glucocorticoid Binding in CD4+T cell Subset. *International Pediatrics* 2002;17, 24-27.

Vogel A, Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Brabant G. and Manns MP, The genetic background of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy and its autoimmune disease components. *J Mol Med* 2002;80:201-211.

Wan S, Xia C, Morel L. IL-6 produced by dendritic cells from lupusprone mice inhibits CD4⁺CD25⁺ T cell regulatory functions. *J Immunol*, 2007;178:271–279.

Wang A, Rud J, Olson CM, Jr. Anguita J. and Osborne BA, Phosphorylation of Nur77 by the MEK-ERK-RSK cascade induces mitochondrial translocation and apoptosis in T cells. *J Immunol* 2009;183,3268-3277.

Wang D, Muller N, McPherson KG. and Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 2006;176:1695-1702.

Wange RL, Gutián R, Isakov N, Watts JD, Aebersold R, Samelson LE. Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol Chem*. 1995;270(32):18730-3.

Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem*. 1994;269(47): 29520-9.

Weber J. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol*. 2010;37(5):430-9.

Weber WE, Buurman WA., Vandermeeren Periyasamy S, Sánchez ER. Antagonism of glucocorticoid receptor transactivity and cell growth inhibition by transforming growth factor-beta through AP-1-mediated transcriptional repression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(12):1571-85.

Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6865–70.

Wiegers GJ, Knoflach M, Böck G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R, Wick G. CD4(+)/CD8(+)/TcR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol*. 2001;31(8):2293-301.

Wing JB, Sakaguchi S, Multiple Treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol*. 2012;3:178.

Winoto A. Genes involved in T-cell receptor mediated apoptosis of thymocytes and T-cell hybridomas. *Immunology* 1997;9:51-58.

Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med.* 1997;185(10):1877-82

Wu L. T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(2):121-6.

Yablonski D, Kadlecak T, Weiss A. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol. Cell Biol.* 2001;21(13):4208-18.

Yadav M, Stephan S, and Bluestone JA. Peripherally induced Tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol.* 2013;4: 232. doi:10.3389

Yarilin AA. and Belyakov IM. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr Med Chem* 2004;11: 447-464.

Yu L, Strandberg L. and Lenardo MJ. The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy* 2008;4:567-573.

Zacharchuk CM, Mercep M, Chakraborti PK, Simons SS Jr, Ashwell JD. Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol.* 1990;145(12):4037-45.

Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A., The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev.* 2011; 10(6):305-10.

Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting Edge: Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Induced by IL-2 and TGF β Are Resistant to Th17 Conversion by IL-6. *J Immunol.* 2008;180(11):7112-7116.

Zheng Y, and Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology* 2007; 8, 457–62

Zhou L, Chong MM. and Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30:646-655.

dc_1343_16

11. MELLÉKLETEK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

dc_1343_16

Reprinted from

JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS

Journal of Immunological Methods 214 (1998) 19–27

Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody

T. Berki ^{a,*}, G. Kumánovics ^b, A. Kumánovics ^a, A. Falus ^c, E. Újhelyi ^d,
P. Németh ^a

^a Department of Immunology and Biotechnology, University Medical School of Pécs, P.O.B. 99, H-7643 Pécs, Hungary

^b Department of Internal Medicine, University Medical School of Pécs, Pécs, Hungary

^c Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary

^d National Blood Transfusion Center, Budapest, Hungary

Received 1 December 1997; accepted 15 January 1998



Scope of the Journal

The JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS is devoted to covering techniques for: (1) quantitating and detecting antibodies and/or antigens and haptens based on antigen-antibody interactions; (2) fractionating and purifying immunoglobulins, lymphokines and other molecules of the immune system; (3) isolating antigens and other substances important in immunological processes; (4) labelling antigens and antibodies with radioactive and other markers; (5) localizing antigens and/or antibodies in tissues and cells, *in vivo* or *in vitro*; (6) detecting, enumerating and fractionating immunocompetent cells; (7) assaying for cellular immunity; (8) detecting cell-surface antigens by cell-cell interactions; (9) initiating immunity and unresponsiveness; (10) transplanting tissues; (11) studying items closely related to immunity such as complement, reticuloendothelial system and others. In addition the journal will publish articles on novel methods for analysing the organisation, structure and expression of genes for immunologically important molecules such as immunoglobulins, T cell receptors and accessory molecules involved in antigen recognition, processing and presentation. Articles on the molecular biological analysis of immunologically relevant receptor binding sites are also invited. Submitted manuscripts should describe new methods of broad applicability to immunology and not simply the application of an established method to a particular substance.

Editors

V. Nussenzweig, *Department of Pathology, New York University Medical Center, School of Medicine, 550 First Avenue, New York, NY 10016, USA*

M.W. Turner, *Immunobiology Unit, Institute of Child Health, University of London, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, UK*

Software Notice Editor

S.J. Merrill, *Department of Mathematics, Statistics and Computer Science, Marquette University, P.O. Box 1881, Milwaukee, WI 53201-1881, USA*

Editorial Board

C.R. Alving, *Washington, DC, USA*

R.S. Basch, *New York, NY, USA*

J.R. Battisto, *Cleveland, OH, USA*

L. Bignold, *Adelaide, Australia*

P. Bongrand, *Marseilles, France*

F. Borek (Founding Editor), *Tel Aviv, Israel*

L.K. Borysiewicz, *Cardiff, UK*

P. Brandtzæg, *Oslo, Norway*

K.A. Brown, *London, UK*

J. Burnie, *Manchester, UK*

J.D. Capra, *Oklahoma City, OK, USA*

S. Challacombe, *London, UK*

S. Chantler, *London, UK*

M. Chapman, *Charlottesville, VA, USA*

E. Claassen, *Leiden, Netherlands*

N.R. Cooper, *La Jolla, CA, USA*

R. Cowan, *Hong Kong*

B. Diamond, *Bronx, NY, USA*

C.A. Dinarello, *Denver, CO, USA*

J. Fabre, *London, UK*

A.J.T. George, *London, UK*

J. Goding, *Parkville, Australia*

J.-L. Guesdon, *Paris, France*

C.S. Hosking, *Newcastle, Australia*

K. James, *Edinburgh, UK*

R. Jefferis, *Birmingham, UK*

J.C. Jensenius, *Århus, Denmark*

A.P. Johnstone, *London, UK*

M. Kazatchkine, *Paris, France*

D.M. Kemeny, *London, UK*

T. Kinoshita, *Osaka, Japan*

H. Koprowski, *Philadelphia, PA, USA*

J. Laman, *Leiden, Netherlands*

M. Lamm, *Cleveland, OH, USA*

R.G. Leslie, *Odense, Denmark*

N. Ling, *Birmingham, UK*

R.N. Maini, *London, UK*

J. Maryanski, *Epalinges, Switzerland*

L. McPhail, *Winston-Salem, NC, USA*

A. Meager, *Potters Bar, UK*

M. Melamed, *London, UK*

P. Minor, *Potters Bar, UK*

A.R. Mire-Sluis, *Potters Bar, UK*

S.L. Morrison, *Los Angeles, CA, USA*

W.J.W. Morrow, *London, UK*

E. Nardin, *New York, NY, USA*

D.J. Newman, *London, UK*

J.J. Oppenheim, *Frederick, MD, USA*

M.G. Ormerod, *Reigate, UK*

T. Out, *Amsterdam, Netherlands*

I. Poxton, *Edinburgh, UK*

E. Pure, *Philadelphia, PA, USA*

K.B.M. Reid, *Oxford, UK*

P. Rubinstein, *New York, NY, USA*

J. Sedgwick, *Sydney, Australia*

A.W. Segal, *London, UK*

E.M. Shevach, *Bethesda, MD, USA*

F. Sinigaglia, *Milan, Italy*

N. Staines, *London, UK*

R. Steinman, *New York, NY, USA*

C.R. Stokes, *Bristol, UK*

D. Stollar, *Boston, MA, USA*

D. Stott, *Glasgow, UK*

R.C. Thorpe, *Potters Bar, UK*

H. Towbin, *Basel, Switzerland*

P.A. Underwood, *North Ryde, Australia*

J.C. Unkeless, *New York, NY, USA*

R. Van Furth, *Oegstgeest, Netherlands*

M. Van Regenmortel, *Strasbourg, France*

J. Vilcek, *New York, NY, USA*

J.W.M. Visser, *New York, NY, USA*

A. Voller, *Berghamsted, UK*

J.R. Yannelli, *Lexington, KY, USA*

F. Zavala, *New York, NY, USA*

H. Zola, *Adelaide, Australia*

S.B. Zolla-Pazner, *New York, NY, USA*

Publication information

Journal of Immunological Methods (ISSN 0022-1759). For 1998 volumes 212–223 are scheduled for publication. Subscription prices are available upon request from the publisher. For institutional subscribers to the *Journal of Immunological Methods* there is a combined subscription option with *Immunotechnology*. For more details please contact the publisher. Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by surface mail except to the following countries where air delivery via SAL mail is ensured: Argentina, Australia, Brazil, Canada, Hong Kong, India, Israel, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Pakistan, P.R. China, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, Thailand and USA. For all other countries airmail rates are available upon request. Claims for missing issues must be made within six months of our publication (mailing) date.

Orders, claims, and product enquiries: please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest to you:

New York, Elsevier Science, P.O. Box 945, New York, NY 10159-0945, USA. Tel: (+1) 212-633-3730, [Toll free number for North American customers: 1-888-4ES-INFO (437-4636)], Fax: (+1) 212-633-3680, e-mail: usinfo-f@elsevier.com

Amsterdam, Elsevier Science, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands. Tel: (+31) 20-4853757, Fax: (+31) 20-4853432, e-mail: nlinfo-f@elsevier.nl

Tokyo, Elsevier Science, 9-15, Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan. Tel: (+81) 3-5561-5033, Fax: (+81) 3-5561-5047, e-mail: info@elsevier.co.jp

Singapore, Elsevier Science, No. 1 Temasek Avenue, #17-01 Millenia Tower, Singapore 039192. Tel: (+65) 434-3727, Fax: (+65) 337-2230, e-mail: asiainfo@elsevier.com.sg

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints, should be directed to the publishers, Elsevier Science Ireland Ltd. Bay 15K, Shannon Industrial Estate, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel (+353) 61 471944; Fax (+353) 61 472144; e-mail: s.cronin@elsevier.ie



ELSEVIER

**JOURNAL OF
IMMUNOLOGICAL
METHODS**

Journal of Immunological Methods 214 (1998) 19–27

Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody

T. Berki ^{a,*}, G. Kumánovics ^b, A. Kumánovics ^a, A. Falus ^c, E. Újhelyi ^d,
P. Németh ^a

^a Department of Immunology and Biotechnology, University Medical School of Pécs, P.O.B. 99, H-7643 Pécs, Hungary

^b Department of Internal Medicine, University Medical School of Pécs, Pécs, Hungary

^c Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary

^d National Blood Transfusion Center, Budapest, Hungary

Received 1 December 1997; accepted 15 January 1998

Abstract

Detection and monitoring the expression and level of intracellular glucocorticoid receptor (GCR) is necessary in many clinical and experimental situations. Binding of radioactive steroids (^3H dexamethasone) to the cytosolic fractions of cells has been recently used. However, it is an expensive, time-consuming technique difficult to use in routine diagnostics. In this article we describe a novel, simple method for GCR detection, using a FITC-conjugated anti-GCR monoclonal antibody (mAb) for flow cytometric measurements in permeabilized cells. The monoclonal antibody was raised against a conserved sequence (150–176 amino acids) of the regulatory part of the receptor. Synthetic peptide (called APTEK-26) fragment of the receptor conjugated to different carriers (TG, BSA) was used for immunization and screening of the hybridomas. The a-GCR 8E9, 3C8 and 5E4 clones (IgG1) were further characterized by immunoserological methods for their reactivity against overlapping synthetic peptide fragments of the receptor and by Western blot technique on cytosolic fraction of HEP G2 cells (containing the GCR). Furthermore the mAbs could be used for the FACS based detection of GCR, despite its low number of antigen structure within the cells. Solving the problem of nonspecific binding of the secondary antibodies we used our high affinity IgG1 a-GCR mAbs directly labeled with the fluorescent dye FITC. The fluorescent labeling of the GCRs in HEP G2 cell line and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were demonstrated by flow cytometric analysis after fixation with 4% paraformaldehyde and permeabilization with saponin. Competition with molar excess of unlabelled antibodies and with the GCR peptide fragment confirmed the specific binding of the 8E9 and 5E4 mAbs to the GCRs. Monitoring the GCR level by flow cytometry would be useful in clinical diagnostics, e.g., in steroid-treated patients and in steroid-resistant states. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Glucocorticoid receptor (GCR); Monoclonal antibody (mAb); Intracellular flow cytometry; Permeabilization

Abbreviations: GCR, glucocorticoid receptor; mAb, monoclonal antibody; PFA, paraformaldehyde; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TG, thyreoglobulin; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate-buffered saline; FITC, fluorescein isothiocyanate; AEC, aminoethylcarbasole

* Corresponding author. Tel: +36-72-324-122/ext. 1994; fax: +36-72-324-122/ext. 1993; e-mail: btimi@apacs.pote.hu

1. Introduction

Glucocorticoid (GC) hormones play an important role in homeostasis, growth and development by interacting with specific high-affinity receptors (GCR). These receptors are located in the cytoplasm of cells, in association with different heat shock proteins (hsp90, hsp70, hsp56) (Kaufmann et al., 1992; Akner et al., 1995). GC hormone uptake causes the dissociation of the GCR from heat shock proteins and translocation of the hormone-receptor complex into the nucleus (Guiochon-Mantel and Milgrom, 1993). Detecting the presence and level of intracellular GCR would be very important and necessary in many clinical states and experimental situations (Homo-Delarchie et al., 1991). Radioligand binding assay is the generally used method for the detection of cytosolic GCRs. In this procedure a large number of cells is required for cytosol preparation, followed by time-consuming radioactive ligand binding and detection steps. Immunological detection of cellular antigens with labeled antibodies may prove a more convenient method. Human peripheral blood lymphocytes and monocytes are the first targets of GC therapy (Gametchu et al., 1993; Rákász et al., 1993). Detection of intracellular GCR content in these cell types may provide substantial new insight into GC resistant states at the single-cell level. In order to establish an immunological procedure of GCR measurement, we developed murine monoclonal antibodies against the human GCR. Conventional polyclonal antibodies were already developed against purified cytosolic GCRs or against recombinant polypeptide fragments of the receptor (mostly against the DNA or steroid binding domain) and used for the immunohistological detection of receptor (McGimsey et al., 1991; Okret et al., 1981). However the specificity, and sensitivity of this method is low, cross reactivity with other steroid hormone receptors occurs, and does not provide quantitative results. Flow cytometric detection of intracellular (cytoplasmic or nuclear) antigens, e.g., basic proteins, cytokines, viral proteins (Prussin and Metcalfe, 1995; Watson et al., 1991; Riggs et al., 1995) with specific monoclonal antibodies has been described recently. In this study we report the development and flow cytometric use of anti-GCR mAbs that may provide an alternative to the existing procedures. This way we can improve

the sensitivity and multiparameter capability of flow cytometry for intracellular GCR antigen detection.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of mouse monoclonal antibodies against human GCR

A 26 amino acid length synthetic peptide fragment (APTEK26, the 150–176 amino acid (aa.) sequence of the GCR) in the regulatory part of the human glucocorticoid receptor (Giguere et al., 1986) was coupled to thyreoglobulin (TG) carrier molecule by glutaraldehyde method (Ausubel et al., 1989) and used for immunizing female Balb/c mice (Charles River). The animals were injected intraperitoneally (i.p.) with 30 µg APTEK26-TG conjugate in CFA into each hind footpad followed with two i.p. boosts in IFA 21 and 14 days later. The splenocytes of the best responder animal were fused to Sp-2/0 Ag14 mouse myeloma cells (originally obtained from Flow Laboratories UK and maintained in our cell depository) according to the method described by Köhler and Milstein (1975). Supernatants from wells were assayed for the presence of anti-APTEK26 antibodies by an indirect simple binding ELISA. The positive wells were cloned and further characterized.

2.2. Antibody capture indirect ELISA

APTEK26 and overlapping synthetic peptide fragments (NP1, the 159–170 and NP2, the 167–176, aa. sequences conjugated to BSA) of the GC receptor were used to determine the binding site of the monoclonal antibodies. ELISA plates (CML, France) were coated with 50 µl of 1 µg/ml peptide (APTEK26 or NP1-BSA or NP2-BSA conjugate) or control proteins (e.g., BSA, gelatin) in coating buffer (50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.6) and incubated overnight at 4°C. The nonspecific binding was blocked with 0.5% gelatin in PBS for 30 min. After three washing steps the hybridoma supernatants or different dilutions of the purified mAbs were added, and the plates were incubated for 1 h at 37°C, followed by adding HRPO labeled rabbit anti-mouse IgG (Dako). After incubation for 1 h at 37°C the plates were washed and developed with OPD (Sigma). The reaction was stopped with sulfuric

acid, and the absorbance at 490 nm was determined using a Dynatech MR 7000 microplate reader.

2.3. Preparation of cytosolic GC receptor fraction

All procedures were performed on ice according to the method described by Csaba and Inczei-Gonda (1992). The liver and thymus isolated from Balb-/c mice (Charles River) were cut into small pieces in ice-cold TS buffer (0.01 M Tris-HCl 1.5 mM EDTA, pH 7.4, freshly supplemented with 2 mM dithiothreitol and 20 mM molybdate and 1 mM PMSF). Hep G2 cells (ATCC HB 8065, a human hepatocellular carcinoma cell line) were collected by scraping, washed three times in ice-cold PBS and both were homogenized in TS buffer (5×10^7 cells/ml) using 3 × 8 strokes of a tight-fitting glass-Teflon Potter homogenizer. Homogenates were centrifuged at 100,000 × g for 60 min, and the supernatants (cytosol) were used for Western blot analysis. Protein content of the cytosol was estimated by the Bradford assay (Bradford, 1976).

2.4. Western blot

The cytosolic fractions of different cell types were boiled for 5 min in SDS sample buffer under reducing conditions immediately after isolation and then separated on an 8–25% gradient SDS-PAGE minigel using Pharmacia Phast System apparatus. The proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane under semidry conditions. The background was blocked with 3% gelatin/TBS/azide for 2 h at room temperature. The membrane was washed three times in wash buffer, and 2 µg/ml biotin labeled 8E9 mAb or 5E4 and 3C8 supernatants or irrelevant mAb were added for 2 h. The samples were washed three times, and then incubated with streptavidin–HRPO conjugate (Amersham, UK) or peroxidase conjugated goat anti-mouse Ig (Dako) for 1 h at room temperature. After several washing steps the color reaction was developed with AEC.

2.5. Immunocytochemistry

To confirm and visualize the intracellular staining of GCR in Hep G2 cells, indirect immunoperoxidase

or immunofluorescence method was employed. Hep G2 cell were grown onto glass slides, washed 2 × in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). After three washing steps in PBS 0.3% Triton X-100 buffer for 20 min was used to permeabilize the cells. The endogenous peroxidase activity of the sample was blocked with 3% H₂O₂ in PBS for 5 min. Incubation with the primary anti-GCR mAb dilutions followed with the FITC or peroxidase labeled anti-mouse antibody (Dako) was performed for 30 min in the permeabilization buffer described. After three washing steps the color reaction was developed with AEC.

2.6. Flow cytometry

Intracellular staining of the GCRs in Hep G2 hepatoma cells and human peripheral blood mononuclear cells isolated on FicollPaque (Pharmacia) gradient was performed on ice using a-GCR mAbs directly conjugated to fluorescein isothiocyanate (Sigma). The FITC conjugation procedure was performed according to the method of Johnstone and Thorpe (1982). After two washing steps in PBS/0.1% NaN₃ the cells were fixed in 4% buffered paraformaldehyde, washed 3 × in PBS and permeabilized with 0.1% saponin or 0.1% Triton X-100 containing PBS/0.1% NaN₃/0.1% BSA buffer (permeabilization buffer). The nonspecific binding sites were blocked with 10% normal mouse serum containing permeabilization buffer for 10 min. The cells were incubated with different dilutions of the FITC labeled anti-GCR mAbs (with or without excess amount of unlabelled mAb or APTEK26 peptide for specificity control experiments), or isotype control for 30 min in permeabilization buffer, washed 2 × in permeabilization buffer, 1 × in PBS and fixed in 1.0% buffered formaldehyde. The samples were measured and analyzed in a Becton Dickinson FACSCalibur equipment. Dead cells were excluded by forward and side scatter gating. Separate gates were set on lymphocytes and monocytes. Typically 10,000 gated events were acquired. List mode files were then analyzed using the CELLQUEST software. The a-GCR-FITC staining was always compared (by overlaying the histogram plots) to the autofluorescent and isotype-FITC control samples.

3. Results

3.1. Identification of the binding sites of a-GCR mAbs

Our goal was to produce anti-GCR mAbs that could be used for the detection of both isolated and intracellular glucocorticoid receptors. We used synthetic peptide fragment (APTEK 26) of the regulatory part of the receptor, which is a conserved part of the GCR, but differs from other steroid receptors (Hollenberg et al., 1985; Giguere et al., 1986). We identified more than 30 anti-APTEK26 mAbs by antibody capture ELISA, which clones were further characterized by their ability to capture overlapping peptide fragments (NP-1, NP-2 conjugated to BSA) of the GC receptor. The mAb 8E9 (IgG1) showed strong reaction both with the APTEK26 and the NP2 peptides in ELISA, which suggests that the binding site is between the 167–176 aa. sequences. The 5E4 (IgG1) clone showed strong immunoserological (ELISA) reaction only with the APTEK26 peptide, suggesting that its binding site is at the beginning of the peptide APTEK26 (150–158 aa. sequence of the GCR). The IgM isotype mAb 3C8 showed weak reaction with both peptides, so its binding site might be the 167–170 aa. sequence (Fig. 1). These clones have been used for further experiments.

3.2. Western blot analysis of the GCR binding ability of mAbs

Cytosolic GC receptor fractions of a human hepatoma cell line (Hep G2) and of mouse thymocytes

Synthetic peptide fragments of the GCR used for the characterization of the mAbs:

APTEK26 - 150-176 amino acid sequence of the GCR :
 NP-1 - 159-170 amino acid sequence
 NP-2 - 167-176 amino acid sequence

APTEKEFPKTHSDVSSEQQQHLKGQTG	(APTEK)
KTHSDVSSEQQ	(NP1)
QQHLKGQTG	(NP2)

^	^	^
5E4	3C8	8E9 mAb

Fig. 1. Binding sites of the a-GCR mAbs (clone No. 5E4, 3C8 and 8E9) were determined by capture ELISA on overlapping synthetic peptide sequences of the GCR.

and hepatocytes prepared as described were separated on 8–25% SDS/PAGE gradient gel under reducing conditions. Western blot analysis demonstrated, that mAbs 8E9, 5E4 and 3C8 all recognized a protein of approximately 97 kD of all cell lysates (Fig. 2). In the absence of the protease inhibitor PMSF a 42 kD band appeared in parallel with the 97 kD band, that was most abundant in the mouse hepatocyte cell lysate. This might be a proteolytic degradation product of the receptor. The mAbs all recognized the BSA-APTEK26 conjugate as positive control, but did not react with the single BSA. This result is consistent with our aim, to prepare mAbs against a well-conserved part of the GCR, which is similar in different species.

3.3. Demonstration of intracellular staining in HepG2 cells by immunocytochemical method

On the basis of our previous results we wanted to verify the reactivity of our mAbs with the native form of intracellular GC receptors. Hep G2 cells after fixation and permeabilization with Triton X-100, were incubated with the anti-GCR mAbs in saponin buffer. The 5E4 (IgG1) and the 3C8 (IgM) clones showed rather inhomogeneous cytoplasmic reaction in virtually all cells, while 25–30% of the cells showed reaction both in the cytoplasm and in the nucleus. Interestingly the 8E9 clone gave only a weak intracytoplasmic reaction (Table 1).

3.4. Optimization of intracellular GCR staining protocol for flow cytometry

For the detection of intracellular antigens by flow cytometry the specificity of the components of the staining reaction has to be first established. The reactivity of a-GCR mAbs was compared to the nonspecific background staining defined using FITC labeled isotype control antibody added at the same concentrations as the a-GCR-FITC mAbs (direct staining reaction). In the case of indirect reactions isotype control first antibody was compared to the a-GCR samples, followed with FITC labeled anti-mouse-Ig antibody. The nonspecific binding of FITC labeled antibodies was blocked by preincubation with 10% normal serum from the same species, and with

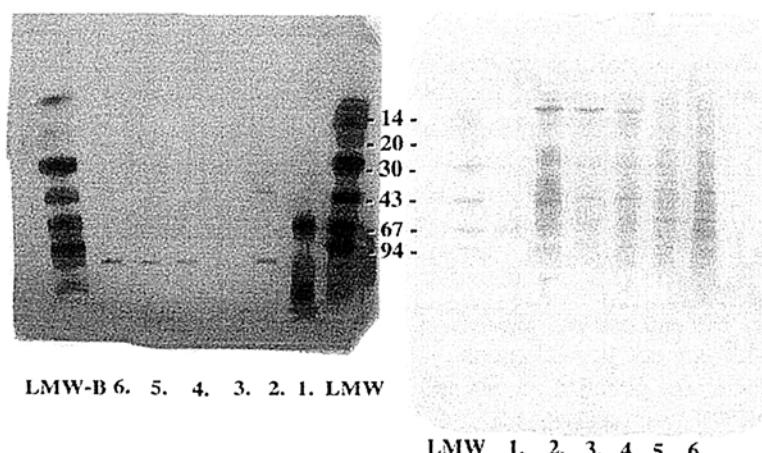


Fig. 2. Detection of cytosolic GCR in different cell lysates (lane 1, APTEK-26-BSA control; lane 2, Balb/c hepatocytes; lane 3, thymocyte cell lysate of Balb/c mouse (100 µg/ml); lane 4, thymocyte cell lysate of Balb/c mouse (250 µg/ml cc.); lane 5, Human Hep G2 cells; lane 6, Immunoprecipitate of Hep G2 cell lysate) using biotinylated a-GCR mAb (clone No. 8E9) and streptavidine-peroxidase for immunoblotting. Biotin-labeled molecular weight standards (LMW-B) were used. (A) Western blotting. (B) SDS-PAGE gradient minigel of Pharmacia Phast-System.

the addition of blocking proteins (BSA or milk) into the permeabilization buffer.

Different permeabilization techniques (saponin, TX-100, methanol) were compared with or without previous fixation with 4% paraformaldehyde of Hep G2 cells and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The 3C8 and 8E9 clones showed the best specific signal without fixation, after permeabilization with 0.1% saponin (Fig. 3). The 5E4 clone showed similar strong reaction both with/or without fixation followed with saponin permeabilization. Without fixation, longer incubation time (more than 30 min) in the saponin-containing buffer caused the destruction of the cells. Triton X-100 permeabilization resulted in changes of the morphology of cells, detected in the alterations of light scatter properties of the PBMC cell populations. PFA/saponin was

used in the subsequent experiments, as it was found suitable for both HepG2 and PBM cells.

3.5. Demonstration of the specificity of the intracellular GCR staining

We employed two different approaches to distinguish more precisely between the specific staining and background. First we added molar excess of synthetic peptide fragment (APTEK26) of the receptor to the anti-GCR-FITC mAb prior to staining, to abrogate specific staining. No alteration in the mean fluorescence of the negative (isotype) control peak was observed. Binding of all of the a-GCR mAbs could be prevented by the addition of a peptide fragment, typically at the concentration range between 0.1–10 µg/ml (Fig. 4a). An indifferent pep-

Table 1
Characterization of a-GCR mAb clones with different immunological methods

a-GCR antibody	ELISA APTEK26	ELISA NP1-BSA	ELISA NP2-BSA	Westernblot (GCR, APTEK)	Immunocytochemistry	Immunofluorescence + IC flow cytometry	Isotype
8E9 mAb	+++	-	++	+	±	+	IgG1
5E4 mAb	+++	-	-	+	++ cytoplasm + nucleus	+++	IgG1
3C8 mAb	++	+	+	+	++ cytoplasm	++	IgM
mouse serum	+++	+	+	ND	++ cytoplasm + nucleus	+	Polyclonal

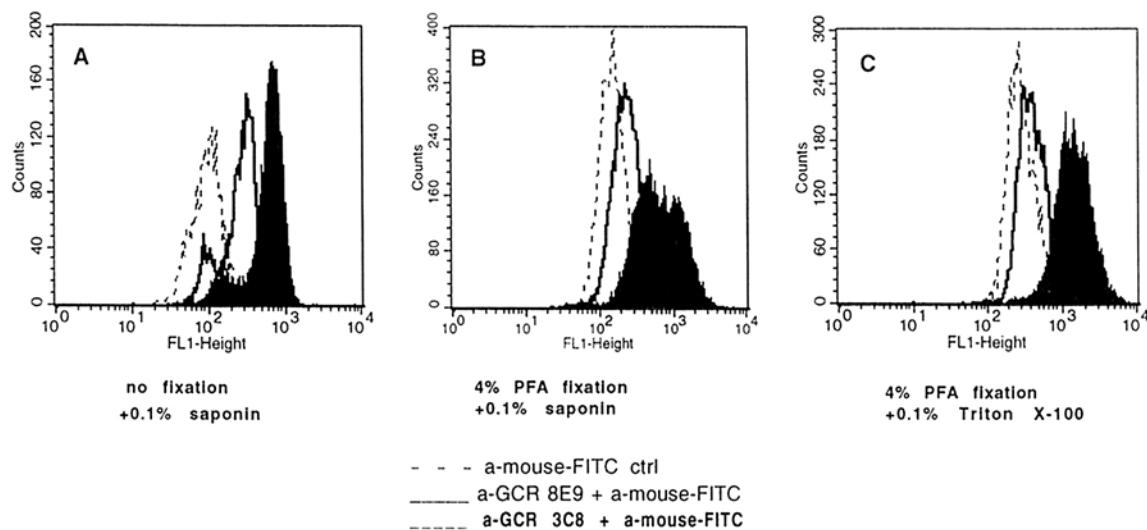


Fig. 3. Flow cytometric histograms represent the reactivity of two different monoclonal a-GCR antibodies (8E9, bold; 3C8 filled; a-mouse control, dotted line) on Hep G2 cells, after different permeabilization protocols with/or without previous fixation with 4% paraformaldehyde. (A) saponin permeabilization without previous fixation, (B) 4% PFA fixation followed with saponin permeabilization, (C) 4% PFA fixation followed with Triton X-100 permeabilization. Indirect labeling was performed using a-GCR mAb supernatants and a-mouse-FITC antibody.

tide (e.g., insulin) did not alter the reactivity of the antibodies. Second we used directly labeled anti-GCR antibodies, which allowed the evaluation of any non-specific binding. During this approach the negative control was coincubated with an excess (10×, 100×) of unlabeled anti-GCR antibody (or the isotype control) and the directly FITC conjugated anti-GCR

mAb. Concentration dependent decrease of fluorescence intensity was detected when the samples were coincubated with the unlabeled a-GCR mAbs (Fig. 4b). Preincubation with molar excess of unlabeled a-GCR mAb inhibited the binding of the FITC labeled form of the same clone (5E4 or 8E9). However preincubation with molar excess of an unlabeled

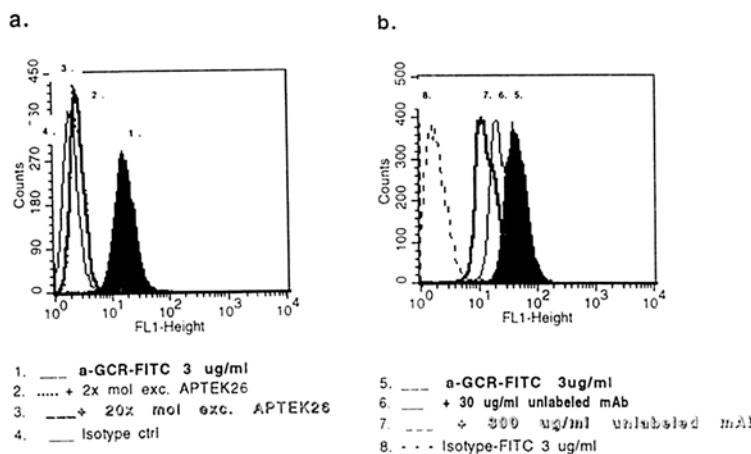


Fig. 4. Demonstration of the specificity of GCR recognition. Hep G2 cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.1% saponin, and stained with a-GCR-FITC (5E4) mAb at 3 µg/ml with/or without preincubation with excess of antigen (APTEK26) (a). (b) Represents the competition of a-GCR-FITC (5E4) with different concentrations of unlabeled a-GCR 5E4 mAb.

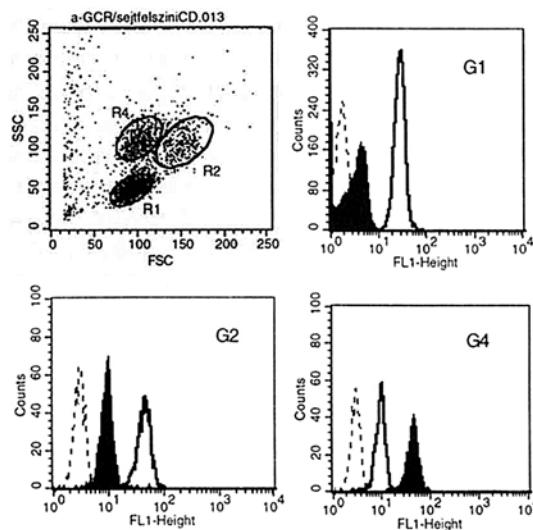


Fig. 5. Direct labeled a-GCR mAb clones (8E9-FITC: shaded histograms; 5E4-FITC: open histograms; dotted histograms: isotype ctrl-FITC, both at 3 µg/ml cc) show different staining patterns on different PBM cell populations. G1 = R1: lymphocytes; G2 = R2: monocytes; G4 = R4: granulocytes.

a-GCR mAb (5E4 or 8E9) did not prevent the binding of the FITC labeled form of the other mAb clone (data not shown). Isotype matched control did not

alter the specific staining with a-GCR-FITC mAbs. The ability to effectively block specific staining with either synthetic peptide fragment of the receptor or unlabeled anti-GCR antibody strongly suggests that the antigen recognized intracellularly is the GC receptor.

3.6. Measurement of the GCR expression in PBMCS

In order to examine the sensitivity of the flow cytometric assay, we measured intracellular GCR expression in human peripheral blood mononuclear cells. The FITC labeled 8E9 and 5E4 IgG1 mAbs in the different cell populations showed different staining pattern. The 8E9 clone showed weak reaction with the cells in the lymphocyte (G1) and monocyte (G2) gate. At the same time it gave strong reaction with the granulocyte cell population (G4). In contrast the 5E4 clone showed strong reaction in both cell populations, but weaker fluorescence could be measured in the granulocytes than that of the 8E9 clone (Fig. 5). Peripheral blood mononuclear cells (isolated by FicollPaque gradient centrifugation) from healthy individuals were *in vitro* treated with different concentrations of dexamethasone for 24 h. Direct FITC

Changes of GCR level in human peripheral blood mononuclear cells after 24 h *in vitro* treatment with 10⁻⁷ M Dexamethasone

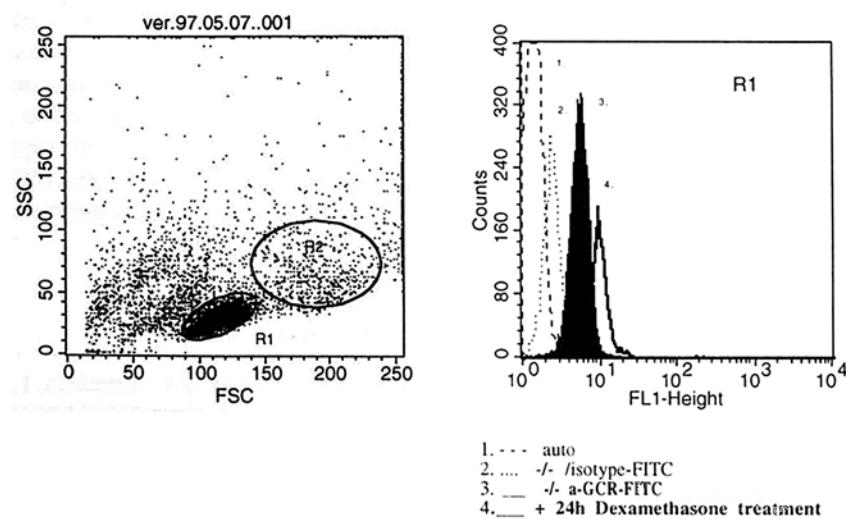


Fig. 6. Dexamethasone treatment increased the GCR level in peripheral blood lymphocytes. PBMC were *in vitro* treated with 10⁻⁷ M dexamethasone, fixed with 4% PFA and permeabilized with saponin. Treated (4) and untreated (3) samples were identically stained with a-GCR-8E9-FITC.

labeled a-GCR clone 8E9 was used for intracellular staining. Treatment with 10^{-7} M dexamethasone caused increased intracellular GCR labeling compared to the untreated controls (Fig. 6). Other dexamethasone concentrations did not alter the GCR staining.

4. Discussion

In this report we describe a new simple immunological method for the detection of intracellular glucocorticoid receptors in different cell types. Monoclonal antibodies were developed against the conserved regulatory part of the receptor using synthetic peptide sequences of the GCR. The reactivity of the mAb clones with the whole receptor molecule was tested using cytosolic GCR fractions from different cell types by Western blot analysis. Three different clones, each reacting with the denatured (SDS) form of the receptor, were compared by immunocytochemical staining of the human Hep G2 hepatoma cell line. The mAb clones showed different intracellular staining patterns. This can be explained with the different binding sites of the mAb clones on the receptor, measured by ELISA of overlapping peptide fragments of the GCR. These sequential binding sites (epitops) can be more or less accessible on the native intracellular form of the receptor, which can explain the different reactivity of the mAbs isolated. The accessibility of the same epitope can also differ in the cytoplasmic and nuclear form of the receptor (Brink et al., 1992; Htun et al., 1996). The a-GCR 8E9 mAb can only recognize the cytoplasmic form of the receptor, while the 5E4 clone binds both the cytoplasmic and nuclear forms of the GCR according to our immunocytochemical measurements.

Using these antibodies in FITC conjugated form we developed a flow cytometric method for intracellular GCR detection. Different fixation and permeabilization procedures were compared (Lan et al., 1996). The fixation with 4% PFA followed by saponin permeabilization did not alter the morphological appearance of the various cell types of PBMCs, and the specific staining reaction of the mAbs was also preserved. The use of BSA in the staining buffer, and the preincubation with normal mouse serum as a blocking step, and the use of

directly conjugated mAbs (Prussin and Metcalfe, 1995) decreased the nonspecific binding to an acceptable level. As such, the level of fluorescence due to the nonspecific binding of the isotype matched antibody was only slightly greater than that of the cellular autofluorescence. The specificity of the GCR staining was demonstrated with different blocking techniques. Blocking with either unlabelled mAb or synthetic peptide fragment of the receptor provided evidence that the fluorescence observed was due to the binding of mAbs to intracellular GCR. No staining was noted when saponin was omitted from the staining and blocking buffers.

Comparing the GCR flow cytometry to the immunocytochemical staining we can conclude, that the staining pattern and intensity with the different mAbs is identical in both techniques. However in flow cytometric analysis we can compare the fluorescence intensity of different cell types with statistical markers. We detected different staining patterns of the two IgG1 mAbs in the PBMC populations (granulocytes vs. lymphocytes), which can be explained either with the different accessibility of the same epitope in the different PBMC cell populations or with the differences in the nuclear/cytoplasmic receptor ratio in the cells.

Intracellular flow cytometry is an easy, reproducible and sensitive method for measuring the GCR level and its changes in PBMCs. This can be an important diagnostic tool for measuring the GCR in patients treated with glucocorticoid hormones. It would be important to determine the GCR level before the steroid treatment and to monitor the GCR level during steroid treatment, especially in steroid-resistant states. We believe that GCR flow cytometry could become a routine diagnostic method for immunologists and clinicians.

References

- Akner, G., Wikström, A.C., Gustaffson, J.A., 1995. Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 1.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1989. Chemical coupling of synthetic peptide to carrier protein using glutaraldehyde. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, p. 11.15.2.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Brink, M., H umbel, B.M., de Kloet, E.R., van Driel, R., 1992. The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology* 130 (6), 3575.
- Csaba, G., Inczefi-Gonda, Á., 1992. Life-long effect of a single neonatal treatment with estradiol or progesterone on rat uterine estrogen receptor binding capacity. *Horm. Metab. Res.* 24, 167.
- Gametchu, B., Watson, C.S., Wu, S., 1993. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J.* 7, 1283.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M., 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645.
- Guiochon-Mantel, A., Milgrom, E., 1993. Cytoplasmic-nuclear trafficking of steroid hormone receptors. *TEM* 4, 322.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M., 1985. Primary structure and expression of functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature (London)* 318, 635.
- Homo-Delarchie, F., Fitzpatrick, F., Christeff, N., Nunez, E.A., Bach, J.F., Dardenne, M., 1991. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40, 610.
- Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D.L., Hager, G.L., 1996. Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intracellular organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3845.
- Johnstone, A., Thorpe, R., 1982. Conjugation of fluorochromes to immunoglobulins. In: *Immunochemistry in Practice*. Blackwell, Oxford, p. 258.
- Kaufmann, S.H., Wright, W.W., Okret, S., Wikström, A.C., Gustaffson, J., Shaper, N.L., Shaper, J.H., 1992. Evidence that rodent epididymal sperm contain the Mr ~ 94,000 glucocorticoid receptor but lack the Mr ~ 90,000 heat shock protein. *Endocrinol.* 130, 3074.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495.
- Lan, H.Y., Hutchinson, P., Tech, G.H., Mu, W., Atkins, R.C., 1996. A novel method of microwave treatment for detection of cytoplasmic and nuclear antigens by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 190, 1.
- McGimsey, W.C., Cidlowsky, J.A., Stumpf, W.E., Sar, M., 1991. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology* 126, 3064.
- Okret, S., Carlstedt-Duke, J., Wrangé, Ö., Carlström, K., Gustafsson, J.A., 1981. Characterization of an antiserum against the glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 677, 205.
- Prussin, C., Metcalfe, D.D., 1995. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods* 188, 117.
- Rákász, É., Gál, A., Bíró, J., Balás, G., Falus, A., 1993. Modulation of glucocorticoid binding in human lymphoid, monocytoid and hepatoma cell lines by inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α . *Scand. J. Immunol.* 37, 684.
- Riggs, R.J., Dando, J.S., Escaich, S., Plavec, I., Böhnlein, E., 1995. Detection of intracellular HIV-1 Rev protein by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 188, 187–189.
- Watson, S.A., Durrant, L.G., Wencyk, P.M., Watson, A.L., Morris, A.L., 1991. Intracellular gastrin in human gastrointestinal tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 866.

dc_1343_16

Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations

Timea Berki¹, László Pálinskás¹, Ferenc Boldizsár¹ and Péter Németh¹

¹Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Szigeti út 12, 7643 Pécs, Hungary

Keywords: Annexin V, anti-GCR mAb, apoptosis, dexamethasone, negative selection, positive selection, RU43044

Abstract

Positive and negative selection steps in the thymus prevent non-functional or harmful T cells from reaching the periphery. To examine the role of glucocorticoid (GC) hormone and its intracellular receptor (GCR) in thymocyte development we measured the GCR expression in different thymocyte subpopulations of BALB/c mice with or without previous dexamethasone (DX), anti-CD3 mAb, RU-486 and RU-43044 treatment. Four-color labeling of thymocytes allowed detection of surface CD4/CD8/CD69 expression in parallel with intracellular GCR molecules by flow cytometry. Double-positive (DP) CD4⁺CD8⁺ thymocytes showed the lowest GCR expression compared to double-negative (DN) CD4⁻CD8⁻ thymocytes and mature single-positive (SP) cells. DX treatment caused a concentration-dependent depletion of the DP cell population and increased appearance of mature SP cells with reduced GCR levels. GCR antagonists (RU-486 or RU-43044) did not influence the effect of DX on thymocyte composition; however, RU-43044 inhibited the high-dose GC-induced GCR down-regulation in SP and DN cells. GCR antagonists alone did not influence the maturation of thymocytes and receptor numbers. Combined low-dose anti-CD3 mAb and DX treatment caused an enhanced maturation (positive selection) of thymocytes followed by the elevation of CD69⁺ DP cells. The sensitivity of DP thymocytes with a GCR^{low} phenotype to GC action and the ineffectiveness of the GCR antagonist treatment may reflect a non-genomic GC action in the thymic selection steps.

Introduction

During T cell development in the thymus rigorous selection steps prevent further maturation of thymocytes bearing TCR unable to recognize self MHC molecules (positive selection) and also cells expressing TCR with high avidity for self peptides presented by self MHC molecules (negative selection) (1,2). Thymocytes bearing TCR with low-to-moderate avidity for self peptide–MHC escape from apoptosis (3). How ligand-induced signaling through the TCR can lead to both rescue from death in the case of positive selection and death in the case of negative selection is unclear. In addition to the avidity model of thymocyte selection, another theory suggests that more receptor-mediated stimuli prevent cell death during positive selection (4,5). The observation that glucocorticoids (GC) are produced by the cortical epithelial cells (6,7) and that they can antagonize TCR-mediated apoptosis in activated T cells (8) and thymocytes (9) has provided experimental

evidence for this theory, which is called the mutual antagonism model of thymocyte development. At the same time another research group investigated the thymocyte development in GCR knockout mice, and described normal T cell maturation and selection in such animals (10,11). Normal CD4/CD8-defined thymocyte subsets were described in GCR dimerization mutant mice (12) as well, which also exclude the genomic GCR-mediated GC action in the thymus. These findings seem to be contradictory with the mutual antagonism model, but do not exclude that a non-receptor-mediated (non-genomic) GC action (13) would affect thymocyte development and its selection steps. Several papers underline the existence of non-genomic GC action, mostly describing rapid GC effects at higher hormone concentrations (14). These GC effects are mediated by membrane-bound receptors (15,16) or are initiated by physicochemical interactions with cellular mem-

Corresponding author: T. Berki; E-mail: timea.berki@aok.pte.hu

Transmitting editor: A. Falus

Received 3 July 2001, accepted 8 February 2002

464 GC receptor expression in thymocytes

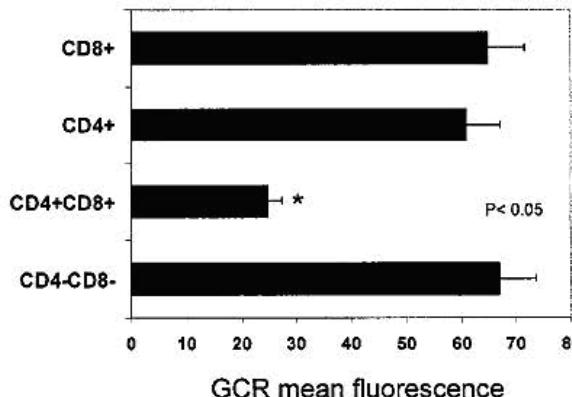


Fig. 1. Intracellular GCR expression in thymocyte subpopulations. Thymocytes of untreated BALB/c mice were stained with anti-CD4-PE and anti-CD8-CyChrome followed by anti-GCR-FITC after fixation and permeabilization. GCR fluorescence was measured on the electronically gated CD4-CD8- (DN), CD4+CD8+ (DP), CD4+ and CD8+ (SP) cells. Bars represent the GCR mean fluorescence \pm SEM of three thymi calculated as the difference between the GCR mean and isotype control mean fluorescence intensities from each gate.

branes (17). The aim of the present study was to detect the GCR expression of the thymocyte subpopulations to explore its role in the selection of double-positive (DP) thymocytes and explain the molecular basis of the different GC sensitivity of them. A monoclonal anti-GCR antibody (18) in triple- and four-color labeling was used to determine the receptor expression in different thymocyte subpopulations. The effect of GCR inhibition with the receptor antagonists RU-486 and RU-43044 (19,20) on thymocyte development and selection was also measured. We compared the effect of high- and low-dose dexamethasone (DX) treatment, and its combination with anti-CD3 treatment, on thymocyte composition and GCR expression.

Methods

Reagents

DX (Oradexon, OR) was purchased from NV Organon Oss Holland as ampoules containing 5 mg/ml. RU-486 and RU-43044 were generous gifts of J. Szekeres Barthó (Department of Microbiology, University of Pécs). FITC-conjugated Annexin V (PharMingen, San Diego, CA; cat no. 65874X) and propidium iodide (PI; Sigma, St Louis, MO; P 4170) were used for apoptosis detection. The following mAb were used for triple labeling experiments: phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse CD4 (L3T4; PharMingen; cat. no. 09005A) and CyChrome-conjugated rat anti-mouse CD8 (Ly-2; PharMingen; cat. no. 553034) mAb. Mouse anti-GCR mAb was produced in our laboratory (18) conjugated with FITC (21) and used for intracellular staining. FITC-conjugated anti-mouse CD69 (Serotec, Kidlington, UK) was used in four-color labeling experiments with the anti-CD4/CD8 mAb for cell surface staining and biotin-conjugated anti-GCR mAb followed by allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin (Becton Dickinson) for intracellular staining of the receptor

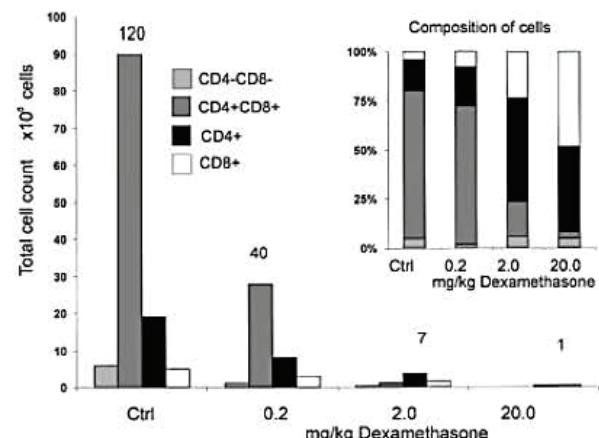


Fig. 2. Cellular composition and total thymocyte number in DX-treated mice. Thymocytes of BALB/c mice treated repeatedly with different concentrations of DX were stained with anti-CD4-PE and anti-CD8-CyChrome following the determination of total cell counts/thymus. Bars represent the total cell number of thymocyte subpopulations (large figure) and the composition of the thymocytes (insert) as a characteristic result of three separate experiments.

molecules. Hamster IgG monoclonal anti-mouse CD3 antibody (NIH 145.2C11) was used for *in vivo* treatments.

Treatment of animals and thymocyte preparation

Thymocytes were prepared as described by Compton and Cidlowski (22). In brief, 2- to 3-week-old (8–10 g body wt) BALB/c mice (Charles River) were injected i.p. with DX (20.0, 2.0 or 0.2 mg/kg body wt) suspended in 100 μ l PBS. RU-486 and RU-43044 stock solution (10 mg/ml) was dissolved in sesame oil and given i.p. (1 mg/kg body wt) in 100 μ l sesame oil. Anti-CD3 (145.2C11) mAb (5 or 50 μ g/animal) was injected i.v. in 100 μ l PBS. Control mice received PBS alone. Animals 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.

Apoptosis detection

Double staining for FITC-Annexin V (PharMingen) binding and for cellular DNA using propidium iodide (PI) was performed according to the method of Vermes *et al.* (23). Briefly, 5×10^5 thymocytes were resuspended in 100 μ l binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂). Then 5 μ l FITC-Annexin V (1 μ g/ml final volume) and 0.5 μ g PI were added to the cells, and the mixture was incubated at room temperature in dark for 15 min. Binding buffer (400 μ l) was added before flow cytometric analysis.

Detection of GCR expression in thymocytes

Thymocytes (1×10^6) in 100 μ l binding buffer (PBS/0.1% NaN₃/0.1% BSA) were labeled for the expression of CD4, CD8 and CD69 molecules for 30 min on ice. After two washing steps in PBS the cells were fixed with 4% paraformaldehyde

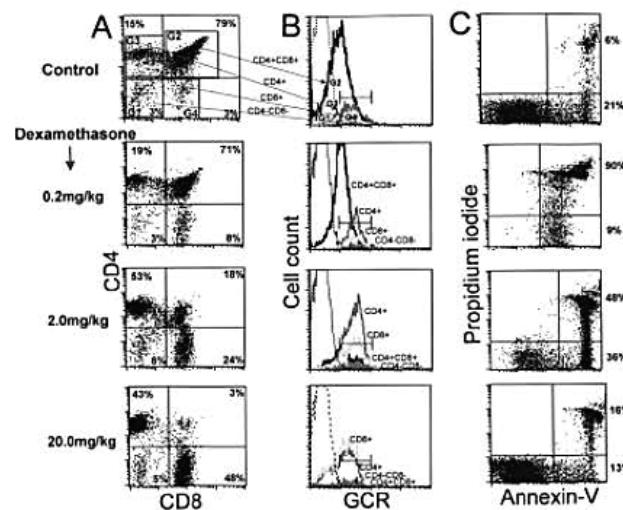


Fig. 3. GCR expression in thymocyte subpopulations (B) and their apoptosis (C) after repeated (4 days) low-, medium- and high-dose steroid treatment. Dot-plots in the first column (A) show the changes in the cellular composition of the thymus detected with CD4/CD8 staining. GCR expression was determined with the same triple-labeling method described in Fig. 1. Histogram plots (B) were created from the electronically gated thymocyte subpopulations and overlaid. The size of histograms indicates the cell number in the gate, while its position on the x-axis shows the fluorescence intensity (proportional with the GCR expression) of the cell population. The apoptosis of the thymocytes (C) was measured by the Annexin V/PI staining method. Percentages in the upper right quadrant indicate the late apoptotic cells and in the lower right quadrant indicate the early apoptotic cells.

(PFA)/PBS for 20 min, washed twice in PBS and stained in saponin buffer (0.1% saponin, 0.1% NaN_3 and 0.1% BSA) for intracellular GCR expression (18,24). After 30 min incubation on ice the cells were washed twice in saponin buffer, once in binding buffer and stored in 500 μl 0.1% PFA/PBS buffer until flow cytometric analysis.

Flow cytometric acquisition and analysis

The samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose CA) using CellQuest software. Thymocytes were gated on FSC/SSC plots according to their size and granularity. The gate determined by the untreated thymocyte sample was used for every further measurement. To determine the expression of GCR and CD69⁺ cells in double-negative (DN), DP and CD4 or CD8 single-positive (SP) populations, two-parameter dot-plots showing cell surface CD4/CD8 staining were first created from the previous gate. Thymocytes were gated according to their CD4 and/or CD8 fluorescence, and these populations were separately analyzed for GCR-FITC (or -APC) log fluorescence (FL1 or FL4 channel). The fluorescence intensity of GCR staining was compared in different thymocyte subpopulations by overlaying the FL1 histograms. The same thymocyte gates were used in four-color labeling experiments to create dot-plots, and determine simultaneously the CD69 and GCR expression in different cell populations.

Two-parameter dot-plots showing Annexin V/PI staining were created to determine the ratio of apoptotic cells in the

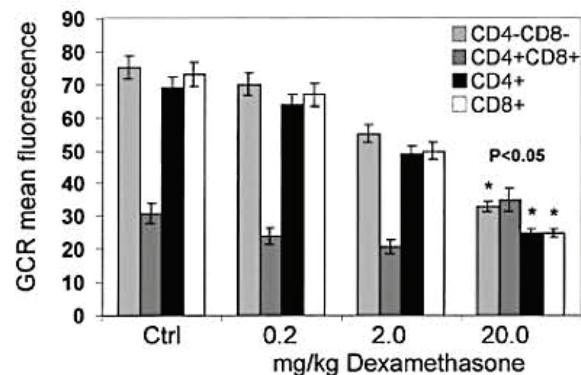


Fig. 4. Steroid-induced alterations in GCR expression of thymocyte subpopulations determined with the triple-labeling method. GCR mean fluorescence intensities (GCR mean minus isotype control mean) analyzed on histograms of Fig. 3 were compared and plotted. Bars represent the mean \pm SEM measured in three animals. *Significantly different from control mice as determined by Fischer's least significance test at $P < 0.05$.

thymus glands. DP cells are late apoptotic, while Annexin V SP cells are early apoptotic cells (23).

Results

GCR expression in thymocyte subpopulations

The mutual antagonism model of thymocyte selection postulates the necessity of GC action during the positive selection step of CD4⁺CD8⁺ (DP) cells. On the other hand, the observation that thymocyte development and selection is normal in GCR knockout mice in the absence of functional GCR seems to be contradictory. To gain more information on this question, we examined the GCR expression in mouse thymocyte subpopulations at different maturation stages. Our flow cytometric triple-labeling detection method (CD4/CD8/GCR) allowed us to determine the GCR levels separately in thymocyte subgroups without previous separation methods. We found that in young (1- to 4-week-old) BALB/c mice thymocytes at different maturation stages exhibit different GCR levels. DP (CD4⁺CD8⁺) cells showed the lowest GCR expression (fluorescence intensity) compared to the DN (CD4-CD8-) and mature SP (CD4⁺ or CD8⁺) cells (Fig. 1). Mature CD4⁺ cells expressed lower GCR levels than the CD8⁺ cells, which was consistent with our previous observation measured in human peripheral blood samples. DP cells with the GCR^{low} phenotype form the majority of thymocytes (78–81%) and these are the cells which undergo the selection steps during their maturation.

Effect of GC treatment

To examine the effect of physiological (low) and pharmacological (high) GC doses on the composition and GCR expression of thymocytes, BALB/c mice were injected every 24 h with high, medium and low doses of (20.0, 2.0 and 0.2 mg/body wt) DX for 4 days. After 24 h the thymic glands were removed and first total cell counts were determined. The repeated DX treatment caused a concentration-dependent

466 GC receptor expression in thymocytes

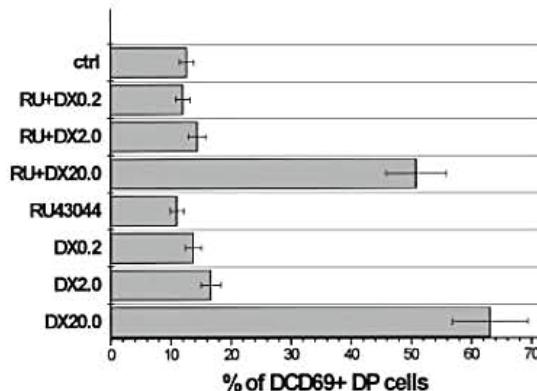


Fig. 5. CD69 expression of DP cells after DX and/or GCR antagonist (RU: RU43044 + DX0.2, 0.2 mg/kg DX; DX2.0, 2.0 mg/kg DX; DX20.0, 20.0 mg/kg DX).

decrease in total thymocyte cell number. Compared to the untreated controls, where the total cell count was $\sim 120 \times 10^6$ cells/thymus, 20.0 mg/kg DX caused >100-fold reduction in thymocyte cell number (Fig. 2). The composition and GCR expression of these cells also changed due to DX treatment determined by triple labeling with anti-CD4/CD8/GCR mAb. DP cells with the GCR^{low} phenotype were the most sensitive to DX treatment. A small DP and GC-resistant cell group remained in the thymus even after high-dose DX treatment in addition to the relatively resistant SP and DN cells (Fig. 3A). Among the mature SP cells, the CD8⁺ ones were the most resistant to GC treatment: the CD4:CD8 ratio decreased due to the increasing dose of DX treatments (Fig. 2, insert). The GCR level (GCR mean fluorescence) of the remaining CD4⁺ and CD8⁺ SP and DN GC-resistant cell groups decreased during the hormone treatment except that of the originally already GCR^{low} DP cells (Figs 3B and 4). More than 60% of these high-dose GC-resistant DP cells showed CD69 cell surface positivity, a marker of thymocyte positive selection. In control samples only 10–14% of the DP cells were CD69⁺ (Fig. 5), although the total DP cell number was 100-fold higher. This observation underlines that cells undergoing positive selection during engagement with TCR are resistant to the apoptotic effect of high-dose DX.

We also measured the early and late apoptotic cells in DX-treated thymi by Annexin V/PI staining. Repeated, low-dose (0.2 mg/kg) steroid treatment did not cause the total depletion of thymocytes, but the remaining cells (with unchanged FSC/SSC) showed an enhanced apoptosis (an early stage of apoptosis, before formation of apoptotic bodies). In contrast, repeated high-dose (20.0 mg/kg) DX treatment after 4 days depleted the sensitive cells (they already fall into apoptotic bodies and were removed) and the remaining GC-resistant cell population did not show a much higher apoptotic tendency than the untreated control (Fig. 3C). It is important to note that this small, resistant cell population consists mostly of SP mature cells (Fig. 3A).

Effect of GCR antagonists

The conventional GC action is mediated through intracellular (cytosolic) GCR, which can be blocked with receptor ant-

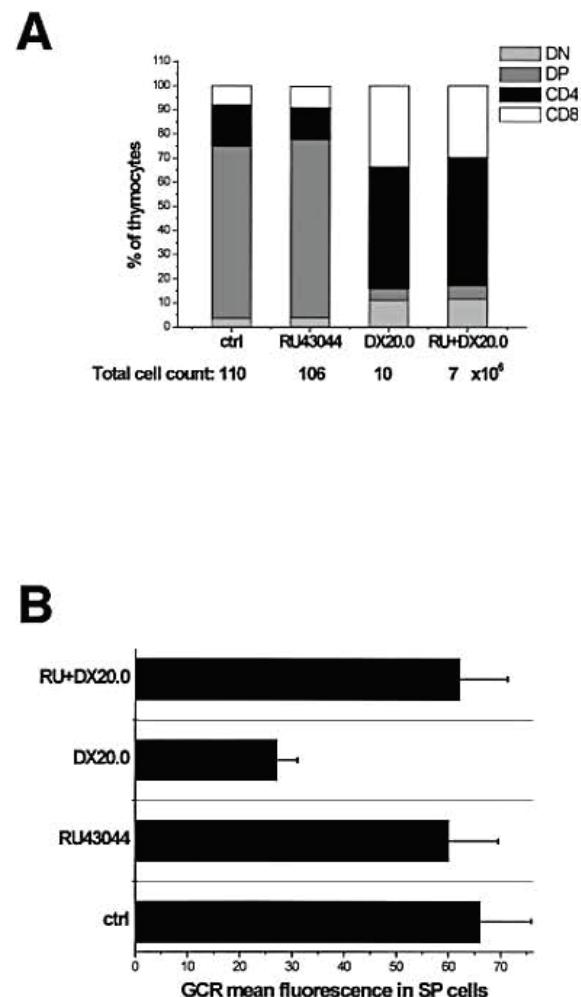


Fig. 6. Effect of GCR antagonist RU-43044 and combined RU-43044 and DX treatment on thymocyte composition and total cell counts (A). RU-43044 in itself did not affect the GCR expression of mature SP cells, but inhibited the GCR down-regulation induced by high-dose DX treatment (B) (DX20.0, 20.0 mg/kg DX; RU, RU-43044).

onists. This so-called genomic GC effect was inhibited in our experiments using a non-specific steroid receptor blocking agent RU-486 and also a specific GCR antagonist RU-43044 (25). To inhibit the receptor-mediated endogenous GC action in thymocyte development the animals were injected with 10 mg/kg RU-486 or RU-43044 every 12 h for 2 days with or without parallel DX (0.2, 2.0 or 20.0 mg/kg) treatment every 24 h. The composition and GCR expression of the thymocytes was examined in parallel with the apoptosis measurements 24 h later. The total cell number and the composition of the different thymocyte subpopulations remained unchanged after treatments with the receptor antagonists (Fig. 6A). RU-43044 pretreatment did not influence the apoptotic effect of DX: the alteration of total cell number, the CD69 expression of DP cells (Fig. 5) and the composition of the thymocytes induced by the GC treatment (Fig. 6A) was the same as without receptor antagonist pretreatment. The receptor antagonists by themselves did not change the receptor number in

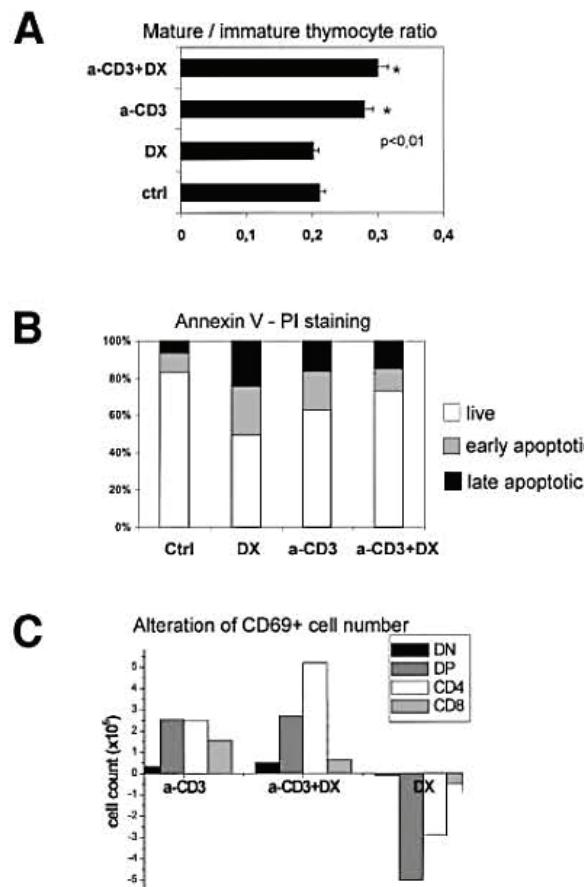


Fig. 7. Effect of single low-dose (2.0 µg/animal) DX or anti-CD3 (5 µg/animal) mAb (a-CD3) treatment and their combination (a-CD3 + DX) on the mature/immature thymocyte ratio (A), the apoptosis of the cells (B) and the CD69 expression of thymocyte subpopulations (C). Bars in (A) represent the mean + SEM measured in three separate thymus glands. Values that are significantly different from untreated control in (A) are indicated by asterisks as determined by Fischer's least significance test. Panel (B) shows one of the characteristic apoptotic cell compositions measured in three animals. Alteration of CD69 expression in different thymocyte subpopulations was determined by the four-color labeling method. Bars represent the differences between total CD69⁺ cell count in different subpopulations (DN, DP and SP) of the control and the treated (anti-CD3, anti-CD3 + DX and DX alone) samples. The results are the mean ± SEM of three independent experiments.

the thymocyte subpopulations. The only effect of the RU-43044 treatment was that it inhibited the DX-induced down-regulation of the GCR level in mature, SP thymocyte subpopulations (Fig. 6B).

Effect of anti-CD3 treatment

In vivo administration of high-dose anti-CD3 antibody induces thymocyte apoptosis. We examined the effect of low-dose *in vivo* anti-CD3 treatment alone and in combination with DX treatment on the composition and GCR expression of thymocyte subpopulations. Intravenous injection of low-dose anti-CD3 mAb (5 µg) alone resulted in an increased appearance of mature cells, while a single low-dose DX (2.0 µg) treatment had no effect on the thymocyte cell composition

measured 24 h following the treatment. However, the combination of the two previous treatments caused a synergistic effect with the enhanced appearance of mature SP cells (Fig. 7A). This tendency of the combined treatment was always characteristic in each experiment; however, the difference between this and the single anti-CD3 treatment was not significant. This can be explained by the continuous presence and effect of the endogenous GC produced by the thymic epithelial cells. At 24 h after the treatments, apoptosis measurements showed a higher apoptosis rate among the thymocytes of low-dose DX and anti-CD3 mAb-treated animals. At the same time the thymocytes of the combined anti-CD3 mAb and low-dose DX-treated animals showed a lower apoptosis rate (Fig. 7B). The higher level of mature cells with a low apoptosis ratio may reflect an enhanced maturation of the cells due to the combined effect of the anti-CD3 mAb and the external steroid dose. One of the hallmarks of this maturation process is the expression of CD69, which first appears on thymocytes as they begin positive selection. We measured increased CD69⁺ DP thymocyte and SP cell number in the thymus glands of anti-CD3 and anti-CD3 and DX-treated animals, while low-dose DX alone caused decreased CD69⁺ thymocyte cell numbers compared to the untreated controls (Fig. 7C). This observation may also underline the effect of combined treatment on positive selection of cells. High-dose (50 µg) anti-CD3 mAb treatment caused the depletion of both the DP and SP cell groups (data not shown). These treatments did not cause significant changes in the GCR number in the remaining cell populations (data not shown).

Discussion

The molecular events leading to positive and negative selection steps during thymocyte development are still unclear. Investigation of the role and signaling pathways of known thymic cytokines 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 (26–29). We have shown in a murine model that different thymocyte subpopulations express different amounts of GCR. DP cells undergoing the positive and negative selection steps through TCR-mediated signaling pathways express the lowest GCR number. This observation is inconsistent with the mutual antagonism model of thymocyte development described by Zacharchuk *et al.* (4), who suggest that a quantitative balance between TCR and GCR signaling would determine the survival and further development of DP cells. The presence of GC during TCR signaling is important in positive selection and development into SP mature cells (29,30). In our experimental conditions the synergistic effect of low-dose anti-CD3 treatment and low-dose GC treatment directing the thymocytes into the mature SP stage with a simultaneous decreased apoptosis (compared to anti-CD3- or DX-treated animals) underline the necessity of these two signaling pathways in positive selection (31,32). The hallmark of this maturation process, the CD69 expression of thymocytes (33,34), increased due to CD3 stimulation and the combined treatment with DX. The same dose of DX alone caused a decreased CD69⁺ cell number. *In vivo* anti-CD3 administration induces and mimics TCR signal-

468 GC receptor expression in thymocytes

ing without specific MHC-TCR interactions, resulting in an enhanced development of mature cells in the presence of GC action. The outcome of continuous interaction between the DP thymocytes and epithelial cells may result either in the induction of apoptosis due to local GC action (6,7) without appropriate TCR-MHC binding (negative selection) or rescue from cell death when the TCR-MHC association competes with the apoptotic signal of GC (9). Our observation that GC-resistant DP cells are mostly CD69⁺ (an early marker of positive selection) also underlines this hypothesis. These survivor DP cells move into the corticomedullary region of the thymus to interact with the MHC-self peptide of bone marrow-derived dendritic cells and macrophages without the influence of the locally produced GC. Here the high-affinity TCR-MHC interaction in the lack of GC results in apoptosis again. This hypothesis suggests the role of GCR signaling in the GC action in thymocyte selection steps.

On the other hand, other papers describe normal thymocyte development in GCR knockout mice (10) and in GCR dimerization-deficient animals (12). The GC-induced signaling pathways (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase activation and G-protein activation) in thymocytes precede the transcription steps required for thymocyte apoptosis (35,36). These observations exclude the role of GCR in thymocyte selection steps. However, the production of GC by thymic epithelial cells is a fact. What is the role of the hormone, what is the mechanism of its action? Our results with the selective detection method of GCR expression in different thymocyte subpopulations suggest that the most steroid-sensitive DP cells with the GCR^{low} phenotype are influenced by GC through another pathway. The other observation that *in vivo* GCR antagonist treatment by itself did not influence the thymocyte number, composition and selection also underlines this hypothesis. Therefore we think that the GC sensitivity of developing DP cells is not a receptor-mediated genomic effect. The non-genomic action of different steroid hormones was described in many experimental (12,15,35) and clinical conditions (13,14,16). It is based on clinical observations where high pharmacological GC doses are used to induce an immediate membrane-stabilizing effect, e.g. in allergic reactions (14). The fast GC effects in these situations exclude the long-lasting genomic action of the hormone. The direct contact of DP thymocytes with the GC-secreting epithelial cells may result in a high local hormone concentration and therefore a paracrine GC effect. This high GC concentration at the interacting surfaces of the two cells can result in a non-genomic GC action mediated through membrane-bound GCR or a direct membrane effect of the resulting hormone signaling pathways (35-37) other than the conventional GCR-mediated pathway (38). Other reports also underline this effect by describing the transcription-independent GC-induced thymocyte apoptosis (17,35). In this way our observation may solve the contradiction that appeared recently around the role of GC and its receptor in thymocyte selection and development.

Acknowledgements

This work was supported partly by grants from the Ministry of Education and by the Ministry of Health and Welfare (Hungary).

Abbreviations

APC	allophycocyanin
DN	double negative
DP	double positive
DX	dexamethasone
GC	glucocorticoid hormone
GCR	glucocorticoid hormone receptor
PE	phycoerythrin
PI	propidium iodine
SP	single positive

References

- Surh, C. D. and Sprent, J. 1994. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100.
- Jameson, S. C. and Bevan, M. J. 1998. T-cell selection. *Curr. Opin. Immunol.* 10:214.
- Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J. T. and Jenkinson, E. J. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 14:74.
- Zacharchuk, C. M., Mercep, M., Chakraborti, P., Simons, S. S. and Ashwell, J. D. 1990. Programmed T-lymphocyte death: cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 145:4037.
- Vacchio, M. S. and Ashwell, J. D. 1997. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J. Exp. Med.* 185:2033.
- Vacchio, M. S., Papadopoulos, V. and Ashwell, J. D. 1994. Steroid production in the thymus: implication for thymocyte selection. *J. Exp. Med.* 179:1835.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjövall, J., Jondal, M. and Okret, S. 1999. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J.* 13:893.
- Baus, E., Andris, F., Dubois, P. M., Urbain, J. and Leo, O. 1996. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 156: 4555.
- Vacchio, M. S., Lee, J. Y. and Ashwell, J. D. 1999. Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J. Immunol.* 163:1327.
- Purton, J. F., Boyd, R. L., Cole, T. J. and Godfrey, D. I. 2000. Intrathymic T-cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity* 13:179.
- Godfrey, D. I., Purton, J. F., Boyd, R. L. and Cole, T. J. 2000. Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol. Today* 21:606.
- Reichardt, H. M., Kaestner, K. H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. and Schütz, G. 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93:531.
- Wehling, M. 1997. Specific, nongenomic steroid action. *Annu. Rev. Physiol.* 59:365.
- Buttgereit, F., Brand, M. D. and Burmester, G. R. 1999. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem. Pharmacol.* 58:363.
- Orchinik, M., Murray, T. F. and Moore, F. L. 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252:1848.
- Gametchu, B., Watson, C. S. and Wu, S. 1993. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J.* 7:1283.
- Buttgereit, F., Krauss, S. and Brand, M. D. 1997. Methylprednisolone inhibits uptake of Ca⁺⁺ and Na⁺ into concanavalin A-stimulated thymocytes. *Biochem. J.* 326:329.
- Berki, T., Kumánovics, G., Kumánovics, A., Falus, A., Ujhelyi, E. and Németh, P. 1998. Production and flow-cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunol. Methods* 214: 19.

- 19 Philibert, D. and Teutsch, G. 1990. RU 486 development. *Science* 247:622.
- 20 Moguilewsky, M. and Philibert, D. 1984. RU 38486: potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by an impaired activation. *J. Steroid Biochem.* 20:270.
- 21 Johnstone, A. and Thorpe, R. 1988. Conjugation of fluorochromes to immunoglobulins. In *Immunochemistry in Practice*. 2nd edn, p. 264. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 22 Compton, M. M. and Cidlowski, J. A. 1986. Rapid *in vivo* effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 118:38.
- 23 Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184:39.
- 24 Prussin, C. and Metcalfe, D. D. 1995. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods* 188:117.
- 25 Szekeres-Bertho, J., Philibert, D. and Chaouat, G. 1990. Progesterone suppression of pregnancy lymphocytes is not mediated by glucocorticoid effect. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23:42.
- 26 Zilberman, Y., Yefenof, E., Oron, E., Dorogin, A. and Guy, R. 1996. T cell receptor-independent apoptosis of thymocyte clones induced by a thymic epithelial cell line is mediated by steroids. *Cell. Immunol.* 170:78.
- 27 Wilckens, T. and De Rijk, R. 1997. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* 18:418.
- 28 Oldenburg, N. B., Evans-Storm, R. B. and Cidlowski, J. A. 1997. *In vivo* resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in rat thymocytes with normal steroid receptor function *in vitro*. *Endocrinology* 138:810.
- 29 Ashwell, J. D., Lu, F. W. M. and Vacchio, M. S. 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 18:309.
- 30 Xue, Y., Murdjeva, M., Okret, S., McConkey, D., Kiuossis, D. and Jondal, M. 1996. Inhibition of I-A^d-, but not D^b-restricted peptide-induced thymic apoptosis by glucocorticoid receptor antagonist RU486 in T cell receptor transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 26:428.
- 31 Smith, C. A., Williams, G. T., Kingston, R., Jenkins, E. J. and Owen, J. J. T. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337:181.
- 32 Jondal, M., Okret, S. and McConkey, D. 1993. Killing of immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes *in vivo* by anti-CD3 or 5'-N(ethyl)-carboxamido-adenosine is blocked by glucocorticoid receptor antagonist RU-486. *Eur. J. Immunol.* 23:1246.
- 33 Hettmann, T. and Leiden, J. M. 2000. NF-kappa B is required for positive selection of CD8⁺ thymocytes. *J. Immunol.* 165:5004.
- 34 Nakayama, T., Kasprowicz, D. J., Yamashita, M., Schuber, L. A., Gillard, G., Kimura, M., Didierlaurent, A., Koseki, H. and Ziegler, S. F. 2002. The generation of mature, single-positive thymocytes *in vivo* is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J. Immunol.* 168:87.
- 35 Cifone, M. G., Migliorati, G., Parroni, M. R., Marchetti, C., Millimaggi, D., Santoni, A. and Riccardi, C. 1999. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase and caspases. *Blood* 93:2282.
- 36 Iwata, M., Iseki, R., Sato, K., Tozawa, Y. and Ohoka, Y. 1994. Involvement of protein kinase C ϵ in glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes. *Int. Immunol.* 6:431.
- 37 Yang, J., Serres, C., Philibert, D., Robel, P., Baulieu, E. E. and Jouannet, P. 1994. Progesterone and RU486: Opposing effects on human sperm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91:529.
- 38 Wyllie, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555.

dc_1343_16



Available online at www.sciencedirect.com



Immunology Letters 90 (2003) 97–102



www.elsevier.com/locate/

Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model

Ferenc Boldizsár*, László Pálinskás, Domokos Bartis, Péter Németh, Tímea Berki

Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

Received 7 July 2003; received in revised form 4 August 2003; accepted 5 August 2003

Abstract

Thymocyte maturation in the thymus is controlled by stromal and humoral components. Among the humoral regulators locally produced glucocorticoids (GCs) seem to have a key role in the positive selection of thymocytes. Our previous studies have shown that the administration of GCs or the stimulation through the CD3 complex can induce apoptosis of double positive (DP) cells, but the combined presence of these stimuli induces positive selection. In this work our aim was to investigate the effects of antigen exposure and synthetic GC hormone (dexamethasone, DX) administration on the selection processes of DP cells in TcR transgenic mice. In our model, AND—pigeon cytochrome c (PCC)-specific I-E^k (MHC-II) restricted V β 3, V α 11 TcR expressing transgenic mice were treated with PCC, with high or low dose DX, or with PCC and DX together, followed by the analysis of total thymocyte numbers, thymocyte composition, with regard to their CD69, V β 3 and Annexin V expression. The administration of PCC and/or DX for 2 days resulted in a decreased DP cell number and a significantly increased CD4 SP cell ratio. However, in both cases the total thymocyte numbers decreased. CD69 expression increased on both DP and CD4 SP cells after PCC and/or DX treatments. We found that after DX or combined treatment, the percentage of Annexin V positive cells increased. The ratio of V β 3 TcR bearing DP thymocytes showed no change after DX or PCC administrations alone, but it decreased significantly after combined treatment. MHC-II bound PCC peptides in the presence of GCs enhanced the maturation of V β 3+ DP cells into CD4 SP stage, therefore, the V β 3- cells remained mostly in the DP immature stage. These data indicate that both antigen and low dose GC alone are capable of inducing positive selection of DP cells, but together they gave a stronger effect in promoting positive selection. From these we conclude that GCs influence the maturation and selection processes of thymocytes.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Glucocorticoids; TcR transgenic mice; Positive selection

1. Introduction

T-cell development in the thymus proceeds through well defined stages [1]. The T-cell receptor (TcR) gene rearrangement processes are initiated in immature cells with double negative (DN: CD4-, CD8-, TcR-, CD3-) phenotype coupled with their intense proliferation. After successful TcR gene rearrangement, the developing cells reach the double positive (DP: CD4+, CD8+, $\alpha\beta$ TcR+, CD3+) stage of maturation, and are selected on the basis of the signal transducing function and antigen specificity of their TcR. DP thymocytes expressing non-functional TcR are deleted by “neglect”, thymocytes bearing high affinity TcR for antigens presented in the thymus are prone to die during negative selection, while the cells with functional, but

low affinity TcR survive (positive selection) [2,3]. These cells have been found to display CD69, a reliable cell surface marker associated with positive selection [4,5]. Finally, self-MHC-restricted, non-autoreactive CD4 or CD8 single positive (SP) cells are permitted to leave the thymus and home to peripheral lymphoid organs.

Thymocyte maturation, selection, proliferation and migration processes are regulated by micro-environmental factors, provided by the complex meshwork of thymic epithelial cells, dendritic cells and macrophages [6,7]. High density of MHC-I- and MHC-II-presented antigen fragments on the surface of thymic stromal cells are crucial for both positive and negative selection processes, in addition to a range of adhesion molecules. Transgenic mice expressing TcR for a specific antigen are useful models in the investigation of T-cell activation/apoptosis pathways initiated by TcR signaling [8] and also for studying thymic selection processes [9,10].

* Corresponding author. Tel.: +36-72-536-288; fax: +36-72-536-289.

E-mail address: fboldizsar@hotmail.com (F. Boldizsár).

Stromal cells do not only provide direct cell–cell interactions for thymocytes, but also produce a number of humoral regulatory molecules [11]. Among these, glucocorticosteroids (GCs) produced locally by the thymic epithelial cells [12,13] have a key role in the process of apoptosis [14,15] and selection events [16] of thymocytes. However, in glucocorticoid receptor (GCR)-deficient mice, normal thymocyte development was observed [17], suggesting that GCR is not essential for thymocyte maturation [18]. Apart from the classical genomic pathway of GC action [19], recently three possible non-genomic pathways were suggested [20]. These include the cytoplasmic interaction of GCR with other signaling pathway components (e.g. Src) [20], non-specific membrane changes [21] including ion transport across the plasma membrane [20], and membrane-receptor-mediated [20] pathways. DP cells are the most sensitive to GC-induced apoptosis, although they express the lowest cytoplasmic GCR levels [22,23], which also suggests the involvement of non-classical GC pathways.

GCs can modify TcR signals, thus prevent DP cells from apoptosis and induce positive selection, according to the “mutual antagonism” theory of thymocyte development [24,25]. To seek support for this proposed mechanism, previously we have shown in a Balb/c mouse model that anti-CD3 monoclonal antibody administration together with synthetic GC treatment can enhance positive selection of DP thymocytes [22].

The present work was aimed at elucidating how GCs can modify the selection processes of DP thymocytes in the presence or absence of antigen in a TcR transgenic mouse model, by following the alterations of the cellular composition, selection processes and apoptosis of thymocytes. The advantage of this approach is that it allows the clonotypic analysis and the follow up of cells exposed to selection-linked influences in their physiological tissue environment. Here we show further evidence for the active role of GCs during positive selection.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Three- to 4-week-old (10 g body weight) B10.Cg-TgN-(TcrAND)53Hed (AND) pigeon cytochrome *c*-specific I-E^k (MHC-II) restricted V β 3, V α 11 TcR transgenic mice produced by Kaye et al. [26] were used (a generous gift from Zsuzsanna Szondi from the University of Debrecen, Hungary). Mice were kept under conventional conditions, provided with pelleted rodent chow and acidified water. After different treatments animals were killed by rapid decapitation. The animal experiments were carried out in accordance with the regulations set out by the University's Committee on Animal Experimentations.

2.2. Chemicals and buffers

Pigeon cytochrome *c* (PCC) (10 mg/ml stock solution) was obtained from Sigma. Dexamethasone (DX) (Oradexon, Organon) (4 mg/ml stock solution) was purchased from N. V. Organon Oss Holland. Phosphate buffered saline (PBS) was used for washing and keeping cells until use. Cell surface labeling with monoclonal antibodies was carried out in binding buffer (0.1% NaN₃, 0.1% BSA containing PBS), Annexin V labeling was performed in Annexin binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂).

2.3. Monoclonal antibodies

We used the following monoclonal antibodies: phycoerythrin (PE) conjugated rat anti-mouse CD4 (clone # L3T4, BD Pharmingen, CA), CyChrome (CyC) conjugated rat anti-mouse CD8 (clone # Ly-2, BD Pharmingen, CA), FITC conjugated rat anti-mouse CD8 α (clone # IBL-3/25) [27], FITC conjugated hamster anti-mouse CD69 (clone # HI.2F3, Serotec), PE conjugated hamster anti-mouse V β 3 T-cell receptor (clone # KJ25, BD Pharmingen, CA). For early apoptosis detection, we used FITC conjugated Annexin V (BD Pharmingen, CA).

2.4. Treatment of animals and thymocyte preparation

AND mice were injected i.p. with 40 μ g PCC dissolved in 100 μ l PBS once per day for 2 days. Another group of mice received 10 mg/kg body weight (high dose) or 1 mg/kg body weight (low dose) DX i.p. dissolved in 100 μ l PBS once per day for 2 days. The third group of mice was treated with PCC and low dose DX for 2 days. Control mice received only PBS. Isolated thymi were homogenized in PBS with a glass/glass homogeniser. The suspension was filtered through nylon mesh, thymocytes were washed once in PBS and then the cell number of samples was set to 10⁶ except for Annexin V staining, where 2 \times 10⁵ cells were used.

2.5. Thymocyte fluorescent cell surface labeling

We used triple labeling technique for the simultaneous detection of cell surface CD4, CD8, CD69 or CD4, CD8, V β 3 or CD4, CD8, Annexin V molecules on thymocytes. Briefly, thymocyte samples (10⁶) were incubated with monoclonal antibody cocktails for 30 min in 100 μ l binding buffer on ice, then washed twice in PBS, and finally resuspended in 500 μ l 0.1% buffered PFA in PBS. For the detection of early apoptotic thymocytes Annexin V–FITC labeling was performed after cell surface CD4/CD8 staining. Briefly, samples were incubated with Annexin V–FITC for 15 min in 100 μ l Annexin binding buffer at room temperature, then diluted with 400 μ l Annexin binding buffer, which was immediately followed by flow cytometric measurement.

2.6. Flow cytometric acquisition and analysis

Samples were measured and analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), using the Cell Quest software. The thymocytes were gated according to their size and granularity on forward and side scatter dot plots. The gate set on untreated control thymocytes was used for the analysis of all samples. Thymocyte subpopulations resolved according to their CD4/CD8 fluorescence parameters were separately analyzed for CD69-FITC, V β 3-PE or Annexin V-FITC fluorescence in FL1 channel (for FITC) or FL2 channel (for PE). We used fluorescent histogram plots both for comparing the mean fluorescence intensities of different samples and calculating the ratio of positively stained cells.

2.7. 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.

3. Results

3.1. Changes of thymocyte number

DX is known to deplete a substantial fraction of T-cell precursors [28], therefore, we first determined the alteration of thymus size induced by the antigen and DX, by the total cell counts of thymi. The total cell numbers of control AND thymi was 69.4 ± 27.5 million (Table 1). Two days of PCC treatment reduced total cell numbers to 56.4 ± 22.6 , while 4 days PCC treatment to 38.4 ± 13.7 million. Both high and

Table 1
Average of total thymocyte number ($\times 10^6$) \pm S.D. after different treatments

	Thymocyte count \pm S.D. ($\times 10^6$)
Control	69.4 ± 27.6
PCC	56.4 ± 22.6
DX high	$5.6 \pm 5.1^*$
DX low	$12.9 \pm 4.2^*$
PCC + DX low	$4.3 \pm 3.5^*$

Each test groups consisted of three animals of a representative experiment.

* $P < 0.05$.

Table 2

Changes of DP and CD4 SP ratios after PCC, DX or combined treatment

	Control	PCC	DX high	DX low	PCC + DX low
DP% \pm S.D.	28.3 ± 6.7	$14 \pm 2.2^*$	$0.9 \pm 0.3^{**}$	$2.7 \pm 0.8^{**}$	$2.2 \pm 1.9^{**}$
CD4 SP% \pm S.D.	61 ± 3.2	65.7 ± 5.6	$78.5 \pm 13.6^*$	$87.6 \pm 1.9^*$	$74.2 \pm 1.1^*$

Values represent the average ratio (percent of thymocytes) \pm S.D. of DP and CD4 SP cells, calculated from the data of a group of three mice. Treatment modalities are indicated in the header.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.005$.

low dose DX alone or in combination with PCC caused a more extensive thymocyte depletion (5.7 ± 5.1 , 12.9 ± 4.2 and 4.3 ± 3.5 million cells, respectively; Table 1).

3.2. Alterations of thymus composition

The thymocyte subpopulations of AND TcR transgenic mice showed a striking difference compared to those of age matched Balb/c mice [26]. The overwhelming dominance of DP cells, present in Balb/c thymus (70–80% DP versus 10–15% CD4 SP) was replaced by high frequency of mature CD4 SP cells (20–30% DP versus 60–70% CD4 SP) in AND thymus, even without the administration of the antigen recognizable by the transgen-encoded TcR [26]. Untreated control thymi of AND mice contained $8 \pm 2.2\%$ DN, $28.3 \pm 6.7\%$ DP, $61 \pm 3.2\%$ CD4 SP and $2.6 \pm 2.3\%$ CD8 SP cells. Two days of PCC treatment resulted in a significant decrease of DP cell ratio to $14 \pm 2.2\%$ (Table 2). High or low dose DX or combined PCC + DX administration caused severe DP cell depletion ($0.9 \pm 0.3\%$, $2.7 \pm 0.8\%$ and $2.2 \pm 2\%$, respectively; Table 2). At the same time, a significant CD4 SP cell ratio increase could be noticed after high dose DX ($78.5 \pm 13.6\%$), low dose DX ($87.6 \pm 1.9\%$) and combined PCC + DX ($74.2 \pm 10.8\%$) treatments compared to untreated control ($61 \pm 3.2\%$; Table 2). On the other hand we could not detect any significant changes of the DN or CD8 SP thymocyte ratio after any form of treatments (data not shown).

Mature (CD4 SP)/immature (DP) thymocyte ratios were calculated from the CD4 SP and DP ratio (% of thymocyte) of each animals. In control AND thymi CD4 SP/DP ratio was 2.3 ± 0.7 (Fig. 1). PCC treatment caused only a twofold elevation in CD4 SP/DP ratio (4.7 ± 0.4 ; Fig. 1). High or low dose DX or combined PCC and DX administration increased the mature/immature thymocyte ratio significantly (91.4 ± 34.6 , 34.5 ± 11.2 and 50.4 ± 24.3 , respectively; Fig. 1).

3.3. Effect of antigen and/or DX exposure on the V β 3 TcR expression during thymocyte maturation

In normal (untreated) AND mice the ratio of lymphoid cells expressing transgenic V β 3 TcR increases throughout the thymocyte differentiation (DN: $76.8 \pm 3.4\%$, DP: $88.3 \pm 2\%$, CD4: $99.5 \pm 0.3\%$). PCC administration led to a decreased ratio of V β 3 expressing DN cells down to $51.8 \pm 13.5\%$, but their ratio in the DP stage remained

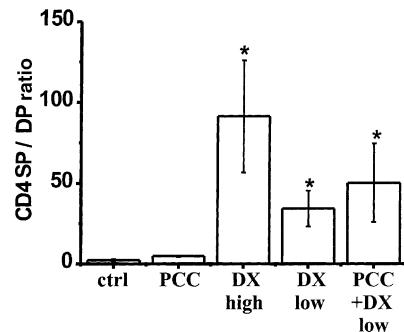


Fig. 1. Ratio of CD4 SP (mature)/DP (immature) thymocytes. Bars represent the average ratios \pm S.D. from the data of three animals. High or low dose DX and combined PCC/DX treatments caused significant increase in the mature/immature thymocyte ratio, while PCC alone had minor effect (* $P < 0.05$).

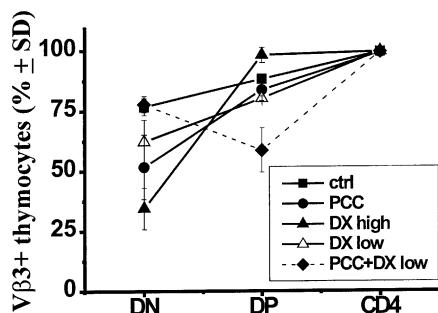


Fig. 2. V β 3 TcR expression of DN, DP and CD4 SP thymocytes. Each data point represents the average ratio of V β 3 positive thymocytes (% \pm S.D.) calculated from the data of three animals of each test groups. PCC, high or low dose of DX treatment caused significant depletion of the V β 3 TcR expressing DN cells, while combined PCC + DX treatment significantly depleted the V β 3 TcR expressing DP cells.

constant ($83.8 \pm 4.4\%$; Fig. 2). High dose DX caused a significant drop in the ratio of V β 3 positive DN thymocytes to $34.5 \pm 8.6\%$ and a slight, but statistically significant increase in the V β 3 positive DP ratio ($98.2 \pm 3.1\%$; Fig. 2). Low dose of DX reduced both the V β 3+ DN and DP thymocyte ratio significantly ($62.3 \pm 9.1\%$ and $80.2 \pm 1\%$, respectively; Fig. 2). Combined PCC and DX treatment caused significant loss of the V β 3 bearing DP thymocytes ($58.7 \pm 9.1\%$; Fig. 2). Neither treatment caused alteration in the relative size of V β 3 + CD4 SP population (Fig. 2).

3.4. CD69 expression by DP and CD4 SP cells

The appearance of CD69 on DP and CD4 SP cells is characteristic for the process of positive selection [4,5]. In control mice approximately 1% of DP cells expressed CD69. All treatments caused a significant increase of CD69 expressing DP cell percentage (PCC: $5.1 \pm 2\%$, high dose DX: $9.8 \pm 0.6\%$, low dose DX: $13.1 \pm 1.6\%$, PCC + DX: $19.4 \pm 9.7\%$, respectively; Fig. 3A). We found a significantly increased CD69 display after administration of PCC, low dose DX or combined PCC + DX by CD4 SP thymocytes

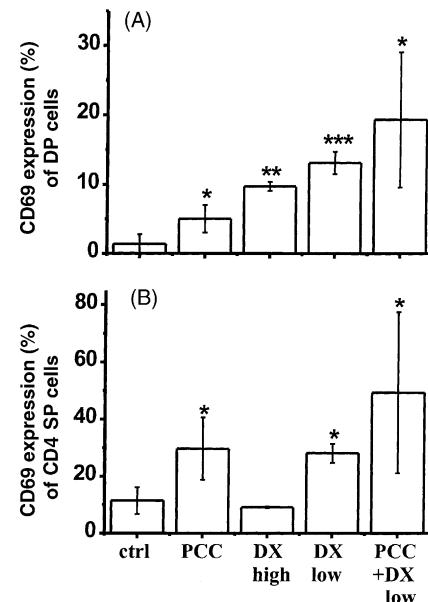


Fig. 3. CD69 expression of DP and CD4 SP cells. Bars represent the average percentage of CD69 positive thymocytes \pm S.D. from the data of three animals. (A) Treatment with the antigen (PCC) or DX increased the ratio of CD69 positive DP cells. Combined PCC + DX administration caused the highest elevation. (B) On CD4 SP cells only PCC, low DX and combined PCC + DX treatment caused significant CD69 expression increase (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$).

($29.7 \pm 10.9\%$, $28.2 \pm 3.4\%$ and $49.3 \pm 28.2\%$, respectively) compared to the untreated control values ($11.5 \pm 4.7\%$; Fig. 3B). On the other hand, treatment with high dose DX ($9.2 \pm 0.3\%$) did not alter significantly the CD69 expression of CD4 SP cells (Fig. 3B).

3.5. Occurrence of early apoptotic cells among various thymocyte subpopulations

Apoptosis is a major element in shaping the size of various lymphocyte populations during their development and function [29]. Appearance of Annexin V is an early apoptotic marker [30], indicating the translocation of phosphatidyl-serine molecules from the inner to the outer layer of the cell membrane [31]. In control AND mice $8.1 \pm 1.9\%$ of DP cells showed Annexin V positivity (Fig. 4A). PCC treatment did not cause significant change in the ratio of early apoptotic DP cells ($9.5 \pm 3.6\%$). Low dose DX or combined PCC + DX administration induced a significant increase in the percentage of Annexin V positive DP cells ($36.5 \pm 9.7\%$ and $48.9 \pm 16.7\%$, respectively). The highest frequency of Annexin V positive DP cells was observed upon high dose treatment with DX ($70 \pm 12.45\%$). In the CD4 SP population, the ratio of Annexin V positive cells increased significantly after low dose DX and PCC + DX treatments ($6.8 \pm 3.2\%$ and $20.6 \pm 16.6\%$, respectively) compared to control ($3.1 \pm 1\%$; Fig. 4B).

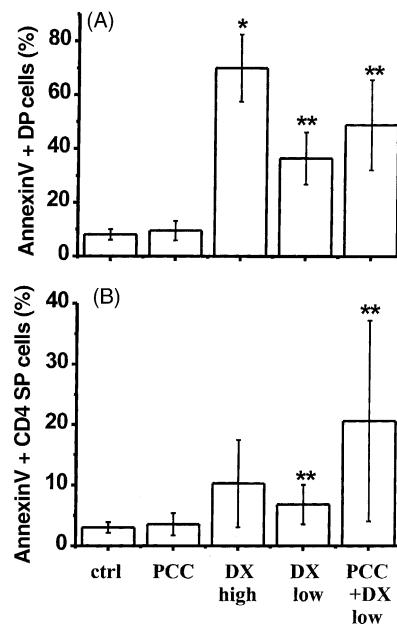


Fig. 4. The ratio of early apoptotic (Annexin V positive) DP and CD4 SP thymocytes. Bars show the average percent of Annexin V positive thymocytes \pm S.D. based on the data of three animals. (A) High dose DX treatment caused the most marked elevation in the ratio of early apoptotic DP cells, however low dose DX and PCC + DX treatments also increased significantly the ratio of Annexin V positive DP cells. (B) CD4 SP cells were less sensitive to high dose DX, but significant elevation of early apoptotic cell ratio was found after low dose DX and combined PCC + DX treatments (*P < 0.005, **P < 0.05).

4. Discussion

In the present study we investigated whether the thymocyte development in PCC-specific TcR transgenic mice can be diverted by treatments with their cognate antigen (PCC), synthetic GC(DX) and combined administration of those. The underlying rationale for choosing these manipulations was that the exact role of GCs in thymocyte maturation, described as the “mutual antagonism” theory, is still controversial and few *in vivo* evidence is available. The presence of antigen caused a significant drop of DP cell frequency, while the GC and combined treatments caused almost the total depletion of DP cells. These alterations were accompanied by a CD4 SP ratio increase indicating that part of the DP cells might have been induced to differentiate in this direction.

The effect of simultaneous TcR engagement and synthetic GC exposure was evaluated by following the PCC antigen-specific V β 3 transgenic TcR expressing thymocyte ratio after the different treatments. Interestingly, while the transgenic TcR-bearing DN thymocytes were sensitive to both DX and antigen administrations to some degree, DP cells with transgenic TcR were most sensitive to the combined treatment. The CD4 SP V β 3 TcR frequency remained unaltered after either form of treatments. T cells are typically able to recognize only processed antigens, presented as 8–20 amino-acid long peptide fragments associated

with MHC Class-I or -II molecules on the surface of antigen presenting cells [32]. After antigen administration in AND mice PCC fragments are presented with I-E^k on thymic macrophages and dendritic cells, leading to the negative selection of V β 3+ DP cells binding the presented antigen–MHC-II complexes at high affinity, thus reducing total thymocyte numbers. The thymocyte depleting characteristic of DX alone was also demonstrable, similarly to what we have found previously in Balb/c model [22]. However, this effect was not specific for V β 3+ DP cells, as Balb/c mice bear a random TcR repertoire.

Positive selection is characterized by the appearance of CD69 antigen on DP and SP cells [5], which feature was applied to monitor the positively selected DP and CD4 SP thymocytes. Both the antigen and DX by itself induced a substantial increase of CD69 expression by DP cells, and the combined PCC + DX treatment triggered the highest elevation. However, the CD69 expression of CD4 SP cells increased only after antigen exposure or low dose DX and combined treatments, but not in case of high dose DX administrations. It is very likely that high dose GC exposure caused only a transient CD69 expression increase of DP cells followed by subsequent apoptosis. This notion is also supported by observations on the up-regulation of CD69 and CD25 molecules on DP cells undergoing spontaneous or steroid-induced apoptosis in tissue culture [33]. On the contrary, antigen and low dose GC or their combination induced positive selection allowing a higher ratio of CD69 positive survivor CD4 SP cells. In Balb/c mice a similar CD69 expression induction was found after low dose of DX and anti-CD3 antibody treatments [22]. Both findings support the theory that GCs at low dose can enhance the positive selection of DP cells [24]. Since low dose GC and combined antigen and GC exposure caused the highest increase in mature/immature ratio, together with a significant elevation of CD69 expression, we infer that antigen and low dose GC together can induce positive selection of DP thymocytes.

The pro-apoptotic effects of DX are well documented [12,13]. Negatively selected DP cells also undergo apoptosis [34], so we determined the ratio of early apoptotic cells after exposure to antigen, DX and their combination. Similarly to previous observations in Balb/c thymocytes [20], DP cells were most sensitive to apoptosis induced by high dose of GC, although low dose GC and combined treatment also increased the Annexin V positive DP cell ratio. Taking into account the reduction of total cell numbers, we conclude that this thymocyte depletion event is probably mediated by apoptosis. We also found significantly increased ratio of Annexin V positive CD4 SP cells after low dose DX or combined antigen and GC treatment, which could be the result of the pro-apoptotic activity of GCs on activated T cells as described previously [35].

These data provide further evidence that GCs potently alter the thymocyte selection steps both in the presence and absence of antigen in AND transgenic model. This perturbation is manifested in a significant increase of the ratio

of positively selected cells ($V\beta 3$ TcR/CD4 SP), probably including those recognizing I-E^k bound PCC fragments with low affinity, paired with a considerably higher negative selection rate effecting the high affinity TcR bearing thymocytes. In this shift, the TcR signaling pathways altered by GCs may offer one possible explanation. Better understanding of the cross-talk between TcR and GC signaling pathways could explain the regulatory role of GCs on thymocyte maturation.

Acknowledgements

To Zsuzsanna Szondi (University of Debrecen, Hungary) for AND mice, to Péter Balogh for the IBL 3/25 monoclonal antibody and correction of the manuscript, to Pápa Lászlóné for the technical assistance. This work was partly supported by the National Research and Development Program (NKFP1/026/2001).

References

- [1] P. Res, H. Spits, Semin. Immunol. 11 (1999) 39–46.
- [2] E. Sebzda, S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M.F. Bachmann, P.S. Ohashi, Ann. Rev. Immunol. 17 (1999) 829–874.
- [3] T.K. Starr, S.C. Jameson, K.A. Hogquist, Ann. Rev. Immunol. 21 (2003) 139–176.
- [4] H.J. Schuurman, D. van Wichen, R.A. de Weger, Thymus 14 (1989) 43–53.
- [5] I. Yamashita, T. Nagata, T. Tada, T. Nakayama, Int. Immunol. 5 (1993) 1139–1150.
- [6] G. Anderson, N.C. Moore, J.J. Owen, E.J. Jenkinson, Ann. Rev. Immunol. 14 (1996) 73–99.
- [7] D. Amsen, A.M. Kruisbeek, Immunol. Rev. 165 (1998) 209–229.
- [8] N.J. Vasquez, L.P. Kane, S.M. Hedrick, Immunity 1 (1994) 45–56.
- [9] E.O. Matechak, N. Killeen, S.M. Hedrick, B.J. Fowlkes, Immunity 4 (1996) 337–347.
- [10] G.J. Kersh, S.M. Hedrick, J. Immunol. 154 (1995) 1057–1068.
- [11] S. Ben-Efraim, Y. Keisari, R. Ophir, M. Pecht, N. Trainin, Y. Burstein, Crit. Rev. Immunol. 19 (1999) 261–284.
- [12] M.S. Vacchio, V. Papadopoulos, J.D. Ashwell, J. Exp. Med. 179 (1994) 1835–1846.
- [13] A. Pazirandeh, Y. Xue, I. Rafter, J. Sjövall, M. Jondal, S. Okret, FASEB J. 13 (1999) 893–901.
- [14] J.A. Brewer, O. Kanagawa, B.P. Sleckman, L.J. Muglia, J. Immunol. 169 (2002) 1837–1843.
- [15] N. Tonomura, K. McLaughlin, L. Grimm, R.A. Goldsby, B.A. Osborne, J. Immunol. 170 (2003) 2469–2478.
- [16] M.S. Vacchio, J.D. Ashwell, J. Exp. Med. 185 (1997) 2033–2038.
- [17] J.F. Purton, R.L. Boyd, T.J. Cole, D.I. Godfrey, Immunity 13 (2000) 179–186.
- [18] D.I. Godfrey, J.F. Purton, R.L. Boyd, T.J. Cole, Immunol. Today 21 (2000) 606–611.
- [19] J.M. Berg, Cell 57 (1989) 1065–1068.
- [20] F. Buttigereit, A. Scheffold, Steroids 67 (2002) 529–534.
- [21] R.J. Borski, G.N. Hyde, S. Fruchtman, W.S. Tsai, Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 129 (2001) 533–541.
- [22] T. Berki, L. Pálinskás, F. Boldizsár, P. Németh, Int. Immunol. 14 (2002) 463–469.
- [23] G.J. Wiegers, M. Knoflach, G. Bock, H. Niederegger, H. Dietrich, A. Falus, R. Boyd, G. Wick, Eur. J. Immunol. 31 (2001) 2293–2301.
- [24] M.S. Vacchio, J.Y. Lee, J.D. Ashwell, J. Immunol. 163 (1999) 1327–1333.
- [25] G.L. Stephens, J.D. Ashwell, L. Ignatowitz, Int. Immunol. 15 (2003) 623–632.
- [26] J. Kaye, M.L. Hsu, M.E. Sauron, S.C. Jameson, N.R. Gascoigne, S.M. Hedrick, Nature 341 (1989) 746–749.
- [27] T. Czömpöly, Á. Lábadi, M. Balázs, P. Németh, P. Balogh, Biochem. Biophys. Res. Comm. 307 (2003) 791–796.
- [28] K.S. Barone, P.C. O'Brien, J.R. Stevenson, Cell. Immunol. 148 (1993) 226–233.
- [29] M. Jaattela, J. Tschopp Nat. Immunol. 4 (2003) 416–423.
- [30] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, J. Immunol. Meth. 184 (1995) 39–51.
- [31] J.S. Martin, C.P.M. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C.A.A. van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green, J. Exp. Med. 182 (1995) 1545–1556.
- [32] R.M. Zinkernagel, P.C. Doherty, Adv. Immunol. 27 (1979) 51–177.
- [33] H. Kishimoto, C.D. Surh, J. Sprent, J. Exp. Med. 181 (1995) 649–655.
- [34] E. Palmer, Nat. Rev. Immunol. 3 (2003) 383–391.
- [35] C. Cancedda, G. Filaci, F. Puppo, M. Ghio, P. Contini, F. Indiveri, Ann. N.Y. Acad. Sci. 966 (2002) 49–63.

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Immunobiology ■ (■■■) ■■■■■

Immunobiology

www.elsevier.de/imbio

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

Ferenc Boldizsár*, László Pálinkás, Tamás Czömpöly, Domokos Bartis, Péter Németh, Timea Berki

Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pecs, Szigeti ut 12., H-7643 Pecs, Hungary

Received 10 January 2006; received in revised form 15 June 2006; accepted 16 June 2006

Abstract

Several studies have shown that of the four major thymocyte subsets, the CD4/CD8 double positive (DP) thymocytes are the most sensitive to in vivo glucocorticoid hormone (GC)-induced apoptosis. Our aim was to analyse fine molecular differences among thymocyte subgroups that could underlie this phenomenon. Therefore, we characterised the glucocorticoid hormone receptor (GR) expression of thymocyte subgroups both at the mRNA and protein levels by real-time PCR and flow cytometry, and correlated these features to their apoptotic sensitivity. We also investigated the time-dependent effects of the GC agonist dexamethasone (DX) with or without GC antagonist (RU486) treatments on GR mRNA/protein expression. We also analysed the expression of two apoptosis-related gene products: dexamethasone-induced gene 2 (Dig2) mRNA and Bcl-2 protein. We found that DN thymocytes had the highest GR expression, followed by CD8 single positive (SP), CD4 SP and DP thymocytes in 4-week-old BALB/c mice, both at the mRNA and protein levels, respectively. In DP cells, the Dig2 expression was significantly higher, while the Bcl-2 expression was significantly lower than in DN, CD4 SP and CD8 SP thymocytes. Single high dose DX treatment caused time-dependent depletion of DP thymocytes due to their higher apoptosis rate, which could not be abolished with RU486 pretreatment. After a single high dose DX treatment, there was a transient, significant increase of the GR mRNA and protein level of unsorted thymocytes after 8 and 16 h, followed by a significant decrease at 24 h, respectively. The time-dependent GR expression changes after DX administration could not be inhibited by the GC antagonist RU486. Twenty-four hours after exposure to high dose DX the DN, CD4 SP and CD8 SP cells showed a significant decrease of GR mRNA and protein expression, whereas the DP thymocytes, showed no significant alteration of GR mRNA or protein expression. The kinetical analysis of GR expression and apoptotic marker changes upon single high dose GC analogue administration revealed a two-phase process in thymocytes: early events, within 4–8 h, include GR upregulation and early apoptosis induction, while the late events appear most prominently at 16–20 h, when the GR is already downregulated and apoptotic cell ratio reaches its peak, with marked DP cell depletion. The low GR, high Dig2 and low Bcl-2 expression, coupled with the absence of homologous downregulation of GR after exogenous GC analogue treatment, could contribute to the high GC sensitivity of DP thymocytes. The downregulated GR and Bcl-2 together with the upregulated Dig2 level in DP cells indicates the significance of intrathymic GC effects at this differentiation stage. Since GR expression changes and apoptotic events could not be

*Corresponding author. Tel.: +36 72 536 288; fax: +36 72 536 289.

E-mail address: fboldizsar@hotmail.com (F. Boldizsár).

completely inhibited by GC antagonist, we propose the involvement of non-genomic GR mechanisms in these processes.

© 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Double positive thymocytes; Glucocorticoid receptor; Glucocorticoid hormone autoregulation; Dig2; Bcl-2; Dexamethasone

Introduction

Glucocorticoid hormones (GCs) are regulators of differentiation, activation, survival and apoptosis of T lymphocytes (Reichardt, 2004). GCs exert their action either through genomic, or through other, non-genomic mechanisms described recently (Buttgereit and Schefold, 2002). The glucocorticoid receptor (GR) is a member of the steroid receptor superfamily (Evans, 1988), consisting of 3 domains: a hormone-binding domain, a highly conserved DNA-binding domain and the least conserved N-terminal domain (Hollenberg et al., 1985). The inactive form of GR is associated with Hsp-90 in the cytoplasm (Smith and Toft, 1993). Upon hormone binding, GR dissociates from Hsp-90 and translocates to the nucleus, where it forms dimers and functions as a transcription factor, binding to specific conserved palindromic DNA sequences (GGTACAnnnTGTTCT), called glucocorticoid response elements (GRE) (Berg, 1989). GREs were found in the promoter region of a broad array of genes from different species, for example the rat phenylethanolamine *N*-methyltransferase gene (Tai et al., 2002) and beta2-adrenergic receptor gene (Cornett et al., 1998), the murine tyrosine hydroxylase gene (Hagerty et al., 2001), the human sgk1 gene (Itani et al., 2002), parathyroid hormone (He et al., 2002) and PHEX gene (Hines et al., 2002), explaining the complex effects of GCs. Wang and colleagues (2003) performed oligonucleotide microarray analysis of ~10,000 genes from dexamethasone (DX) treated S49.A2, WEHI 7.2 cells and murine thymocytes, and identified dexamethasone-induced gene 2 (Dig2, GeneBank accession No.: AY260552), as a candidate anti-apoptotic gene. The overexpression of Dig2 in WEHI 7.2 mouse thymoma cell line resulted in GC resistance (Wang et al., 2003), suggesting that it possesses anti-apoptotic activity.

The mouse GR gene spans approximately 110 kilobases and its transcripts consist of 9 exons (Strähle et al., 1992). The N-terminal segment is encoded by exon 2, the DNA-binding zinc-fingers are encoded by exons 3 and 4, while the C-terminal hormone-binding site is encoded by the remaining 5 exons, respectively (Strähle et al., 1992). In humans there are two isoforms of the GR: alpha (777 AA residues) and beta (742 AA residues) differing at their carboxyl termini (Hollenberg et al., 1985); in mice, however, the beta isoform could not be identified (Otto et al., 1997).

The expression of GR is autoregulated by GCs in a cell- or tissue-dependent manner. Its repression was described in NIH 3T3 mouse fibroblasts (Hoeck et al., 1989), in human IM-9 lymphocytes and rat pancreatic acinar AR42J cells (Rosewicz et al., 1988), and in rat hepatoma cells (Okret et al., 1986), while upregulation was found in a human leukaemic T-cell line CEM-C7 (Eisen et al., 1988; Antakly et al., 1989; Ashraf et al., 1991). It was observed that homologous downregulation is an important factor in GC resistance (Schaaf and Cidlowski, 2003). Even though GREs were described in the promoter region of the GR gene, the mechanism of homologous downregulation has not been completely explored yet (Okret et al., 1986).

Thymus cortical epithelial cells are capable of local GC production (Pazirandeh et al., 1999), thus exerting paracrine action on thymocytes and possibly participating in the regulation of positive selection processes (Vacchio et al., 1994). Our previous results showed that CD4, CD8 double positive (DP) thymocytes are the most sensitive thymic subset in 4-week-old BALB/c mice to DX-induced apoptosis *in vivo* (Berki et al., 2002). On the other hand, others claimed that GCs are dispensable in thymocyte maturation (Godfrey et al., 2000), based on studies performed on GR -/- mice (Cole et al., 1995), where unaltered thymocyte differentiation was found (Purton et al., 2000). Nevertheless, the exact role of GC and its receptor in thymocyte development still remains controversial up to date (Jondal et al., 2004), complicated by other regulators of apoptosis, e.g. proteins of the Bcl-2 family (Reed, 1998), which, besides GCs, could also contribute to the different apoptotic sensitivity of thymocyte subpopulations.

To elucidate the background of different GC sensitivities of thymocytes, in the present study, we analysed the GR expression in thymocyte subpopulations at different maturation stages (DN, DP and CD4 or CD8 SP cells) at the mRNA and protein levels. In addition, we investigated the time-dependent effect of GC agonist (DX) and antagonist (RU486) treatment on GR expression using real-time PCR and flow cytometry and correlated them to the thymus composition and apoptotic marker changes. We also characterised two apoptosis-related gene products Dig2 and Bcl-2 levels in thymocyte subpopulations, respectively. Our data indicate that the effect of GCs in thymocytes is determined by a balance between the GR expression and Dig2 and Bcl-2 transcription in a differentiation-stage-dependent manner.

ARTICLE IN PRESS

F. Boldizsár et al. / Immunobiology ■ (■■■) ■■■-■■■

3

Materials and methods**Materials**

DX (5 mg/ml stock solution) (Oradexon, OR) was purchased from NV Organon Holland. RU486 (Mifepristone, Sigma) (10 mg/ml stock solution in ethanol) was used as GC inhibitor. The following monoclonal antibodies were used for cell surface labelling: phycoerythrin-conjugated rat anti-mouse CD4 (Clone L3T4, Pharmingen) and CyChrome-conjugated rat anti-mouse CD8 (Clone Ly 2, Pharmingen). Cytoplasmic GR labelling was performed with monoclonal anti-GR-FITC antibody (Clone 5.E4) (Berki et al., 1998). The Bcl-2 protein was detected with monoclonal anti-Bcl-2-FITC antibody (Clone 3F11) from BD Pharmingen. Annexin V (BD, Pharmingen, CA) labelling was performed in Annexin-binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂). Propidium iodide (PI) was purchased from Sigma. Thymi were homogenised in PBS (phosphate buffered saline). The cells were washed and labelled in PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃ staining buffer. For intracellular labelling, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde, and permeabilised in PBS containing 0.1% saponin, 0.1% BSA and 0.1% NaN₃. Total RNA isolation was performed with TriReagent (Sigma). DNA was digested with Deoxyribonuclease I (Sigma). For reverse transcription M-MLV RT, RNase H (-) point mutant enzyme (Promega), oligothymidylic acid (Sigma) and RNaseOut recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) were used. Real-time PCR was done with Light-Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche). All other fine chemicals were purchased from Sigma.

Treatment of mice and thymocyte preparation

One group of 3- to 4-week-old (10 g body weight) BALB/c mice (Charles River) were injected i.p. with high (10 mg/kg) dose DX dissolved in 100 µl PBS. Another group of animals received RU486 in 100 µl sesame oil i.p./animal for 2 days before the high dose DX administration. The third group of mice was injected with only 1 mg/kg body wt RU486 in 100 µl sesame oil i.p./animal. Control mice received only PBS. Mice from each group were killed by rapid decapitation after 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 or 24 h, their thymi were isolated and homogenised in PBS with a glass/glass homogeniser. The suspension was filtered through nylon mesh, the thymocytes were washed once in PBS and then the cell concentration of samples was set to 10⁷/ml.

Fluorescence labelling, flow cytometric acquisition and analysis

We used triple labelling technique for the simultaneous detection of cell surface CD4, CD8 and intracellular GR or Bcl-2 molecules on unsorted thymocytes. Briefly, thymocytes (1×10^6) in 100 µl staining buffer (PBS, 0.1% NaN₃, 0.1% BSA) were labelled for the expression of CD4 and CD8 molecules for 30 min on ice. After two washing steps in PBS, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 min, washed twice in PBS and stained in permeabilising saponin buffer (0.1% saponin, 0.1% NaN₃ and 0.1% BSA) for intracellular GR and Bcl-2 molecules (Berki et al., 1998). After 30 min incubation on ice, the cells were washed twice in saponin buffer, once in binding buffer and stored in 500 µl 0.1% PFA/PBS buffer until flow cytometric analysis.

The samples were analysed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose CA) using the CellQuest software. Thymocytes were gated on FSC/SSC plots according to their size and granularity. The gate determined by the untreated thymocyte sample was used for every further measurement. To determine the expression of GR and Bcl-2 cells in DN, DP, CD4 SP or CD8 SP populations, two-parameter dot-plots showing cell surface CD4/CD8 staining (FL2/FL3 channels) were first created from the previous gate. Thymocytes were gated according to their CD4 and/or CD8 fluorescence, and these populations were separately analysed for anti-GR-FITC or anti-Bcl-2-FITC log fluorescence (FL1 channel). The fluorescence intensity of GR or Bcl-2 staining was compared in different thymocyte subpopulations by overlaying the FL1 histograms.

Apoptosis detection

For apoptosis detection, double staining with Annexin V-FITC (PharMingen) and PI was performed according to the method of Vermes et al. (1995). Briefly, 5×10^5 thymocytes were resuspended in 100 µl binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂). Then 5 µl Annexin V FITC (1 µg/ml final volume) and 0.5 µg PI were added to the cells, and the mixture was incubated at room temperature in the dark for 15 min. Binding buffer (400 µl) was added before flow cytometric analysis. Two-parameter dot-plots showing Annexin V/PI staining (FL1/FL3 channels) were created to determine the ratio of apoptotic cells in the thymus glands. Annexin V/PI double positive cells are late apoptotic, while Annexin V single positive cells are early apoptotic cells (Vermes et al., 1995).

Cell sorting

10^7 thymocytes were labelled with anti-CD4-PE and anti-CD8-CyC mAbs for 30 min, in labelling buffer at room temperature, followed by washing and flow cytometric analysis performed on a Becton Dickinson FACS-Vantage SE instrument with Cell Quest Pro software. Sorting of thymocyte subpopulations was carried out according to their fluorescence in FL2 (PE-578 nm) and FL3 (CyChrome-670 nm) channels.

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was isolated from 10^7 unsorted or 2×10^5 sorted thymocytes with Tri Reagent according to the manufacturer's instructions. The final RNA precipitate was dissolved in DEPC water and the RNA content and purity was checked by UV spectrophotometry at 260 and 280 nm. To eliminate DNA contamination of RNA, the samples were digested with DNase before reverse transcription. Reverse transcription was performed from 1 µg RNA/sample in the presence of 0.5 µg oligo(dT)₁₆, M-MLV RT 1× reaction buffer, 1 mM of each dNTP, 40 units of RNase Inhibitor and 1 unit of M-MLV reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions, parallel with negative controls without the reverse transcriptase enzyme.

Real-time PCR

Real-time PCR reactions were performed on the cDNA samples with rat-mouse β -actin (forward: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC-3'; reverse: 5'-TCT GCG CAA GTT AGG TTT TGT C-3'; product size 825 bp; Tm: 57 °C), mouse GR (forward: 5'-TGG TGT GCT CCG ATG A-3'; reverse: 5'-AGG GTA GGG GTA AGC-3'; product size: 328 bp; Tm: 60 °C) and mouse Dig2 (forward: 5'-GACGTGTGTGTG-GAGCAAGGC-3'; reverse: 5'-CCGGTACTTAGCGTCAG-3'; product size: 197; Tm: 60 °C) primers on a Roche Light Cycler using LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit. Reaction mix (20 µl/capillary tube) contained 4 mM MgCl₂, 0.5 µM primers, 1 µl cDNA and 2 µl LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I in PCR grade sterile water. SYBR green fluorescence was detected during the 35 cycles long reactions at 87 °C in case of actin primers and at 82 °C in case of GR primers. The specificity of the reactions was verified by melting curve analysis (melting peak of rat-mouse actin at 89 °C; mouse GR at 84 °C) and agarose gel electrophoresis. Relative quantification was done using both primers in each sample. First reaction efficiencies were calculated, based on a dilution series of the strongest cDNA sample, then from the crossing point differences, the relative cDNA levels were

obtained. At the end, the relative GR mRNA values were corrected with relative actin mRNA values of the same sample.

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

Different GR mRNA expression of thymocyte subpopulations

Thymocyte subpopulations were sorted after anti-CD4-PE and anti-CD8-CyC labelling based on their FL2-FL3 fluorescence signals (Fig. 1A). The original thymocyte sample contained 3% DN, 76% DP, 15% CD4 SP and 6% CD8 SP cells (Fig. 1A). The cell sorting yielded 96%, 98%, 95% and 93% purity of DN (Fig. 1D), DP (Fig. 1C), CD4 SP (Fig. 1B) and CD8 SP (Fig. 1E) cells, respectively.

Real-time PCR analysis of cDNA from these sorted thymocytes revealed that there are significant differences in the GR mRNA expression among thymocyte subpopulations (Fig. 1F). DP cells had the lowest GR mRNA expression (0.7 ± 0.25 relative mRNA level), CD4 SP cells expressed 1.9 times (1.31 ± 0.66 relative mRNA level), CD8 SP cells expressed 2.7 times (1.90 ± 2.04) and DN thymocytes expressed 4 times higher (2.85 ± 2.53 relative mRNA level) GR mRNA levels than DP thymocytes, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1F).

GR and Bcl-2 protein expression of thymocyte subpopulations

Parallel to GR mRNA, GR protein level in thymocyte subpopulations was also determined after surface labelling of cells with anti-CD4-PE and anti-CD8-CyC antibodies, followed by intracellular labelling with anti-GR-FITC (Berki et al., 1998). Thymocyte subpopulations were gated based on their fluorescence signals in FL2 and FL3 channels and GR levels were analysed from each thymocyte gate (Berki et al., 1998). Flow cytometric detection of the GR also showed that DP thymocytes had significantly lower GR protein levels compared to DN, CD4 SP and CD8 SP cells ($P < 0.05$) (Fig. 2A). We found no significant difference in GR protein levels of DN, CD4 SP or CD8 SP populations (Fig. 2A). Interestingly, in CD4 SP thymocytes, there was a considerable discrepancy between GR protein and mRNA levels.

Bcl-2 is an anti-apoptotic protein inhibiting the function of caspases (Cory, 1995). Since DP cells show

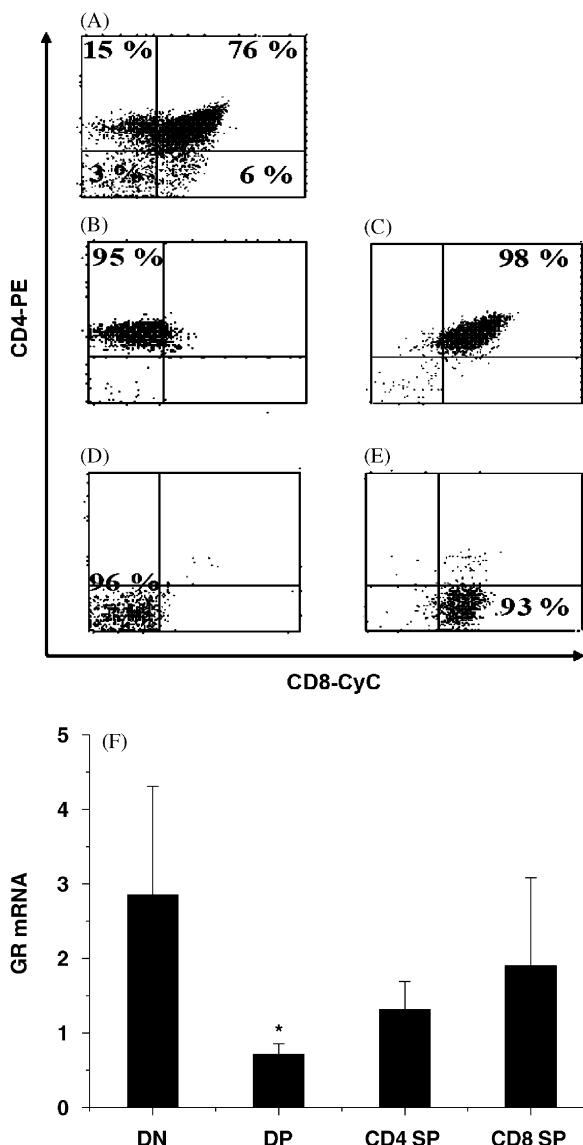


Fig. 1. GR mRNA expression in thymocyte subpopulations. (A)–(E) Thymocytes were sorted after cell surface anti-CD4-PE and anti-CD8-CyC labelling according to their FL2/FL3 fluorescence. (A) The two dimensional fluorescence dot plot shows the typical distribution of 3–4-week-old BALB/c thymocytes. (B) CD4 SP thymocytes after cell sorting. (C) DP thymocytes after cell sorting. (D) DN thymocytes after cell sorting. (E) CD8 SP thymocytes after cell sorting. Numbers on dot plots B–E indicate the purity of cell populations after cell sorting. (F) GR mRNA expression relative to β -actin of the different thymocyte subpopulations analysed by real-time PCR. Bars represent the mean \pm SD of relative GR mRNA levels in DN, DP, CD4 SP and CD8 SP thymocytes from 3 separate experiments. (* $P < 0.05$).

a considerably higher sensitivity to DX-induced apoptosis than DN, CD4 SP and CD8 SP cells, we compared the Bcl-2 level of thymocyte subpopulations by intracellular flow cytometry in the four major thymocyte subsets (Fig. 2B). We found that DP thymocytes

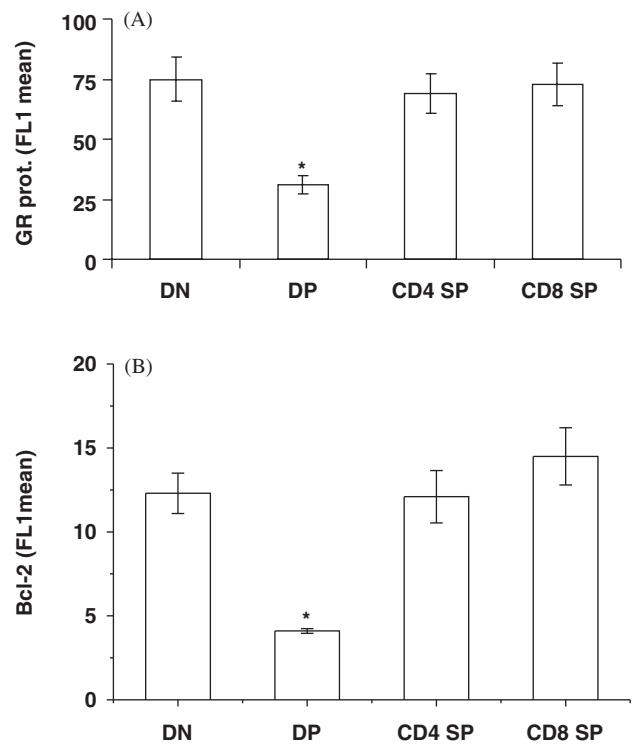


Fig. 2. GR and Bcl-2 expression in thymocyte subpopulations. (A) Cytoplasmic GR protein levels of thymocyte populations in untreated mice measured by triple colour flow cytometry. Bars represent GR mean fluorescence intensities \pm SD measured in FL1 channel from 3 separate experiments (* $P < 0.05$). (B) Bcl-2 expression of thymocyte subgroups in untreated mice measured by flow cytometry. Bars represent mean FL1 fluorescence intensities \pm SD from 3 separate experiments. Bcl-2 level of DP cells was significantly lower than that of other thymocyte subgroups (Student *t*-test, * $P < 0.01$).

expressed significantly lower levels of Bcl-2 (FL1 mean fluorescence: 4.1 ± 0.14), compared to DN, CD4 SP and CD8 SP thymocytes (FL1 mean fluorescence: 12.3 ± 1.2 , 12.1 ± 1.56 and 14.5 ± 1.7 , respectively) (Fig. 2B), in similar distribution to that of the GR.

Time-dependent changes in thymocyte numbers, subsets and apoptotic markers after a single high dose DX administration with or without RU486 pretreatment

Since it has been previously established by our group (Berki et al., 2002) and also others (Wiegers et al., 2001), that DP cells are the most sensitive to GC-induced depletion, we assessed the time-dependent thymocyte subpopulation changes after a single high dose DX and/or RU486 injection, using cell surface anti-CD4-PE and anti-CD8-CyC labelling of cells by flow cytometry. Flow cytometric statistics showed that in untreated control thymi, distribution of the four major subsets were 3.6% DN, 83.2% DP, 10% CD4 SP and 3.1%

CD8 SP, respectively (Fig. 3). After a single high dose DX treatment, DP cells reached gradually a marked depletion at 24 h (44.9%), with a relative dominance of the mature CD4 SP (36.1%) and CD8 SP (9.8%) cells (Fig. 3A). RU486 pretreatment could not revert the DX-induced thymus composition changes, at 24 h the DP cell ratio dropped to 35.4%, while the CD4 SP and CD8 SP cell ratio increased to 44 and 15.2%, respectively (Fig. 3B). RU486 treatment alone caused no significant changes in apoptotic markers (data not shown).

We also analysed the total cell count from each group of mice (Table 1). Twenty-four hours after a single high dose treatment, the thymus cell number decreased to 26.8 million from 142.8 million in control mice. There was a major drop in total cell numbers 8 h after the DX treatment (59.2 million), before this time point cell numbers were 142.8, 144, 148, 102.8 and 113.4 million, respectively. The cell-depleting effect of the DX could not be inhibited with RU486 pretreatment (19.5 million cells 24 h after treatment vs. 105.4 million in control mice), although it was a bit prolonged: the major decrease in cell numbers appeared 12 h after the DX treatment (105.4, 109.3, 108.4, 129, 104.4 and 120.8 million before 12 h vs. 38.4, 35.9, 25 and 19.5 million cells after 12 h, respectively). RU486 treatment alone caused no significant changes in thymic cell numbers (data not shown).

GC- and GC-analogue-induced DP cell depletion is mediated by apoptosis, so next we analysed the time-dependent changes in apoptosis with combined Annexin V/PI staining by flow cytometry. Annexin V single positive cells indicate the early apoptotic cells, while Annexin V/PI double positive cells represent the late apoptotic cells, respectively (Vermes et al., 1995). After a single high dose DX injection, thymocytes showed an initial 4-fold increase in Annexin V staining at 4 h, with a slight decrease at 8 h followed by a more marked 8-fold increase at 16–20 h (Fig. 4A). The late apoptotic cell ratio increase significantly 12 h after the DX treatment, and reached a maximum at 24 h when more than 40% of cells were already late apoptotic (Fig. 4A). When mice were pretreated with GC antagonist prior to the DX administration, the initial increase (at 4 h) in the percentage of Annexin V single positive cells was present, but the later (after 8 h) changes in Annexin V and Annexin V/PI positive cell percentage were abolished (Fig. 4B). RU486 treatment alone caused no significant changes in apoptotic markers (data not shown).

Time-dependent changes of thymocyte GR mRNA and protein level after a single high dose DX administration with or without RU486 pretreatment

As GCs themselves have been established to participate in the regulation of GR expression (Rosewicz et al.,

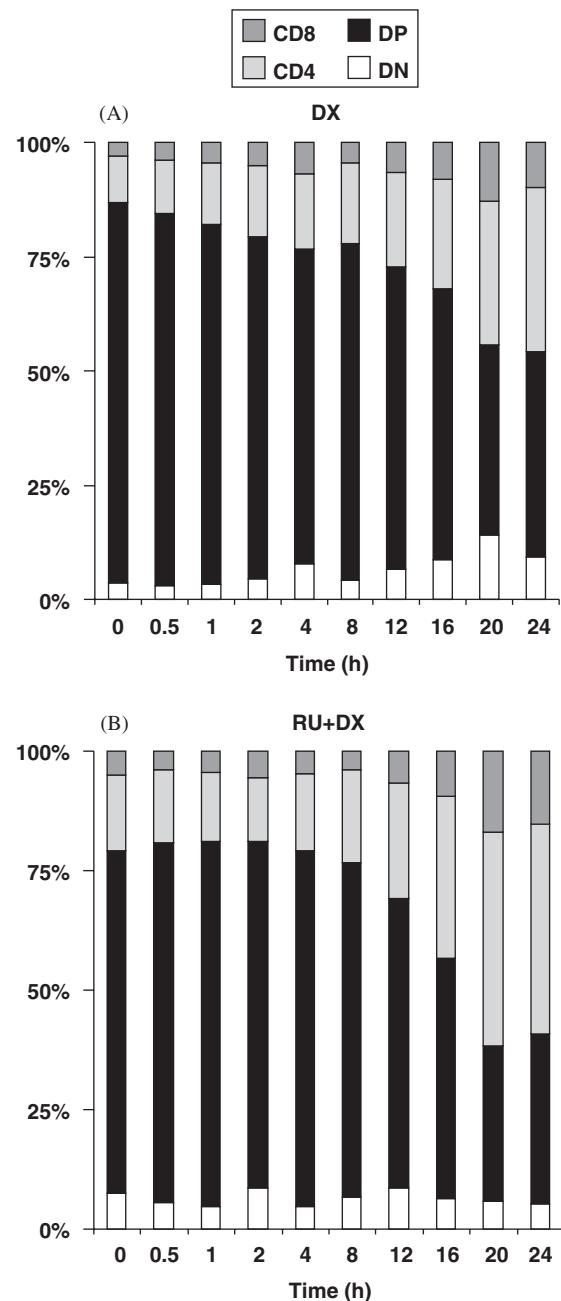


Fig. 3. Time-dependent changes in thymocyte composition after single high dose DX administration with (B) or without RU486 pretreatment (A). Thymocyte composition was analysed by flow cytometry after cell surface labelling with anti-CD4-PE and anti-CD8-CyC antibodies. Time elapsed after different treatments is indicated on the x-axis. White, black, light grey and dark grey segments of the bars represent DN, DP, CD4 SP and CD8 SP cell ratio, respectively. Diagrams show the data of a representative measurement from 3 separate experiments.

1988), we next characterised the time-course of GR mRNA levels 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h after exposure to DX with or without RU486 treatment from

Table 1. Time-dependent changes in total thymocyte numbers

Time	Ctrl	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
DX	142.8	144	148	102.8	113.4	59.2	37.8	31.6	29.4	26.8
RU+DX	105.4	109.3	108.4	129	104.4	120.8	38.4	35.9	25	19.5

Time elapsed after different treatments is indicated in the first row in hours (time). The second and third rows show thymocyte numbers (million cells) after DX or RU+DX treatments, respectively. Table shows the data of a representative measurement from 3 separate experiments.

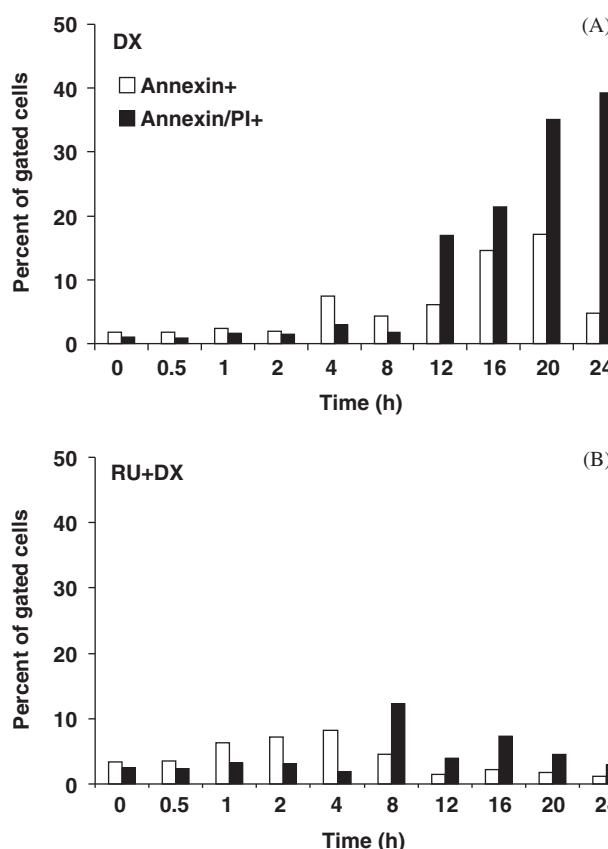


Fig. 4. Time-dependent changes in apoptosis markers after single high dose DX administration with (B) or without RU486 pretreatment (A). Annexin V/PI staining of cells was followed by flow cytometric detection. Annexin V single positive cells are early apoptotic (white bars), Annexin V/PI double positive cells are late apoptotic (black bars). Time elapsed after different treatments is indicated on the x-axis. Diagrams show the data of a representative measurement from 3 separate experiments.

unsorted thymocytes. After a single high dose DX injection, GR mRNA expression increased considerably at first, reaching a 4.5-fold peak at 4–8 h, followed by a gradual decrease until 24 h, when it dropped to only 50% of the control (Fig. 5A). Pretreatment with the GC antagonist RU486 could not inhibit the initial effect of DX (Fig. 5B), though there was a faster decline in GR mRNA levels after 4 h. The RU486 treatment alone did not cause any significant alteration in GR mRNA levels (Fig. 5C).

The GR protein levels were also determined by flow cytometry after intracellular GR staining at each time point. There was also a transient increase in the protein levels after DX treatment (3.5-fold, compared to control) ($P < 0.05$), reaching the peak at 16 h, followed by a decrease until 24 h (Fig. 5D). RU486 pretreatment slightly inhibited the DX-induced cytoplasmic GR protein level changes (Fig. 5E), and had no effect alone (Fig. 5F). The alterations of protein level followed the mRNA expression changes with an approximately 8 h delay (Fig. 5).

Effect of DX treatment on the GR mRNA and protein expression of thymocyte subpopulations

To delineate more specifically the likely candidate subpopulation for DX-mediated GR expression changes, next we analysed how the GR expression of different thymocyte subpopulations were affected by DX treatment. Twenty-four hours after a high dose DX treatment, we measured the GR mRNA levels of sorted thymocytes by real-time PCR. GR mRNA levels variously decreased by 81% in DN (Fig. 6A), 74% in CD4 SP (Fig. 6A) and 93% in CD8 SP (Fig. 6A) thymocytes, respectively. DP thymocytes showed unaltered GR mRNA expression after a single high dose DX treatment (Fig. 6A).

Parallel to determining the GR mRNA expression changes induced by DX, we also analysed the GR protein expression alterations. We found that GR protein levels decreased after a single high dose DX injection in DN, CD4 SP and CD8 SP thymocytes by 56%, 64% and 66%, respectively (Fig. 6B). In contrast, the GR protein level in DP cells remained unaltered after a single high dose DX treatment (Fig. 6B), similarly to its mRNA expression (Fig. 6A).

Dig2 expression of thymocyte subpopulations

Dig2 is a recently identified gene product induced by DX treatment in vitro (Wang et al., 2003). First we assessed whether Dig2 is also induced by DX treatment in vivo. Two hours after a single high dose DX administration, we found a 5-fold increase of Dig2 mRNA expression (relative Dig2 mRNA level: 2.05) compared to the untreated control (relative Dig2

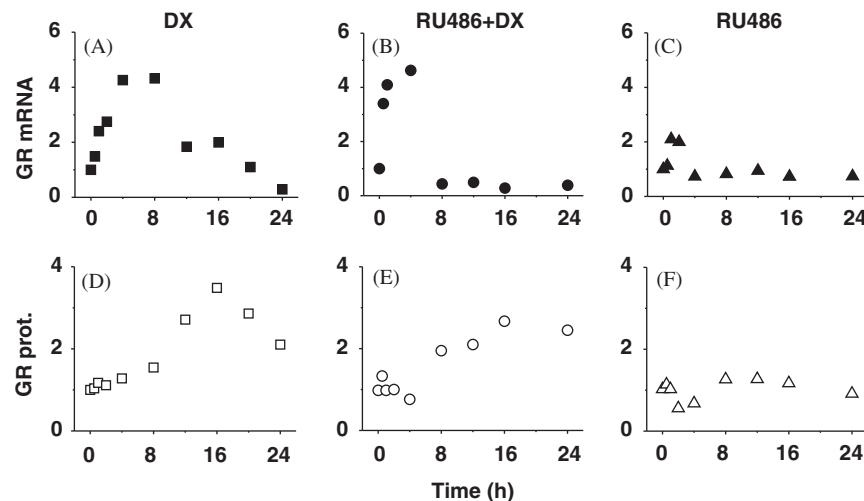


Fig. 5. Time course of GR mRNA and protein expression in thymocytes after a single high dose DX injection, either with (B, E) or without (A, D) previous RU486 pretreatment, or RU486 administration alone (C, F). Data points on diagrams A, B and C represent the relative GR mRNA level of thymocytes, while data points on diagrams D, E and F represent the ratio of FL1 mean fluorescence intensities compared to the untreated control measured by flow cytometry, respectively. Diagrams show the data of a representative measurement from 3 separate experiments.

mRNA level: 0.34) (Fig. 7A). This increased expression could not be inhibited by RU486 pretreatment (relative Dig2 mRNA level: 2.22) (Fig. 7A). RU486 treatment alone also increased Dig2 mRNA levels (relative Dig2 mRNA level: 0.8) in thymocytes (Fig. 7A).

Next, we analysed the Dig2 expression by various thymocyte subgroups from untreated mice. DP cells had significantly higher Dig2 mRNA level (relative Dig2 mRNA level: 0.3) than that in DN (relative Dig2 mRNA level: 0.12) or CD4 SP (relative Dig2 mRNA level: 0.05) and CD8 SP cells (relative Dig2 mRNA level: 0.15), respectively (Fig. 7B).

Discussion

The ability of GCs to induce apoptosis of both mature and immature T lymphocytes is well established (Ashwell et al., 2000). In a previous work, we reported different GC sensitivities of thymocyte subpopulations (Berki et al., 2002), which was in line with previous findings (Cohen, 1992) as well. However, the reason for different GC sensitivity of distinct thymocyte subsets is still unclear. Here, we analysed four possible underlying factors: GR level, GR expression regulation by GCs, Dig2 expression and Bcl-2 expression, together with functional data on apoptosis.

Differential GR expression by target cells could be an obvious explanation for their different GC sensitivity (Pazirandeh et al., 2002). In the present study, we establish that the GR mRNA and protein expression showed considerable differences between thymocyte subpopulations: the DP cells had the lowest GR

expression, followed by CD4 SP, CD8 SP and DN cells, at both the mRNA expression and the protein level. DP cells react most intensely to GC-induced apoptosis, despite their relatively low GR expression, suggesting that the GR level alone is unlikely to be the determining factor of GC sensitivity. Other signalling mechanisms could contribute to the GC sensitivity of cells (Ashwell et al., 2000), as well. Another possible explanation might be that apoptosis of DP thymocytes is mediated by non-genomic GC effects (Buttgereit and Scheffold, 2002), including the interaction of the cytoplasmic GR with other signalling molecules. This mechanism is also supported by our present results, that RU486 could not inhibit the GC-induced DP cell depletion and also could not revert the initial apoptotic events 4 h after the DX administration.

In an autoregulatory fashion, GCs participate in GR expression regulation (Rosewicz et al., 1988). A major goal of our present study was, to follow the time course of GC-induced *in vivo* GR expression changes in mouse thymocytes, together with the apoptotic markers Annexin V/PI and the changes in thymocyte subsets, respectively. We found an interesting bi-phasic pattern of expression change in GR mRNA and protein levels after a single high dose DX administration, with an initial increase until 4–8 (mRNA) and 16 (protein) h, followed by a gradual decrease until 24 h. Similar bi-phasic GR expression changes were described in rat hepatoma cells by Okret and colleagues (1986). The repression of GR expression 24 h after DX treatment was also in line with previous findings (Okret et al., 1986; Rosewicz et al., 1988; Hoeck et al., 1989). Similarly to the GR expression pattern change, the rise

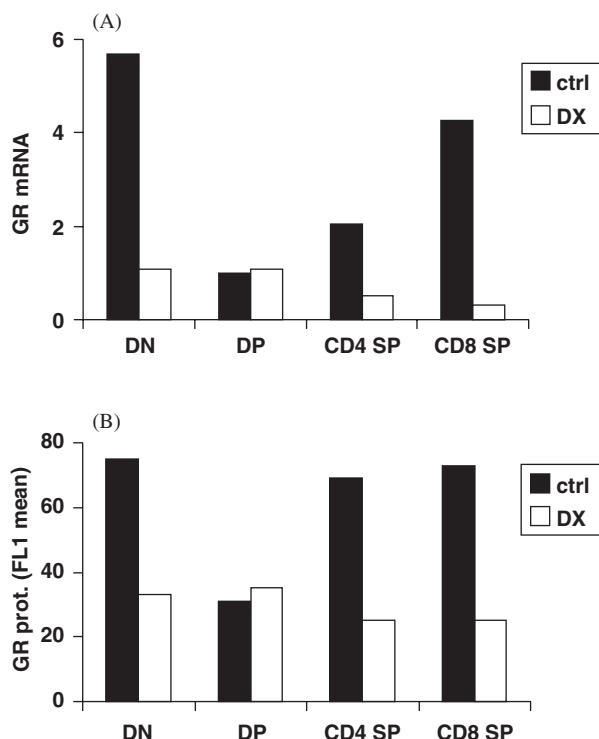


Fig. 6. GR mRNA (A) and protein level (B) changes in different thymocyte subpopulations 24 h after a single high dose DX treatment. (A) Bars represent the relative GR mRNA levels of sorted DN, DP, CD4 SP and CD8 SP thymocytes analysed by real-time PCR, respectively, from control (black) or high dose DX treated (white) mice. (B) GR protein level changes of thymocyte subpopulations measured by flow cytometry. Bars show the mean FL1 fluorescence of control, untreated (black) and high dose DX treated (white) thymocyte subpopulations. Diagrams show the data of a representative measurement from 3 separate experiments.

in early apoptotic cell ratio showed two peaks: an early increase at 4 h and a later, more marked increase at 16–20 h, followed by the increase in the late apoptotic cell ratio as well. Very similar in vivo apoptosis kinetics were found in C57BL/6 mice by Tosa and colleagues (2003). The GR expression changes and the apoptotic marker changes were coupled with the gradual depletion of DP cells. Based on the parallel GR expression changes and phosphatidyl-serin translocation to the outer lipid layer of the plasma membrane 4 h after GC analogue treatment, we propose that the GR could participate in the regulation of the early steps of apoptosis. Since these early (within 4 h) events were not antagonised by the GC antagonist pretreatment, the possibility of non-genomic GC action arises. Here, we found that apoptosis induced 12–24 h after a single high dose GC analogue exposure was inhibited by GC antagonist pretreatment, that is in line with previous findings by others (Erlacher et al., 2005).

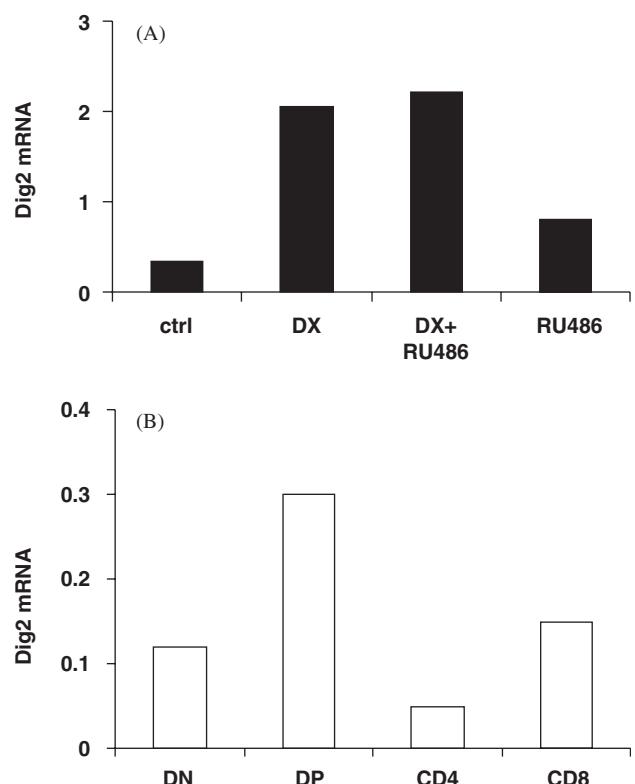


Fig. 7. Dig2 mRNA expression of thymocytes assessed by real time PCR. (A) Bars represent the relative Dig2 mRNA levels in control, DX, DX + RU486 and RU486 treated mice. (B) Bars show the relative Dig2 mRNA expression of thymocyte subpopulations in untreated mice. Diagrams show the data of a representative measurement from 3 separate experiments.

The GC–GR complex translocates to the nucleus within 30 min (Berki et al., 2000), where it acts as a transcription factor of different genes containing GREs (Berg, 1989). The GR gene itself also contains GRE (Okret et al., 1986), possibly contributing to the self-regulatory role of GCs on GR. The initial increase of GR mRNA (8 h) and protein (16 h) expression could be caused by direct binding of the GR–GC complex to the GR gene itself, thus inducing transcription. RU486 was shown to inhibit the translocation of GR to the nucleus in rat thymocytes (Lefebvre et al., 1988) and also to stabilise the association of GR to Hsp-90 in mouse lymphoma cells (Distelhorst and Howard, 1990). On the other hand, the translocation of GR to the nucleus was described upon RU486 treatment (Pariante et al., 2001; Schaaf and Cidlowski, 2003), and the partial GR agonistic effect of RU486 was also shown (Kraml et al., 2003; Nordeen et al., 1993), suggesting that the GR antagonist effect of RU486 is dependent on the experimental system and cell/tissue type, respectively. According to our data, RU486 could not block the early (within 8 h) transcriptional autoregulatory activity of the GR in mouse thymocytes, in vivo, but the exact

mechanism of this needs further elucidation. The GC-GR complex may interact with a number of other transcription factors, including NF- κ B (Ray and Prentoine, 1994), AP-1 (Periyasami and Sanchez, 2002; Yang-Yen et al., 1990), CREB (Imai et al., 1993), STAT-3 (Zhang et al., 1997) and STAT-5 (Stocklin et al., 1996), which could account for the effects of DX manifested later (24 h).

Twenty-four hours after a single high dose DX injection, DN, CD4 SP and CD8 SP cells showed a considerable decrease in GR mRNA expression, while DP cells did not change their GR mRNA expression, which was also reflected in the immunologically detectable amount of the receptor. It seems that in DP cells the homologous downregulation which plays a pivotal role in glucocorticoid resistance (Schaaf and Cidlowski, 2002) is impaired. GR downregulation seems to be a common mechanism in all thymocytes except DP cells. This lessened sensitivity to downregulate GR in DP cells could contribute to their higher sensitivity to GCs. Unaltered GR level could lead to increased hormone efficiency through persistent GC action. In addition, NF- κ B transrepression could also lead to GC resistance (Almawi and Melemedjian, 2002). Since the GR beta isoform is missing in mice, the inhibitory role of GR beta (Oakley et al., 1999) can be excluded in our experimental system.

A recent study identified Dig2 as a valuable reporter for GC exposure of thymocytes in vitro (Wang et al., 2003). We found that its expression could be increased by in vivo GC analogue treatment in BALB/c thymocytes, confirming the in vitro results of Wang and colleagues (2003). However, we could not inhibit GC action with RU486 pretreatment, although a successful in vitro inhibition on S49.A2 mouse thymoma cells was reported (Wang et al., 2003). Currently, the inefficiency of RU486 in in vivo systems cannot be excluded. According to Wang and colleagues (2003), overexpression of Dig2 in vitro had a protective effect against DX-induced apoptosis in WEHI 7.2 cells. Interestingly, we found a relatively high Dig2 expression in BALB/c DP thymocytes, despite their high DX sensitivity.

Amongst the various participants of the cellular responses leading to apoptosis, Bcl-2 protein family members are important regulators of apoptosis (Reed, 1998). Here we describe that not only GR, but the anti-apoptotic protein Bcl-2 is also expressed differentially in mouse thymocyte subsets. Not surprisingly, DP thymocytes, with the highest sensitivity for apoptosis, express the lowest levels of Bcl-2, which might contribute to their higher DX sensitivity. Similar expression pattern was described by Ma and colleagues (1995). In addition to regulating their own receptor and Dig2, GCs also participate in the regulation of the expression of Bcl-2 family members (Almawi et al., 2004). The pro-apoptotic protein Bad is upregulated in thymocytes

after 5 h DX treatment (Mok et al., 1999), while the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL is repressed by DX in leukaemic cells (Broome et al., 2002) and human osteosarcoma cells (Rogatsky et al., 1999).

Based on these results, we propose that the DX-induced effects on thymocytes in vivo appear in two waves: an early group of events (at 4–8 h) include GR upregulation and the appearance of a smaller proportion of early apoptotic cells coupled with the Dig2 gene induction, while the second group of events is induced later (at 16–24 h) when the GR is already downregulated and the number of early and late apoptotic cells increase dramatically, respectively. The low GR, the high Dig2 and low Bcl-2 expression, and the inefficient homologous downregulation upon GC analogue exposure in DP cells imply that DP cells are under endogenous GC influence, originating from GC-rich compartments of the thymus, within the cortical reticular epithelial domain (Vacchio et al., 1994). Therefore, prior to their exposure to DX, these cells had already downregulated their GR and Bcl-2 proteins, and increased their Dig2 expression, still within the thymic microenvironment, thereby exogenous GC administration could not induce further expression changes in these molecules at this differentiation stage. This humoral balancing mechanism unique for the DP cells might further shape the available T-cell repertoire during their thymic differentiation. It remains to be seen whether this steroid-driven mechanism can interact with the other signalling events operating at this crucial stage of T-cell development.

Acknowledgements

To Péter Balogh for critically reading the manuscript and useful advice. To Ms. Mária Pápa and Ms. Judit Melczer for technical assistance. To Attila Miseta and Péter Csutora (Department of Laboratory Medicine, University of Pécs) for helping us in using the Roche Light Cycler and Krisztián Kvell (Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs) for useful advice.

This work was supported by Hungarian National Health Foundation ETT32/KO/03.

References

- Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., 2002. Negative regulation of nuclear factor- κ B activation and function by glucocorticoids. *J. Mol. Endocrinol.* 28, 69–78.
- Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., Jaoude, M.M., 2004. On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Leukocyte Biol.* 76, 7–14.
- Antakly, T., Thompson, E.B., O'Donnell, D., 1989. Demonstration of the intracellular localization and up-regulation

ARTICLE IN PRESS

- of glucocorticoid receptor by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Cancer Res.* 49 (8 Suppl), 2230s–2234s.
- Ashraf, J., Kunapuli, S., Chilton, D., Thompson, E.B., 1991. Cortivazol mediated induction of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in wild-type and dexamethasone-resistant human leukemic (CEM) cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 561–568.
- Ashwell, J.D., Lu, F.W., Vacchio, M.S., 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 309–345.
- Berg, J.M., 1989. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57, 1065–1068.
- Berki, T., Kumanovics, G., Kumanovics, A., Falus, A., Ujhelyi, E., Nemeth, P., 1998. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunol. Methods* 214, 19–27.
- Berki, T., Grama, L., Németh, P., 2000. Detection of steroid induced glucocorticoid receptor (GR) translocation and expression with a FITC labeled monoclonal antibody. *Cytometry* 10 (Suppl.), 99.
- Berki, T., Pálinkás, L., Boldizsár, F., Németh, P., 2002. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int. Immunol.* 14, 463–469.
- Broome, H.E., Yu, A.L., Diccianni, M., Camitta, B.M., Monia, B.P., Dean, N.M., 2002. Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes T-cell acute lymphoblastic leukemia cells to chemotherapeutic drugs. *Leukemia Res.* 26, 311–316.
- Buttgereit, F., Scheffold, A., 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529–534.
- Cohen, J.J., 1992. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin. Immunol.* 4, 363–369.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., Schutz, G., 1995. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9, 1608–1621.
- Cornett, L.E., Hiller, F.C., Jacobi, S.E., Cao, W., McCraw, D.W., 1998. Identification of a glucocorticoid response element int he rat beta2-adrenergic receptor gene. *Mol. Pharmacol.* 54, 1016–1023.
- Cory, S., 1995. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 513–543.
- Distelhorst, C.W., Howard, K.J., 1990. Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone RU486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *J. Steroid Biochem.* 36, 25–31.
- Eisen, L.P., Elsasser, M.S., Harmon, J.M., 1988. Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 263, 12044–12048.
- Erlacher, M., Knoflach, M., Stec, I.E., Bock, G., Wick, G., Wiegers, G.J., 2005. TCR signaling inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in murine thymocytes depending on the stage of development. *Eur. J. Immunol.* 35 (11), 3287–3296.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Godfrey, D.I., Purton, J.F., Boyd, R.L., Cole, T.J., 2000. Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol. Today* 21, 606–611.
- Hagerty, T., Fernandez, E., Lynch, K., Wang, S.S., Morgan, W.W., Strong, R.T., 2001. Interaction of a glucocorticoid-responsive element with regulatory sequences in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurochem.* 78, 1379–1388.
- He, B., Tong, T.K., Hiou-Tim, F.F., Al-Akad, B., Kronenberg, H.M., Karapli, A.C., 2002. The murine gene encoding parathyroid hormone: genomic organisation, nucleotide sequence and transcriptional regulation. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 193–203.
- Hines, E.R., Collins, J.F., Jones, M.D., Serey, S.H., Ghishan, F.K., 2002. Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, 356–363.
- Hoeck, W., Rusconi, S., Groner, B., 1989. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptor in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 264, 14396–14402.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M., 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635–641.
- Imai, E., Miner, J.N., Mitchell, J.A., Yamamoto, K.R., Granner, D.K., 1993. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 268, 5353–5356.
- Itani, O.A., Liu, K.Z., Cornish, K.L., Campbell, J.R., Thomas, C.P., 2002. Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5' flanking region. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, 971–979.
- Jondal, M., Pazirandeh, A., Okret, S., 2004. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol.* 25, 595–600.
- Kraml, J., Kolinska, J., Sinkora, J., Zakostecka, M., Kadlecova, L., Hirsova, D., Noskova, L., 2003. Glucocorticoid agonistic and antagonistic effects of mifepristone and onapristone on thymocyte subset composition and CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in infant male rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 85–96.
- Lefebvre, P., Danze, P.M., Sablonniere, B., Richard, C., Formstecher, P., Dautrevaux, M., 1988. Association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90 K nonsteroid-binding component is stabilized by both steroid and nonsteroidal antiglucocorticoids in intact cells. *Biochemistry* 27, 9186–9194.
- Ma, A., Pena, J.C., Chang, B., Margosian, E., Davidson, L., Alt, F.W., Thompson, C.B., 1995. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4763–4767.
- Mok, C.L., Gil-Gomez, G., Williams, O., Coles, M., Taga, S., Tolaini, M., Norton, T., Kioussis, D., Brady, H.J., 1999. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J. Exp. Med.* 189, 575–586.

ARTICLE IN PRESS

- Nordeen, S.K., Boba, B.J., Moyer, M.L., 1993. Latent agonist activity of the steroid antagonist, RU486, is unmasked in cells treated with activators of protein kinase A. *Mol. Endocrinol.* 7, 731–742.
- Okley, R.H., Jewell, C.M., Yudt, M.R., Bofetado, D.M., Cidlowski, J.A., 1999. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 274, 27857–27866.
- Okret, S., Poellinger, L., Dong, Y., Gustafsson, J.A., 1986. Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5899–5903.
- Otto, C., Reichardt, H.M., Schutz, G., 1997. Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. *J. Biol. Chem.* 272, 26665–26668.
- Pariante, C.M., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Su, C., Miller, A.H., 2001. The steroid receptor antagonists RU40555 and RU486 activate glucocorticoid receptor translocation and are not excreted by the steroid hormones transporter in L929 cells. *J. Endocrinol.* 169, 309–320.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjövall, J., Jondal, M., Okret, S., 1999. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymus epithelial cells. *FASEB J.* 13, 893–901.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Prestegaard, T., Jondal, M., Okret, S., 2002. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *FASEB J.* 16, 727–729.
- Periyasami, S., Sanchez, E.R., 2002. Antagonism of glucocorticoid receptor transactivity and cell growth inhibition by transforming growth factor-beta through AP-1 mediated transcriptional repression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1571–1585.
- Purton, J.F., Boyd, R.L., Cole, T.J., Godfrey, D.I., 2000. Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity* 13, 179–186.
- Ray, A., Prefontaine, K.E., 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 752–756.
- Reed, J.C., 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225–3236.
- Reichardt, H.M., 2004. Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2797–2805.
- Rogatsky, I., Hittelman, A.B., Pearce, D., Garabedian, M.J., 1999. Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5036–5049.
- Rosewicz, S., McDonald, A.R., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., Miesfield, R.L., Logdson, C.D., 1988. Mechanism of glucocorticoid down-regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 263, 2581–2584.
- Schaaf, M.J., Cidlowski, J.A., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 37–48.
- Schaaf, M.J., Cidlowski, J.A., 2003. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1922–1934.
- Smith, D.F., Toft, D.O., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 7, 4–11.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., Groner, B., 1996. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726–728.
- Strähle, U., Schmidt, A., Kelsey, G., Stewart, A.F., Cole, T.J., Schmid, W., Schütz, G., 1992. At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6731–6735.
- Tai, T.C., Claycomb, R., Her, S., Bloom, A.K., Wong, D.L., 2002. Glucocorticoid responsiveness of the rat phenyletanamine N-methyltransferase gene. *Mol. Pharmacol.* 61, 1385–1392.
- Tosa, N., Murakami, M., Jia, W.Y., Yokoyama, M., Masunaga, T., Iwabuchi, C., Inobe, M., Iwabuchi, K., Miyazaki, T., Onoe, K., Iwata, M., Uede, T., 2003. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 15, 741–749.
- Vacchio, M.S., Papadopoulos, V., Ashwell, J.D., 1994. Steroid production in the thymus: implication for thymocyte selection. *J. Exp. Med.* 179, 1835–1846.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.
- Wang, Z., Malone, M.H., Thomenius, M.J., Zhong, F., Xu, F., Distelhorst, C.W., 2003. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J. Biol. Chem.* 278, 27053–27058.
- Wiegers, G.J., Knoflach, M., Bock, G., Niederegger, H., Dietrich, H., Falus, A., Boyd, R., Wick, G., 2001. CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 31, 2293–2301.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., Karin, M., 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205–1215.
- Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J.S., Fuentes, N.L., Fuller, G.M., 1997. Stat3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 30607–30610.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 98 (2006) 147–154

The Journal of
Steroid Biochemistry
&
Molecular Biology

www.elsevier.com/locate/jsbmb

Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells

Domokos Bartis*, Ferenc Boldizsár, Mariann Szabó, László Pálinkás,
Péter Németh, Timea Berki

University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Immunology and Biotechnology, Szigeti út 12, H-7643 Pécs, Hungary

Received 4 February 2005; received in revised form 12 July 2005; accepted 19 September 2005

Abstract

Steroid hormones are known to mediate rapid non-genomic effects occurring within minutes, besides the classical genomic actions mediated by the nuclear translocation of the cytoplasmic glucocorticoid receptor (GR). The glucocorticoid hormone (GC) has significant role in the regulation of T-cell activation; however, the cross-talk between the GC and T-cell receptor (TcR) signal transducing pathways are still to be elucidated. We examined the rapid effects of GC exposure on *in vitro* cultured human T-cells. Our results showed that Dexamethasone (DX), a GC analogue, when applied at high dose (10 μM), induced rapid (within 5 min) tyrosine-phosphorylation events in Jurkat cells. Short DX pre-treatment strongly inhibited the tyrosine-phosphorylation stimulated by CD3 cross-linking. Furthermore, we also investigated the phosphorylation status of ZAP-70, an important member of tyrosine kinase mediated signalling pathway of TcR-elicited T-cell activation. Here, we demonstrate that high dose DX induced a rapid ZAP-70 tyrosine-phosphorylation in Jurkat T-cells. DX-induced ZAP-70 phosphorylation could be inhibited by RU486 (GR antagonist), suggesting that this process was GR mediated. DX-induced ZAP-70 phosphorylation did not occur in the absence of active p56-lck as examined in the p56-lck kinase-deficient Jurkat cell line JCaM1.6. Our results show that DX, at a high dose, can rapidly influence the initial tyrosine-phosphorylation events of the CD3 signalling pathway in Jurkat cells, thereby modifying TcR-derived signals. Lck and ZAP-70 represent an important molecular link between the TcR and GC signalling pathways.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Glucocorticoid hormone; Glucocorticoid hormone receptor; Non-genomic effects; ZAP-70; Tyrosine-phosphorylation; Jurkat cells

1. Introduction

Glucocorticoid hormones (GCs) participate in the regulation of differentiation, activation, survival and apoptosis of T lymphocytes [1]. GCs modulate the immune response by inhibiting the cellular (Th1) branch of the immune response while promoting humoral (Th2) response [2]. For these reasons GCs have been used as immunosuppressive therapeutic agents for 50 years in autoimmune and other inflammatory diseases, organ transplantations and haematological malignancies [2,3].

The major physiological source of GCs is the adrenal glands [4], but extraadrenal GC production was also found in the thymus [5], the chicken bursa [6] and the intestinal

epithelial cells [7]. Depending on other simultaneous signalling processes, extraadrenally produced GCs can possess local immunomodulatory effects, eliciting both stimulatory and inhibitory responses [7,8].

In addition to a number of other GC-sensitive tissues like lung, spleen, brain, liver, kidney, heart, adrenal, testis [11], muscle, different cell lines and tumors [12], mature peripheral T-cells [9] and thymocytes [10] also express glucocorticoid receptor (GR). The inactive form of GR is associated with Hsp-90 in the cytoplasm [13]. Upon ligand binding, GR dissociates from Hsp-90 and translocates to the nucleus, where it forms dimers and functions as transcription factor, binding to specific conserved palindromic DNA sequences (GGTA-CAnnnTGTTCT), called glucocorticoid response elements (GRE) [14]. The receptor translocation to the nucleus occurs within 30 min in HepG2 cell line [15], and subsequent gene transcription effects develop within hours.

* Corresponding author. Tel.: +36 72 536 288; fax: +36 72 536 289.

E-mail address: dominicus@freemail.hu (D. Bartis).

Accumulating evidence show that besides the classical genomic GC action, other, non-genomic mechanisms also exist. The recent opinion is that rapid GC effects might be mediated through three different mechanisms: (1) specific cytoplasmic protein–protein interactions involving the cytoplasmic GR (cGR), (2) specific signalling mechanisms through the membrane-bound GR and (3) non-specific physico-chemical GC interactions with the cell membrane [16]. Croxtall et al. observed that epidermal growth factor (EGF)-stimulated cPLA2 (cytosolic PLA2) activation with subsequent arachidonic acid release could be inhibited by Dexamethasone [17]. This effect was considered to be a glucocorticoid receptor-dependent (RU486-sensitive), but transcription-independent (actinomycin-insensitive) mechanism [17]. Hitherto all steroid hormone classes (glucocorticoids, progesterone, estrogens, androgens, neurosteroids, mineralocorticoids, Vitamins D3, T3 and T4) have been shown to mediate rapid, non-genomic effects [18]; however, the exact signalling mechanisms are still to be identified.

It has been shown that GCs inhibit the early steps of TcR signalling events such as the calcium flux, inositol phosphate production and phospholipase-C γ 1 tyrosine-phosphorylation following TcR ligation in murine T-cell hybrids [19]. GCs also inhibit the phosphorylation of some early T-cell signalling molecules such as the T-cell receptor (TcR) zeta chain and the ZAP-70 kinase in T-cell hybridomas and murine thymocytes [20]. The authors proposed a non-genomic GC signalling mechanism through the cytoplasmic GR which affected the membrane compartmentalisation of src-family kinases [20]. They also found that GC hormone treatment altered the lipid composition of lipid rafts of a murine T-cell hybridoma, thereby altering the raft association and palmitoylation of key signalling molecules [21]. However, the GC effects described in the above works [19–21] needed hours to manifest. Only few data are available about the signalling mechanisms induced by rapid steroid effects which occur within minutes. Particularly, the modulatory effects of steroid hormones on the phosphorylation status of key signalling elements are sparse, therefore we set out to investigate this process in more depth.

It has been shown that the Vitamin D receptor mediates rapid src tyrosine-phosphorylation and consequent MAP-kinase activation in muscle cells following ligand binding [22,23]. Boonyaratatanakornkit et al. found that the progesterone receptor interacts with the src-family tyrosine kinases via their SH3 domains and stimulates the activation of the Ras/Raf-1/MAP-kinase pathway [24].

In this paper, we report that Dexamethasone (DX), a glucocorticoid hormone analogue, rapidly diminishes the tyrosine-phosphorylation events caused by CD3 cross-linking. We assayed the phosphorylation status of ZAP-70, a key T-cell signalling protein and found that high dose DX rapidly induced its phosphorylation on tyrosine residues. The DX-induced phosphorylation process proved to be sensitive to the GR antagonist RU486 and was absent in p56-lck-deficient Jurkat cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

We used Jurkat cells (human acute T-cell leukemia) and its p56-lck-deficient subclone (JCaM1.6), both a generous gift from E. Monostori (Biological Research Centre, Szeged, Hungary). Cells were cultured in humidified atmosphere, containing 5% CO₂ at 37 °C, in RPMI medium supplemented with 5 and 10% fetal calf serum (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), respectively.

2.2. Chemicals and buffers

All fine chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) otherwise indicated. Dexamethasone was used as glucocorticoid hormone agonist and RU486 (Mifepristone) was used as glucocorticoid antagonist, both dissolved in DMSO at a concentration of 10 mM. For the Western blot experiments Jurkat cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 10% glycerol and 1% Triton X-100). Aprotinin, leupeptin (Fluka, Buchs, Switzerland) (10 µg/ml), PMSF (2 mM) and sodium orthovanadate (2 mM) were freshly added to the lysis buffer. The cell lysates were separated by SDS-PAGE after adding equal amount of 2× sample buffer (125 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.006% Bromo-phenol-blue and 10% mercaptoethanol) or subjected to immunoprecipitation. The gels were blotted overnight to nitrocellulose membranes using a Trans-Blot cell blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). To saturate non-specific binding sites, the blots were soaked in blocking buffer (1% bovine serum albumin, 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20, pH 7.4). For washing the blots washing buffer was used (10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween-20, pH 7.4). Western blot visualisation was performed by enhanced chemiluminescence as described in the manufacturer's instructions (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) or, in case of anti-ZAP-70 immunoblots with bromo-chloro-indolyl-phosphate/nitro-blue tetrazolium (BCIP/NBT), in a 100 mM sodium chloride, 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 9.5, buffer. For stripping the blots we used Restore Stripping Buffer (Pierce).

2.3. Antibodies

We used mouse monoclonal anti-human CD3 antibody (clone: UCHT-1, 1 mg/ml stock solution in PBS) for cell activation. Immunoprecipitation was performed with purified rabbit polyclonal anti-ZAP-70 antibody (kindly provided by E. Monostori, Biological Research Centre, Szeged, Hungary). The tyrosine-phosphorylation pattern was examined by using biotinylated monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (clone: PY20, Transduction Laboratories, Lexington,

KY, USA) and HRPO-conjugated streptavidin (Amersham, Little Chalfont, UK) as a secondary reagent. To prove the equal protein loading we used monoclonal mouse anti- β -actin antibody (Sigma). ZAP-70 immunoblots were probed with monoclonal anti-ZAP-70 antibody (clone: 29, Transduction Laboratories) and alkaline-phosphatase labelled rabbit polyclonal anti-mouse (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) secondary antibody. Biotinylated monoclonal anti-insulin antibody (clone: 2D11) was used as negative control.

2.4. Glucocorticoid analogue and glucocorticoid antagonist treatment

Jurkat cells were cultured for 4 h in RPMI supplemented with 10^{-5} M RU486 or solvent. After the exposure, cells were harvested, and 5×10^6 to 10^7 cells per sample were resuspended in 500 μ l RPMI. 10^{-5} M Dexamethasone was added and cells were incubated at 37 °C for various periods as indicated.

2.5. Cell activation and lysis

Fifty micrograms UCHT-1 anti-CD3 monoclonal antibody was added to the DX-treated or untreated samples. Following 1 or 2 min of incubation at 37 °C the activation was stopped by quickly freezing the cells in liquid nitrogen. Then, the samples were lysed for 30 min in 500 μ l ice-cold lysis buffer. Following lysis the samples were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C. Postnuclear supernatants were aspirated and boiled for 5 min with equal amounts of 2× sample buffer or subjected to immunoprecipitation.

2.6. Immunoprecipitation and Western blot

Equal amounts of cell lysates were incubated on a rotator platform at 4 °C for 2 h with 10 μ l of the precipitating anti-serum. Then, 30 μ l slurry of Protein G coupled Sepharose beads were added for additional 2 h. The beads were pelleted and five washes were performed with ice-cold washing buffer. After washing the beads were resuspended in 100 μ l of SDS sample buffer and the immunoprecipitates were boiled for 5 min. After a quick spin the supernatants were collected and loaded on 7.5 or 10% SDS-polyacrylamide gels. SDS-PAGE was performed using a BioRad MiniProtean electrophoresis equipment. The gels were blotted overnight to nitrocellulose membranes by wet transfer procedure. After blocking non-specific binding sites for 1 h, the blots were incubated for 2 h with 0.2 μ g biotinylated monoclonal anti-PY antibody. Western blot negative controls were incubated with biotinylated monoclonal anti-insulin antibody for the same time period at the same concentration. Following extensive washing, the HRPO-conjugated streptavidin (1:5000 dilution) was added for another hour. Western blots were visualised with SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate. Then stripping of the membranes was performed and blots were reprobed with 0.5 μ g of monoclonal anti-ZAP-70 anti-

body. Following extensive washing the alkaline-phosphatase labelled rabbit anti-mouse antibody (1:2000 dilution) was added for another 1 h. Reprobed Western blots were visualised with BCIP/NBT substrate.

2.7. Analysis of blots

Densitometry of the blots was carried out with the ScionImage software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Relative densities of phosphotyrosine blots were corrected with relative densities of ZAP-70 blots of the same sample, to obtain the relative phosphorylation levels of ZAP-70 in each sample.

2.8. Statistical analysis

Each experiment was repeated three times and representative blots are shown in the figures. The effect of treatments was tested for statistical significance using Student's *t*-test. $P < 0.05$ denoted statistical significance.

3. Results

3.1. Dexamethasone alters the tyrosine-phosphorylation pattern of Jurkat cells

First we examined how DX treatment influences the tyrosine-phosphorylation pattern of resting and anti-CD3 activated Jurkat cells. Two minutes of 10 μ M DX treatment alone caused increased protein tyrosine-phosphorylation at the 34, 52, 59, 70 and 90 kDa molecular weight bands in whole Jurkat cell lysates, compared to the solvent-treated control (Fig. 1). Activation with monoclonal anti-CD3 antibody markedly increased the tyrosine-phosphorylation of several proteins in whole cell lysates at 25, 34, 38, 40, 52, 59, 70 and 90 kDa molecular weight ranges, respectively (Fig. 1). A 2 min DX pre-treatment at 10 μ M concentration inhibited the anti-CD3-induced tyrosine-phosphorylation of the proteins of 34, 38, 40, 52, 59 and 90 kDa (Fig. 1). We got no significant signal on negative control blots, incubated with biotinylated monoclonal anti-insulin antibody (data not shown).

3.2. High dose Dexamethasone rapidly induces ZAP-70 phosphorylation

ZAP-70 plays a central role in the TcR signal transduction pathway, by phosphorylating a broad range of substrates, and itself is also phosphorylated on several tyrosine residues [25]. For this reason, we investigated the tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 after DX and/or anti-CD3 treatments. Five-minute exposure to 10 μ M DX caused an average of four-fold (3.32 ± 1.72) increase in tyrosine-phosphorylation of the ZAP-70 kinase in the anti-ZAP-70 precipitated samples (Fig. 2). The anti-CD3 treatment also resulted in a four-fold increase (3.59 ± 1.69) in the tyrosine-phosphorylation of

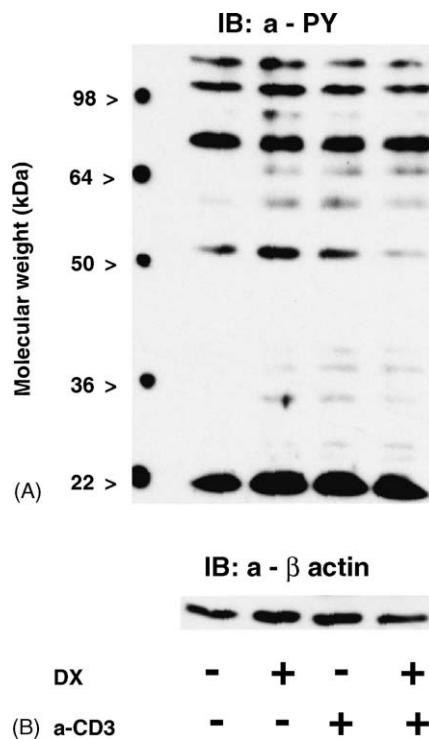


Fig. 1. Dexamethasone and/or anti-CD3 treatment influenced the tyrosine-phosphorylation pattern in Jurkat cell lysates. Western blotting was performed with monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (Panel A). Then, the blot was stripped and reprobed with monoclonal anti-beta actin antibody to check equal protein loading (Panel B). Molecular weight markers are indicated on the left, treatment modalities on the bottom side of the blot. The experiment was repeated three times with similar results. Here, a representative Western blot is depicted.

ZAP-70 kinase (Fig. 2). The tyrosine-phosphorylation after combined DX + anti-CD3 treatment was higher (4.98 ± 2.83) than in case of anti-CD3 or DX treatment alone (five-fold versus four-fold increase, respectively). Phosphorylation increase after single DX or anti-CD3 or combined treatments proved significant compared to the solvent-treated control sample (Student's *t*-test, $P < 0.05$). We observed higher phosphorylation after combined DX + anti-CD3 treatment than single DX or anti-CD3 treatment in all of our independent experiments, but this further rise was statistically not significant by Student's *t*-test (Fig. 2).

3.3. Temporal kinetics of ZAP-70 tyrosine-phosphorylation following single high dose Dexamethasone treatment

Since the kinetics of tyrosine-phosphorylation is a key feature to understand cellular signalling events [26], we further investigated the time course of DX-induced ZAP-70 tyrosine-phosphorylation. The tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 occurs rapidly after the addition of high dose DX. We measured a rise in tyrosine-phosphorylation after 1 and 2 min after DX administration, respectively (Fig. 3). Dephosphorylation occurred within 5 min (Fig. 3).

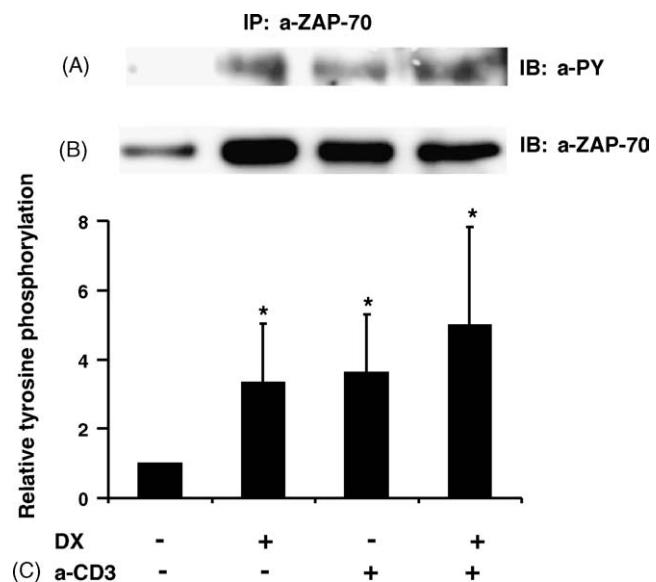


Fig. 2. Effect of Dexamethasone and/or anti-CD3 treatment on ZAP-70 tyrosine-phosphorylation. Western blotting was performed on anti-ZAP-70 immunoprecipitated (IP: a-ZAP-70) samples with anti-phosphotyrosine antibody (IB: a-PY) (Panel A). The blots were stripped and reprobed with monoclonal anti-ZAP-70 antibody (IB: a-ZAP-70) (Panel B). The relative phosphotyrosine content of ZAP-70 is shown as relative density averages \pm S.D. from the densitometry data of three separate experiments (* $P < 0.05$) (Panel C). Treatment modalities are indicated below the diagram (Panel C).

3.4. ZAP-70 phosphorylation induced by Dexamethasone is p56-lck dependent

In addition to acting as a tyrosine kinase, ZAP-70 is a substrate of p56-lck, a T-cell specific src-family tyrosine kinase [27]. We therefore tested whether the DX-induced rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 was p56-lck dependent. When JCaM1.6, the p56-lck-deficient subclone of Jurkat cells was subjected to high dose DX treatment, we observed no rise in the degree of tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 kinase (Fig. 4). The anti-CD3 activation induced notable increase in tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in JCaM1.6 cells (Fig. 4). Additional DX stimulation did not alter the



Fig. 3. Time-dependent tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 after high dose Dexamethasone treatment. Western blotting was performed on anti-ZAP-70 immunoprecipitated (IP: a-ZAP-70) samples with anti-phosphotyrosine antibody (IB: a-PY) (Panel A). The blots were stripped and reprobed with monoclonal anti-ZAP-70 antibody (IB: a-ZAP-70) (Panel B). Duration of the Dexamethasone treatment is indicated below the figure. The experiment was repeated three times with similar results.

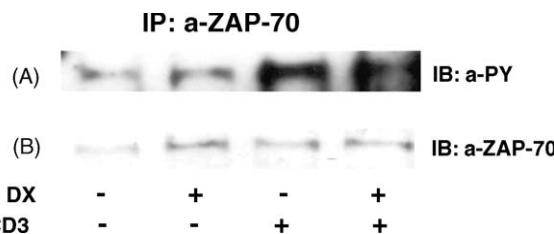


Fig. 4. ZAP-70 tyrosine-phosphorylation after Dexamethasone and/or anti-CD3 treatment in p56-lck kinase-deficient Jurkat subclone JCaM1.6. Western blotting was performed on anti-ZAP-70 immunoprecipitated (IP: a-ZAP-70) samples with anti-phosphotyrosine antibody (IB: a-PY) (Panel A). The blots were stripped and reprobed with monoclonal anti-ZAP-70 antibody (IB: ZAP-70) (Panel B). Treatment modalities are indicated below the blots. A representative Western blot is shown from three independent experiments with similar results.

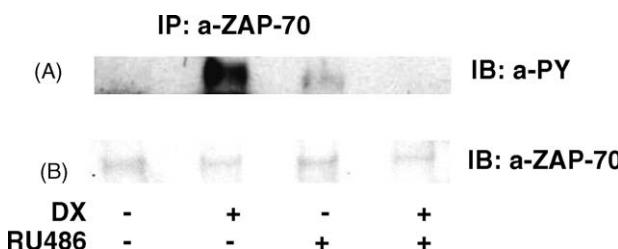


Fig. 5. Effect of RU486 (Mifepristone, glucocorticoid receptor antagonist) pre-treatment on the Dexamethasone-induced tyrosine-phosphorylation of ZAP-70. Western blotting was performed on anti-ZAP-70 immunoprecipitated (IP: a-ZAP-70) samples with anti-phosphotyrosine antibody (IB: a-PY) (Panel A). The blots were stripped and reprobed with monoclonal anti-ZAP-70 antibody (IB: ZAP-70) (Panel B). Treatment modalities are indicated below the blots. A representative Western blot is shown from three independent experiments with similar results.

phosphotyrosine increase caused by anti-CD3 activation in the p56-lck-deficient cell line (Fig. 4).

3.5. ZAP-70 phosphorylation can be elicited by the glucocorticoid receptor

Previous studies indicated the existence of various non-genomic GC effects, either GR mediated or receptor independent. Therefore, we investigated whether tyrosine-phosphorylation alterations in Jurkat T-cells induced by DX were GR-dependent using RU 486 (Mifepristone), a glucocorticoid receptor antagonist [28]. DX alone caused markedly growth in the tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 (Fig. 5). Pre-treatment of Jurkat cells for 4 h with equimolar RU486 prevented this rapid phosphorylation of ZAP-70 induced by subsequent high dose DX exposure (Fig. 5). RU 486 treatment alone caused no remarkable tyrosine-phosphorylation change in ZAP-70 (Fig. 5).

4. Discussion

Our work was aimed at clarifying the GC-TcR signal cross-talk in Jurkat cells *in vitro*. It has been known for a long

time that GCs exhibit immunosuppressive effects [2]. As a model for TcR engagement, the cross-linking of the CD3 signalling complex with anti-CD3 antibody increases the phosphotyrosine content in T-cells [29]. Others have shown that GC alters the tyrosine-phosphorylation after TcR activation in T-cells [20]. However, those DX effects needed hours to manifest, although they proved to be non-genomic. The GC effects we demonstrate here occurred within 5 min, which strongly suggest that these responses were non-genomic in nature. The phosphotyrosine content of DX-treated Jurkat cells increased, while the addition of DX reduced the degree of tyrosine-phosphorylation in anti-CD3 activated Jurkat cells. This demonstrated the rapid suppressive effects of GCs on T-cell activation, which is supported by previous findings [20], however on a considerably different time scale.

The ZAP-70 kinase has a central role in TcR signalling [25]. After the MHC-peptide complex engaged the TcR, the ITAMs on the CD3 complex are rapidly phosphorylated [25]. These phosphorylation events are mediated by the src-family kinases [27]. Following CD3 phosphorylation, ZAP-70 kinase is recruited to the phosphotyrosines by its tandem SH2 domains and additional phosphorylation events occur [26]. The ZAP-70 kinase phosphorylates LAT and other adaptor proteins, which leads to the augmentation of the cell activation signal [30]. We investigated whether the GC hormone was able to influence ZAP-70 phosphorylation. Our experiments showed that DX caused a marked rise in ZAP-70 tyrosine-phosphorylation within 5 min. ZAP-70 kinase activity is regulated by site-specific tyrosine-phosphorylation [31,32]. Increase in the phosphotyrosine content of ZAP-70 might lead to either the increase or inhibition of kinase activity [32]. ZAP-70 is a member of the Syk-family tyrosine kinases, which contains 30 tyrosine residues. Several of these are potential phosphorylation sites. The known activation sites are Y315, Y319 [33], Y493 [34], some of them have inhibitory function Y292 [35], Y492 [34], others have unknown function (Y69, Y126 and Y178), respectively [31].

Some authors previously showed that the application of DX abrogated the early events of TcR-CD3 signalling. Van Laethem et al. demonstrated that 1 μ M DX treatment for 6–16 h inhibited the phosphorylation of the TcR-zeta chain, ZAP-70, and the transmembrane adaptor LAT [20]. The authors suggested that these effects were due to altered acylation and lipid raft compartmentalisation of key signalling molecules [21]. In our experiments, we used high dose DX (10 μ M) for 0.5–30 min, which was considerably shorter than reported in other experimental systems. The increased ZAP-70 tyrosine-phosphorylation after DX treatment seemed in contrast to what Van Laethem et al. have found on DX attenuated ZAP-70 tyrosine-phosphorylation [20]. To elucidate this controversy, we analysed the kinetics of ZAP-70 phosphorylation response induced by DX. We found that 10 μ M DX induced rapid, transient ZAP-70 phosphorylation, within 1 min and dephosphorylation occurred already after 5 min. Such rapid GC actions suggested the involvement of near-membrane structures. Structural data indicate that ZAP-70 is

localised adjacent to the cytoplasmic membrane both in its active and inactive form [36,37]. ZAP-70 is a key substrate of src-family kinases, which also localise in lipid rafts of the lymphocyte membranes [38], which supports this interpretation.

Next, we determined whether the DX-induced tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 occurred in the absence of active p56-lck, a key kinase in T-cell activation with ZAP-70 as one of its important substrates. Our results revealed that DX was unable to induce ZAP-70 phosphorylation in the absence of p56-lck, suggesting that phosphorylation events initiated by DX in T-cells involve the p56-lck kinase. Interestingly, the anti-CD3-induced phosphorylation of ZAP-70 in JCaM1.6 cells was not defective. This might be due to the compensatory effect of other src-family kinases for example p59-fyn which might remain active in JCaM1.6 cells and participate in ZAP-70 phosphorylation [39–41]. DX treatment could not increase anti-CD3-induced tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in the p56-lck-deficient cell line, in contrast to wild-type Jurkat cells. This suggests that anti-CD3 activation and DX treatment may have caused the phosphorylation of different tyrosine residues of ZAP-70.

Steroid hormones mediate their rapid non-genomic effects either through the classical cytoplasmic receptor by specific protein–protein interactions or through their putative membrane receptor. Moreover, direct physico-chemical interactions may also participate in hormone action [16]. Some studies showed the rapid suppressive effect of GCs on mitogen activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [42] and rat thymocytes [43]. They showed that the oxygen consumption of the ConA-activated PBMC [42] or rat thymocytes [43] rapidly decreased in response to high dose methylprednisolone. The administration of high dose GC diminished the sodium and calcium ion transport across the plasma membrane and also inhibited the calcium signal following the ConA-activation in rat thymocytes [43]. These effects were thought to be due to direct physicochemical interactions with the plasma membrane and occurred at very high GC concentrations (1–10 mM) [43].

Our results showed that GC action was inhibited by the application of equimolar Mifepristone, a GR antagonist, suggesting that the rapid phosphorylation events induced by DX was mediated by the GR. The participation of GR in the rapid steroid signalling process of Jurkat cells raises the question whether the receptor is membrane-bound (mGR) or localises in the cytoplasm (cGR). Hsp-90 provides a binding site for the inactive form of cGR, which complex is dissociated by the ligand binding to GR [13]. The src-family member p56-lck also binds Hsp-90, which might have an important function in arranging the active conformation of the src-family kinases [44]. Moreover, the disruption of functional Hsp-90 with geldanamycin inhibits T-cell activation and decreases the phosphorylation of lck and Raf-1 kinases [44]. These data imply that the cGR and the p56-lck might localise in the same multimolecular compartment organised by the Hsp-90, thereby influencing each other's function.

Gametchu demonstrated the presence of GR-like antigens in the plasma membrane of a mouse T-lymphoma cell line [45] and in human leukaemia cells [46], suggesting that the GR may reside in the plasma membrane, too. The presence of membrane GR has been shown in the membrane of normal mononuclear blood cells [47]. Others have partially purified and characterised a novel membrane resident GC binding protein from amphibian brain [48]. This novel mGR protein is different from the classical cGR, since it resembles the properties of receptors containing seven transmembrane domains [48]. Similarly, Wong et al. recently identified and cloned a novel protein termed Modulator of Nongenomic Activity of ER (MNAR), a previously uncharacterised scaffold protein that modulates ER interaction with src-family protein tyrosine kinases [49]. They showed that this interaction leads to src activation and the stimulation of MAPK pathway. These data, together with our findings, raise the possibility of the mGR participating in the mediation of rapid glucocorticoid actions.

In conclusion, we established that the hierarchy of p56-lck and ZAP-70 represents an important link between the GC and TcR signalling pathways in Jurkat cells. Our data may provide a better insight to the molecular events underlying the rapid effects of high dose GC treatment.

Acknowledgements

To Éva Monostori (Biological Research Centre, Szeged, Hungary) for the cell lines and the polyclonal anti-ZAP-70 antibody. To Péter Balogh for critically reading of the manuscript and useful advices. To Ms. Mária Pápa and Ms. Judit Melczer for technical assistance. This work was partly supported by the “Foundation for the Advance of Medical Education”, University of Pécs, Faculty of Medicine, Hungary (Ferenc Boldizsár), and by the National Plan for Research and Development of Hungary (NKFP1/48/2001 and 01/26/2001), and by the National Health Foundation (ETT 593/2003).

References

- [1] H.M. Reichardt, Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting, *Curr. Pharm. Des.* 10 (23) (2004) 2797–2805.
- [2] D. Franchimont, Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024 (2004) 124–137.
- [3] O. Frankfurt, S.T. Rosen, Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates, *Curr. Opin. Oncol.* 16 (6) (2004) 553–563.
- [4] S.S. Nussey, S.A. Whitehead, *Endocrinology: An Integrated Approach*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 2001.
- [5] M.S. Vacchio, V. Papadopoulos, J.D. Ashwell, Steroid production in the thymus: implication for thymocyte selection, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 1835–1846.

- [6] O. Lechner, H. Dietrich, G.J. Wiegers, M. Vacchio, G. Wick, Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus, *Int. Immunol.* 13 (6) (2001) 769–776.
- [7] I. Cima, N. Corazza, B. Dick, A. Fuhrer, S. Herren, S. Jakob, E. Ayuni, C. Mueller, T. Brunner, Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation, *J. Exp. Med.* 200 (12) (2004) 1635–1646.
- [8] J.D. Ashwell, F.W. Lu, M.S. Vacchio, Glucocorticoids in T cell development and function, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 309–345.
- [9] J.F. Purton, J.A. Monk, D.R. Liddicoat, K. Kyriassoudis, S. Sakkal, S.J. Richardson, D.I. Godfrey, T.J. Cole, Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death, *J. Immunol.* 173 (6) (2004) 3816–3824.
- [10] T. Berki, L. Palinkas, F. Boldizsar, P. Nemeth, Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations, *Int. Immunol.* 14 (5) (2002) 463–469.
- [11] J.E. Kalinyak, R.I. Dorin, A.R. Hoffman, A.J. Perlman, Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by Dexamethasone, *J. Biol. Chem.* 262 (22) (1987) 10441–10444.
- [12] P. Norgaard, H.S. Poulsen, Glucocorticoid receptors in human malignancies: a review, *Ann. Oncol.* 2 (8) (1991) 541–557.
- [13] D.F. Smith, D.O. Toft, Steroid receptors and their associated proteins, *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 4–11.
- [14] J.M. Berg, DNA binding specificity of steroid receptors, *Cell* 57 (1989) 1065–1068.
- [15] T. Berki, L. Grama, P. Németh, Detection of steroid induced glucocorticoid receptor (GR) translocation and expression with a FITC labeled monoclonal antibody, *Cytometry Suppl.* 10 (2000) 99.
- [16] F. Buttigereit, A. Scheffold, Rapid glucocorticoid effects on immune cells, *Steroids* 67 (2002) 529–534.
- [17] J.D. Croxtall, Q. Choudhury, R.J. Flower, Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism, *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 289–298.
- [18] R.M. Lösel, E. Falkenstein, M. Feuring, A. Schultz, H.C. Tillmann, K. Rossol-Haseroth, M. Wehling, Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 965–1016.
- [19] E. Baus, F. Andris, P.M. Dubois, J. Urbain, O. Leo, Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes, *J. Immunol.* 156 (1996) 4555–4561.
- [20] F. Van Laethem, E. Baus, L.A. Smyth, F. Andris, F. Bex, J. Urbain, D. Kioussis, O. Leo, Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling, *J. Exp. Med.* 193 (7) (2001) 803–814.
- [21] F. Van Laethem, X. Liang, F. Andris, J. Urbain, M. Vandenbranden, J.M. Ruysschaert, M.D. Resh, T.M. Stulnig, O. Leo, Glucocorticoids alter the lipid and protein composition of membrane rafts of a murine T cell hybridoma, *J. Immunol.* 170 (2003) 2932–2939.
- [22] C. Buitrago, R. Boland, A.R. de Boland, The tyrosine kinase c-src is required for 1,25(OH)2-Vitamin D3 signalling to the nucleus in muscle cells, *BBA-Mol. Cell. Res.* 1541 (3) (2001) 179–187.
- [23] C.G. Buitrago, V.G. Pardo, A.R. de Boland, R. Boland, Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase Calpha mediates 1alpha,25(OH)2-Vitamin D3 regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells, *J. Biol. Chem.* 278 (4) (2003) 2199–2205.
- [24] V. Boonyaratanaornkit, M.P. Scott, V. Ribon, L. Sherman, S.M. Anderson, J.L. Maller, W.T. Miller, D.P. Edwards, Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-src-family tyrosine kinases, *Mol. Cell.* 8 (2) (2001) 1269–1280.
- [25] J.E. van Leeuwen, L.E. Samelson, T cell antigen-receptor signal transduction, *Curr. Opin. Immunol.* 11 (3) (1999) 242–248.
- [26] A.C. Chan, B.A. Irving, J.D. Fraser, A. Weiss, The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (20) (1991) 9166–9170.
- [27] T. Mustelin, K. Tasken, Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases, *Biochem. J.* 371 (2003) 15–27.
- [28] I. Jung-Testas, E.E. Baulieu, Inhibition of glucocorticosteroid action in cultured L-929 mouse fibroblasts by RU 486, a new anti-glucocorticosteroid of high affinity for the glucocorticosteroid receptor, *Exp. Cell. Res.* 147 (1) (1983) 177–182.
- [29] A. Weiss, D.R. Littman, Signal transduction by lymphocyte antigen receptors, *Cell* 76 (2) (1994) 263–274.
- [30] W. Zhang, J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R.P. Trible, L.E. Samelson, LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation, *Cell* 92 (1) (1998) 83–92.
- [31] J.D. Watts, M. Affolter, D.L. Krebs, R.L. Wange, L.E. Samelson, R. Aebersold, Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine-phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70, *J. Biol. Chem.* 269 (47) (1994) 29520–29529.
- [32] G. Kong, M. Dalton, J.B. Wardenburg, D. Straus, T. Kurosaki, A.C. Chan, Distinct tyrosine-phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function, *Mol. Cell. Biol.* 16 (9) (1996) 5026–5035.
- [33] V. Di Bartolo, D. Mege, V. Germain, M. Pelosi, E. Dufour, F. Michel, G. Magistrelli, A. Isacchi, O. Acuto, Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signalling, *J. Biol. Chem.* 274 (10) (1999) 6285–6294.
- [34] D. Mege, V. Di Bartolo, V. Germain, L. Tuosto, F. Michel, O. Acuto, Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signalling pathways, *J. Biol. Chem.* 271 (51) (1996) 32644–32652.
- [35] A. Magnan, V. Di Bartolo, A.M. Mura, C. Boyer, M. Richelme, Y.L. Lin, A. Roure, A. Gillet, C. Arrieumerlou, O. Acuto, B. Malissen, M. Malissen, T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase, *J. Exp. Med.* 194 (4) (2001) 491–505.
- [36] J. Sloan-Lancaster, W. Zhang, J. Presley, B.L. Williams, R.T. Abraham, J. Lippincott-Schwartz, L.E. Samelson, Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein, *J. Exp. Med.* 186 (10) (1997) 1713–1724.
- [37] R.D. Huby, M. Iwashima, A. Weiss, S.C. Ley, ZAP-70 protein tyrosine kinase is constitutively targeted to the T cell cortex independently of its SH2 domains, *J. Cell. Biol.* 137 (7) (1997) 1639–1649.
- [38] T. Magee, N. Pirinen, J. Adler, S.N. Pagakis, I. Parmyrd, Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signalling, *Biol. Res.* 35 (2) (2002) 127–131.
- [39] N. Fusaki, K. Semba, T. Katagiri, G. Suzuki, S. Matsuda, T. Yamamoto, Characterization of p59fyn-mediated signal transduction on T cell activation, *Int. Immunol.* 6 (8) (1994) 1245–1255.
- [40] N. Fusaki, S. Matsuda, H. Nishizumi, H. Umemori, T. Yamamoto, Physical and functional interactions of protein tyrosine kinases, p59fyn and ZAP-70 in T cell signalling, *J. Immunol.* 156 (4) (1996) 1369–1377.
- [41] D. Filipp, M. Julius, Lipid rafts: resolution of the “fyn problem”? *Mol. Immunol.* 41 (6–7) (2004) 645–656.
- [42] D. Schmid, G.R. Burmester, R. Tripimacher, G. Fici, P. von Voigtlander, F. Buttigereit, Short-term effects of the 21-aminosteroid lazaroïd tilirazad mesylate (PNU-74006F) and the pyrrolopyrimidine lazaroïd PNU-101033E on energy metabolism of human peripheral blood mononuclear cells, *Biosci. Rep.* 21 (1) (2001) 101–110.
- [43] F. Buttigereit, S. Krauss, M.D. Brand, Methylprednisolone inhibits uptake of Ca^{2+} and Na^+ ions into concanavalin A-stimulated thymocytes, *Biochem. J.* 326 (1997) 329–332.
- [44] T. Schnaider, J. Somogyi, P. Csermely, M. Szamel, The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signalling events of T-lymphocyte activation, *Cell Stress Chaperones* 5 (1) (2000) 52–61.

- [45] B. Gametchu, Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis, *Science* 236 (4800) (1987) 456–461.
- [46] B. Gametchu, C.S. Watson, S. Wu, Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients, *FASEB J.* 7 (13) (1993) 1283–1292.
- [47] B. Bartholome, C.M. Spies, T. Gaber, S. Schuchmann, T. Berki, D. Kunkel, M. Bienert, A. Radbruch, G.R. Burmester, R. Lauster, A. Scheffold, F. Buttigereit, Membrane glucocorticoid receptors (mGR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis, *FASEB J.* 18 (1) (2004) 70–80.
- [48] S.J. Evans, T.F. Murray, F.L. Moore, Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72 (5) (2000) 209–221.
- [49] C.W. Wong, C. McNally, E. Nickbarg, B.S. Komm, B.J. Cheskis, Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with src/Erk phosphorylation cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (23) (2002) 14783–14788.



Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90

Domokos Bartis ^{a,*}, Ferenc Boldizsár ^a, Krisztián Kvell ^a, Mariann Szabó ^a, László Pálinkás ^a, Péter Németh ^a, Éva Monostori ^b, Tímea Berki ^a

^a Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Hungary

^b Lymphocyte Signal Transduction Laboratory, Institute of Genetics, Biological Research Center of Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

Received 5 December 2006

Abstract

The glucocorticoid receptor (GR) participates in both genomic and non-genomic glucocorticoid hormone (GC) actions by interacting with other cytoplasmic signalling proteins. Previously, we have shown that high dose Dexamethasone (DX) treatment of Jurkat cells causes tyrosine phosphorylation of ZAP-70 within 5 min in a GR-dependent manner. By using co-immunoprecipitation and confocal microscopy, here we demonstrate that the liganded GR physically associates with ZAP-70, in addition to its phosphorylation changes. The association of the ligand-bound GR and ZAP-70 was also observed in HeLa cells transfected with ZAP-70, suggesting that this co-clustering is independent of lymphocyte specific factors. Furthermore, the ZAP-70 was found to also co-precipitate with Hsp-90 chaperone both in Jurkat and transgenic HeLa cells, independent of the presence of DX. These findings raise the possibility that ZAP-70 may serve as an important link between GC and TcR-induced signaling, thereby transmitting non-genomic GC action in T-cells.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: ZAP-70; Glucocorticoid receptor (GR); Hsp-90; Non-genomic glucocorticoid effects; Jurkat cells

Glucocorticoid hormones (GCs) are lipophilic steroid molecules that can freely diffuse through biological membranes [1]. The ligand-free glucocorticoid receptor (GR) is a component of a multimeric protein complex in the cytoplasm. This multi-protein complex consists of heat-shock proteins, several immunophillins, and the inactive GR [2]. Upon ligand binding, the GR dissociates from this multi-protein complex, dimerises and translocates into the nucleus, where it serves as transcription factor [3]. In the nucleus the GR binds to specific DNA sequences called glucocorticoid response elements (GRE) [4]. This signalling mechanism of the GCs is called the classical, genomic pathway. The activated GR also interacts with a number of other transcription factors e.g., STATs, AP-1, NFκB, and octamer transcription factors [5].

GC effects exerted through the genomic pathway result in changes in the gene expression pattern and they need *de novo* protein synthesis to occur [5]. Nevertheless, there are GC effects that cannot be explained on the basis of the above, genomic pathway. In the clinical practice, GCs are used in the treatment of neurotraumatic cases, such as acute spinal cord injury [6] and acute allergic diseases e.g., anaphylactic reactions [7,8], where rapid actions are required. Due to the lack of time for gene expression changes, these prompt GC effects are considered to be non-genomic effects.

It has been shown that the early steps of TcR-signalling events are inhibited by GC exposure [9]. GCs also inhibit the phosphorylation of proximal T-cell signalling molecules in T-cell hybridomas and murine thymocytes [10]. GC hormone treatment altered the lipid composition of membrane lipid rafts of a murine T-cell hybridoma, thereby altering the raft association and palmitoylation of key signalling molecules [11]. However, the GC effects needed

* Corresponding author. Fax: +36 72 536 289.

E-mail address: dominicus@freemail.hu (D. Bartis).

hours to develop in the above works and only few data were available until recently about the signalling mechanisms induced by rapid steroid effects which occur within minutes.

Protein–protein interactions are a possible way to exert non-genomic GC functions as proposed in the model by Buttigereit and colleagues [12]. Some protein–protein interactions are already known concerning the GR. The unliganded GR is complexed with Hsp-90 chaperone in the cytoplasm [2]. The translocation of the liganded GR dimers into the nucleus is supported by cytoskeletal elements [13]. The Hsp-90 also participates maintaining the signalling function of the p56-lck kinase [14]. Since ZAP-70 is one of the main substrates of p56-lck [15], and the ligand-free GR is complexed by Hsp-90, we assume that these molecules are in the same macromolecular compartment in the cytoplasm. A recent study described that the glucocorticoid hormone modulates the activity of lck and fyn kinases in peripheral blood Th cells [16].

In a previous work, we have shown that Dexamethasone (DX), a GR agonist causes rapid p56-lck dependent tyrosine phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells, which could be inhibited by GR antagonist pre-treatment [17]. Here, we report that in the presence of its agonist, the GR co-precipitates with ZAP-70 in Jurkat cells and in HeLa cells transfected with ZAP-70. We confirmed this GC-induced molecular association with confocal microscopy. The co-localization of the GR, ZAP-70, and Hsp-90 may explain our previous findings [17] suggesting possible functional cross-link between the signaling pathways of TcR–CD3 complex and glucocorticoid hormone, which may participate in the fine tuning of T-cell response, thymic selection, and apoptosis processes.

Materials and methods

Cell lines. Jurkat cells, P116 (ZAP-70 deficient Jurkat subclone), and HeLa cells were cultured at 37 °C in humidified atmosphere, containing 5% CO₂, in RPMI medium supplemented with 5% (Jurkat cells) and 10% (HeLa and P116 cells) fetal calf serum (Gibco).

Lentivirus production and transduction. Human full-length wild-type ZAP-70 cDNA has been inserted in the pWPTS lentiviral transfer plasmid under the control of an EF1 promoter as published elsewhere [18]. Lentivirus production and transduction of P116 and HeLa cell lines were performed as described elsewhere [19,20].

Chemicals and buffers. All fine chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, otherwise indicated. Dexamethasone (DX) and Geldanamycin (GA) were dissolved in DMSO at a concentration of 4 and 1 mg/ml, respectively. For intracellular free calcium measurement Fluo-3 AM (Molecular Probes), 1 mg/ml stock solution was dissolved in Pluronic-F-127 + DMSO. For the Western blot experiments, cells were lysed in an ice-cold TEM buffer containing 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 4 mM EDTA, 20 mM sodium molybdate, and 10% glycerol). Aprotinin, leupeptin (10 µg/ml), and PMSF (2 mM) were freshly added to the buffer. For washing Western blots washing buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 0.1% Tween-20) was used. The intracellular labelling for confocal microscopy was performed in saponine buffer (0.1% saponine, 0.1% BSA, and 0.1% azide in PBS).

Antibodies. Immunoprecipitation was performed either with polyclonal anti-ZAP-70 antibody generated by immunizing rabbits with a peptide corresponding to the amino acids 485–499 of ZAP-70 sequence, or mouse

monoclonal anti-GR antibody (clone 8E9) produced in our laboratory [21]. For Western blotting, mouse monoclonal anti-ZAP-70 (clone: 29, Transduction Laboratories) mouse monoclonal anti-GR antibody (clone 5E4, [21]), and rabbit polyclonal anti-HSP-90 (Santa Cruz Biotechnology) were used. HRPO-conjugated goat anti-mouse IgG (Hunnavix) and anti-rabbit IgG (Pierce) were applied as secondary antibodies. For confocal microscopy, anti-GR-FITC (5E4), and phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-ZAP-70 antibodies (eBioscience, 1E7.2) were used. FITC and PE-conjugated mouse IgG1 isotype control antibodies (DakoCytomation) were applied as negative controls.

Geldanamycin and Dexamethasone treatment of cells. Cells were incubated overnight in complete RPMI medium in the presence of 1.78 µM Geldanamycin or solvent (DMSO). After the incubation, cells were washed in serum-free RPMI and subjected to DX treatment as described previously [17]. Briefly, cells were resuspended in RPMI at a concentration of 10⁸/ml and incubated at 37 °C with 10 µM DX or solvent for 5 min. After incubation, the reaction was stopped by placing the tubes in liquid nitrogen (for Western blots) or with ice-cold PBS-azide (for microscopy).

Lysis, immunoprecipitation and Western blot. Ten million cells were lysed in 500 µl TEM buffer by sonication on ice. Postnuclear supernatants were aspirated and subjected to immunoprecipitation. Equal amounts of cell lysates were incubated on a rotator platform at 4 °C with 30 µl slurry of protein G coupled Sepharose beads (Amersham) for 30 min. After the removal of the pre-clearing beads, 10 µl antibody was added for 2 h. Then protein G-Sepharose beads were added for additional 2 h. Beads were washed five times with ice-cold washing buffer. The electrophoresis and Western blotting of the samples were performed as described previously [17].

Confocal microscopy. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and washed in saponine buffer. The labelling of the cells was performed in saponine buffer with an antibody concentration of 1 µg/ml. After 1 h incubation on ice, the cells were washed twice in saponine buffer and layered onto slides. The excess fluid was carefully aspirated and the slides were covered using 50% glycerol-PBS. In case of HeLa-trZAP-70 cells, the above process was performed on cell monolayers. The examination of the samples was carried out using an Olympus Fluoview 300 confocal microscope or later a Olympus Fluoview FV1000S-IX81 system.

Ca²⁺-signal measurement. Intracellular free calcium was measured according to the protocol previously described by Boldizsar et al. [22].

Results

The GR and Hsp-90 co-precipitates with ZAP-70 in the lysates of DX treated Jurkat cells

As our previous results [17] indicated, GC induced rapid phosphorylation of ZAP-70, therefore we investigated the possible association of ZAP-70 and GR in Jurkat cells. Immunoprecipitation was performed on lysates of DX or vehicle-treated Jurkat cells, reciprocally with anti-ZAP-70 and anti-GR antibodies. Upon DX treatment, the co-precipitation of the two molecules increased, indicating that agonist promoted the GR association with ZAP-70. (Fig. 1A) To further characterise the subcellular localisation and relation of ZAP-70 and GR in the cytoplasm, we visualised the two molecules simultaneously by confocal microscopy. In vehicle-treated, resting Jurkat cells both ZAP-70 and GR showed even, mostly cytoplasmic distribution, (Fig. 1C) with almost no co-localisation. Upon 5 min high dose DX treatment, we observed co-localisation of the two molecules clustered underneath the cell membrane. (Fig. 1D) Investigating Hsp-90 relation to ZAP-70 by immunoprecipitation we found, that Hsp-90 co-precip-

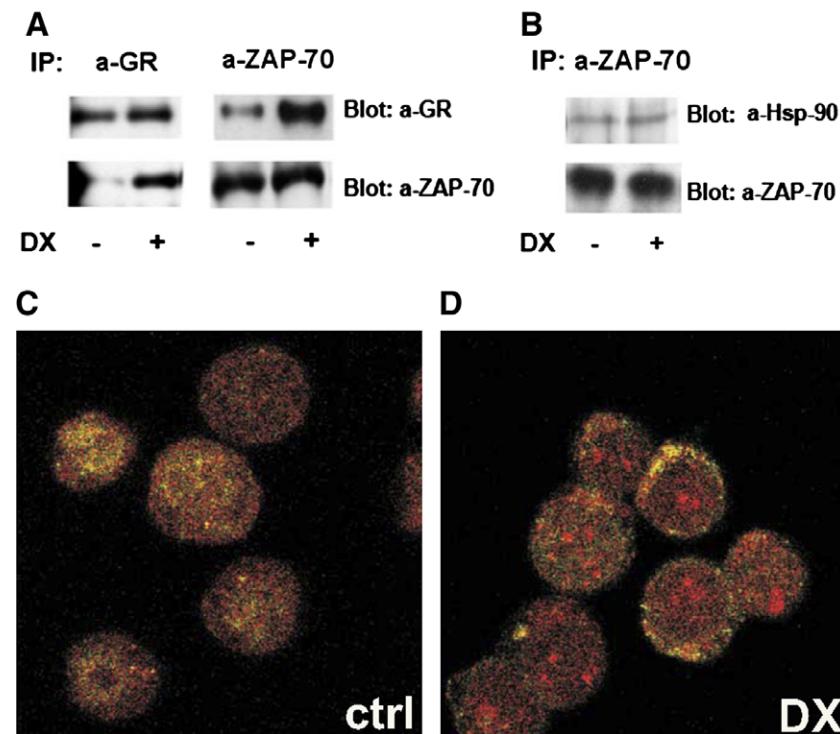


Fig. 1. Association of ligand-bound GR with ZAP-70 in Jurkat cells. (A) Anti-GR and anti-ZAP-70 Western blots are shown from anti-GR or anti-ZAP-70 precipitated Jurkat cell lysates with or without DX treatment. Equal amount of GR and ZAP-70 precipitated when anti-GR and anti-ZAP-70 antibodies were used for precipitation, respectively, while GR and ZAP-70 co-precipitation markedly increased in the DX-treated samples. (B) Anti-Hsp-90 and anti-ZAP-70 Western blots are shown from anti-ZAP-70 precipitated Jurkat cell lysates with or without DX pretreatment. Anti-ZAP-70 was used as precipitating antibody in all samples. Equal amount of Hsp-90 co-precipitated both in the control and DX treated samples. The amount of precipitated ZAP-70 was found to be equal in all samples. The Western blots shown on the figure are representatives from three separate experiments. (C,D) Jurkat cell samples were prepared after fixation and intracellular a-GR-FITC (green channel) and a-ZAP-70-PE (red channel) labelling, followed by sedimentation onto slides and examination with a confocal microscope. In the DX-treated samples, the GR and the ZAP-70 showed near-membrane co-localisation (DX, D), while this phenomenon was absent in the untreated controls (Ctrl, C). The figure shows representative images from three separate experiments. (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

itated with ZAP-70 in Jurkat cells, but DX treatment did not alter the association of the two molecules (Fig. 1B).

The GR associates with ZAP-70 expressed in transgenic HeLa cells

ZAP-70 is a T-and NK-cell specific molecule and it is also in close relation with other lymphocyte specific molecules e.g. p56-lck. We aimed to investigate whether the co-precipitation of the GR and ZAP-70 molecules were dependent on these lymphocyte specific factors. We used a lentiviral vector construct for transfecting ZAP-70 deficient Jurkat cells (P-116) and HeLa human epithelial carcinoma cells to stably express the full-length ZAP-70. The ZAP-70 expression level in transfected P116 cells was higher (MFI:98) than in Jurkat cells (MFI:28) as tested by flow cytometry. (Fig. 2A) Moreover, the ZAP-70 construct was fully functional in P-116 cells as shown by anti-CD3 activation and calcium signal measurement. (Fig. 2B) Despite the higher ZAP-70 expression in ZAP-70 transfected P116 cells, the calcium signal was similar to that of wild-type Jurkat cells (Fig. 2B).

The ZAP-70 expression level in transfected HeLa cells was higher (MFI:108) than that of Jurkat cells (MFI:28) as tested by flow cytometry. (Fig. 3A) Reciprocal immunoprecipita-

tions and immunoblotting with anti-ZAP-70 and anti-GR antibodies were performed from HeLa-trZAP-70 cell lysates (Fig. 3B). ZAP-70 co-precipitated with GR in HeLa-trZAP-70 cells. The clustering required the presence of GR ligand (Fig. 3B), similarly to what we have found in Jurkat cells (Fig. 1A). Co-localisation of the two molecules was also verified with confocal microscopy. We observed intensive cytoplasmic staining of both the GR and ZAP-70 molecules in both DX untreated and treated HeLa-trZAP-70 cells (Fig. 3D and E, respectively). We found a perinuclear co-localisation of ZAP-70 with GR in HeLa-trZAP-70 cells upon 5 min high dose DX treatment, (Fig. 3E) while in the untreated samples both molecules showed even distribution throughout the cytoplasm (Fig. 3D). Examining Hsp-90 relation to ZAP-70 by immunoprecipitation, we found that Hsp-90 co-precipitated with ZAP-70 in HeLa-trZAP-70 cells, similarly to Jurkat cells. DX treatment did not alter the association of the two molecules (Fig. 3B).

ZAP-70 and Hsp-90 co-precipitation in Jurkat lysates are inhibited by GA

To better clarify the role of Hsp-90 in this signalling process, we aimed to investigate whether GA, a specific

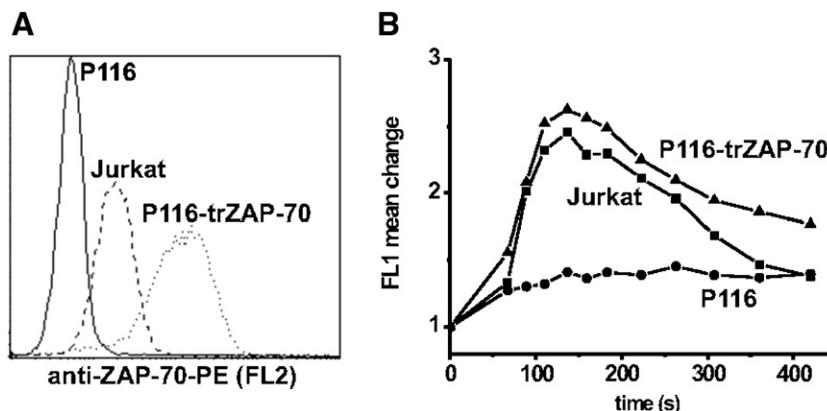


Fig. 2. Lentiviral transfection of P116 (ZAP-70 deficient) cells with ZAP-70. (A) ZAP-70 expression of ZAP-70 transfected P116 cells was compared to untransfected P116 and Jurkat cells by flow cytometry after intercellular phycoerythrin (PE)-conjugated anti-ZAP-70 antibody labelling. Flow cytometric histogram shows PE conjugated anti-ZAP-70 fluorescence (FL2) of a representative measurement from three separate experiments. (B) Calcium signal of ZAP-70 transfected P116 cells (\blacktriangle) was compared to untransfected P116 (\bullet) and Jurkat cells (\blacksquare). Diagrams show the result of a representative measurement from three separate experiments.

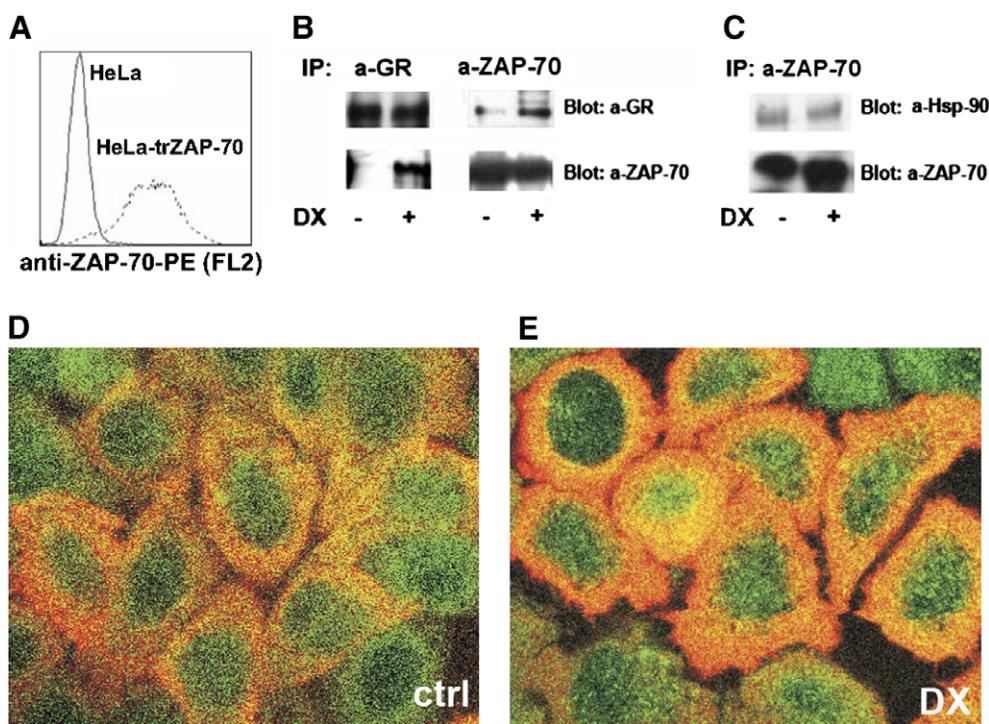


Fig. 3. Liganded GR clustering with ZAP-70 in HeLa-trZAP-70 cells. (A) Representative flow cytometric histograms show the ZAP-70 expression of control and HeLa-trZAP-70 cells after labelling with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-ZAP-70 antibody. (B) Anti-GR and anti-ZAP-70 blots are shown from anti-GR or anti-ZAP-70 precipitated HeLa-trZAP-70 cell lysates with or without DX treatment. Equal amount of GR and ZAP-70 precipitated when anti-GR and anti-ZAP-70 antibodies were used for precipitation, respectively, while GR and ZAP-70 co-precipitated only in the DX-treated samples. (C) Anti-Hsp-90 and anti-ZAP-70 blots are shown from anti-ZAP-70 precipitated HeLa-trZAP-70 cell lysates with or without DX pretreatment. Anti-ZAP-70 was used as precipitating antibody in all samples. Equal amount of Hsp-90 co-precipitated both in the control and DX treated samples. The amount of precipitated ZAP-70 was found to be equal in all samples. The Western blots shown in the figure are representatives from three separate experiments. (D,E) Representative confocal microscopic pictures show HeLa-trZAP-70 cells grown in a monolayer after fixation and intracellular labelling with phycoerythrin conjugated anti-ZAP-70 antibody (red channel) and FITC-conjugated anti-GR antibody (green channel). Control cells are depicted left (D) and Dexamethasone-treated cells are depicted right (E). (E) In the DX-treated samples the GR and the ZAP-70 showed perinuclear co-localisation (E), while this phenomenon was absent in the untreated controls (D). The figure shows representative images from three separate experiments. (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Hsp-90 inhibitor, interferes with GR-ZAP-70 association. We performed immunoprecipitation with anti-ZAP-70 antibody. Although GA inhibited the

co-precipitation of ZAP-70 with Hsp-90, it did not impair the DX-induced GR-ZAP-70 association (Fig. 4).

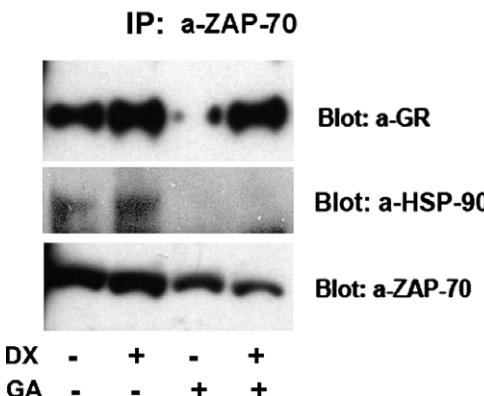
Jurkat cells

Fig. 4. Geldanamycin treatment does not inhibit the Dexamethasone-induced ZAP-70–GR co-precipitation. Anti-GR, anti-Hsp-90, or anti-ZAP-70 blots are shown from anti-ZAP-70 precipitated control or DX-treated Jurkat cell lysates with or without Geldanamycin pretreatment. Geldanamycin treatment did not influence the increased association of ZAP-70 with GR upon DX treatment. Equal amount of Hsp-90 co-precipitated with ZAP-70 both in the control and DX treated samples, which was completely abrogated by Geldanamycin pre-treatment. The amount of precipitated ZAP-70 was found to be equal in control and DX treated samples with or without Geldanamycin pretreatment. The blots shown are representatives from three separate experiments.

Discussion

Steroid hormones can exert rapid, non-genomic and genomic hormone effects [1]. Our recent finding was that 5 min, high dose GR agonist (Dexamethasone) treatment causes rapid p56-lck-dependent tyrosine phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells [17]. In this study, we set out to investigate the possible molecular link between the GR and ZAP-70. We demonstrate here, that after short term, high dose DX treatment GR co-precipitates with ZAP-70. We also confirmed the close relation of these two molecules upon DX treatment in the submembrane compartment of the cytoplasm by confocal microscopy in Jurkat cells. Minimal association was found between ZAP-70 and the GR in DX untreated cells. This association offers a plausible explanation for the rapid GC-induced ZAP-70 tyrosine-phosphorylation as described earlier [17]. GR associating with ZAP-70 upon ligand binding, may modify latter's conformation or molecular environment, which in turn may lead to the tyrosine-phosphorylation of ZAP-70.

ZAP-70 and p56-lck are lymphocyte specific molecules, while the Hsp-90 and GR are ubiquitous. To clarify whether the association of the GR and ZAP-70 was dependent upon lymphocyte specific factors, we performed the same investigations on HeLa-trZAP-70 cells. The ligand-bound GR showed similar co-clustering with ZAP-70 in the HeLa-trZAP-70 cells than in Jurkat cells. Interestingly, we found different co-localisation patterns in Jurkat and HeLa-trZAP-70 cells. While the co-clustering of the two molecules in Jurkat cells occurred in the submembrane compartment, in HeLa-trZAP-70 cells perinuclear co-localisation was observed. Presumably in Jurkat cells, where

the TcR-signalling machinery is complete, ZAP-70 is directed towards the membrane during the signal transduction processes. In HeLa cells, where the transgenic expressed ZAP-70 is somewhat incompatible, the partner molecules sorting for membrane orientation are absent. Based on this we conclude that the molecular association between the liganded GR and the ZAP-70 is independent of lymphocyte specific factors, but takes place in distinct cellular compartments.

Hsp-90 is a molecular chaperone which associates with several other proteins [2]. We found, that ZAP-70 is associated with Hsp-90 in both Jurkat and transgenic HeLa cells. Similarly to this, others have recently shown that ZAP-70 is physically associated with Hsp-90 in B-CLL cells [23]. Although ZAP-70 is a T- and NK-cell specific molecule, it is pathologically expressed by malignant B-CLL cells, where it is associated to the activated form of Hsp-90 [23]. Castro and colleagues proposed that B-CLL cells, similarly to many other tumor cells, express the “activated” form of Hsp-90, with high ATPase activity [23], existing in multi-chaperone complexes [24], whereas normal cells express Hsp-90 in its non-activated form, which does not associate with ZAP-70 [23]. Our results here show that the association of ZAP-70 with the Hsp-90 was independent from the presence or absence of the GR agonist, but it could be abrogated with the Hsp-90 antagonist GA. As Jurkat cells are of malignant origin, the ZAP-70–Hsp-90 association might represent a new aspect of the leukemic phenotype. It is accepted that the GR dissociates from the Hsp-90 after ligand binding [3]. Here we describe the ligand-dependent association of GR to ZAP-70, which cannot be blocked by GA. Based on these data, we conclude that Hsp-90 complexes a lot of client proteins in the cytoplasm, both ligand-free GR and ZAP-70 among others. When GR ligand is present, the ZAP-70–GR association increases and becomes Hsp-90 independent. We hypothesise that ZAP-70 might exist in two forms in the cytoplasm of Jurkat cells, depending on its association with Hsp-90. It appears that there is a relatively constant amount of ZAP-70 bound to Hsp-90, which is not affected by GR agonist treatment and therefore possibly is not involved in the rapid GR-induced phosphorylation events. The non-Hsp-90 bound ZAP-70 fraction, on the other hand, would associate with the ligand-bound GR and, consequently, may be involved in the cross talk between the TcR and GR signalling pathways. If we take into consideration the findings of Castro and colleagues [23], we can also speculate that the fraction of ZAP-70 that associates to the “activated” Hsp-90 molecules present in the cytoplasm may represent an inactive molecular fraction.

In conclusion, the results of our past [17] and present work suggest the existence of a hitherto unknown function of ZAP-70: it is poised at the junction between the GR and TcR signal transduction pathways which may also be affected by the chaperone Hsp-90. However, the exact roles of ZAP-70, p56-lck, GR, and Hsp-90 in the balance between these events need further elucidation.

Acknowledgments

Thanks to György Sétáló Jr. and Gergely Berta (University of Pécs, Department of Medical Biology), Endre Kiss, and János Matkó (Eötvös Lóránd University, Department of Immunology) for helping by confocal microscopy. The Olympus Fluoview-1000 system we used at the Department of Medical Biology was supported by Grant GVOP-3.2.1-2004-04-0172/3.0 to Pécs University. Thanks to Péter Balogh and Judit Pongrácz for critically reading the manuscript. Thanks to Mrs. Lászlóné Pápa and Mrs. Attiláné Melczer for the excellent technical assistance.

References

- [1] R.M. Losel, E. Falkenstein, M. Feuring, A. Schultz, H.-C. Tillmann, K. Rossol-Haseroth, M. Wehling, Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 965–1016.
- [2] P. Csermely, T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka, G. Nardai, The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review, *Pharmacol. Ther.* 79 (1998) 129–168.
- [3] W.B. Pratt, E.R. Sanchez, E.H. Bresnick, S. Meshinch, L.C. Scherrer, F.C. Dalman, M.J. Welsh, Interaction of the glucocorticoid receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: an evolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation, *Cancer Res.* 49 (1989) 2222s–2229s.
- [4] J.M. Berg, DNA binding specificity of steroid receptors, *Cell* 57 (1989) 1065.
- [5] B.M. Necela, J.A. Cidlowski, Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1 (2004) 239–246.
- [6] E.D. Hall, J.E. Springer, Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal, *NeuroRx* 1 (2004) 80–100.
- [7] A.F.T. Brown, D. McKinnon, K. Chu, Emergency department anaphylaxis: a review of 142 patients in a single year, *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (2001) 861.
- [8] K.L. Drain, G.W. Volcheck, Preventing and managing drug-induced anaphylaxis, *Drug Saf.* 24 (2001) 843–853.
- [9] E. Baus, F. Andris, P.M. Dubois, J. Urbain, O. Leo, Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes, *J. Immunol.* 156 (1996) 4555–4561.
- [10] F. Van Laethem, E. Baus, L.A. Smyth, F. Andris, F. Bex, J. Urbain, D. Kioussis, O. Leo, Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 803–814.
- [11] F. Van Laethem, X. Liang, F. Andris, J. Urbain, M. Vandenbranden, J.-M. Ruysschaert, M.D. Resh, T.M. Stulnig, O. Leo, Glucocorticoids alter the lipid and protein composition of membrane rafts of a murine T cell hybridoma, *J. Immunol.* 170 (2003) 2932–2939.
- [12] F. Buttigereit, A. Scheffold, Rapid glucocorticoid effects on immune cells, *Steroids* 67 (2002) 529–534.
- [13] G. Akner, K. Mossberg, A.C. Wikstrom, K.G. Sundqvist, J.A. Gustafsson, Evidence for colocalization of glucocorticoid receptor with cytoplasmic microtubules in human gingival fibroblasts, using two different monoclonal anti-GR antibodies, confocal laser scanning microscopy and image analysis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39 (1991) 419–432.
- [14] T. Schnaider, J. Somogyi, P. Csermely, M. Szamel, The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signaling events of T-lymphocyte activation, *Cell Stress Chaperon.* 5 (2000) 52–61.
- [15] A.C. Chan, D.M. Desai, A. Weiss, The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction, *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 555–592.
- [16] M. Lowenberg, J. Tuynman, J. Bilderbeek, T. Gaber, F. Buttigereit, S. van Deventer, M. Peppelenbosch, D. Hommes, Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn, *Blood* 106 (2005) 1703–1710.
- [17] D. Bartis, F. Boldizsar, M. Szabo, L. Palinkas, P. Nemeth, T. Berki, Dexamethasone induces rapid tyrosine phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98 (2006) 147–154.
- [18] F. Bovia, P. Salmon, T. Matthes, K. Kvell, T.H. Nguyen, C. Werner-Favre, M. Barnet, M. Nagy, F. Leuba, J.-F. Arrighi, V. Piguet, D. Trono, R.H. Zubler, Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors, *Blood* 101 (2003) 1727–1733.
- [19] K. Kvell, T.H. Nguyen, P. Salmon, F. Glauser, C. Werner-Favre, M. Barnet, P. Schneider, D. Trono, R.H. Zubler, Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors, *Mol. Ther.* 12 (2005) 892–899.
- [20] U. O'Doherty, W.J. Swiggard, M.H. Malim, Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding, *J. Virol.* 74 (2000) 10074–10080.
- [21] T. Berki, G. Kumanovics, A. Kumanovics, A. Falus, E. Ujhelyi, P. Nemeth, Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody, *J. Immunol. Methods* 214 (1998) 19–27.
- [22] F. Boldizsar, T. Berki, A. Miseta, P. Nemeth, Effect of hyperglycemia on the basal cytosolic free calcium level, calcium signal and tyrosine phosphorylation in human T-cells, *Immunol. Lett.* 82 (2002) 159–164.
- [23] J.E. Castro, C.E. Prada, O. Loria, A. Kamal, L. Chen, F.J. Burrows, T.J. Kipps, ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 106 (2005) 2506–2512.
- [24] A. Kamal, L. Thao, J. Sensintaffar, L. Zhang, M.F. Boehm, L.C. Fritz, F.J. Burrows, A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors, *Nature* 425 (2003) 407–410.

Available online at www.sciencedirect.com

Immunobiology 213 (2008) 39–50

Immunobiology

www.elsevier.de/imbio

Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis

László Pálinkás, Gergely Talabér, Ferenc Boldizsár*, Domokos Bartis,
Péter Németh, Timea Berki

Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7643 Pécs, Hungary

Received 22 September 2006; received in revised form 24 May 2007; accepted 22 June 2007

Abstract

Glucocorticoid hormone (GC) production by thymic epithelial cells influences TcR signalling in DP thymocytes and modifies their survival. In the present work, we focused on exploring details of GC effects on DP thymocyte apoptosis with or without parallel TcR activation in AND transgenic mice, carrying TcR specific for pigeon cytochrome C, *in vivo*. Here we show that the glucocorticoid receptor (GR) protein level was the lowest in DP thymocytes, and it was slightly down-regulated by GC analogue, anti-CD3, PCC and combined treatments as well. Exogenous GC analogue treatment or TcR stimulation alone lead to marked DP cell depletion, coupled with a significant increase of early apoptotic cell ratio (AnnexinV staining), marked abrogation of the mitochondrial function in DP cells (CMXRos staining), and significant decrease in the Bcl-2^{high} DP thymocyte numbers, respectively. On the other hand, the simultaneous exposure to these two proapoptotic signals effectively reversed all the above-described changes. The parallel analysis of CD4 SP cell numbers, AnnexinV, CMXRos, Bcl-2 and GR stainings revealed, that the GR and TcR signals were not antagonistic on the mature thymocytes. These data provide experimental evidence in TcR transgenic mice, *in vivo*, that when TcR activation and GR signals are present simultaneously, they rescue double positive thymocytes from programmed cell death. The two separate signalling pathways merge in DP thymocytes at such important apoptosis regulating points as the Bcl-2 and GR, showing that their balanced interplay is essential in DP cell survival.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Glucocorticoid hormone (GC); Glucocorticoid receptor (GR); Double positive (DP) thymocytes; Apoptosis; Mutual antagonism; Bcl-2

Introduction

The production of immunocompetent (self MHC restricted, tolerant) T lymphocytes is a key element for the balanced function of the immune system (Klein and Hořejší, 1997). The special microenvironment of the

thymus has a central role in this process (Ladi et al., 2006). The complex meshwork of thymic stromal cells is composed of thymic epithelial cells, macrophages, dendritic cells and fibroblasts, providing a vast surface for direct cell-cell interactions and producing soluble factors regulating thymocyte development, intrathymic migration and selection processes (Anderson and Jenkinson, 2001). Key molecular players in cell-cell interactions are adhesion molecules, chemokine recep-

*Corresponding author. Tel.: +36 72 536 288; fax: +36 72 536 289.
E-mail address: fboldizsar@hotmail.com (F. Boldizsár).

tors (Savino et al., 2004), Wnt (Pongracz et al., 2003) and MHC (Klein and Kyewski, 2000) molecules.

Thymocyte maturation proceeds through well-defined stages in the thymus, characterised by the sequential expression of T-cell specific surface molecules, including T-cell receptor (TcR), CD3, CD4 and CD8 (Res and Spits, 1999). Bone marrow progenitors are committed to the T-cell direction as a result of Notch-1 receptor signalling (Radtke et al., 2004), and become double negative (DN) thymocytes with no cell surface TcR, CD3, CD4 and CD8, respectively. After successful rearrangement in the α and β TcR gene loci, the developing cells reach the double positive (DP): CD4+, CD8+, TCR+, CD3+ stage, and are selected on the basis of the signal transducing capability and antigen specificity of their TcR (Sebzda et al., 1999). DP thymocytes expressing a TcR with subthreshold avidity die by neglect (Starr et al., 2003). Thymocytes that express a TcR with high avidity for self peptides presented on self MHC molecules are eliminated by activation induced apoptosis (negative selection) (Starr et al., 2003). Cells recognising self MHC bound peptides with medium to low avidity survive (positive selection) (Starr et al., 2003). As a result of these selection processes, a self MHC-restricted and self-tolerant naive T cell repertoire is formed, to be distributed in the peripheral lymphoid organ compartments (Starr et al., 2003).

Several soluble factors are produced locally by the thymic stromal cells, including glucocorticoid hormone (GC) (Lechner et al., 2000). Lymphoid cells, especially the DP thymocytes, are highly sensitive to GC induced apoptosis (Cohen, 1992; Blomgren and Andersson, 1970), but the molecular mechanism(s) in the background are still to be elucidated. Paradoxically, low-to-moderate concentrations of GCs antagonise TcR-mediated apoptosis via the glucocorticoid receptor (GR) ("mutual antagonism theory") (Vacchio et al., 1999). On the other hand, the role of the GR in thymic differentiation processes was questioned by works on GR-knockout and GR dimerisation mutant mice where there was no abnormality in T cell development and selection (Godfrey et al., 2000).

Apoptosis is a central element in eliminating the non-functional or potentially self-reactive T-cell clones during thymic maturation. Programmed cell death is a universal chain of events, leading to the cleavage of genomic DNA and the fragmentation of the cells (Hengartner, 2000). Early steps of apoptosis include the loss of membrane phosphatidylserine asymmetry (Vermes et al., 1995) and the activation of upstream caspases (caspase-8 and -10) (Ho and Hawkins, 2005). The central or mitochondrial phase integrates various apoptotic stimuli, and initiates the effector caspases (caspase-9, -3, -6, and -7), mainly through the release of cytochrome C to the cytoplasm (Hengartner, 2000).

Although GC induced apoptosis in thymocytes has been known for a long time, we still do not have an integrated picture of the underlying molecular events. However, several details have been elucidated in the last decade (Frankfurt and Rosen, 2004). Most of the works agree that for apoptosis induction the liganded GR has to translocate to the nucleus, where it acts as a transcription factor, binding to GRE sequences in GC responsive genes. However, recent work by Sionov et al. (2006) showed that mitochondrial translocation, rather than nuclear translocation, of the GR plays a key role in determining GC sensitivity of cells. GC exposure leads to Ca^{2+} -mobilisation, Src and Cdk2 activation, together with phosphatidylinositol-specific phospholipase C phosphorylation, and activation of acidic sphingomyelinase (Smase) with subsequent ceramide generation (Marchetti et al., 2003; Granes et al., 2004). The mitochondrial pro-apoptotic members of the Bcl-2 protein family Bax, tBid, Bim, and Bak are involved in the downstream effector mechanisms (Almawi et al., 2004). The mitochondrial membrane potential decreases, and cytochrome C and Smac/Diablo are released to the cytoplasm leading to the activation of caspase-9 and -3 and endonucleases (Zhang et al., 2000).

The Bcl-2 protein, a member of the anti-apoptotic BH1-4 subfamily, was demonstrated to play a critical role in thymocyte survival, especially at the stage of death by neglect (Zhang et al., 2000). Bcl-2 over-expressing T-cell hybridoma is resistant to GC induced apoptosis (Memon et al., 1995).

Our previous *in vivo* observations have provided *in vivo* evidence in both normal, Balb/c and AND TcR transgenic mice that the four major thymocyte subpopulations (DN, DP, CD4 SP and CD8 SP cells) have different GC sensitivities (Berki et al., 2002; Boldizsar et al., 2003). We demonstrated that the DP cells are the most sensitive to GCs, although they have the lowest GR expression, suggesting the possible participation of non-genomic GC actions in thymocyte development (Berki et al., 2002). We also found that TcR stimulation-induced apoptosis could successfully be inhibited with synthetic GC analogue treatments, in both Balb/c (Berki et al., 2002) and AND TcR transgenic mice (Boldizsar et al., 2003), resulting in a higher ratio of positively selected CD4+ SP cells, providing further *in vivo* evidence for the role of GCs in the positive selection processes (Boldizsar et al., 2003).

In our present work, we further investigate the role of GCs in the apoptosis of thymocytes during the selection processes in the transgenic PCC specific TcR bearing AND mouse model. We characterised the apoptotic processes of thymocytes upon simultaneous or separate activation through TcR and GR by analysing phosphatidylserine translocation to the outer cell membrane layer and mitochondrial membrane potential changes as two early parameters of apoptosis and correlated these

features with the expression of Bcl-2 and GR in the DP and CD4 SP subsets, respectively.

Materials and methods

Mice

We used 3–4-week-old (10 g body weight) B10.Cg-TgN (TcR AND) 53Hed (AND) pigeon cytochrome C specific I-E^k (MHC-II) restricted V β 3, V α 11 TcR transgenic mice (a generous gift from Zsuzsanna Szondi from the University of Debrecen, Hungary). Mice were kept under conventional conditions and were provided with pelleted rodent chow and acidified water ad libitum. The animal experiments were carried out in accordance with the regulations set out by the University's Committee on Animal Experimentations (#BA 02/2000-2/2006).

Treatment of animals and thymocyte preparation

The first group of AND mice were injected i.p. with 40 µg Pigeon Cytochrome C (PCC, Sigma) dissolved in 100 µl PBS once per day for 2 days. Another group of mice received monoclonal anti-CD3 antibody (50 µg/animal) once 24 h before sacrifice. The third group of mice was treated 10 mg/kg body weight Dexamethasone (DX) i.p. dissolved in 100 µl PBS 4 h before sacrifice. The fourth group of mice was injected with PCC for 2 days and DX 4 h before sacrifice. The fifth group of mice received anti-CD3 24 h before and DX 4 h before the sacrifice. Control mice received only PBS. Isolated thymi were homogenised in PBS with a glass/glass homogeniser. The suspension was filtered through nylon mesh, thymocytes were washed once in PBS and then the cell number of samples was set to 10⁶ except for AnnexinV staining, where 5 × 10⁵ cells were used.

Chemicals and buffers

DX (Oradexon, Organon) (4 mg/ml stock solution) was purchased from N.V. Organon Oss Holland. Phosphate buffered saline (PBS) was used for washing and keeping cells until use. Cell surface labelling with monoclonal antibodies was carried out in binding buffer (PBS containing 0.1% NaN₃ and 0.1% BSA), cell fixation in 4% paraformaldehyde (PFA) solution and permeabilisation buffer (PBS containing 0.1% NaN₃, 0.1% BSA and 0.1% saponin) was used for intracellular labelling. Annexin V labelling was performed in Annexin binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂). Propidium iodide (PI) was purchased from Sigma. CMX-ROS was obtained from Molecular Probes.

Monoclonal antibodies

We used the following monoclonal antibodies for cell surface labelling: phycoerythrin (PE) conjugated rat anti-mouse CD4 (clone# L3T4, BD Pharmingen, CA), CyChrome (CyC) conjugated rat anti-mouse CD8 (clone# Ly-2, BD Pharmingen, CA) and FITC conjugated anti-mouse CD4 (clone# YTS 191.1). Intracellular GR labelling was performed with FITC conjugated mouse anti-GR antibody (clone # 5E4-B1) developed in our laboratory (Berki et al., 1998). For apoptosis analysis, we used FITC conjugated AnnexinV (BD Pharmingen, CA) and anti-Bcl-2 antibody (BD Pharmingen, CA). For *in vivo* CD3 stimulation mice were injected i.v. with 50 µg hamster anti-mouse CD3 antibody (clone #145.2C11) per recipient.

Thymocyte fluorescent cell surface labelling

For the simultaneous detection of cell surface CD4 and CD8 double labelling technique was used. Briefly, thymocyte samples (10⁶) were incubated with monoclonal antibody cocktails for 30 min in 100 µl binding buffer on ice, then washed twice in PBS, and finally resuspended in 500 µl 0.1% buffered PFA in PBS. For the detection of early apoptotic thymocytes Annexin V – FITC staining was performed. Briefly, samples were incubated with Annexin V – FITC for 20 min in 100 µl Annexin binding buffer at room temperature, then diluted with 400 µl Annexin binding buffer, immediately followed by flow cytometric measurement.

Intracellular cell labelling

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 (10⁶) 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 and FITC-conjugated anti-Bcl-2 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 µl 0.1% PFA in PBS.

CMXRos

CMXRos is a lipophilic cationic fluorescent dye that is sequestered in active mitochondria because of their negative mitochondrial membrane potential (Pendergrass et al., 2004), therefore living cells show high CMXRos fluorescence at (CMXRos^{high}). Since apoptotic cells lose their mitochondrial membrane potential (Ly et al.,

2003), CMXRos staining of mitochondria decreases (CMXRos^{low}). The lower CMXRos^{high} cell ratio indicates the loss of mitochondrial membrane potential, i.e. the presence of mitochondrial type of apoptosis (Pendergrass et al., 2004). 10 µl CMX-ROS stock solution (1 µg/ml in DMSO) was added to 10⁶ cells in 1 ml 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.

Flow cytometric acquisition and analysis

Samples were measured and analysed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), using the CellQuest software. The thymocytes were gated according to their size and granularity on forward and side scatter dot plots. The gate set on untreated control living thymocytes was used for the analysis of all samples, thus excluding cells with abnormal morphology that are mostly apoptotic (Curnow et al., 1994). Thymocyte subpopulations resolved according to their CD4-PE/CD8-CyChr fluorescence parameters were separately analysed for AnnexinV-FITC, anti-GR-FITC and anti-Bcl-2-FITC fluorescence in FL1 channel. We used fluorescent histogram plots for both comparing the MFIs of different samples and for calculating the ratio of positively stained cells.

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

GR expression in AND DP and CD4 SP thymocytes and its regulation by *in vivo* DX, anti-CD3, PCC and combined treatments

In our previous works we have shown that the GR expression differs in the four main thymocyte subpopulations of Balb/c mice (Berki et al., 2002; Boldizsár et al., 2006). In the present work, we wished to determine the GR expression levels of the 4 thymocyte subpopulations (DN, DP, CD4 SP, CD8 SP) in young (3–4-week old) AND mice (Fig. 1) by intracellular flow cytometric labelling with anti-GR-FITC antibody. Thymocyte subpopulations were distinguished based on their cell surface CD4 (FL2 channel) and CD8 (FL3 channel) expression (Fig. 1A). The mean fluorescence intensity (MFI) was 160.5±17.7 in the DN cells (Fig. 1A, upper left histogram; Fig. 1B), 55.9±2.8 in DP cells (Fig. 1A, upper right histogram; Fig. 1B), 94.6±15.1 in the CD4

SP cells (Fig. 1A, lower left histogram; Fig. 1B) and 91.8±17.2 in the CD8 SP cells (Fig. 1A, lower right histogram; Fig. 1B). The GR MFI values of CD4- or CD8 SP cells were significantly higher (*P*<0.05) than in the DP cells, and significantly lower (*P*<0.05) than in the DN cells (Fig. 1B).

In recent works we have also shown that GCs participate in the autoregulation of the GR expression in Balb/c thymocytes (Boldizsár et al., 2006). As TcR signalling was demonstrated to interact with the GR signalling (Iwata et al., 1991), we examined the GR expression changes in the DP and CD4+ SP thymocyte populations of AND TcR transgenic mice after exposure to the cognate antigen (PCC), anti-CD3, DX and combined treatments (Fig. 2). In the DP cells we found a significant decrease of GR expression (*P*<0.05) after the administration of PCC (MFI: 33.3±4.7), anti-CD3 (MFI: 38.3±7.5), DX (MFI: 38.1±7.4), PCC+DX (MFI: 42.2±6.2) and anti-CD3+DX combination (MFI: 33.3±0.3) compared to the control animal (MFI: 55.9±2.8) (Fig. 2A and C).

In CD4 SP cells we detected significantly (*P*<0.05) lower GR levels in PCC, DX and anti-CD3+DX treated animals (MFI: 55±7.7, 51.1±12.2 and 61.8±11.1, respectively) compared to the control mice (MFI: 94.6±15.1) (Fig. 2B and D). There was no significant change in the GR level of CD4 SP cells after anti-CD3 and PCC+DX treatments (MFI: 72.4±15.7 and 72.1±14.7, respectively) compared to the control (MFI: 94.6±15.1) (Fig. 2B and D).

Cell number changes in thymus after DX, anti-CD3, PCC and combined treatments

As has been established previously, DX treatment or TcR engagement either with antigen or anti-CD3 antibody results in thymic cell depletion both in Balb/c (Berki et al., 2002) and AND TcR transgenic mice (Boldizsár et al., 2003). In the present experiments we found that total thymus cell numbers significantly decreased (*P*<0.05) after anti-CD3 (50.3±8.7 million), DX (41±3.6 million) and combined PCC+DX (58.3±16.1 million) or anti-CD3+DX (50.7±4 million) treatments, and markedly but not significantly after PCC (81.7±7.6 million) treatment alone, compared to control (108.3±18.9 million), respectively (Table 1).

Previously we, as well as others, have shown that the DP population is the most sensitive thymocyte subgroup for DX induced cell depletion (Berki et al., 2002; Boldizsár et al., 2006). We have also reported that the DX-induced DP cell elimination can be antagonised by simultaneous TcR engagement *in vivo* either with anti-CD3 treatment in Balb/c mice (Berki et al., 2002) or with antigen treatment in TcR transgenic mice (Boldizsár et al., 2003). In the current work we also found that in

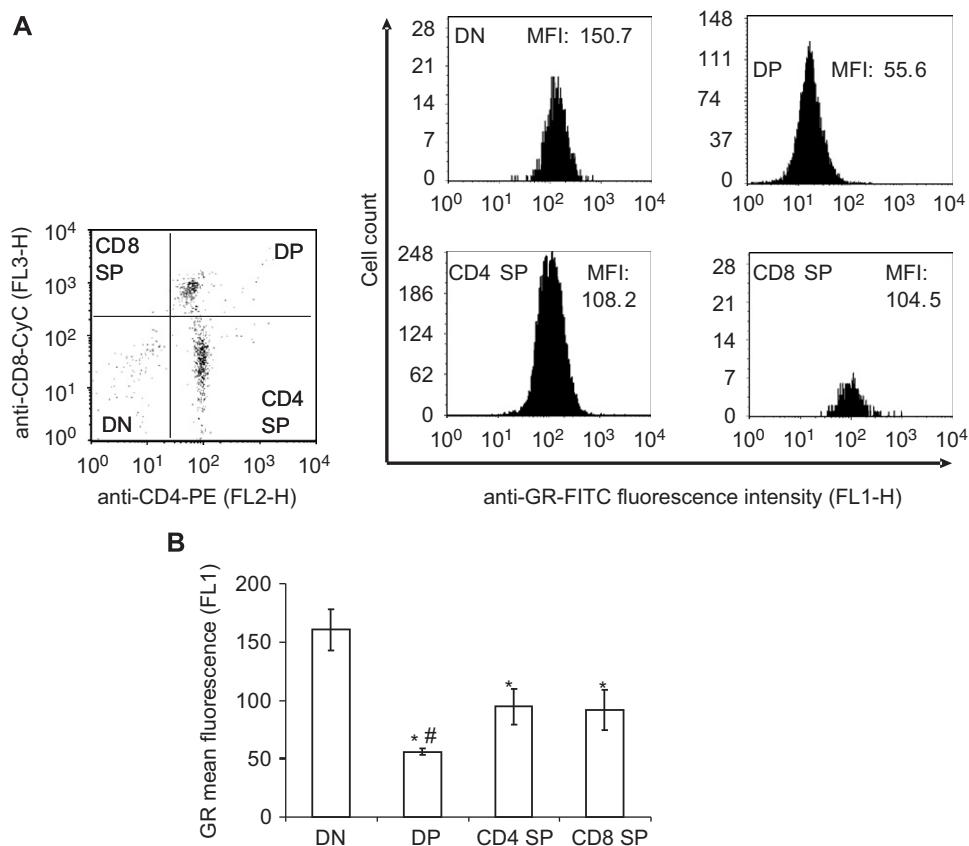


Fig. 1. GR expression of the four major thymocyte subpopulations. (A) Typical distribution of the four major thymocyte subpopulations are shown on the two-dimensional fluorescent dot-plot. Flow cytometric histograms show the typical GR expression, as fluorescence intensities in the four thymocyte populations. (B) Bars represent the average GR expression (MFI) \pm SD in the different thymic cell populations calculated from the data of three transgenic mice (* $P < 0.05$ – compared to DN; # $P < 0.05$ – compared to CD4 SP and CD8 SP).

TcR transgenic mice all treatment modalities led to a significant ($P < 0.05$) DP cell number decrease, except for the PCC treatment alone (Fig. 3A). DP cell number was 25.3 ± 5.9 million in control animals, 23.2 ± 8.7 million in PCC treated mice, 3.4 ± 0.7 million in anti-CD3 treated mice, 1.5 ± 0.1 million in DX treated mice, 10.6 ± 2 million in PCC + DX treated mice and 10.5 ± 2.7 million in anti-CD3 + DX treated mice (Fig. 3A). However, the simultaneous PCC or anti-CD3 treatment with DX led to significantly ($P < 0.05$) increased survival of DP thymocytes compared to DX treatment alone (10.6 ± 2 million or 10.5 ± 2.7 million DP cells versus 1.5 ± 0.1 million DP cells, respectively) (Fig. 3A).

In AND TcR transgenic mice there is an inherent bias towards the CD4 SP direction in thymic T-cell development (Kaye et al., 1989), resulting in high CD4 SP ratio compared to Balb/c mice. We found that the number of CD4 SP cells decreased significantly ($P < 0.05$) after each treatment modality (control: 72.1 ± 12.6 million, PCC: 54 ± 5.1 million, anti-CD3: 39.9 ± 6.9 million, DX: 34.4 ± 3 million, PCC + DX: 44.6 ± 12.3 million and anti-CD3 + DX: 34.4 ± 2.8 million CD4 SP cells, respectively) (Fig. 3B).

Annexin V staining of DP and CD4 SP thymocytes

Annexin V is a phospholipid binding protein that selectively binds phosphatidyl-serine molecules (PS) (Vermes et al., 1995). Under physiological conditions PS can only be found in the inner membrane layer of intact cells. As one of the first step on the road leading to apoptosis, this membrane-asymmetry changes, and PS appears in the outer membrane phospholipid layer, too (Vermes et al., 1995). We found that from $4.5 \pm 0.6\%$ in control AND TcR transgenic mice (Fig. 4A and C) the ratio of Annexin V^{high} DP thymocytes increased significantly ($P < 0.05$) to $29.2 \pm 15.4\%$, $27.6 \pm 10.3\%$ or $30.8 \pm 2.4\%$ after PCC, anti-CD3 or DX treatments, respectively (Fig. 4A and C). Although the combined treatments also caused a significant increase ($P < 0.05$) in the Annexin V^{high} DP cell ratio compared to the control ($4.5 \pm 0.6\%$), co-treatment with PCC ($18.9 \pm 2.1\%$) or anti-CD3 ($21.6 \pm 1.7\%$) significantly ($P < 0.05$) inhibited the proapoptotic effect of DX treatment alone ($30.8 \pm 2.4\%$) (Fig. 4A and C).

In contrast in CD4 SP population we could not detect significant changes in the ratio of Annexin V^{high} cells

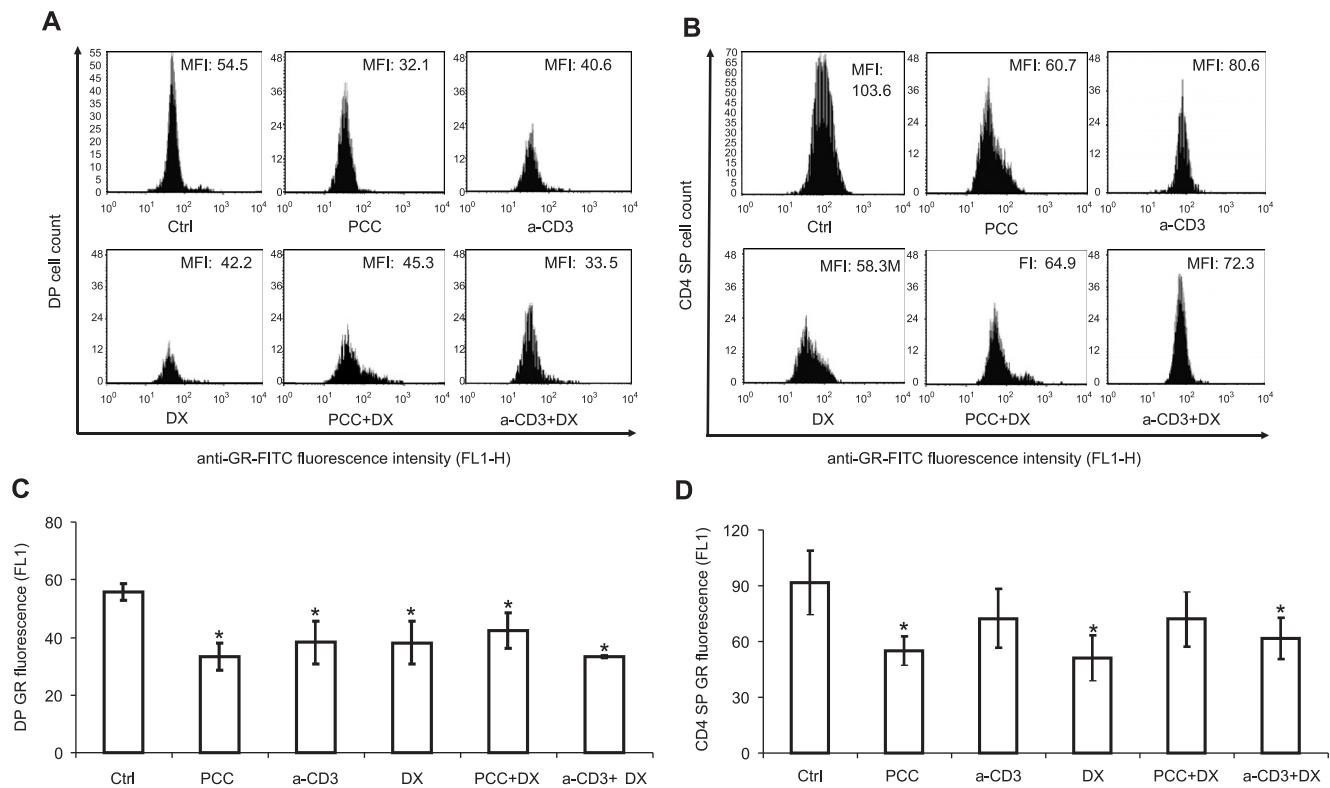


Fig. 2. GR expression changes in DP (A) and CD4 SP (B) cells after PCC, anti-CD3, DX or combined treatments characterised by flow cytometry. Fluorescent histogram plots with mean fluorescent intensity values show the anti-GR-FITC fluorescence from a representative experiment. Bars represent the mean GR fluorescence intensities \pm SD of DP (C) and CD4 SP (D) cells calculated from the data of three animals in each test group (* $P < 0.05$).

Table 1. Average of total thymocyte number ($\times 10^6$) \pm SD after different treatments

	Ctrl	PCC	a-CD3	DX	PCC + DX	a-CD3 + DX
Cell number (million)	108.3	81.7	50.3*	41*	58.3*	50.7*
SD	18.9	7.6	8.7	3.6	16.1	4

Each test group consisted of three animals of a representative experiment. * $P < 0.05$.

after PCC ($5 \pm 2.8\%$) or anti-CD3 and DX combined treatments ($4.5 \pm 2.1\%$) compared to control ($2.4 \pm 0.3\%$) (Fig. 4B and D). However, we found significantly ($P < 0.05$) higher ratio of early apoptotic cells after anti-CD3 ($4.9 \pm 0.4\%$), DX ($7.6 \pm 2.3\%$) and combined PCC and DX ($7.5 \pm 1.4\%$) treatments (Fig. 4B and D).

Changes in the mitochondrial function of DP and CD4 SP cells

Mitochondria play a pivotal role in the integration of various apoptotic signals and also in the central effector phase of apoptosis (Wang, 2001). As CMXRos is a useful means for monitoring the mitochondrial status (Pendergrass et al., 2004), we stained thymocytes with

this mitochondrial membrane potential sensitive dye to study the effects of the various treatments in the different thymocyte populations. The CMXRos^{high} DP cell ratio significantly decreased ($P < 0.05$) after PCC ($8.8 \pm 2.1\%$), anti-CD3 ($1.1 \pm 0.2\%$), DX ($0.6 \pm 0.1\%$), PCC + DX ($5.3 \pm 0.2\%$) and anti-CD3 + DX ($5 \pm 1.1\%$) treatments compared to control ($21.2 \pm 5.2\%$) (Fig. 5A and C). However, after combined PCC + DX or anti-CD3 + DX treatments significantly ($P < 0.05$) higher percentage of DP cells survived with intact mitochondrial function than in the DX or anti-CD3 treated animals ($5.3 \pm 0.2\%$ and $5 \pm 1.1\%$ versus $0.6 \pm 0.1\%$ and $1.1 \pm 0.2\%$, respectively) (Fig. 5C).

In the CD4 SP cell population PCC, anti-CD3, DX, PCC + DX and anti-CD3 + DX treatments caused significant ($P < 0.05$) mitochondrial membrane potential

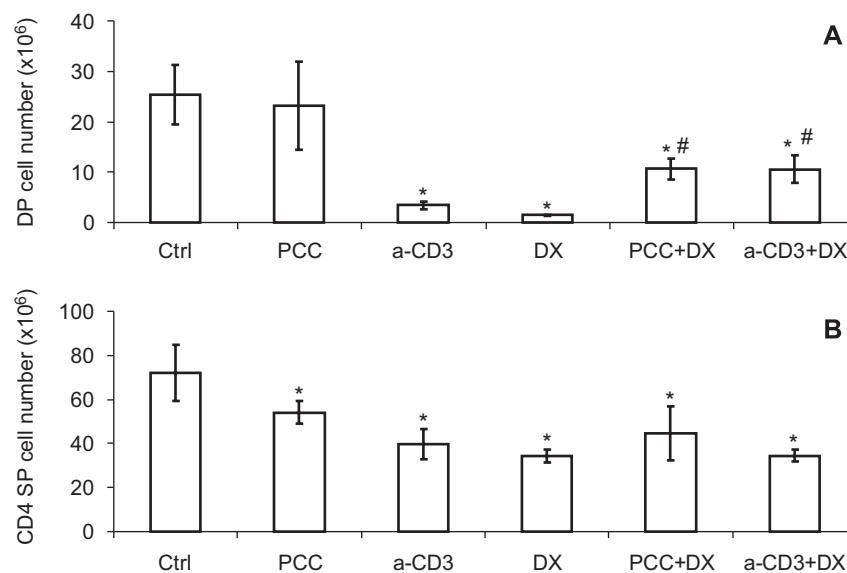


Fig. 3. Changes in the number of DP (A) and CD4 SP (B) cells after PCC, anti-CD3, DX or combined treatments. Bars represent the average numbers ($\times 10^6$) \pm SD calculated from the data of three animals of each test group. Note the different scales for the two different thymocyte subsets. The number of thymocyte subsets was calculated based on total cellularity and percentage of the given cell population (* $P<0.05$ – compared to control; # $P<0.05$ – compared to DX treated sample).

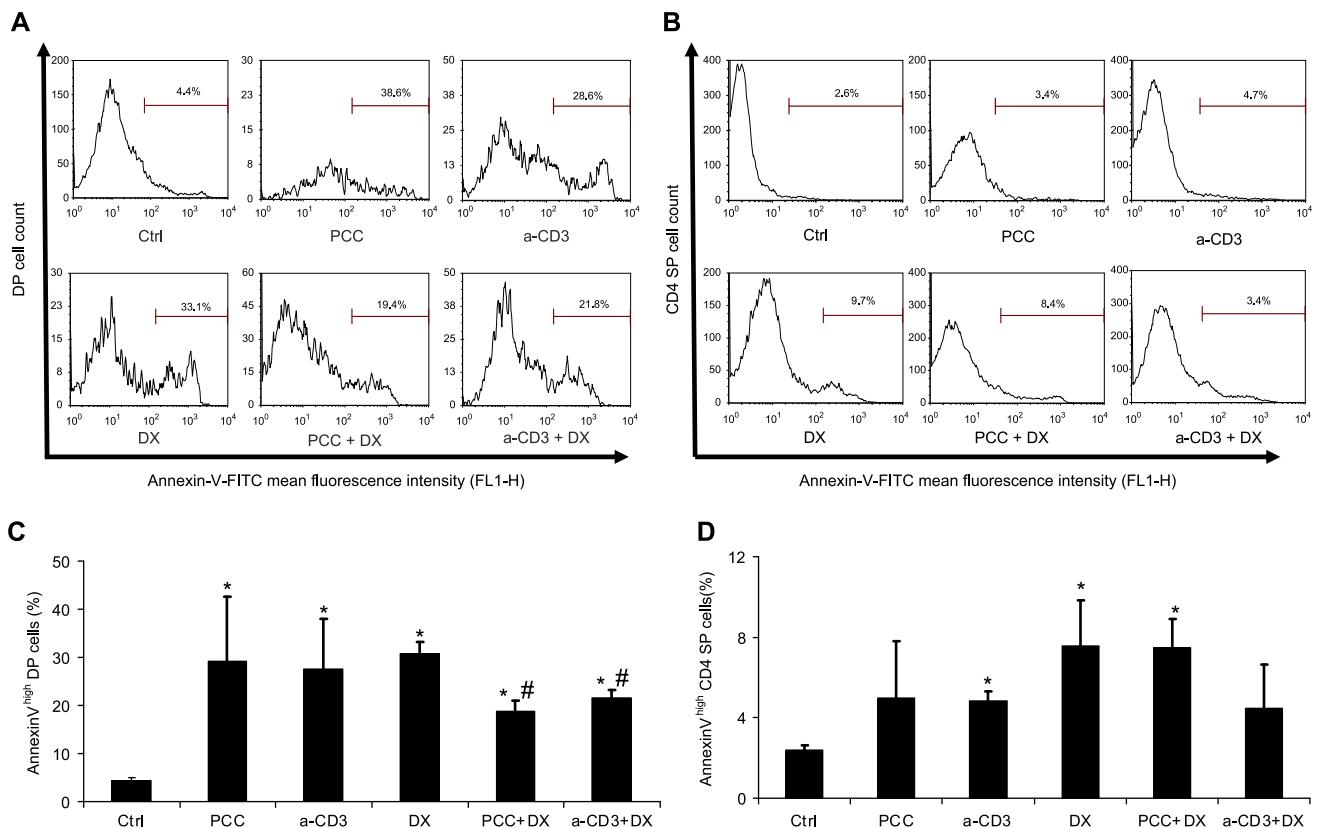


Fig. 4. The ratio of early apoptotic (Annexin V^{high}) DP and CD4 SP thymocytes after different treatments. Typical flow cytometric histogram plots show AnnexinV-FITC fluorescence intensities of the DP (A) and CD4 SP populations (B) after different treatment modalities. AnnexinV^{high} cell percentage is labelled in each histogram plot. Bars show the average Annexin V^{high} cell ratio \pm SD of DP (C) and CD4 SP populations (D) based on the data of three animals in each test group. Note the different scales for the two different thymocyte subsets (* $P<0.05$ – compared to control; # $P<0.05$ – compared to DX treated sample).

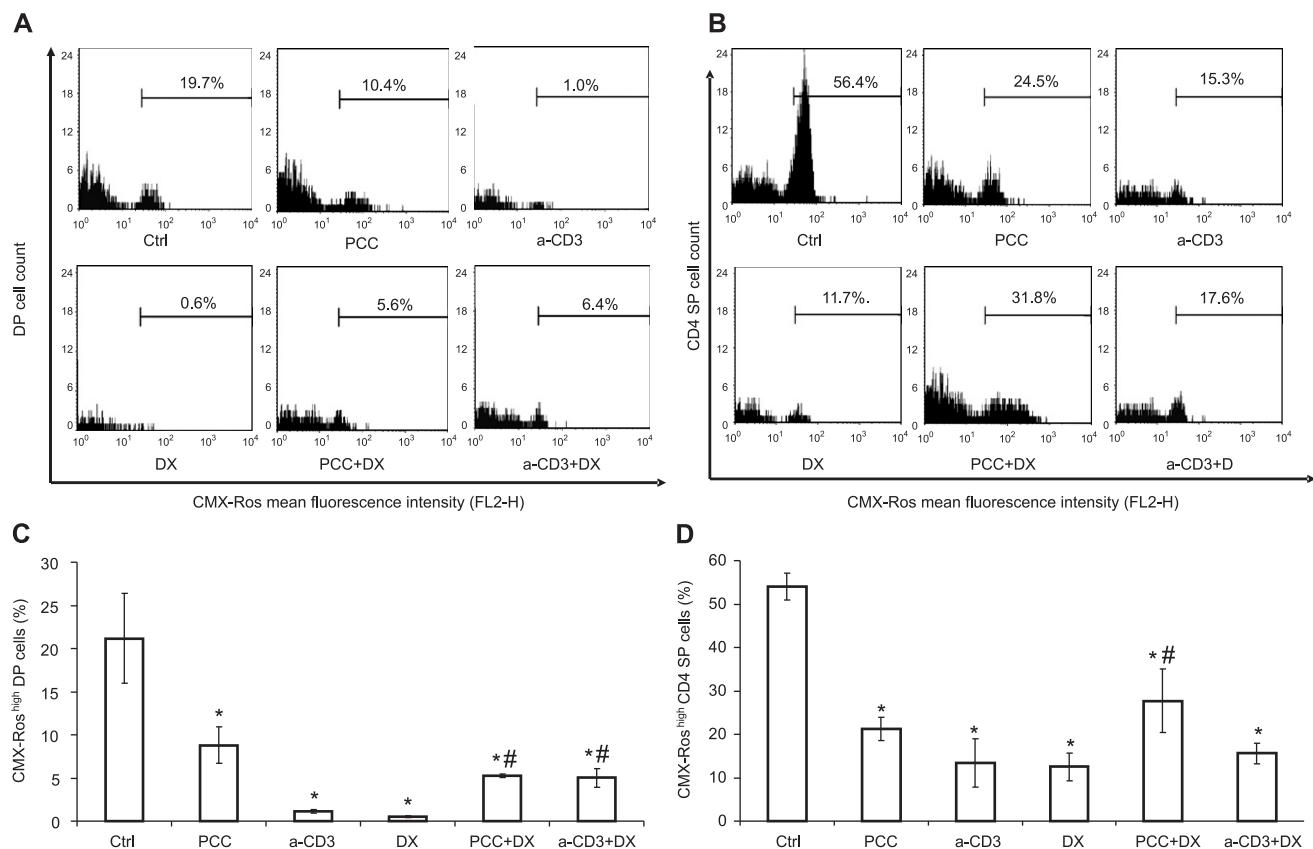


Fig. 5. Changes in mitochondrial membrane potential of DP and CD4 SP cells after PCC, anti-CD3, DX or combined treatments assessed by flow cytometry after CMX-Ros loading of thymocytes. Flow cytometric histogram plots show CMX-Ros fluorescence of the DP (A) and the CD4 SP cells (B). Percentage of CMX-Ros^{high} cells is labelled in each histogram. Bars represent the percentage of CMX-Ros^{high} (with intact mitochondria) DP and CD4 SP (D) cells \pm SD calculated from the data of three animals after different treatments. Note the different scales for the two different thymocyte subsets (* $P < 0.05$ – compared to control; # $P < 0.05$ – compared to DX treated sample).

decrease compared to the untreated control ($21.2 \pm 2.7\%$, $13.5 \pm 5.6\%$, $12.1 \pm 3.2\%$, $27.7 \pm 7.4\%$, $15.6 \pm 2.3\%$ versus $54 \pm 3\%$ CMXRos^{high} CD4 SP cells) (Fig. 5B and D). Interestingly, while PCC could effectively antagonise the DX induced mitochondrial membrane potential decrease ($27.7 \pm 7.3\%$ CMXRos^{high} CD4 SP cells in PCC+DX treated mice versus $12.1 \pm 3.2\%$ CMXRos^{high} CD4 SP cells in DX treated mice; $P < 0.05$), anti-CD3 treatment did not have such protective effect ($15.6 \pm 2.3\%$ CMXRos^{high} CD4 SP cells in anti-CD3+DX treated mice versus $12.1 \pm 3.2\%$ CMXRos^{high} CD4 SP cells in DX treated mice) (Fig. 5D).

Anti-apoptotic Bcl-2 expression

Bcl-2 protein is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family of proteins, key regulators of apoptosis (Chao and Korsmeyer, 1998). Since the Bcl-2 expression was shown to be critical in resistance to DX induced thymocyte apoptosis (Veis et al., 1993), we analysed the changes in Bcl-2^{high} DP and CD4 SP thymocyte

numbers after the different treatments. In the analysis of Bcl-2 fluorescent histogram plots (Fig. 6A and B), the ratio of those cells were calculated that had higher fluorescence intensity than the control and thus considered Bcl-2^{high} (Fig. 6A and B). We calculated the absolute number of Bcl-2^{high} cells from the ratio of Bcl-2^{high} cells (Fig. 6A and B) and the absolute cell numbers in each treatment groups (Table 1). In control AND mice 0.4 ± 0.1 million DP cells were Bcl-2^{high}. PCC+DX and anti-CD3+DX combined treatments caused significant ($P < 0.05$) rise in the number of Bcl-2^{high} DP thymocytes (2.1 ± 0.4 and 1.5 ± 0.4 million DP cells, respectively) (Fig. 6A and C), while anti-CD3 and DX treatments significantly ($P < 0.05$) decreased the numbers of Bcl-2^{high} DP thymocytes (0.1 ± 0.02 and 0.2 ± 0.02 million DP cells, respectively) (Fig. 6A and C). PCC treatment alone did not change significantly the Bcl-2^{high} DP cell number compared to the control (0.7 ± 0.3 vs. 0.4 ± 0.1 million). The DX treatment caused Bcl-2^{high} DP thymocyte number decrease could be reversed by parallel PCC or anti-CD3 treatments (0.2 ± 0.02 versus 2.1 ± 0.4 and 1.5 ± 0.4 million DP cells) (Fig. 6C).

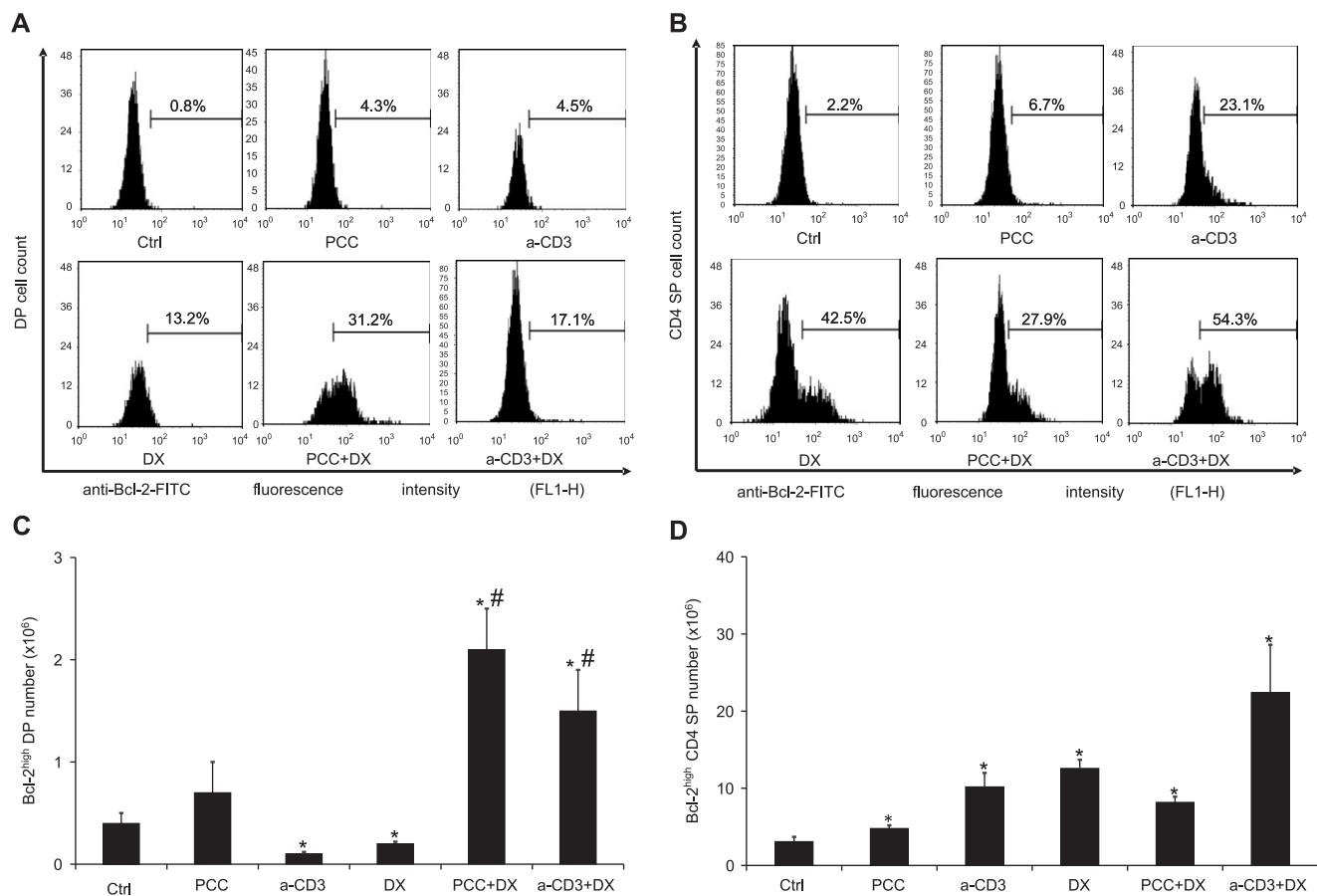


Fig. 6. Changes in the number of Bcl-2^{high} cells after PCC, anti-CD3, DX or combined treatments measured by flow cytometry. Flow cytometric histogram plots show the typical Bcl-2 fluorescence intensities of DP (A) and CD4 SP cells (B). The Bcl-2^{high} cell percentage is labelled in each histogram plot. Bars show the average number ($\times 10^6$) of Bcl-2^{high} DP (C) and CD4 SP (D) cells \pm SD calculated from three different mice in each test group. Note the different scales for the two different thymocyte subsets. The number of thymocyte subsets was calculated based on total cellularity and percentage of Bcl-2^{high} cells (* $P < 0.05$ – compared to control; # $P < 0.05$ – compared to DX treated sample).

Among CD4 SP cells 3.1 ± 0.6 million were Bcl-2^{high} in control mice. We found that all treatment modalities led to the significant ($P < 0.05$) increase of Bcl-2^{high} CD4 SP numbers, although at different scales. Bcl-2^{high} CD4 SP numbers were 4.8 ± 0.4 million after PCC, 10.2 ± 1.8 million after anti-CD3, 12.6 ± 1.1 million after DX, 8.2 ± 0.7 million after PCC + DX and 22.4 ± 6.2 million after anti-CD3 + DX treatments, respectively (Fig. 6B and D). Interestingly the DX induced increase in Bcl-2^{high} CD4 SP numbers (12.6 ± 1.1 million) was significantly decreased by parallel PCC treatment (8.2 ± 0.7 million), while it was further elevated by parallel anti-CD3 treatment (22.4 ± 6.2 million), respectively (Fig. 6D).

Discussion

The role of GCs and their receptor (GR) in thymocyte development has remained controversial to date

(Stephens et al., 2003). Although the apoptosis inducing effect of GCs is established (Cohen, 1992), their role in positive selection of DP thymocytes is still controversial (Vacchio et al., 1999).

We have described previously, that among the four major cell populations in Balb/c mice thymi, the DP cells are the most sensitive to GC induced apoptosis, despite their low GR expression (Berki et al., 2002; Boldizsár et al., 2006). When the exogenous GC treatment is coupled with TcR stimulation, either with anti-CD3 antibody or with the cognate antigen (PCC), it leads to the increased positive selection of DP thymocytes in Balb/c (Berki et al., 2002) or in AND TcR transgenic mice (Boldizsar et al., 2003), respectively.

In our present work we investigated the connection of GC hormone and its receptor in relation to apoptosis signalling, especially the early events of programmed cell death during thymic maturation and selection processes in AND TcR transgenic mice.

In this work thymic cellularity decreased significantly both upon TcR stimulation either with anti-CD3 antibody or the cognate antigen or exogenous GR agonist treatments. The DX induced cell depletion could be reversed when TcR stimulation was also present. Since in AND TcR transgenic mice DP and CD4 SP cells together represent more than 90% of total thymocyte pool, we investigated the changes in the number of these two major subpopulations. The GR agonist or the TcR engagement caused a major drop in DP cell numbers, while this cell depleting effect was less efficient on the CD4 SP mature cell population. Significantly more DP, but not CD4 SP cells survived when the GC and TcR stimulating agent was present simultaneously. On one hand these results confirm our previous work in Balb/c mice (Berki et al., 2002; Boldizsár et al., 2006), they also provide further *in vivo* evidence for the “mutual antagonism theory” (Vacchio et al., 1999; Zacharchuk et al., 1990).

In addition to determining the cell number and composition changes upon the activation of the GR and the TcR, we also followed the outer membrane lipid layer phosphatidylserine content and mitochondrial activity changes, both sensitive early signs of apoptosis (Hengartner, 2000). In DP cells the GR signalling and the TcR signalling either alone or in combination lead to increased phosphatidylserine externalisation, together with a decreased mitochondrial activity. However, we found relatively less early apoptotic DP cells from mice where the two signals were present simultaneously, compared to the single treated animals, similar to previous *in vitro* findings (Zacharchuk et al., 1990). These results clearly show, that in the case of simultaneous GR and TcR stimulation the increased survival of the DP thymocytes is due to the inhibition of early apoptotic events.

Apoptosis of thymocytes is regulated by several factors including GR and Bcl-2 expression studied in this work. In AND TcR transgenic mice we found that GR expression of DP cells was significantly lower than that of DN or mature CD4 or CD8 SP cells, similar to age matched Balb/c mice (Berki et al., 2002; Boldizsár et al., 2006). A possible explanation of the low GR expression in DP cells could be the homologous down-regulation process of the GR upon endogenous GC exposure in the local GC rich microenvironment of the thymus (Boldizsár et al., 2006). In AND mice we found that activation of either the GR or the TcR leads to further GR down-regulation. GCs have been shown to participate in the regulation of GR expression in thymocytes (Boldizsár et al., 2006) and various other cell types (Schaaf and Cidlowski, 2002). However the exact mechanism of how TcR activation induced GR down-regulation in thymocytes occurs needs to be further elucidated, while causing AP-1, NFAT, NF κ B and Elk activation (Lin and Weiss, 2001).

There is a clear discrepancy between the sensitivity of DP cells for GC, and their low level of expression of GR, indicating the possible involvement of non-genomic GC signalling mechanisms (Buttgereit and Scheffold, 2002). One possibility for how non-genomic GR action may take place is through cytoplasmic interactions of the GR with other signalling proteins (Buttgereit and Scheffold, 2002), pointing to Hsp-90, which was found to play a role in TcR signalling, by binding Lck, Raf and ERK (Schnaider et al., 2000), also involved positive selection of thymocytes (Alberolanti-Ila and Hernandez-Hoyos, 2003). Since the inactive GR is also an Hsp-90 client protein (Smith and Toft, 1993), this offers a tempting explanation of the link between GR and TcR signalling, providing a molecular basis for the “mutual antagonism theory”. Recently ZAP-70 was also found to serve as linker between TcR and GR signalling in Jurkat cells (Bartis et al., 2006, 2007).

Bcl-2 is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family of proteins comprising of both pro- and anti-apoptotic molecules. We and others have shown differential Bcl-2 expression by thymocyte subsets previously (Boldizsár et al., 2006; Ma et al., 1995). *In vitro* study using T-cell hybridoma described that Bcl-2 and Bcl-xL selectively antagonised the GC induced apoptosis (Memon et al., 1995). In this study we show that the TcR stimulus when applied together with the GR agonist increase the number of Bcl-2^{high} DP cells significantly, implying their selection advantage. It was also shown earlier that positive selection is coupled with anti-apoptotic Bcl-2 up-regulation (Linette et al., 1994; Williams et al., 2001), which could contribute to DP cell survival (Chao and Korsmeyer, 1998). One possible mechanism for Bcl-2 to enhance cell survival is that it helps preserve the mitochondrial membrane integrity by interacting with outer membrane elements (Gross et al., 1999). This activity is also in line with our present data on the protective effect of the combined treatments on the mitochondrial function.

Taken together here we provide data showing that at the DP stage of differentiation otherwise apoptotic stimuli together lead to survival of cells, in strong contrast to mature CD4 SP cells. We propose that one of the key elements in the anti-apoptotic outcome might be the Bcl-2 molecule, that is up-regulated in positively selected cells as a consequence of the simultaneous presence of TcR and GR signals, respectively.

Acknowledgements

To Zsuzsanna Szondi (University of Debrecen, Hungary) for AND mice. To Péter Balogh for critical reading of the manuscript and useful advice. To Ms. Mária Pápa and Ms. Judit Melczer for technical assistance.

References

- Alberolanti-Ila, J., Hernandez-Hoyos, G., 2003. The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol. Rev.* 191, 79–96.
- Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., Jaoude, M.M., 2004. On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 76, 7–14.
- Anderson, G., Jenkinson, E.J., 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 31–40.
- Bartis, D., Boldizsár, F., Szabó, M., Pálinkás, L., Németh, P., Berki, T., 2006. Dexamethasone induces rapid tyrosine phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98, 147–154.
- Bartis, D., Boldizsár, F., Kvell, K., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P., Monostori, E., Berki, T., 2007. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 253–258.
- Berki, T., Kumanovics, G., Kumanovics, A., Falus, A., Ujhelyi, E., Nemeth, P., 1998. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunol. Methods* 214, 19–27.
- Berki, T., Pálinkás, L., Boldizsár, F., Németh, P., 2002. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int. Immun.* 14, 463–469.
- Blomgren, H., Andersson, E., 1970. Characteristics of the immunocompetent cells in the mouse thymus: cell population changes during cortisone-induced atrophy and subsequent regeneration. *Cell. Immunol.* 1, 545–560.
- Boldizsár, F., Palinkas, L., Bartis, D., Nemeth, P., Berki, T., 2003. Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunol. Lett.* 90, 97–102.
- Boldizsár, F., Pálinkás, L., Czömpöly, T., Bartis, D., Németh, P., Berki, T., 2006. 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* 211, 785–796.
- Buttgereit, F., Scheffold, A., 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529–534.
- Chao, D.T., Korsmeyer, S.J., 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395–416.
- Cohen, J.J., 1992. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin. Immunol.* 4, 363–369.
- Curnow, S.J., Barad, M., Brun-Roubereau, N., Schmitt-Verhulst, A.M., 1994. Flow-cytometric analysis of apoptotic and nonapoptotic T-cell receptor-transgenic thymocytes following in vitro presentation of antigen. *Cytometry* 16, 41–48.
- Frankfurt, O., Rosen, S.T., 2004. Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr. Opin. Oncol.* 16, 553–563.
- Godfrey, D.I., Purton, J.F., Boyd, R.L., Cole, T.J., 2000. Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol. Today* 21, 606–611.
- Granes, F., Roig, M.B., Brady, H.J., Gil-Gomez, G., 2004. Cdk2 activation acts upstream of the mitochondrion during glucocorticoid induced thymocyte apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 34, 2781–2790.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899–1911.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776.
- Ho, P.K., Hawkins, C.J., 2005. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 272, 5436–5453.
- Iwata, M., Hanaoka, S., Sato, K., 1991. Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 21, 643–648.
- Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R., Hedrick, S.M., 1989. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 341, 746–749.
- Klein, J., Hořejší, V., 1997. Immunology. Blackwell Science.
- Klein, L., Kyewski, B., 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 179–186.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., Robey, E.A., 2006. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat. Immunol.* 7, 338–343.
- Lechner, O., Wiegers, G.J., Oliveiranti-Dos-Santos, A.J., Dietrich, H., Recheis, H., Waterman, M., Boyd, R., Wick, G., 2000. Glucocorticoid production in the murine thymus. *Eur. J. Immunol.* 30, 337–346.
- Lin, J., Weiss, A., 2001. T cell receptor signaling. *J. Cell Sci.* 114, 243–244.
- Linette, G.P., Grusby, M.J., Hedrick, S.M., Hansen, T.H., Glimcher, L.H., Korsmeyer, S.J., 1994. Bcl-2 is upregulated at the CD4+ CD8+ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1, 197–205.
- Ly, J.D., Grubb, D.R., Lawen, A., 2003. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8, 115–128.
- Ma, A., Pena, J.C., Chang, B., Margosian, E., Davidson, L., Alt, F.W., Thompson, C.B., 1995. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4763–4767.
- Marchetti, M.C., Di Marco, B., Cifone, G., Migliorati, G., Riccardi, C., 2003. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 101, 585–593.
- Memon, S.A., Moreno, M.B., Petrak, D., Zacharchuk, C.M., 1995. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in T cell hybridoma. *J. Immunol.* 155, 4644–4652.
- Pendergrass, W., Wolf, N., Poot, M., 2004. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 61, 162–169.
- Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G., Jenkinson, E.J., 2003. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 33, 1949–1956.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J., MacDonald, H.R., 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5, 247–253.
- Res, P., Spits, H., 1999. Developmental stages in the human thymus. *Semin. Immunol.* 11, 39–46.

- Savino, W., Mendes-Danti-Cruz, D.A., Smaniotti, S., Silvanti-Monteiro, E., Villanti-Verde, D.M., 2004. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* 75, 951–961.
- Schaaf, M.J., Cidlowski, J.A., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 37–48.
- Schnaider, T., Somogyi, J., Csermely, P., Szamel, M., 2000. The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signaling events of T-lymphocyte activation. *Cell Stress Chaperones* 5, 52–61.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., Ohashi, P.S., 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 829–874.
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E., 2006. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 203, 189–201.
- Smith, D.F., Toft, D.O., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 7, 4–11.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176.
- Stephens, G.L., Ashwell, J.D., Ignatowicz, L., 2003. Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire. *Int. Immunol.* 15, 623–632.
- Vacchio, M.S., Lee, J.Y., Ashwell, J.D., 1999. Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J. Immunol.* 163, 1327–1333.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229–240.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.
- Wang, X., 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922–2933.
- Williams, O., Mok, C.L., Norton, T., Harker, N., Kioussis, D., Brady, H.J., 2001. Elevated Bcl-2 is not a causal event in the positive selection of T cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 1876–1882.
- Zacharchuk, C.M., Mercep, M., Chakraborti, P.K., Simons Jr., S.S., Ashwell, J.D., 1990. Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 145, 4037–4045.
- Zhang, J., Mikecz, K., Finnegan, A., Glant, T.T., 2000. Spontaneous thymocyte apoptosis is regulated by a mitochondrion mediated signaling pathway. *J. Immunol.* 165, 2970–2974.

Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis

Gergely Talabér¹, Ferenc Boldizsár¹, Domokos Bartis¹, László Pálinskás¹, Mariann Szabó¹, Gergely Berta², György Sétáló Jr², Péter Németh¹ and Timea Berki¹

¹Department of Immunology and Biotechnology and ²Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, University of Pecs, Szigeti ut. 12, Hungary

Keywords: apoptosis, double-positive thymocytes, glucocorticoid hormone, glucocorticoid receptor, mitochondria

Abstract

Glucocorticoid receptor (GR) signaling plays an important role in the selection and apoptosis of thymocytes. Besides nuclear translocation, mitochondrial translocation of the ligand-bound GR in lymphoid cells was also shown, which might determine glucocorticoid (GC)-induced apoptosis sensitivity. In the present work, we followed the ligand-induced GR trafficking in CD4+CD8+ double-positive (DP) thymocytes. Using confocal microscopy, we found that upon short-term *in vitro* GC analog [dexamethasone (DX)] treatment, the GR translocates into the mitochondria but not into the nucleus in DP cells. We also analyzed the GR redistribution in cytosolic, nuclear and mitochondrial fractions of unseparated thymocytes by western blot and confirmed that in DX-treated cells a significant fraction of the GR translocates into the mitochondria. DX reduced the mitochondrial membrane potential of DP cells within 30 min, measured by flow cytometry, which refers to a direct modulatory activity of mitochondrial GR translocation. The abundant mitochondrial GR found in DP cells well correlates with their high GC-induced apoptosis sensitivity.

Introduction

Glucocorticoids (GCs) are key regulators of T lymphocyte apoptosis (1) and are commonly used as immunosuppressive drugs in the treatment of many diseases, like hematological malignancies (2) and autoimmune diseases (3). Classically, they act via nuclear receptors: upon ligand binding, the receptor translocates to the nucleus and interacts with respective DNA sequences, called glucocorticoid-responsive elements (GRE), regulating the synthesis of several proteins, including apoptosis-related proteins and cytokines (4). Recently, a number of reports underlined that GCs can act through rapid non-genomic mechanisms, too, for example, by the modulation of ion-exchange processes and the alteration of the physical properties of the plasma membrane (5, 6). Moreover, the GC–glucocorticoid receptor (GR) complex interacts with several cytoplasmic proteins modulating their phosphorylation status independent of the nuclear GR (7–9).

Besides the ‘classical’ cytoplasmic and nuclear expression, lately, GR has been described in other cell compartments, too. Sionov *et al.* (10, 11) demonstrated the presence of the GR in the mitochondria of several lymphoid cell types and reported that the cell lineage-specific GC-induced apoptosis sensitivity is determined rather by the mitochondrial and not by the nuclear translocation of the GC–GR complex. Moreover, membrane GR is suspected to predict the GC resistance in lympho-haemopoietic cells (11, 12).

In the thymic cortex, GCs act as regulators of the differentiation and selection of T cell precursors (1). GCs are among the important soluble factors eliciting key signals in maturing thymocytes together with cytokines (13), chemokines (14) and other soluble factors, for example Wnt molecules (15). Thymocyte–thymic epithelial cell and other stromal cell interactions are also critical during thymocyte development (16). Thymic stromal cells are known to produce GCs locally (17), and more recently, it has also been demonstrated that thymocytes can secrete GCs, too, in an age-dependent manner (18); therefore, thymocytes are located in a GC-rich microenvironment (19).

Correspondence to: F. Boldizsár; E-mail: fboldizsar@gmail.com

Transmitting editor: A. Falus

Received 10 June 2009, accepted 20 August 2009

2 Mitochondrial GR in DP thymocytes

As thymocytes differentiate in a complex stromal network of the thymus, they proceed through well-defined developmental stages, characterized by their cell surface marker CD4 and CD8 expression: CD4-CD8-DN cells express a pre-TcR; then in the next stage of maturation, CD4+CD8+ DP cells undergo positive and negative selection steps, testing their ability to bind to self MHC molecules and to recognize self-structures; and finally, CD4 or CD8 single-positive (SP) cells with the features of the naive mature T cells emigrate from the thymus (20).

GCs have been shown to control selection steps of double-positive (DP) cells (21) by modifying their TCR signal (22, 23). Paradoxically, DP cells, the most GC-sensitive thymocyte subpopulation, express the lowest level of GR both at protein and mRNA level when compared with thymocytes at other developmental stages (19, 24, 25). These findings have suggested that alternative (non-nuclear) GR-signaling pathways might exist in thymocytes (24). In a preliminary work, in a TCR transgenic mouse model, we have shown that thymocytes surviving during T cell selection up-regulate their mitochondrial anti-apoptotic Bcl-2 protein, suggesting that mitochondria were directly involved in regulating thymocyte apoptosis (23).

In our present work, we show that upon *in vitro* exposure to GC the GR translocates to the mitochondria in DP thymocytes within 30 min, having a direct effect on the mitochondrial function as shown by changes in the mitochondrial membrane potential. Quantitative confocal microscopic analysis confirmed the ligand-induced mitochondrial GR translocation. Additionally, we performed subcellular fractionation and western blotting of thymocytes in order to examine the subcellular distribution of the GR after rapid GC exposure. We found that some GR is already present in the mitochondria of untreated DP cells. In the presence of GC agonist, a dominant mitochondrial GR translocation occurred but the nuclear GR trafficking was absent in DP thymocytes. We conclude that the sensitivity of DP thymocytes to GC-induced apoptosis correlates with rapid mitochondrial GR translocation upon ligand binding, which could initiate apoptotic pathways.

Methods

Mice

Three- to four-week-old BALB/c mice were kept under conventional conditions and provided with pelleted rodent chow and acidified water *ad libitum*. All animal experiments were carried out in accordance with the regulations set out by the university's committee on animal experimentations (#BA 02/2000-2/2006).

Cell lines

Sp2/0-Ag14 (mouse myeloma) and RBL2H3 (rat basophilic leukemia) cells were cultured in humidified atmosphere, containing 5% CO₂ at 37°C, in DMEM (Sigma) supplemented with 5 and 10% FCS (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), respectively.

mAbs

The following mAbs from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA) were used for flow cytometry: anti-CD4-FITC (clone#

YTS-191.1) and anti-CD8-cychrome (CyC) (clone# Ly-2), and for confocal microscopy: anti-CD4-Pacific Blue (clone# RM4-5), anti-CD8-Alexa fluor 647 (clone# 53-6.7) and anti-GR-FITC (5E4-B1) (26).

Antibodies for western blot were the following: mouse monoclonal anti-Cytochrome C (BD Pharmingen), mouse monoclonal anti-GR (5E4-B1), mouse monoclonal anti-β-actin (Sigma) and rabbit polyclonal anti-Histone H1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG antibody were used as secondary antibodies.

Short-term *in vitro* GC treatment of isolated thymocytes and cell lines

After sacrifice, thymi were removed and homogenized mechanically in RPMI (Sigma) followed by filtration through nylon mesh. Cell viability was determined by trypan-blue exclusion using a hemocytometer.

One million thymocytes, RBL2H3 or Sp2 cells were treated *in vitro* with 1 μM dexamethasone (DX, Sigma; dissolved in DMSO until use in 10 mM stock) in serum-free media for 5, 10 or 30 min. Control samples were kept under the same conditions for the same time in the presence of the solvent alone. The treatment was stopped by adding ice-cold PBS containing 0.1% NaN₃.

Flow cytometric analysis of mitochondrial function with mitotracker chloromethyl-X-rosamine

Chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros; Invitrogen) is a lipophilic reagent that diffuses across the cell membrane and accumulates in intact mitochondria due to normal mitochondrial membrane potential (27). Briefly, 10 μl CMX-Ros stock solution (1 μg ml⁻¹ in DMSO) was added to 10⁶ cells in 1 ml of serum-free RPMI, following the manufacturer's instructions and then cells were incubated for 30 min at 37°C parallel with 1 μM DX treatment. Cell surface labeling with anti-CD4-FITC and anti-CD8-CyC was performed on ice in binding buffer (PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃) followed immediately by flow cytometric analysis.

Flow cytometric data acquisition and analysis

Samples were measured and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using the CellQuest software. First, thymocytes were gated according to their size and granularity on forward and side scatter dot plots. Thymocyte subpopulations according to their cell surface CD4/CD8 expression were analyzed separately for CMX-Ros intensity that was detected in the FL2 channel (ex.: 579 nm, em.: 599 nm). Fluorescent histogram plots were used to compare the mean fluorescent intensity (MFI) values of the different samples.

Labeling of cells for confocal laser scanning microscopy

CMX-Ros loaded ± DX-treated CD4-Pacific Blue and CD8-Alexa Fluor 647-labeled thymocytes, RBL2H3 or Sp2 cells were fixed in 4% PFA and washed in permeabilization buffer (PBS containing 0.1% BSA, 0.1% NaN₃ and 0.1% saponin). The intracellular labeling of the cells was performed in

saponin buffer with 1 µg ml⁻¹ anti-GR-FITC antibody (26). Briefly, cells were incubated on ice for 30 min and then washed twice in saponin buffer and finally once with PBS and cytosined onto slides. For nuclear staining, RBL2H3-cells and Sp2-cells were labeled with DAPI (Invitrogen) for 5 min. The excess fluid was carefully aspirated and the slides were covered using 50% glycerol-PBS.

Confocal microscopic image acquisition and analysis

Visualization and analysis of the samples were carried out using an Olympus Fluoview 300 confocal microscope with an Olympus Fluoview FV1000S-IX81 image acquisition software system. Data were collected in four separate channels, including differential interference contrast (DIC), UV for CD4, FITC for GR, red for mitochondria and far red for CD8. Sequential scanning and Kalman setting were used for image acquisition to avoid cross-talk between the channels and to eliminate noise, respectively. Signals were collected from cells in 3–3 frames and CMX-Ros–GR morphological association was analyzed.

Images were overlaid in the following alignment: CD4-Pacific Blue with CD8-Alexa fluor 647 or CMX-Ros with GR-FITC. Cell contours were controlled using DIC images. CMX-Ros–GR images were analyzed further with the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) using the co-localization plug-in. Based on the analysis of pixel fluorescence intensities, ranging from 0 to 255, specific staining was distinguished from background by using a threshold value of 50 as described elsewhere (28, 29). Then, co-localized pixels between CMX-Ros and GR were counted. One hundred DP cells per sample were analyzed altogether using this approach.

Subcellular fractionation

Mitochondria Isolation Kit (Pierce) was used to obtain cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fraction from thymocytes, according to manufacturer's instructions, with minor modifications according to Stasik *et al.* (30). Briefly, isolated solvent control and DX-treated thymocytes were washed in cold PBS and lysed. After centrifugation at 800 × g for 10 min, the nuclear pellet was washed 3× in 0.5% NP-40 in Tris-buffered saline, centrifuged at 1000 × g for 5 min, suspended in SDS sample buffer (125 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.006% Bromo-phenol-blue and 10% mercaptoethanol) and boiled. The post-nuclear supernatant was centrifuged first at 3000 × g for 15 min and then at 12 000 × g for 5 min. The pellet containing mitochondria was dissolved in SDS sample buffer and the clear supernatant was used as a cytosolic fraction.

Western blotting

Cell fractions were boiled and subjected to SDS-PAGE on a 10 or 15% gel. The gels were blotted overnight to nitrocellulose membranes using a Trans-Blot cell blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After transfer, nitrocellulose membranes (Bio-Rad) were soaked in blocking buffer (2% BSA, 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20, pH 7.4) and then incubated with mouse monoclonal anti-GR antibody (5E4-B1) (26). Mouse mono-

clonal anti-β-actin (Sigma), mouse monoclonal anti-Cytochrome C (BD) and rabbit polyclonal anti-Histone H1 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used as controls for the protein content and purity of the fractions. Blots were then probed with secondary anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG HRP-labeled antibodies in 1:1000 dilutions. For washing, the blots washing buffer was used (10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20, pH 7.4). Western blot visualization was performed by enhanced chemiluminescence as described in the manufacturer's instructions (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Pierce, Rockford, IL, USA). Luminescent light signals were detected with Kodak Image Station 2000R blot documentary system.

Analysis of blots

Densitometry of blots was done with the Quantityone software (Bio-Rad). Relative densities of GR blots were normalized to the relative densities of β-actin, cytochrome C and Histone H1 blots from the same samples to determine the relative expression of GR in the subcellular fractions.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SD. The effect of various treatments between groups was tested for statistical significance using Student's *t*-test. *P* < 0.05 denoted statistical significance.

Results

Different GR staining pattern of DP and CD4 SP cells

In previous works, we (19, 24) and others (25) have shown that DP thymocytes have the lowest GR expression among the thymocyte subpopulations both in BALB/c and also in a TCR transgenic mouse model (23). Low GR expression of DP cells was verified both on protein level, with flow cytometry (24, 25), and on the mRNA level, with quantitative PCR (19). However, the subcellular localization of the GR in thymocytes remained to be elucidated. Therefore, we performed a morphological comparison of the GR expression in the four main thymocyte subpopulations.

Figure 1 shows confocal microscopic images of CD4 (blue), CD8 (red) and GR (green)-labeled subpopulations of thymocytes. Note: the dominance of the DP and CD4 SP thymocytes is typical in 3- to 4-week-old BALB/c mice (31). On Fig. 1, the DIC (Fig. 1A and D), merged images of the CD4 and CD8 double-cell surface staining (blue and far red, respectively) (Fig. 1B and E) and intracellular GR (FITC green) (Fig. 1C and F) labeling is shown. The weak GR staining in DP cells and strong GR staining in CD4 SP cells (Fig. 1E and F) is in line with previous flow cytometric quantifications (24). There was also a marked difference in the GR staining pattern of the DP and the CD4 SP subpopulations: in DP cells, weak and granular GR staining was localized mostly to the outer rim of the cells (Fig. 1E and F); on the other hand, CD4 SP cells exhibited a more homogenous cytoplasmic and also some nuclear GR staining (Fig. 1E and F).

4 Mitochondrial GR in DP thymocytes

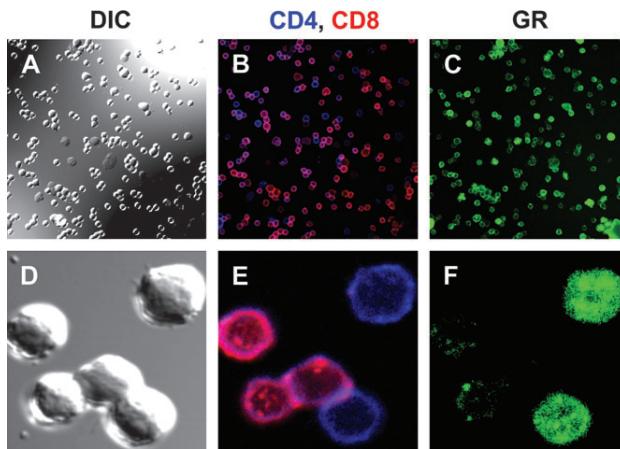


Fig. 1. DP and CD4 SP thymocytes show different GR staining pattern. Representative confocal microscopic images of the major BALB/c thymocyte subpopulations, DIC (A and D), CD4 (blue channel) and CD8 (far red channel) overlaid (B and E) and intracellular GR (green channel) (C and F) images are shown. DP thymocytes (magenta) (B and E) show weak and dominantly granular GR staining (C and F), CD4 SP cells (blue) (B and E), on the other hand, show a more intensive and rather homogenous cytoplasmic and some nuclear GR staining (C and F). The panels in this figure show representative images of at least three separate experiments.

After ligand induction, mitochondrial localization of the GR increased in DP cells

Among the major thymocyte subpopulations, DP cells are the most sensitive to GC-induced apoptosis (24). Since Sionov *et al.* (10, 11) have proposed that GC-induced apoptosis sensitivity correlates with the ligand-induced mitochondrial rather than nuclear translocation of the GR, we studied whether the mitochondrial GR translocation was present in DP cells. Moreover, the granular staining pattern specific for DP cells (Fig. 1E and F) also raised the possibility of the mitochondrial localization of the GR. To test this hypothesis, the mitochondrial dye CMX-Ros and GR co-localization was analyzed in double negative (DN), DP, CD4 SP and CD8 SP cells (Fig. 2), and a comparative analysis was done on DP cells before and after short-time GC treatments (Figs 3 and 4).

CMX-Ros–GR overlaid images of the four major thymocyte subpopulations are shown on Fig. 2. Some mitochondrial GR staining (CMX-Ros–GR co-localization) was observed in all studied cell types (Fig. 2). Upon 30 min DX treatment, the association between the GR and the mitochondria increased in DP cells, but no nuclear translocation was observed (Fig. 3A and B). To quantify the ligand-induced mitochondrial GR translocation, we compared the number of co-localized pixels (both GR and CMX-Ros signals present) in individual DP cells before and after the DX treatment (Fig. 4). There was a nearly 4-fold increase in the number of mitochondrial GR pixels after 30 min DX treatment (350 ± 109 versus 87 ± 36 in the control) (Fig. 4).

As morphological controls for the ligand-induced nuclear or mitochondrial GR translocations (based on our previous unpublished observation), in an additional experiment, we studied two cell lines of lympho-haemopoietic origin, Sp2/0-

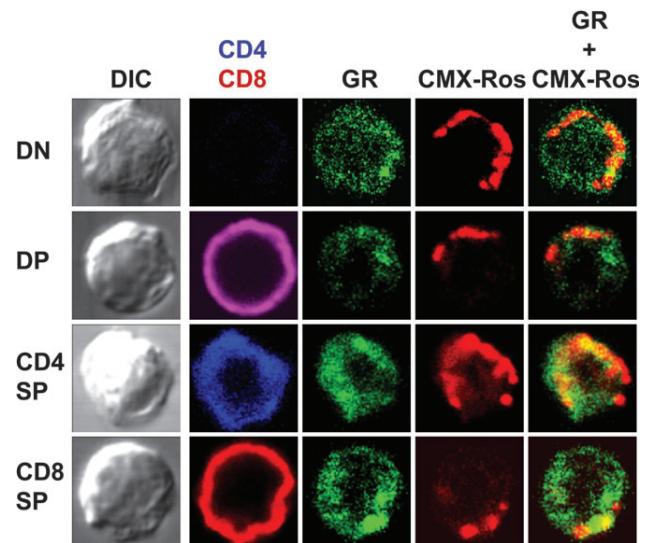


Fig. 2. GR and mitochondrial staining of thymocytes. Confocal microscope images of GR-CMX-Ros co-localization in the four major thymocyte subpopulations according to their CD4 (blue) and CD8 (red) cell surface expression. Representative images show DN, DP, CD4 SP and CD8 SP thymocytes from at least three separate experiments. Co-localization of the GR with the mitochondria (GR-CMX-Ros merge) is indicated by yellow areas.

Ag mouse myeloma and RBL2H3 rat mast cells, respectively (supplementary Figure 1, available at *International Immunology Online*). In RBL2H3-cells, some nuclear translocation of the GR appeared already after 10 min of DX exposure (data not shown) that completed after 30 min (supplementary Figure 1, available at *International Immunology Online*). In contrast, in Sp2-cells, mainly mitochondrial localization of GR was observed and no nuclear GR translocation appeared after 30 min DX treatment (supplementary Figure 1, available at *International Immunology Online*).

DP cells possessed the lowest level of mitochondrial membrane potential among thymocytes that was further decreased by short-time in vitro DX exposure

Mitochondria are important signal integrating and cellular target organelles for apoptosis (32). Since we have found ligand-induced mitochondrial translocation of the GR in DP cells (Figs 3 and 4), we analyzed the functional consequences of DX exposure on mitochondria by flow cytometry. Besides labeling intact mitochondria, CMX-Ros can also be used for monitoring the mitochondrial membrane potential (ψ_m) (27). In our previous work, we studied the mitochondrial function of thymocytes after *in vivo* DX exposure (23).

In the present study, *in vitro* CMX-Ros-loaded cells were DX treated and cell surface labeled with CD4 and CD8 for flow cytometric analysis. CMX-Ros MFI was detected in FL2-H and analyzed in all thymocyte subpopulations after different treatment times. In control (solvent-treated) samples, the DP cells had significantly lower ($P < 0.05$) CMX-Ros MFI when compared with the other thymocyte subpopulations [80 ± 19 in DP cells versus 136 ± 33 in DN cells, 112 ± 8 in CD4 SP and 196 ± 32 in CD8 SP cells, respectively (Fig. 5A and B)].

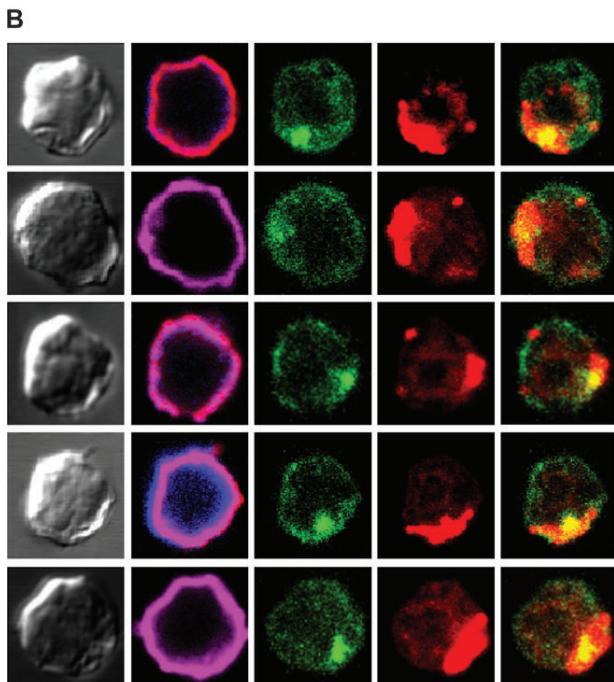
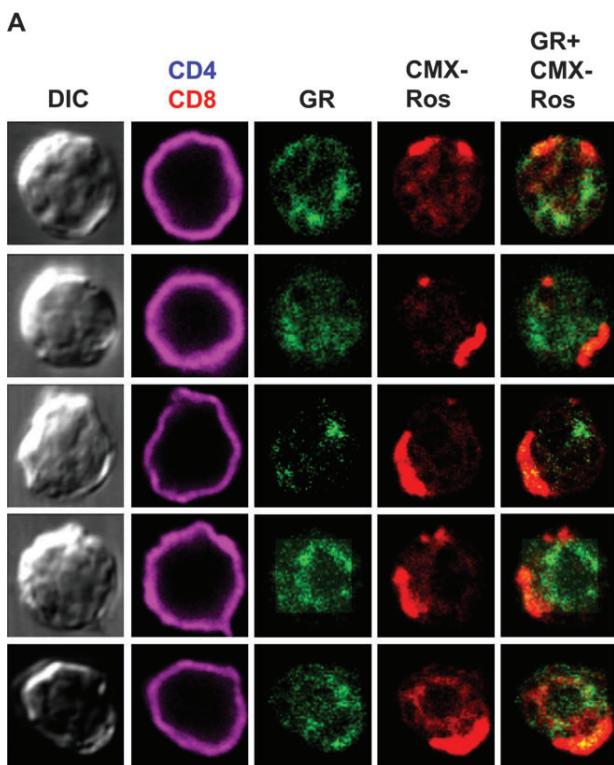


Fig. 3. Ligand-induced mitochondrial translocation of the GR in DP thymocytes after 30 min *in vitro* DX treatment. Representative confocal microscopic DIC, CD4 (blue channel) and CD8 (far red channel) double labeled, mitochondria (CMX-Ros, red channel), intracellular GR (green channel) and finally GR-CMX-Ros merged images show 5–5 control (A) and *in vitro* DX-treated (B) DP cells. Co-localization of the GR with the mitochondria (GR-CMX-Ros merge) is indicated by yellow areas. The panels in this figure show representative images of at least three separate experiments.

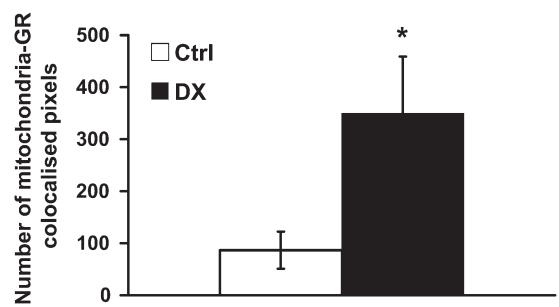


Fig. 4. Quantification of the changes in the GR-CMX-Ros co-localization in DP thymocytes after *in vitro* DX treatment. Bars represent the number of co-localized pixels (GR with CMX-Ros) showing the mitochondrial translocation. The mean \pm SD was calculated from the data of 100 DP cells per treatment, respectively. Significantly higher ($P < 0.05$) values in DX-treated cells versus controls are indicated by asterisk.

The CMX-Ros MFI decreased significantly ($P < 0.05$) in DP cells after 30 min of DX exposure from 80 ± 19 to 45 ± 15 when compared with solvent-treated control (Fig. 5C and 5D) but remained unchanged upon shorter (5 or 10 min) DX exposure (79 ± 16 and 79 ± 15 , respectively).

Subcellular fractionation of thymocytes confirmed the ligand-induced mitochondrial translocation of the GR

Finally, in order to confirm the short-term DX-induced GR trafficking to the mitochondria observed with confocal microscopy, we performed subcellular fractionation and isolated cytoplasmic, nuclear and mitochondrial fractions from unseparated thymocytes. Note: although here thymocytes were not separated based on their cell surface phenotype, 70–80% of the cells are in the DP stage in 3- to 4-weeks-old BALB/c mice (31); therefore, results from our western blot experiments most likely give an impression about the DP cells. In solvent-treated samples, GR was found in all fractions, including the cytoplasm, the nucleus and in trace amounts in the mitochondria (Fig. 6A). Upon DX treatment, the level of the GR decreased in the cytoplasm and rapidly translocated into the nucleus and the mitochondria (Fig. 6A). Densitometric quantification of the western blots confirmed that DX treatment resulted in a significant ($P < 0.05$) decrease of GR expression (relative GR expression: 0.42 ± 0.25) in the cytoplasm, but the mitochondrial and nuclear GR levels increased significantly ($P < 0.05$) at the same time (relative GR expression: 2.58 ± 1.35 and 2.32 ± 0.21 , respectively) (Fig. 6B). The presence of the GR in the nuclear fractions in the western blots is most likely the result of the presence of SP and DN (non-DP) cells in the unseparated thymocyte samples. The strong nuclear signals might be due to the 2–3 times higher GR expression of the non-DP cells (19, 24, 25).

Discussion

The molecular mechanisms and importance of GC-exerted signaling pathways during thymocyte apoptosis and differentiation are still not fully understood (33). The seemingly contradictory phenomenon that in DP thymocytes, the high GC-induced apoptosis sensitivity is coupled with low GR

6 Mitochondrial GR in DP thymocytes

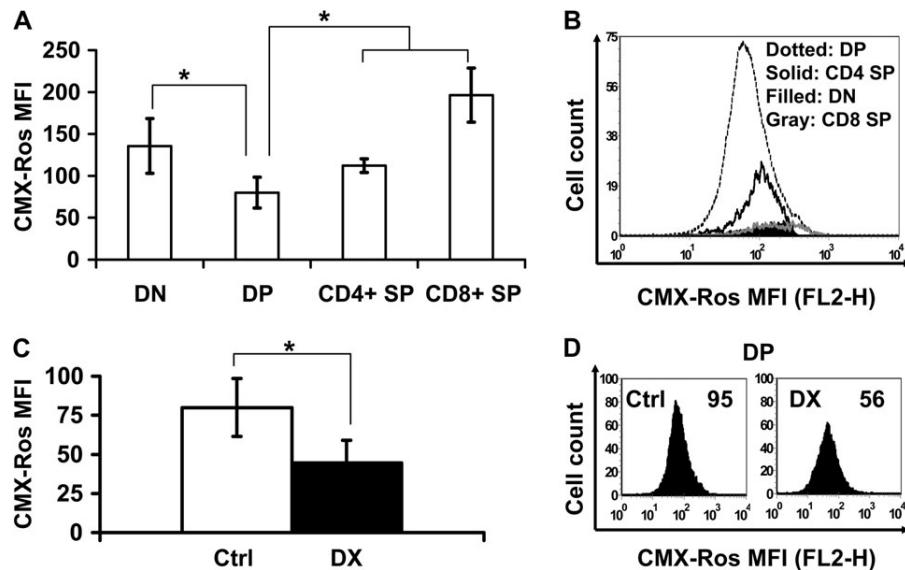


Fig. 5. Mitochondrial membrane potential in thymocyte subpopulations (A and B), and its changes in DP cells upon 30 min of DX treatment (C and D). (A) Bars indicate mean \pm SD of CMX-Ros MFI (calculated from the data of three animals) in the different thymocyte subpopulations. Significant ($P < 0.05$) differences are indicated by asterisk. (B) The overlaid fluorescent histogram plot shows the CMX-Ros MFI of DN, DP, CD4 SP and CD8 SP thymocyte subpopulations. (C) CMX-Ros MFI changes upon *in vitro* DX treatment in DP thymocytes. Bars represent mean \pm SD of CMX-Ros MFI. Significant ($P < 0.05$) differences are indicated by asterisk. (D) Corresponding fluorescent histogram plots show CMX-Ros MFI of control and DX-treated DP cells.

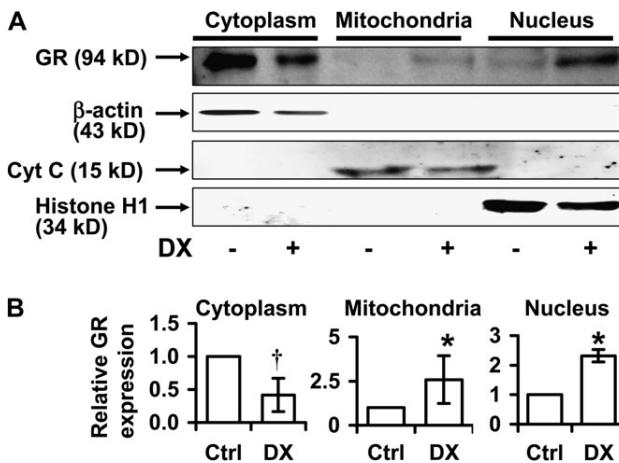


Fig. 6. Redistribution of the GR in the cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fractions of unseparated thymocytes. (A) GR was detected in thymocyte subcellular fractions probed with anti-GR mAb (5E4-B1) by western blotting. Blots were also probed with anti-β-actin, anti-Cytochrome C (Cyt C) and anti-Histone H1 antibodies to confirm the purity of the cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fractions, respectively. Upon DX treatment, mitochondrial and nuclear GR increase was coupled by cytoplasmic GR decrease. (B) Diagrams show the relative GR expression in the cytoplasm (normalized to β-actin), the mitochondria (normalized to Cyt C) and the nucleus (normalized to Histone H1). Bars represent the mean of relative densities compared with the controls \pm SD. Significantly ($P < 0.05$) higher (asterisk) and lower (dagger) values compared with the controls are indicated. The figure shows representative blots (A) and densitometry data of at least three independent experiments (B). Blots were detected using the Kodak Image Station blot documentation system.

expression (24, 25) have directed the attention toward alternative GC actions. Sionov *et al.* demonstrated, for the first time, in different haemopoietic cell lines that, after ligand binding parallel to nuclear translocation, GR can also translocate to the mitochondria (10, 11). In our present work, we show that in BALB/c DP thymocytes, there is a significant association between the GR and the mitochondria. Moreover, a ligand-dependent rapid mitochondrial GR translocation could be verified, after short-time *in vitro* GC-analog treatment. Therefore, we hypothesize that there is a connection between mitochondrial GR translocation and GC sensitivity of DP cells.

Mitochondria-directed mechanisms (including hydrogen peroxide production) and mitochondrial proteins are possible key players in GC-induced thymocyte apoptosis (1, 34). In a TcR-transgenic mouse model, we have already demonstrated that the anti-apoptotic mitochondrial protein, Bcl-2, was up-regulated in thymocytes undergoing positive selection and coupled with significant changes in the mitochondrial membrane potential (23). These results already suggested that *in vivo* GC-induced apoptotic signals could target the mitochondria in DP cells (23). The morphological association between mitochondria and GR, described in the present work, verified the possibility of alternative GR signaling at this developmental stage.

Mitochondria are target organelles of apoptosis since the apoptotic enzyme cascade ends in the disintegration of the mitochondria and cytoplasmic release of Cytochrome C (35). Therefore, the presence of the GR in the mitochondria of DP thymocytes is of special importance in the regulation of apoptosis by GCs. Here, we found that the GR was

present to some extent in the mitochondria of all major murine thymocyte populations. The ligand-induced mitochondrial GR translocation was dominant in DP cells that are known to be the most sensitive to GC-induced apoptosis *in vivo* (22–24). Interestingly, no nuclear translocation of the GR was observed after short-term DX treatment in DP cells. Sionov *et al.* (10, 11) showed that the translocation of the GR into the mitochondrion, but not nucleus could be the main regulator of GC-induced apoptosis sensitivity in lympho-haemopoietic cell lines. Therefore, the ligand-induced mitochondrial GR translocation found in DP cells could dictate their high sensitivity to GC-induced apoptosis.

Interestingly, the mitochondrial GR was also found in ligand (GC)-free experimental condition. This could be caused either by *in vivo* GC exposure, prior to extraction, in thymocytes that are located in the GC-secreting microenvironment of the thymus (19) or mitochondrial GR translocation could occur in a ligand-independent manner, too (10).

In our present work, it was also found that DP cells possess the lowest mitochondrial membrane potential among thymocyte subpopulations, which could also confer to an increased sensitivity to GC-induced apoptosis (21). Short-time GC treatment induced significant but not complete loss of mitochondrial membrane potential in DP cells, most likely due to the rapid non-genomic modulatory effect of glucocorticoids on the mitochondrial function, similar to what was shown by others previously in high-dose GC-treated and conA-stimulated rat thymocytes (36, 37). These results raise the possibility that the mechanism of non-genomic action of GCs is universal in GC-sensitive cells.

It was already reported that the mitochondrial genome contains similar sequences to GRE (38, 39); therefore, it is possible that GR binds to mitochondrial DNA and influences mitochondrial gene transcription similar to what was demonstrated in other experimental systems (40). However, the present results seem to exclude the gene transcription-dependent mechanisms due to their rapid (within 30 min) nature. Besides, steroid hormone receptors, like the GR, transcription factors (41), for example RelB and NFAT (30), or nuclear orphan receptors, like Nur77 (42, 43), which is an important regulator during thymocyte negative selection (44), can also translocate to the mitochondria in thymocytes (42, 43). Recently, it has been also found that incomplete TCR chains can also target the mitochondria and trigger apoptosis (45). It is tempting to speculate that the GR interacts with the above mentioned transcription factors, as in the nucleus (4), or other apoptosis-related proteins in the mitochondria, similar to the cross-talk between Nur77 with Bcl-2 (43).

Other rapid effects of GCs, already elucidated, also involve interactions with important signaling proteins, including TCR signaling associated molecules, like the ZAP-70 in Jurkat T cells (9, 46) and Lck and Fyn in primary T cells (47, 48). Based on these findings, together with our results, presented here, mitochondria may serve as important signal-integrator organelles during the selection processes of the thymocytes regulated by GR signaling.

In conclusion, here, we provide new data about the GR intracellular distribution in BALB/c thymocyte subpopulations and evidence of an alternative GR-mediated signal targeting the mitochondria and regulating mitochondrial function in im-

mature DP thymocytes. However, the fine details of the molecular mechanisms how mitochondrial GR exert their effects during thymocyte apoptosis need further intensive studies.

Supplementary data

Supplementary Figure 1 is available at *International Immunology Online*.

Funding

Operative Program for Economic Competitiveness (GVOP-3.2.1-2004-04-0172/3.0 to G.S. and GVOP-3.1.1.-2004-05-0537/3.0).

Acknowledgements

We would like to thank Dr Tamas Nagy (Department of Laboratory Medicine, University of Pecs) for helping us using the Kodak Image Station 2000R blot documentary system.
Conflict of Interest: None.

Abbreviations

CMX-Ros	chloromethyl-X-Rosamine
CyC	cychrome
DIC	differential interference contrast
DN	double negative
DP	double positive
DX	dexamethasone
GC	glucocorticoid
GR	glucocorticoid receptor
GRE	glucocorticoid-responsive element
MFI	mean fluorescent intensity
SP	single positive

References

- 1 Herold, M. J., McPherson, K. G. and Reichardt, H. M. 2006. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:60.
- 2 Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N. L. and Rosen, S. T. 2002. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin. Cancer Res.* 8:1681.
- 3 Rhen, T. and Cidlowski, J. A. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 353:1711.
- 4 Smoak, K. A. and Cidlowski, J. A. 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* 125:697.
- 5 Buttigereit, F. and Scheffold, A. 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67:529.
- 6 Lowenberg, M., Verhaar, A. P., van den Brink, G. R. and Hommes, D. W. 2007. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol. Med.* 13:158.
- 7 Rider, L. G., Hirasawa, N., Santini, F. and Beaven, M. A. 1996. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is suppressed by low concentrations of dexamethasone in mast cells. *J. Immunol.* 157:2374.
- 8 Solito, E., Mulla, A., Morris, J. F., Christian, H. C., Flower, R. J. and Buckingham, J. C. 2003. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 144:1164.
- 9 Bartis, D., Boldizsar, F., Kvall, K. *et al.* 2007. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:253.

8 Mitochondrial GR in DP thymocytes

- 10 Sionov, R. V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y. and Yefenof, E. 2006. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 203:189.
- 11 Sionov, R. V., Kfir, S., Zafir, E., Cohen, O., Zilberman, Y. and Yefenof, E. 2006. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5:1017.
- 12 Bartholome, B., Spies, C. M., Gaber, T. et al. 2004. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 18:70.
- 13 Yarilin, A. A. and Belyakov, I. M. 2004. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr. Med. Chem.* 11:447.
- 14 Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6:127.
- 15 Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G. and Jenkinson, E. J. 2003. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 33:1949.
- 16 Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J. and Jenkinson, E. J. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 14:73.
- 17 Vacchio, M. S. and Ashwell, J. D. 1997. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J. Exp. Med.* 185:2033.
- 18 Qiao, S., Chen, L., Okret, S. and Jondal, M. 2008. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. *Exp. Cell Res.* 314:3027.
- 19 Boldizsar, F., Palinkas, L., Czompoly, T., Bartis, D., Nemeth, P. and Berki, T. 2006. 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* 211:785.
- 20 Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. and Reichardt, H. M. 2004. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:263.
- 21 Vacchio, M. S. and Ashwell, J. D. 2000. Glucocorticoids and thymocyte development. *Semin. Immunol.* 12:475.
- 22 Boldizsar, F., Palinkas, L., Bartis, D., Nemeth, P. and Berki, T. 2003. Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunol. Lett.* 90:97.
- 23 Palinkas, L., Talaber, G., Boldizsar, F., Bartis, D., Nemeth, P. and Berki, T. 2008. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology* 213:39.
- 24 Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F. and Nemeth, P. 2002. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int. Immunol.* 14:463.
- 25 Wiegers, G. J., Knoflach, M., Bock, G. et al. 2001. CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 31:2293.
- 26 Berki, T., Kumanovics, G., Kumanovics, A., Falus, A., Ujhelyi, E. and Nemeth, P. 1998. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunol. Methods* 214:19.
- 27 Pendergrass, W., Wolf, N. and Poot, M. 2004. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 61:162.
- 28 Mancuso, M. R., Davis, R., Norberg, S. M. et al. 2006. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J. Clin. Investig.* 116:2610.
- 29 Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H. et al. 2004. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am. J. Pathol.* 165:35.
- 30 Stasik, I., Rapak, A., Ziolo, E. and Strzadala, L. 2008. The mitochondrial localization of RelB and NFATx in immature T cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 13:493.
- 31 Oh, S. H. and Kim, K. 1999. Expression of interleukin-1 receptors in the later period of foetal thymic organ culture and during suspension culture of thymocytes from aged mice. *Immunol. Cell Biol.* 77:491.
- 32 Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15:2922.
- 33 Jondal, M., Pazirandeh, A. and Okret, S. 2004. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol.* 25:595.
- 34 Tonomura, N., McLaughlin, K., Grimm, L., Goldsby, R. A. and Osborne, B. A. 2003. Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J. Immunol.* 170:2469.
- 35 Goldenthal, M. J. and Marin-Garcia, J. 2004. Mitochondrial signalling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol. Cell. Biochem.* 262:1.
- 36 Buttigereit, F., Burmester, G. R. and Brand, M. D. 2000. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol. Today* 21:192.
- 37 Buttigereit, F., Grant, A., Muller, M. and Brand, M. D. 1994. The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur. J. Biochem.* 223:513.
- 38 Demanacos, C., Djordjevic-Markovic, R., Tsawdaroglou, N. and Sekeris, C. E. 1995. The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55:43.
- 39 Demanacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D. A. and Sekeris, C. E. 1996. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 61:226.
- 40 Scheller, K. and Sekeris, C. E. 2003. The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Exp. Physiol.* 88:129.
- 41 Psarra, A. M. and Sekeris, C. E. 2008. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1783:1.
- 42 Stasik, I., Rapak, A., Kalas, W., Ziolo, E. and Strzadala, L. 2007. Ionomycin-induced apoptosis of thymocytes is independent of Nur77 NBRE or NurRE binding, but is accompanied by Nur77 mitochondrial targeting. *Biochim. Biophys. Acta* 1773:1483.
- 43 Thompson, J. and Winoto, A. 2008. During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J. Exp. Med.* 205:1029.
- 44 Sohn, S. J., Thompson, J. and Winoto, A. 2007. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 19:510.
- 45 Shani, N., Rubin-Lifshitz, H., Peretz-Cohen, Y. et al. 2008. Incomplete T cell receptor β peptides target the mitochondrion and induce apoptosis. *Blood* 113:3530.
- 46 Bartis, D., Boldizsar, F., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P. and Berki, T. 2006. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98:147.
- 47 Lowenberg, M., Verhaar, A. P., Bilderbeek, J. et al. 2006. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* 7:1023.
- 48 Lowenberg, M., Tuynman, J., Bilderbeek, J. et al. 2005. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106:1703.



Review

Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells

Ferenc Boldizsar*, Gergely Talaber, Mariann Szabo, Domokos Bartis, Laszlo Palinkas, Peter Nemeth, Timea Berki

Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pecs, 7624 Pecs, Szigeti ut. 12., Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2009

Received in revised form

9 October 2009

Accepted 13 October 2009

Keywords:

Glucocorticoid hormone

Mitochondrion

Non-genomic effects

T cell

ZAP-70

ABSTRACT

In the last decade new glucocorticoid (GC)-signalling mechanisms have emerged. The evolving field of non-genomic GC actions was precipitated from two major directions: (i) some rapid/acute clinical GC applications could not be explained based on the relatively slowly appearing genomic GC action and (ii) accumulating evidence came to light about the discrepancy in the apoptosis sensitivity and GR expression of thymocytes and other lymphoid cell types. Herein, we attempt to sample the latest information in the field of non-genomic GC signalling in T cells, and correlate it with results from our laboratory. We discuss some aspects of the regulation of thymocyte apoptosis by GCs, paying special interest to the potential role(s) of mitochondrial GR signalling. The interplay between the T cell receptor (TcR) and glucocorticoid receptor (GR) signalling pathways is described in more detail, focusing on ZAP-70, which is a novel target of rapid GC action.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Contents

Genomic- and non-genomic GC effects	521
Cross-talk between the GR and TcR signalling proteins	522
GC regulation of T cell development	523
Mitochondrial GR	523
Concluding remarks	524
References	525

Genomic- and non-genomic GC effects

Classically, GC hormones exert their effects through the nuclear translocation of the ligand-bound GR from the cytoplasm, which then acts as a transcription factor, and binds to glucocorticoid responsive elements (GRE) in the promoter region of several target genes (Drouin et al. 1992; Berg 1989)(Fig. 1). The GR is a member of the steroid receptor superfamily, comprised of three functional domains: hormone-, DNA-binding- and a less conserved N-terminal domain (Evans 1988). The unliganded (inactive) GR forms a multi-molecular complex with heat shock proteins and immunophilins in the cytoplasm (Smith and Toft 1993). Upon ligand binding the GR dissociates from its chaperones reaching the active conformation by forming homodimers (Drouin

et al. 1992). The number of genes regulated directly by the GR is estimated between 10 and 100 per cell (Hayashi et al. 2004). Thus, GCs exert a great range of effects on various tissues and cell types (Munck et al. 1984). Moreover, glucocorticoid hormone (GC) derivatives are widely used in anti-inflammatory and immuno-suppressive therapy due to their robust anti-inflammatory effects (Buttgereit et al. 2005).

Non-genomic GC effects, on the other hand, are not mediated by such transcriptional activity, but through alternative pathways (Fig. 1). Buttgereit and colleagues have proposed 3 alternative GC mechanisms: (i) signalling through a (putative) membrane GR (mGR), (ii) direct membrane effect of the GCs and (iii) interaction of the GR with other signalling proteins in the cytoplasm (Buttgereit and Scheffold 2002) (Fig. 1). A fourth alternative GC signalling pathway has been established lately based on the mitochondrial GR translocation described in a number of cell types (Sionov et al. 2006a; Sionov et al. 2006b; Psarra et al. 2005; Du et al. 2009; Talaber et al. 2009) (Fig. 1).

Membrane-bound GR (Fig. 1) was found in rodent and human lymphoid cell lines as well as in amphibian brain (Gametchu

Abbreviations: chronic lymphocytic leukaemia, CLL; glucocorticoid hormone, GC; glucocorticoid hormone receptor, GR; T cell receptor, TcR; double positive, DP; dexamethasone, DX; green fluorescent protein, GFP

* Corresponding author. Tel.: +36 72 536 288; fax: +36 72 536 289.

E-mail address: fboldizsar@hotmail.com (F. Boldizsar).

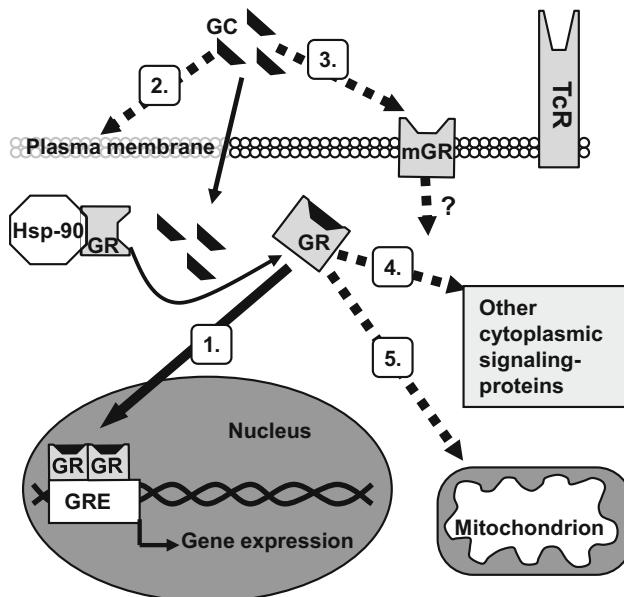


Fig. 1. Summary of the genomic- (solid arrow) and non-genomic (dashed arrows) GC signalling pathways in T cells. Various signalling pathways are indicated with numbers: 1 – classical, genomic pathway; 2 – direct membrane effects; 3 – membrane GR; 4 – interaction of the GR with cytoplasmic signalling proteins; 5 – mitochondrial pathway.

1987; Gametchu et al. 1999; Evans et al. 2000; Evans et al. 1998; Orchinik et al. 1991). Furthermore, correlation was found between the mGR expression and the cell cycle-dependent GC-induced apoptosis sensitivity of a human leukaemia cell line (Sackey et al. 1997). Interestingly, Sionov and colleagues proposed that the presence of the mGR correlates with GC-resistance of a cell type (Sionov et al. 2006a; Sionov et al. 2006b). However, the expression of the mGR could only be verified with a high sensitivity monoclonal antibody conjugated liposomal fluorescent method on human blood monocytes and B cells, due to the low frequency of these molecules (Bartholome et al. 2004). Moreover, the mGR+ monocyte frequency increased in rheumatoid arthritis, SLE and ankylosing spondylitis patients suggesting a potential pathogenetic role of the mGR in these diseases (Bartholome et al. 2004; Spies et al. 2006; Tryc et al. 2006). However, no data has been published so far, whether thymocytes expressed mGR at any differentiation stage. Also, it remains to be elucidated which intracellular signalling molecules or second messengers are utilized by the mGR.

Direct membrane effects of glucocorticoid analogues (Fig. 1) have been described for a long time, for example on human red blood cells (Rand et al. 1977). High-dose steroid treatment influenced the membrane lipid mobility in mammary cancer cell line (Van Bommel et al. 1987). Triamcinolone-acetonide, a synthetic glucocorticoid analogue, increased membrane lipid mobility in LPS treated B lymphocytes (Keating et al. 1985; Keating et al. 1988). Methylprednisolon treatment of ConA-stimulated rat thymocytes inhibited membrane transport of Na^+ and Ca^{2+} , and increased the H^+ uptake into the mitochondria (Buttgereit et al. 1997). Leukocyte fluid shear response was modified by DX: GC-treatment of rat leukocytes lead to disturbed plasma membrane pseudopod retraction (Fukuda et al. 2004). In canine kidney epithelial cell system a direct effect of DX on tight junction formation was found (Peixoto and Collares-Buzato 2006). Twenty minutes of cortisol treatment caused changes in the excitability of principal basolateral amygdala neurons (Duvarci and Pare 2007). All such studies imply that GCs, especially at high

doses, could change plasma membrane physico-chemical properties due to their lipid soluble nature.

The third type of non-genomic GC action, as suggested by Buttgereit and colleagues (Buttgereit and Scheffold 2002), is the interaction of the GR with other signalling proteins in the cytoplasm (Fig. 1), which will be discussed in the next section in more detail focusing on T cells.

Cross-talk between the GR and TcR signalling proteins

Since T cells are the main targets of the GC-mediated immunosuppression the modification of TcR signalling by GCs is of particular interest. Lowenberg and colleagues described a novel link between the TcR and GR (Löwenberg et al. 2007). According to their work, in human CD4+ T cells, the GR associates with the early signalling-complex of the TcR, Lck and Fyn molecules after TcR stimulation (Löwenberg et al. 2005; Löwenberg et al. 2006). Short term (10 min) DX treatment inhibited the TcR activation-induced Lck/Fyn phosphorylation, which was due to the disruption of the GR-TcR-Lck-Fyn multimolecular complex (Löwenberg et al. 2005; Löwenberg et al. 2006).

Parallel, in Jurkat human T cell line we have shown that 2–5 min high dose DX treatment, without TcR activation, leads to the transient tyrosine-phosphorylation of ZAP-70, a key molecule in the early stage of T cell activation (Bartis et al. 2006). This effect was Lck-dependent and could be inhibited by the GR antagonist RU486 (Bartis et al. 2006). In a following work we demonstrated the direct association of the ZAP-70, the GR and Hsp-90 in the cytoplasm of DX-treated Jurkat cells, which provided a structural basis for the functional cooperation of these molecules (Bartis et al. 2007). Association of the ZAP-70 and the GR was not an exclusive phenomenon in Jurkat cells, as confirmed by experiments on ZAP-70 transfected HeLa cells (Bartis et al. 2007). In Fig. 2 we propose a model explaining the rapid GC-analogue-induced ZAP-70 phosphorylation.

Importantly, our data highlighted, for the first time, that DX treatment has a direct effect on ZAP-70 through the GR. The GC-induced ZAP-70 tyrosine phosphorylation is a fascinating new finding, because GCs are potent inhibitors of T cell functions. Therefore, a fine analysis of phosphorylated tyrosine residues in ZAP-70 seems inevitable to clarify the biological importance of this DX-induced effect. ZAP-70 has 4 activator (Y315, Y319, Y474 and Y493) and 4 inhibitor (Y292, 492, 597 and 598) phosphoryla-

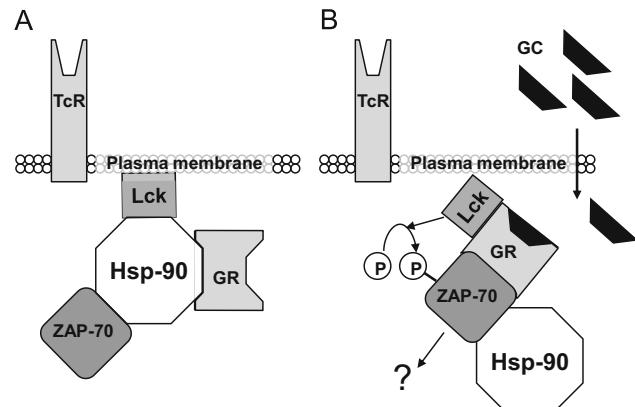


Fig. 2. Putative model of the interactions between ZAP-70, GR, p56-Lck and Hsp-90 in Jurkat cells. **A:** The GR, Lck and ZAP-70 molecules form a multi-molecular complex with Hsp-90 in the membrane-proximal compartment of resting (control) Jurkat cells. **B:** Few minutes after high dose GC-analogue treatment the activated GR dissociates from the Hsp-90 and associates with ZAP-70 leading to its phosphorylation by p56-Lck.

tion sites (Au-Yeung et al. 2009). The analysis of several ZAP-70 targeted point mutant Jurkat cell lines are in progress in our laboratory (unpublished data), which could provide a detailed picture about the phosphorylation balance of activator and inhibitor Tyr residues involved in rapid GC action. The importance of high-dose GC analogue-induced rapid ZAP-70 phosphorylation is underlined by novel haematological markers of chronic lymphocytic leukaemia (CLL), too. ZAP-70 expression in B-CLL cells has been reported to associate with poor disease prognosis, most likely through enhancing BcR signalling (Chen et al. 2002; Rassenti et al. 2004; Chen et al. 2005). Recently, down-regulation of ZAP-70 and Syk was described *in vitro* in high-dose Methylprednisolone-treated B-CLL cells, but this was insufficient for apoptosis induction (Boelens et al. 2009). Hopefully, the haematological studies complemented with *in vitro* phosphorylation studies will lead to understanding the role of ZAP-70 in CLL.

When we compare the above-described fundamental works by Lowenberg and colleagues and our group we can find some major differences in the experimental systems used. Lowenberg and colleagues showed the association of the GR to the TcR signalling molecules (Lck, Fyn and TcR) in TcR-activated human peripheral CD4+ T cells. We, on the other hand, showed the association between ZAP-70 and GR in GC analogue-treated Jurkat T cells. These differences could be explained by two major reasons: (i) primary T cells versus leukaemia cell line, and (ii) TcR signal combined with DX treatment versus only DX treatment.

Despite the aforementioned discrepancies, the highly versatile role of the GR in protein–protein interactions emerges from the molecular cross-talk between the TcR and GR signalling pathways. A potential regulator of these processes could well be Hsp-90, which is not only closely bound to the cytoskeleton network but also suggested to be involved in molecular trafficking in the cytoplasm (Csermely et al. 1998). Moreover, association between TcR signalling proteins like Lck, Raf and ZAP-70 and Hsp-90 have been described (Schnaider et al. 1998; Schnaider et al. 2000; Bartis et al. 2007). Changes in the cytoskeletal network upon different activation signals have been reported in T cells (Gomez and Billadeau 2008; Billadeau et al. 2007; Burkhardt et al. 2008). Therefore, it is very likely that the GR's association with different protein partners in the TcR signalling pathway is guided by Hsp-90 and other chaperone proteins.

GC regulation of T cell development

It has been known for a long while, that high systemic adrenal GC hormone levels lead to thymus involution, while the low concentration or lack of GC results in persisting oversized thymus (Selye 1936; Star 1895; Jaffe 1924a, b). Later apoptosis was identified as the major mechanism responsible for the GC-induced thymocyte-depleting effect (Wyllie 1980). However, only the pioneer work of Ashwell and colleagues highlighted the more complex regulatory nature of the locally produced GCs in the thymocyte differentiation process (Ashwell et al. 2000). Thymic epithelial cells (TEC) are capable of GC production, thus DP thymocytes undergo positive selection in a GC rich microenvironment (Vachio et al. 1994; Pazirandeh et al. 1999; Lechner et al. 2000, 2001; Boldizsar et al. 2006). It has been recently shown, that besides the thymus epithelium, thymocytes are also capable to produce GCs (Qiao et al. 2008, 2009). According to the works of Qiao and colleagues, TEC derived GCs have negative, whereas thymocyte derived GCs have positive effects for the thymus homeostasis (Qiao et al. 2008, 2009). With aging, GC production in TECs declines but increases in thymocytes. GCs have been shown to modify the TcR signal threshold during positive selection; hence, otherwise apoptotic stimuli, when acting

simultaneously, might drive CD4+ CD8+ double positive (DP) thymocytes towards survival (Ashwell et al. 1996, 2000).

DP cells are most sensitive to GC-induced apoptosis among the major thymocyte subpopulations (Wiegers et al. 2001; Berki et al. 2002; Palinkas et al. 2008). Works from our laboratory and others' established that there are significant differences in the GR expression of the 4 major thymocyte subpopulations both at the protein and mRNA level (Wiegers et al. 2001; Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2006; Palinkas et al. 2008). Unexpectedly, DP thymocytes had the lowest GR expression, thus no correlation could be established between the GC-induced apoptosis sensitivity and the intracellular GR expression (Wiegers et al. 2001; Berki et al. 2002). The low GR expression of DP thymocytes could be the result of their local GC exposure in the GC rich microenvironment of the thymus, which was also supported by their high Dig2 and low Bcl-2 expression (Boldizsar et al. 2006). *In vivo*, synthetic GC treatment leads to the dramatic fall of DP cell numbers through the abrogation of the mitochondrial membrane potential and decrease in Bcl-2 expression (Palinkas et al. 2008). Alongside the apoptosis-inducing capacity GCs could also enhance the positive selection of DP thymocytes *in vivo*, when TcR signal was induced simultaneously (Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2003). This effect was indicated by the increased CD69 expression on DP and CD4 single positive cells, together with higher output of mature CD4+ cells (Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2003). Therefore, the "Janus-face" nature of GC effects on DP thymocytes was demonstrated *in vivo*, confirming the concept of "mutually antagonistic" signals. Our original results about the *in vivo* GC analogue effects are summarized in Table 1.

The discrepancy between the GR expression and the GC-induced apoptosis sensitivity in DP cells has already raised the possibility of non-conventional GR signalling pathways in controlling thymocyte differentiation processes. This notion was confirmed by another line of evidence deriving from experiments done with RU486, a synthetic GC antagonist. Neither the selective DP cell depleting effect, nor the early appearing pro-apoptotic effects of a single high-dose DX treatment could be inhibited by RU486 *in vivo* (Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2006). Furthermore, the auto-regulatory role of DX on the GR expression could not be antagonised by RU486 pre-treatment (Boldizsar et al. 2006). The predominant effect of RU486 is the inhibition of the GR translocation to the nucleus after ligand binding (Lefebvre et al. 1988; Distelhorst and Howard 1990). Thus, the pro-apoptotic activity of GCs in DP cells is most likely independent from the nuclear translocation of the active GR, turning the attention to the possibility of non-genomic GC action.

Mitochondrial GR

Recently it has been demonstrated that upon ligand binding the glucocorticoid receptor can directly translocate to the mitochondria in both lymphoid (Sionov et al. 2006a; Sionov et al. 2006b) and non-lymphoid cells (Psarra et al. 2005; Du et al. 2009), where it can initiate the apoptotic cascade. Indeed, the ligand-induced mitochondrial GR translocation showed a close correlation with the GC-induced apoptosis sensitivity of several cell types. Thus, this novel mechanism became an attractive candidate alternative GR-signalling pathway (Figs. 1 and 3), which could mediate the rapid apoptotic response in thymocytes. In favour of this hypothesis, lately, we have demonstrated that in DP cells the GR translocates to the mitochondria rather than to the nucleus upon short-term *in vitro* GC treatment (Talaber et al. 2009). The mitochondrial GR translocation correlated with the high GC-induced apoptosis sensitivity of this cell type (Talaber et al. 2009). However, the exact steps how the translocated GC-GR

Table 1Exogenous GC analogue-induced effects on thymocytes *in vivo*.

DX effect	RU486	TcR	Reference(s)
DP cell depletion	—	±	(Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2003; Boldizsar et al. 2006; Palinkas et al. 2008)
AnnexinV induction	NE	±	(Berki et al. 2002; Palinkas et al. 2008)
Early (4 h) apoptosis induction	—	NE	(Boldizsar et al. 2006)
Late (8 h <) apoptosis induction	+	NE	(Boldizsar et al. 2006)
Mitochondrial membrane potential decrease	NE	±	(Palinkas et al. 2008)
Bcl-2 down-regulation in DP cells	NE	+	(Boldizsar et al. 2006; Palinkas et al. 2008)
DP CD69 up regulation ^a	—	+	(Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2003)
Increased SP/DP ratio ^a	NE	+	(Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2003)
DX-induced GR down-regulation ^b	+ ^c	—	(Berki et al. 2002; Boldizsar et al. 2006; Palinkas et al. 2008)
Transient GR up-regulation ^b	—	NE	(Boldizsar et al. 2006)

Table summarizes the most important effects of *in vivo* DX treatment on thymocytes based on our original results listed in the References column. Interactions when combined with the GC antagonist RU486 or TcR stimulation are indicated (+: inhibition; +/−: partial inhibition; −: no inhibition, NE: not evaluated). Apoptosis related results are highlighted with bold face.

^a Indicators of positive selection.

^b GR autoregulation by GC.

^c In single positive cells.

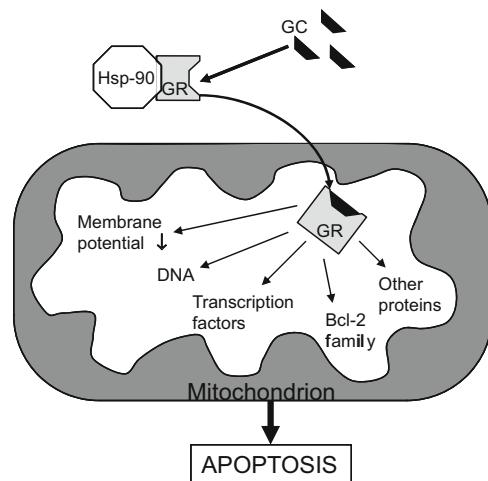


Fig. 3. Mitochondrial trafficking of the ligand-bound GR and its potential biological effects in thymocytes. After ligand binding the GR rapidly translocates to the mitochondria. The activated GR might interact with a number of mitochondrial proteins regulating apoptosis, or act as a transcription factor influencing mitochondrial gene transcription directly or indirectly through interacting with other transcription factors. One of the earliest indicators of mitochondrial loss of function and initiation of the apoptotic cascade is decrease in mitochondrial membrane potential.

complex initiates the apoptotic cascade in the mitochondrion is still to be elucidated.

In Fig. 3 we summarized the possible interactions of the ligand-activated GR in the mitochondrion, which can possibly lead to apoptosis. High-dose GC-analogue treatment reduced the mitochondrial membrane potential (Buttgereit et al. 1994; Buttgereit et al. 2000; Palinkas et al. 2008), which might be an early indicator of GC-induced apoptosis mediated by non-genomic effects. The GR might interact with the heat-shock protein elements (e.g. Hsp-60) of the mitochondrial membrane, as it interacts with Hsp 90 in the cytoplasm (Pratt and Toft 1997), or it could interact with other mitochondrial proteins similar to its cytoplasmic interactions (Bartis et al. 2006; Bartis et al. 2007; Löwenberg et al. 2005). GR could exert its apoptosis-regulating effect by interacting with members of the Bcl-2 family, similarly to another nuclear receptor, Nur77, which was shown to translocate to the mitochondria in thymocytes and convert Bcl-2 to a killer protein (Thompson and Winoto 2008). Furthermore, the mitochondrial GR can promote the assembly of the Bax/Bak

oligomers, which participate in apoptosis initiation (Brunelle and Letai 2009) and mitochondrial permeability transition. The association of GR with Bcl-2 was not only reported in lymphohaeopoietic cells, but also in neurons (Du et al. 2009), suggesting that this phenomenon is not T cell specific. GR can also regulate the level of the proapoptotic Bcl-2 family members, through genomic effect (Herold et al. 2006; Herr et al. 2007). Interestingly, in the mitochondrial DNA, GRE-like sequences were found, which suggests that the mitochondrial GR could influence the mitochondrial gene transcription directly (Demonacos et al. 1996; Berdianier 2006; Psarra et al. 2009; Psarra and Sekeris 2009). This latter mechanism is supported by previous reports about the role of mitochondrial steroid receptors in regulating genes of oxidative phosphorylation in the mitochondria (Scheller and Sekeris 2003; Psarra et al. 2009). Also, the GR might regulate mitochondrial gene expression indirectly through influencing other transcription factors. For example, interaction of the GR with thioredoxin and NF-κB was described in the mitochondria of HEK293 cells (Psarra et al. 2009). Besides NF-κB, AP-1, CREB and p53 have been also found in the mitochondria in a variety of cell and tissue types which could also represent potential candidate partners for the mitochondrial GR (Psarra et al. 2009; Psarra and Sekeris 2009).

Overall, there is accumulating evidence, that mitochondrial GR plays a significant role in regulating the GC-sensitivity and apoptosis of lymphoid cells. The possible effects mediated by the mitochondrial GR could be both mitochondrial gene expression dependent and independent, but the fine molecular events need further exploration.

Concluding remarks

A strong driving force of studies aiming at the non-genomic GC effects in T cells derives from the clinical point of view, motivated by the need for new, more selective GC analogues with fewer side effects than their “classical” counterparts. However, recent advances in this field have enriched our immunological and cell biological knowledge profoundly. Novel interactions between the GR and other signalling proteins highlighted a complex network in immune cells regulating their activation and differentiation. Consequently, now the GR can be viewed as a universal player in the fine-tuning of T cell functions from the earliest phosphorylation steps in the cytoplasm to the regulation of gene expression in the nucleus. Better understanding of these novel GR signalling pathways and their place in the signalling network of immune cells could significantly enhance the development of new drugs

targeting not only the GR, but also its partner molecules. Modulating GC effects "indirectly" through "complementary" signalling pathways offers a promising new approach in the field of immunomodulation.

References

- Ashwell, J.D., King, L.B., Vaccchio, M.S., 1996. Cross-talk between the T cell antigen receptor and the glucocorticoid receptor regulates thymocyte development. *Stem Cells* 14, 490–500.
- Ashwell, J.D., Lu, F.W., Vaccchio, M.S., 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 309–345.
- Au-Yeung, B.B., Deindl, S., Hsu, L.Y., Palacios, E.H., Levin, S.E., Kuriyan, J., Weiss, A., 2009. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol. Rev.* 228, 41–57.
- Bartholome, B., Spies, C.M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G.R., Lauster, R., Scheffold, A., Buttigereit, F., 2004. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 18, 70–80.
- Bartis, D., Boldizsar, F., Kvall, K., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P., Monostori, E., Berki, T., 2007. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 253–258.
- Bartis, D., Boldizsar, F., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P., Berki, T., 2006. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98, 147–154.
- Berdanier, C.D., 2006. Mitochondrial gene expression: influence of nutrients and hormones. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231, 1593–1601.
- Berg, J.M., 1989. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57, 1065–1068.
- Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F., Nemeth, P., 2002. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int. Immunol.* 14, 463–469.
- Billadeau, D.D., Nolz, J.C., Gomez, T.S., 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 131–143.
- Boelens, J., Lust, S., Van Bockstaele, F., Van Gele, M., Janssens, A., Derycke, L., Vanhoecke, B., Philippé, J., Bracke, M., Offner, F., 2009. Steroid effects on ZAP-70 and SYK in relation to apoptosis in poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* 33, 1335–1343.
- Boldizsar, F., Palinkas, L., Bartis, D., Nemeth, P., Berki, T., 2003. Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model. *Immunol. Lett.* 90, 97–102.
- Boldizsar, F., Palinkas, L., Czompoly, T., Bartis, D., Nemeth, P., Berki, T., 2006. 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* 211, 785–796.
- Brunelle, J.K., Letai, A., 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci.* 122, 437–441.
- Burkhardt, J.K., Carrizosa, E., Shaffer, M.H., 2008. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 233–259.
- Buttigereit, F., Burmester, G.R., Brand, M.D., 2000. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol. Today* 21, 192–199.
- Buttigereit, F., Burmester, G.R., Lipworth, B.J., 2005. Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear. *Lancet* 365, 801–803.
- Buttigereit, F., Grant, A., Muller, M., Brand, M.D., 1994. The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur. J. Biochem.* 223, 513–519.
- Buttigereit, F., Krauss, S., Brand, M.D., 1997. Methylprednisolone inhibits uptake of Ca^{2+} and Na^+ ions into concanavalin A-stimulated thymocytes. *Biochem. J.* 326 (Part 2), 329–332.
- Buttigereit, F., Scheffold, A., 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529–534.
- Chen, L., Apgar, J., Huynh, L., Dicker, F., Giago-McGahan, T., Rassenti, L., Weiss, A., Kipps, T.J., 2005. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105, 2036–2041.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., Kipps, T.J., 2002. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 4609–4614.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohazska, Z., Nardai, G., 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79, 129–168.
- Demonacos, C.V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D.A., Sekeris, C.E., 1996. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 61, 226–232.
- Distelhorst, C.W., Howard, K.J., 1990. Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone RU486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *J. Steroid Biochem.* 36, 25–31.
- Drouin, J., Sun, Y.L., Tremblay, S., Lavender, P., Schmidt, T.J., De Lean, A., Nemer, M., 1992. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 6, 1299–1309.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B.S., Manji, H.K., 2009. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3543–3548.
- Duvarci, S., Pare, D., 2007. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J. Neurosci.* 27, 4482–4491.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Evans, S.J., Moore, F.L., Murray, T.F., 1998. Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 1–8.
- Evans, S.J., Murray, T.F., Moore, F.L., 2000. Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72, 209–221.
- Fukuda, S., Mitsuoka, H., Schmid-Schönbein, G.W., 2004. Leukocyte fluid shear response in the presence of glucocorticoid. *J. Leukoc. Biol.* 75, 664–670.
- Gametchu, B., 1987. Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science* 236, 456–461.
- Gametchu, B., Chen, F., Sackey, F., Powell, C., Watson, C.S., 1999. Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 64, 107–119.
- Gomez, T.S., Billadeau, D.D., 2008. T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv. Immunol.* 97, 1–64.
- Hayashi, R., Wada, H., Ito, K., Adcock, I.M., 2004. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 51–62.
- Herold, M.J., McPherson, K.G., Reichardt, H.M., 2006. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 60–72.
- Herr, I., Gassler, N., Friess, H., Buchler, M.W., 2007. Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12, 271–291.
- Jaffe, H.L., 1924. The influence of the suprarenal gland on the thymus: I. Regeneration of the thymus following double suprarenalectomy in the rat. *J. Exp. Med.* 40, 325–342.
- Jaffe, H.L., 1924. The influence of the suprarenal gland on the thymus: III. Stimulation of the growth of the thymus gland following double suprarenalectomy in young rats. *J. Exp. Med.* 40, 753–759.
- Keating, K.M., Barisas, B.G., Roess, D.A., 1988. Glucocorticoid effects on lipid lateral diffusion and membrane composition in lipopolysaccharide-activated B-cell leukemia 1 cells. *Cancer Res.* 48, 59–63.
- Keating, K.M., Roess, D.A., Peacock, J.S., Barisas, B.G., 1985. Glucocorticoid effects on membrane lipid mobility during differentiation of murine B lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 846, 305–312.
- Lechner, O., Dietrich, H., Wiegers, G.J., Vacchio, M., Wick, G., 2001. Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus. *Int. Immunol.* 13, 769–776.
- Lechner, O., Wiegers, G.J., Oliveira-Dos-Santos, A.J., Dietrich, H., Recheis, H., Waterman, M., Boyd, R., Wick, G., 2000. Glucocorticoid production in the murine thymus. *Eur. J. Immunol.* 30, 337–346.
- Lefebvre, P., Danze, P.M., Sablonniere, B., Richard, C., Formstecher, P., Dautrevaux, M., 1988. Association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90 k nonsteroid-binding component is stabilized by both steroid and nonsteroidal antigenic glucocorticoids in intact cells. *Biochemistry* 27, 9186–9194.
- Löwenberg, M., Tuynman, J., Bilderbeek, J., Gaber, T., Buttigereit, F., van Deventer, S., Peppelenbosch, M., Hommes, D., 2005. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106, 1703–1710.
- Löwenberg, M., Verhaar, A.P., Bilderbeek, J., Marle, J., Buttigereit, F., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J., Hommes, D.W., 2006. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* 7, 1023–1029.
- Löwenberg, M., Verhaar, A.P., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2007. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol. Med.* 13, 158–163.
- Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J., 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25–44.
- Orchinik, M., Murray, T.F., Moore, F.L., 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252, 1848–1851.
- Palinkas, L., Talaber, G., Boldizsar, F., Bartis, D., Nemeth, P., Berki, T., 2008. Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology* 213, 39–50.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjovall, J., Jondal, M., Okret, S., 1999. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J.* 13, 893–901.
- Peixoto, E.B., Collares-Buzato, C.B., 2006. Modulation of the epithelial barrier by dexamethasone and prolactin in cultured Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Cell Biol. Int.* 30, 101–113.
- Pratt, W.B., Toft, D.O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360.
- Psarra, A.M., Hermann, S., Panayotou, G., Spyrou, G., 2009. Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF- κ B modulates glucocorticoid receptor and NF- κ B signaling in HEK 293 cells. *Biochem. J.*
- Psarra, A.M., Sekeris, C.E., 2009. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 431–436.
- Psarra, A.M., Solakidi, S., Trougakos, I.P., Margaritis, L.H., Spyrou, G., Sekeris, C.E., 2005. Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2544–2558.

- Qiao, S., Chen, L., Okret, S., Jondal, M., 2008. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. *Exp. Cell Res.* 314, 3027–3035.
- Qiao, S., Okret, S., Jondal, M., 2009. Thymocyte-synthesized glucocorticoids play a role in thymocyte homeostasis and are downregulated by adrenocortotropic hormone. *Endocrinology* 150, 4163–4169.
- Rand, P.W., Lacombe, E., Barker, N.D., Kallechey, G.L., 1977. Effects of methylprednisolone on the physical properties of the human red cell. *J. Lab Clin. Med.* 89, 1241–1250.
- Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Greaves, A., Weiss, A., Kipps, T.J., 2004. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351, 893–901.
- Sackey, F.N., Watson, C.S., Gametchu, B., 1997. Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *Am. J. Physiol.* 273, E571–E583.
- Scheller, K., Sekeris, C.E., 2003. The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Exp. Physiol.* 88, 129–140.
- Schnaider, T., Somogyi, J., Csermely, P., Szamel, M., 1998. The Hsp90-specific inhibitor, geldanamycin, blocks CD28-mediated activation of human T lymphocytes. *Life Sci.* 63, 949–954.
- Schnaider, T., Somogyi, J., Csermely, P., Szamel, M., 2000. The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signalling events of T-lymphocyte activation. *Cell Stress Chaperones* 5, 52–61.
- Selye, H., 1936. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br. J. Exp. Pathol.* 17, 234–248.
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E., 2006. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 203, 189–201.
- Sionov, R.V., Kfir, S., Zafirir, E., Cohen, O., Zilberman, Y., Yefenof, E., 2006. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5, 1017–1026.
- Smith, D.F., Toft, D.O., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 7, 4–11.
- Spies, C.M., Schaumann, D.H., Berki, T., Mayer, K., Jakstadt, M., Huscher, D., Wunder, C., Burmester, G.R., Radbruch, A., Lauster, R., Scheffold, A., Buttigereit, F., 2006. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1139–1146.
- Star, P., 1895. Clayton hospital and wakefield general dispensary: an unusual case of addison's disease; sudden death; remarks. *The Lancet* 145, 284.
- Talaber, G., Boldizsar, F., Bartis, D., Palinkas, L., Szabo, M., Berta, G., Setalo, G. Jr., Nemeth, P., Berki, T., 2009. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int. Immunol. Epub.* 7 Sept 2009.
- Thompson, J., Winoto, A., 2008. During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J. Exp. Med.* 205, 1029–1036.
- Tryc, A.B., Spies, C.M., Schneider, U., Kunkel, D., Berki, T., Sieper, J., Burmester, G.R., Radbruch, A., Scheffold, A., Buttigereit, F., 2006. Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* 33, 2249–2253.
- Vacchio, M.S., Papadopoulos, V., Ashwell, J.D., 1994. Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J. Exp. Med.* 179, 1835–1846.
- Van Bommel, T., Marsen, T., Bojar, H., 1987. Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res.* 7, 1217–1223.
- Wiegers, G.J., Knoflach, M., Böck, G., Niederegger, H., Dietrich, H., Falus, A., Boyd, R., Wick, G., 2001. CD4(+) CD8(+) TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 31, 2293–2301.
- Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556.

Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells

M. Szabo, T. Czompoly, K. Kvell, G. Talaber, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki and F. Boldizsar

Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, H-7643 Pecs, Hungary

Correspondence to: F. Boldizsar, Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, H-7643 Pecs, Szigeti ut 12, Hungary;
E-mail: ferenc.boldizsar@aok.pte.hu

Received 28 September 2011, accepted 10 November 2011

Abstract

Zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa (ZAP-70) kinase is a key regulator in the early steps of TCR signaling but some aspects of its fine regulation are still unclear. From its 31 tyrosine (Y) residues, 11 phosphorylation sites have been identified, some with activator (Y315 and Y493) or inhibitory (Y292 and Y492) and others with unknown function (Y069, Y126 and Y178). In our present work, we aimed to elucidate the role of different Y residues of ZAP-70, especially those with unknown function, in calcium signaling and the autoregulation of the kinase. ZAP-70-deficient Jurkat cells (P116) were stably reconstituted with point-mutated ZAP-70 constructs where tyrosine residues 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 or 493 were replaced with phenylalanine (F). The anti-CD3-elicited calcium signal increased in F069-, F292- and F492-ZAP-70-expressing cell lines but decreased in the F126-, F315- and F493-ZAP-70-expressing cell lines. ZAP-70 point mutations led to phosphorylation changes predominantly in SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa (SLP-76) but not linker of activated T cells (LAT) during CD3-activation; moreover, we detected basal hyperphosphorylation of SLP-76 Y128 in the F126-, F178- and F492-ZAP-70-expressing cell lines. In summary, Y069, Y178, Y292 and Y492 have inhibitory, while Y126, Y315 and Y493 activator role in anti-CD3-induced T-cell activation. Phosphorylation changes in LAT and SLP-76 suggest that fine regulation of ZAP-70 on calcium signaling is rather transmitted through SLP-76 not LAT. Additionally, negative or positive autoregulatory function of Y292 and Y493 or Y315, respectively, was revealed in ZAP-70. These data indicate that previously not characterized Y069, Y126 and Y178 in ZAP-70 participate in the fine regulation of TCR signaling.

Keywords: lentiviral transfection, site-directed mutagenesis, TCR signaling, ZAP-70

Introduction

T cells are key players of adaptive immunity: they recognize peptide antigens with their TCR in an MHC-restricted manner (1, 2), which leads to their activation/differentiation and the engagement of effector mechanisms. Co-receptors, like CD4 or CD8, CD28 and the protein tyrosine phosphatase CD45 are also involved in TCR-mediated signaling (3–5). A complex network of signaling events is prerequisite for T-cell activation. Upon close TCR-peptide-MHC binding, early phosphorylation steps are initiated. First, the sarcoma (Src) non-receptor tyrosine kinase family member, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) (CD4/8 associated) is primed by the phosphatase CD45 through the removal of an inhibitory phosphate group from tyrosine (Y)505 (6). Next, Lck is activated by the phosphorylation of Y394 by the activated TCR complex (6). The activated Lck, in turn, phosphorylates immunoreceptor tyrosine-based activation motifs found in the TCR-associated CD3 complex (7). The phosphor-

ylated CD3 ζ chain provides a docking site for the spleen tyrosine kinase (Syk) family member zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa (ZAP-70) kinase (8).

ZAP-70 is phosphorylated by Lck and activated to become a key organizer of downstream TCR signaling steps. Two important target molecules of the ZAP-70 are the adapter proteins linker of activated T cells (LAT) and SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa (SLP-76) (9–11). Phosphorylation of these molecules leads to the formation of a multimolecular complex involving growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), IL2-inducible T-cell kinase, GRB2-related adaptor downstream of Src homology 2 domain containing transforming protein (Shc) and Vav that results in activation of phospholipase C- γ 1 (PLC γ 1) (12, 13). PLC γ 1, in turn, cleaves phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate producing two second messengers: inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) (14). DAG initiates two major pathways

2 ZAP-70 tyrosines regulate proximal TCR signaling

the rat sarcoma (Ras) and protein kinase C theta (PKC θ) signaling (15). Ras triggers the MAP kinase cascade that results in the activation of transcription factors [e.g. activator protein 1 (AP-1)] (16), while activation of PKC θ activates the nuclear factor κ B (NF κ B) pathway leading also to transcriptional regulation (17).

IP₃ releases Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum (intracellular Ca²⁺ store) that is followed by the opening of plasma membrane Ca²⁺ channels as well (capacitative influx) (18). Elevated intracellular Ca²⁺ level then activates calcineurin, calmodulin and finally the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT) (19). As a consequence of all above-mentioned signaling cascades, a number of transcription factors are activated (AP-1, NFAT and NF κ B) which lead to complex gene expression changes in activated T cells (20).

The ZAP-70 kinase is member of the Syk non-receptor tyrosine kinase family and is expressed in T cells, NK cells and basophile granulocytes (8, 21). ZAP-70 consists of two N-terminal Src homology 2 (SH2) domains and a C-terminal kinase domain separated by interdomains A and B, respectively (22). ZAP-70 contains 31 Y residues in total, 11 of which have been identified as phosphorylation sites by mass spectroscopy; however, the physiological function of some is still unknown (23). For example, little is known about Y069, Y126, Y178 and Y238, located in the two SH2 domains and interdomain A, although Y126 is considered to be involved in the autophosphorylation of the kinase (23). Interdomain B contains three regulatory Y residues at 292, 315 and 319. Y292 plays an inhibitory role in TCR-mediated signaling and serves as docking site for casitas B-lineage lymphoma (24–26). Y315 binds Vav and sarcoma virus CT10 oncogene homolog II and bears both positive and negative regulatory functions in T-cell activation (27, 28). Y319 plays a positive regulatory function and is important in PLC- γ 1 and Ras-mediated signaling (29, 30). Y residues found in interdomain B also influence T-cell development (31–33). Five tyrosines of the kinase domain are considered to take part in T-cell activation. Y474 is the docking site for Shc (34); Y492 has inhibitory, while Y493 has an activatory role in T-cell activation (35, 36). Y597 and Y598 are negative regulatory sites (37). Most of the functions of specific Y residues mentioned so far were examined in either B cell-based systems or Jurkat cells.

In our present work, we aimed to elucidate the function yet unknown Y residues of the ZAP-70 kinase. To that end, we reconstituted P116 cells (a ZAP-70-deficient Jurkat subclone) with point-mutated ZAP-70 molecules, where Y residues at positions 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 or 493 were replaced with phenylalanine (F) using a lentiviral transfection system. After establishing the mutant ZAP-70-expressing cell lines, we analyzed how these mutations affected the TCR signaling pathway by characterizing the Ca²⁺ signaling and phosphorylation events. Two important substrates of the ZAP-70 kinase, LAT and SLP-76 molecules, were studied in more detail. Here, we provide new data about the regulatory functions of Y069, Y126, Y178 residues of the ZAP-70 kinase. Moreover, we show that ZAP-70 point mutations exert their regulatory effect on Ca²⁺ signaling through SLP-76. Importantly, we established an array of new Jurkat cell lines carry-

ing targeted mutations, which provide a useful tool for future signaling studies as well.

Methods

Chemicals and buffers

All fine chemicals were obtained from Sigma unless otherwise stated.

Cell lines

Jurkat (ATCC TIB-152), P116 (ZAP-70-deficient Jurkat subclone; ATCC CRL-2676) or transgenic P116 cells transfected with the wild-type (WT) or point-mutated ZAP-70 were cultured under conventional conditions (37°C, humidified atmosphere, containing 5% CO₂) in RPMI supplemented with 10% FCS (Gibco), sodium pyruvate (1 mM) and glucose (4.5 g l⁻¹), penicillin and streptomycin.

Cloning and site-directed mutagenesis of the human ZAP-70

The full-length human ZAP-70 coding sequence (henceforth WT-ZAP-70) was amplified using the primers P1 (forward) and P2 (reverse) (annealing temperature: 57°C; product length: 1881 bp) containing BamH1 and Sal1 restriction sites, respectively (Supplementary Table 1 is available at *International Immunology Online*). We used a cDNA library transcribed from human peripheral T cell total RNA as template for the cloning PCR. Next, the PCR product was purified and cloned into a TA vector using the InsTAClone PCR cloning kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions; thereafter, the plasmid with the insert was sequenced.

Site-directed mutagenesis of the human ZAP-70 was done in two steps using the TA-cloned WT sequence as a template. First, PCRs were done using primers containing the Y-F mutations at different amino acid (AA) positions (Supplementary Table 1 and Figure 1 are available at *International Immunology Online*); the following forward and reverse primer combinations were used: P1-P069, P1-P126, P1-P178, P1-P238, P1-292, P315-P2, P492-P2 and P493-P2 (Supplementary Table 1 and Figure 1 are available at *International Immunology Online*). The PCR products were purified and used as megaprimer in the second step PCRs in pair with P1 or P2 to amplify the full-length ZAP-70 constructs containing the Y-F mutations. The final products were TA cloned and sequenced which verified the targeted mutations.

All PCRs were done with a high fidelity Proof Start DNA Polymerase (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Stable transfection of the ZAP-70 constructs into ZAP-70-deficient P116 cell line using lentiviral vectors

P116 cells were transfected with the lentiviral vectors containing the mutated or the full-length WT-ZAP-70 cDNA. Briefly, point-mutated or WT-ZAP-70 cDNA has been inserted into the pWPTS lentiviral transfer plasmid under control of elongation factor-1 (EF1) promoter. This late second-generation lentiviral construct contains central polypurine tract and WPREs that increase transgene integration and expression (38, 39). For lentivirus production, an envelope construct (pMD.G),

a packaging plasmid (R8.91), and the transfer plasmid (pWPTS with EF1-ZAP-70) were transiently co-transfected by calcium-phosphate method into 293T cells pre-treated with chloroquine (1 mM final concentration). Following an overnight incubation and medium change, the supernatant of the virus producer cells was harvested after 24 h, centrifuged (2000 r.p.m., 10 min, 4°C) and filtered (0.45-μm pore size polyvinylidene fluoride-coated filters) to eliminate rough cellular debris (40). P116 cells were transfected by spinoculation (41) at MOI = 10 (MOI: multiplicity of infection or virus/cell ratio).

Antibodies

The following antibodies were used for western blotting: mouse monoclonal anti-phosphotyrosine (clone PY20, 1:5000) and anti-ZAP-70 (clone 29/ZAP-70 Kinase, 1:5000) antibodies were from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA); mouse monoclonal anti-β-actin (clone AC-74, 1:50000) was from Sigma and rabbit polyclonal anti-SLP-76 (1:1000) antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). As secondary antibodies, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000; Hurnavix, Hungary) or anti-rabbit IgG HRP (1:1000; Pierce) were used.

For immunoprecipitation (IP), we used mouse monoclonal anti-SLP-76 (clone F-7; 2 μg per sample) antibody from Santa Cruz Biotechnology and rabbit polyclonal ZAP-70 (a kind gift from E. Monostori, University of Szeged, Hungary).

For flow cytometry, we used mouse monoclonal FITC-conjugated anti-ZAP-70 antibody (clone 2F3.2; Upstate Biotechnology) recognizing AAs 1–254 of the ZAP-70 kinase and

mouse monoclonal PE-conjugated ZAP-70 antibody (clone 1E7.2; eBioscience) recognizing AAs 282–307 (Fig. 1A). Phospho-specific PE-conjugated mouse anti-SLP-76 pY128 (clone J141-668.36.58) antibody was purchased from BD Biosciences.

Intracellular staining and flow cytometry for the detection of intracellular ZAP-70 expression

Cells (10^6) per sample were fixed in PBS containing 4% PFA for 20 min and then permeabilized in saponine buffer (PBS containing 0.1% NaN_3 , 0.1% BSA and 0.1% saponine). Cells were labeled with two different antibodies recognizing two different epitopes of ZAP-70 (see above and Fig. 1A) in permeabilization buffer for 45 min on ice. Next, samples were washed twice with saponine buffer and once with PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN_3 .

Flow cytometric acquisition and analysis were done with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using the CellQuest software. Cells were gated based on their forward scatter/side scatter parameters, 10 000 events were acquired in each sample. Mean fluorescence intensity values (MFI) were calculated based on histograms. As negative staining controls, unlabeled auto-fluorescent samples and isotype-matched control antibodies for each color were used.

Activation of cells

Anti-human-CD3 monoclonal antibody (OKT-3; ATCC CRL-8001; 5 μg per sample) was used for the activation of 10^6

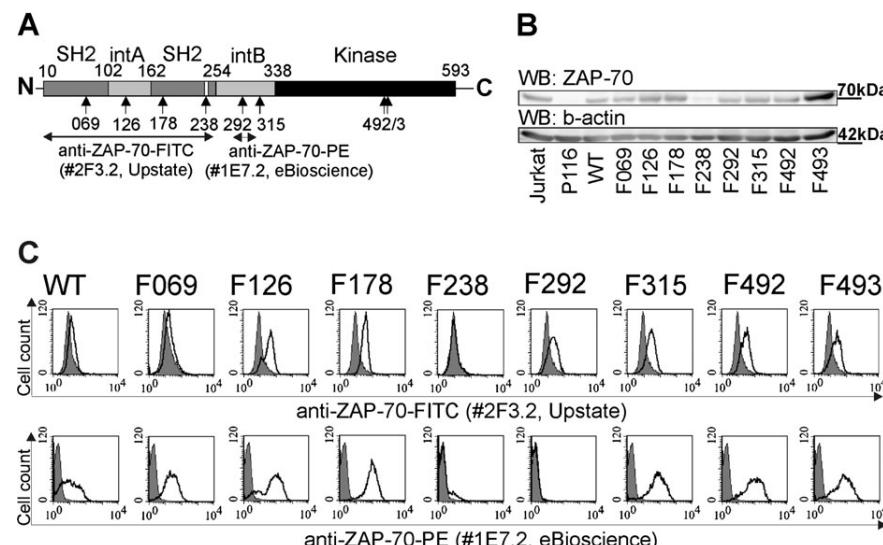


Fig. 1. Targeted point mutation analysis of selected ZAP-70 tyrosines (Y). (A) Structure of human ZAP-70. Domains of the molecule are indicated in the ribbon diagram (SH2: dark gray; interdomain: light gray and kinase: black). Numbers show the positions of selected amino acid residues. Specific Y residues that were mutated to F in the study are indicated with vertical arrows and their AA position numbers. A putative immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif sequence (236VEYLKL241) containing Y238 is indicated as a white area in the second SH2 domain. Epitopes of the two different monoclonal anti-ZAP-70 antibodies are indicated with horizontal double arrows. (B): ZAP-70 expression of the different cell lines was first detected with WB (upper panel). To check equal loading of the samples, we reprobed the blot with anti-β-actin antibody (lower panel). (C): ZAP-70 expression of the transfected cell lines was also analyzed with flow cytometry using two different monoclonal anti-ZAP-70 antibodies. Representative fluorescent histogram plots show the FL1 [anti-ZAP-70-FITC (#2F3.2, Upstate)] or FL2 [anti-ZAP-70-PE (#1E7.2, eBioscience)] fluorescence intensities. Gray filled histograms show the fluorescent staining of the ZAP-70-deficient P116 cells (served as negative control), whereas bold black histograms represent the fluorescent signals of the ZAP-70-transfected cells.

4 ZAP-70 tyrosines regulate proximal TCR signaling

T cells in 100 µl RPMI, at 37°C under continuous shaking (Thermo Mixer, Eppendorf, Germany) for 2 min. For western blots (WBs), the reaction was stopped in liquid nitrogen, for Phospho-flow experiments with 4% PFA.

WB and IP

Resting or activated cells were lysed in Triton X lysis buffer (50 mM HEPES, 10 mM Na-pyrophosphate, 10 mM EDTA, 100 mM NaF, 10% glycerol and 1% Triton X-100, pH 7.3, freshly completed with protease inhibitor and Naorthovanadate) for 30 min on ice and then centrifuged for 10 min at 13 000 r.p.m. The supernatant was either boiled in SDS sample buffer (125 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue and 10% mercaptoethanol) for 10 min or further used for IP.

For IP, cell lysates were incubated in blocking buffer (Tris-buffered saline containing 10% BSA and 0.1% NaN₃) with the appropriate amount of antibody (see in Antibodies) for 2 h and then incubated with Protein-G (GE Healthcare, UK) for 2 h. After washing three times, immunocomplexes were removed from the Protein-G by 10 min boiling in SDS sample buffer.

Samples were separated on 7.5 or 10% SDS-polyacrylamide gel using a MiniProtean system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and blotted onto nitrocellulose membranes with Trans-Blot equipment (Bio-Rad) overnight. Membranes were soaked in blocking buffer [2% BSA or 5% non-fatty dry milk (Bio-Rad), 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4] for 1 h at room temperature (RT) and then incubated with the appropriate dilution of primary antibodies (see in Antibodies) in 10-times diluted blocking buffer for an additional 2 h at RT. Washing of the membranes was performed in wash buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl and 0.1% Tween-20, pH 7.4). After washing, blots were developed with HRP-conjugated secondary antibodies. Following additional washing, blots were visualized using Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA). Signals were detected with the Fuji LAS4000 imaging system (Fuji, Japan). Antibodies were removed using Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce) and after blocking (see above), blots were re-probed with the second primary antibody. Densitometry of the blots was performed with the Scion-Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Flow cytometric detection of anti-CD3 treatment-elicited intracellular Ca²⁺ signal

To detect the changes in the free intracellular Ca²⁺ level, cells were loaded with the Ca²⁺ selective indicator dye Fluo-3-acetoxymethyl ester (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the protocol described by Minta *et al.* (42). Flow cytometric measurements were performed and analyzed with a FACS Calibur flow cytometer using the CellQuest software. Baseline Ca²⁺ level was measured for 50 s and then OKT-3 was added to the samples and the measurements lasted for a total of 5 min. To analyze the dynamics of the Ca²⁺ signal, the changes of FL1 intensity, being proportional to the intracellular Ca²⁺ level (42), were plotted against time (43). Briefly, gates were created along the time axis of the activation dot plots at definite time points and the mean FL1 fluorescence

intensities were calculated from every gate. These values were divided with the basal fluorescence intensities measured in the same sample before the addition of the activating agent and represented as 'FL-1 change' (y-axis) (43).

Phosphorylation changes after T-cell activation detected with Phospho-flow technique

Resting or OKT-3-activated cells were fixed with 4% PFA at 37°C for 10 min under continuous shaking and then permeabilized in Phosflow Perm Buffer III (BD Pharmingen) for 30 min on ice. Samples were then washed in PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃ and incubated with anti-SLP-76 pY128 antibody for 45 min at RT. Samples were washed in PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃ and finally re-suspended in PBS. Flow cytometric acquisition and analysis were performed with a FACS Calibur flow cytometer using the CellQuest software (BD Biosciences). The anti-CD3-induced phosphorylation increase was calculated by dividing the SLP-76 pY128 MFI values measured in activated cells with the MFI value of the resting cells.

Statistical analysis

Descriptive statistics was used to determine group means and the standard errors of the means (mean ± SEM). Differences between two groups were tested for statistical significance using Student's *t*-test. A value of *P* ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Establishment of Jurkat cell lines transfected with ZAP-70 containing targeted point mutations at different tyrosine residues

To elucidate the role of different Y residues in TCR signaling, we have generated Jurkat cell lines stably expressing Y-F 'loss of function' point mutants of the ZAP-70 protein. To this end, we applied site-directed mutagenesis on the WT-ZAP-70 coding sequence to change Y residues 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 and 493 to F (Fig. 1A) leading to potential changes in signaling cascades based on the mass spectrographic data by Watts *et al.* (23). To date, no *in vivo* functional data were available about the first four (069, 126, 178 and 238) Y residues. The latter four residues are better known: Y292 and Y492 have been shown to possess inhibitory, whereas Y315 and Y493 possess activator role. This experimental setup was beneficial in two ways: (i) the known inhibitory and activator Y residues provided us internal controls to compare the effect of Y-F mutations of yet unknown residues on TCR signaling and (ii) we could validate/compare our data with those in previous works by other research groups. Importantly, this is the first systematic study in which eight targeted mutations in human ZAP-70 have been analyzed parallel using a knock-in cell line model.

The Y-F point mutant ZAP-70 constructs were introduced into P116 cells (ZAP-70-deficient Jurkat cells) using lentiviral transfection. The expression of the ZAP-70 molecule was confirmed with WB and flow cytometry (Fig. 1B and C). All transgenic cell lines expressed comparable levels of the ZAP-70 except the F238-ZAP-70 cell line (Fig. 1B and C).

The antibodies used for flow cytometry recognized two different parts of ZAP-70 (Fig. 1A). Importantly, the cell line expressing F292-ZAP-70 could not be stained with anti-ZAP-70-PE clone 1E7.2 because the epitope of this antibody lies between AAs 284 and 307. Therefore, targeted Y-F mutation at position 292 abruptly the epitope necessary for antigen recognition, which, in turn, verified the presence of this mutation (besides sequencing). The expression level of the ZAP-70 proved to be stable over time as checked regularly by intracellular ZAP-70 staining and flow cytometry (data not shown).

Interestingly, despite three repeated transfections, we could not establish the F238-ZAP-70-expressing cell line (Fig. 1B and C) although the construct was complete as assessed by repeated sequence and restriction analysis. As a consequence of this unsuccessful transfection, we omitted the analysis of Y238 from further parts of this study, despite the fact that Y238 is found in a putative immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif sequence (²³⁶VEYLKL²⁴¹) based on an own preliminary sequence analysis (Fig. 1A) so it would have represented an interesting signaling target Y residue. Although we have no direct evidence why the expression of the F238-ZAP-70 was not successful, we might speculate that this mutation would affect post-translational modifications of the molecule leading to defective protein folding and subsequent breakdown.

Targeted Y-F point mutations in ZAP-70 alter the anti-CD3 treatment-induced Ca²⁺ signaling in Jurkat cells

Next, we checked if the transgenic ZAP-70 molecule was functionally active and restored the TCR/CD3 signaling pathway in P116 cells. In the absence of ZAP-70, the TCR signaling is blocked at an early stage leading to impaired T-cell activation *in vitro* and abnormal T-cell differentiation *in vivo* (44, 45). A plausible and simple way to check TCR/CD3 signaling is the analysis of anti-CD3-evoked Ca²⁺ signal. Here, confirming a previous study, introduction of the WT-ZAP-70 into P116 cells led to the restoration of the impaired anti-CD3-induced Ca²⁺ signal (Fig. 2) (46). Thus, the lentiviral transfection led to the stable expression of a functional ZAP-70 molecule.

Targeted Y-F mutations had diverse effects on the anti-CD3-elicited Ca²⁺ signal (Fig. 2). As expected, mutation of the known inhibitory Y residues 292 and 492 led to an increased Ca²⁺ signal when compared with the WT-ZAP-70-expressing cells, while the mutation of the activator Y493 in the kinase domain completely abolished the anti-CD3-induced Ca²⁺ signal showing that the phosphorylation of this Y is essential for downstream TCR/CD3 signaling events (Fig. 2). Importantly, the opposing regulatory function of the neighboring Y492 and Y493 was mirrored in the Ca²⁺ signaling results (Fig. 2) and provided further proof that our site-directed mutagenesis approach was indeed precise. Mutation of the regulatory/activator Y315 led to a slightly decreased Ca²⁺ signal (Fig. 2).

The amplitude of the Ca²⁺ signal was significantly higher in the F069-ZAP-70-expressing cell line than in the WT-ZAP-70-expressing cell line, similar to what was found in the F292 and F492 mutant cell lines, indicating that Y069 could have an inhibitory role in TCR/CD3 signaling. Mutation at Y126 led to a significantly decreased Ca²⁺ signal, very simi-

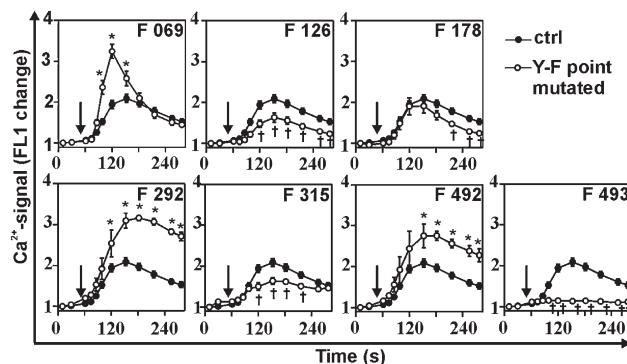


Fig. 2. Effect of Y-F mutations on the anti-CD3-elicited Ca²⁺ signaling in Jurkat cells. The Ca²⁺ signal was detected by flow cytometry after loading the cells with the Fluo-3AM indicator. Mean FL-1 fluorescence intensities (proportional with intracellular free Ca²⁺ level; y-axis) were plotted against time (x-axis). The effects of different point mutations were compared with the Ca²⁺ signal of the WT-ZAP-70-expressing cell lines (control); significantly ($P \leq 0.05$) higher (*) or lower (+) values are indicated. Data points in the diagrams represent mean \pm SEM values calculated from three independent measurements. Ca²⁺ signals of the Y-F point mutants or the control are shown with empty or black dots, respectively. Anti-CD3 was added to the samples at 50 s (labeled with vertical black arrows) and the measurement continued for another 4 min.

lar to the effect of Y315 mutation. Based on this analogy, we propose that Y126 in interdomain A could have an activator/regulatory function-like Y315 has in interdomain B. Y-F mutation at the 178 AA position did not affect the anti-CD3-induced Ca²⁺ signaling.

To exclude the possibility that the transfections have changed the CD3 expression of the mutant cell lines and this would have led to the above differences in Ca²⁺ signaling, we checked the cell surface CD3 on all cell lines regularly but found no significant difference (data not shown).

Point mutations of specific Y residues in ZAP-70 alter tyrosine phosphorylation pattern and ZAP-70 autophosphorylation during TCR/CD3 signaling

First, we analyzed the anti-CD3 treatment-induced tyrosine phosphorylation patterns of the cell lines (Fig. 3A). Various Y-F mutations in the ZAP-70 molecule affected significantly the tyrosine phosphorylation of the cells. Phospho-protein bands of ~35, 55, 70 (most likely ZAP-70) and 115 kDa showed differences in the mutants compared with the WT-ZAP-70-expressing cells (Fig. 3A). A general hyperphosphorylation could be observed in the F292-ZAP-70-expressing cells (Fig. 3A). As expected, P116 ZAP-70-deficient cells did not activate upon anti-CD3 treatment (Fig. 3A). Densitometry of the 70-kDa band revealed that mutations at Y292 and Y493 led to a marked hyperphosphorylation (actin-corrected relative densities: 1.2 and 1.4, respectively) (Fig. 3A).

To confirm that the 70-kDa band observed on the whole cell lysate phospho-blot (Fig. 3A) was indeed ZAP-70, we performed IP with anti-ZAP-70 antibody (Fig. 3B, upper panels). We found increased phosphorylation of the ZAP-70 in the F292- and F493-ZAP-70 mutant cells (Fig. 3B, upper panels), which was in line with the results of the cell lysates (Fig. 3A). Y-F mutation at residue 315 led to slightly

6 ZAP-70 tyrosines regulate proximal TCR signaling

decreased ZAP-70 phosphorylation (interestingly not seen in the cell lysates, Fig. 3A), while other mutations did not alter the anti-CD3-induced ZAP-70 phosphorylation (Fig. 3B, upper panels). Importantly, these results indicated that Y-F mutations at specific residues in ZAP-70 had an impact on the autophosphorylation (autoregulation) of the kinase.

SLP-76 phosphorylation is regulated by specific Y residues in ZAP-70

SLP-76 and LAT are two important substrates of ZAP-70 and their phosphorylation is critical for the activation of PLC γ and thus the initiation of Ca $^{2+}$ -signaling (9, 11, 12). Therefore, next, we analyzed the phosphorylation of these two proteins using IP and WB. We found slight SLP-76 hyperphosphorylation in the F069-, F178-, F292-, F315- and F492-ZAP-70-expressing cell lines compared with the control WT-ZAP-70-expressing cells (Fig. 3B, lower panels). SLP-76 phosphorylation was impaired in the F493-ZAP-70 cells simi-

lar to P116 cells (Fig. 3B, lower panels), indicating that this activating residue is not only critical in the Ca $^{2+}$ signal but also in phosphorylating SLP-76. Opposite to this, in case of LAT, Y-F point mutations in ZAP-70 did not alter the anti-CD3-induced phosphorylation significantly (data not shown). As expected, in P116 cells, phosphorylation of both SLP-76 and LAT was diminished due to the absence of ZAP-70.

With the Phospho-flow technique, phosphorylation events can be analyzed in a Y-specific manner. So next, we tested the above described phosphorylation changes in SLP-76 with the commercially available phospho-specific antibody recognizing the phosphorylation of Y128 (Fig. 4). We found a significantly decreased phosphorylation of SLP-76 Y128 in the anti-CD3-stimulated F493-ZAP-70-expressing cell line when compared with the WT-ZAP-70-transfected P116 cells (Fig. 4A and B) which was in line with the above IP experiment, indicating that Y128 in SLP-76 is phosphorylated by

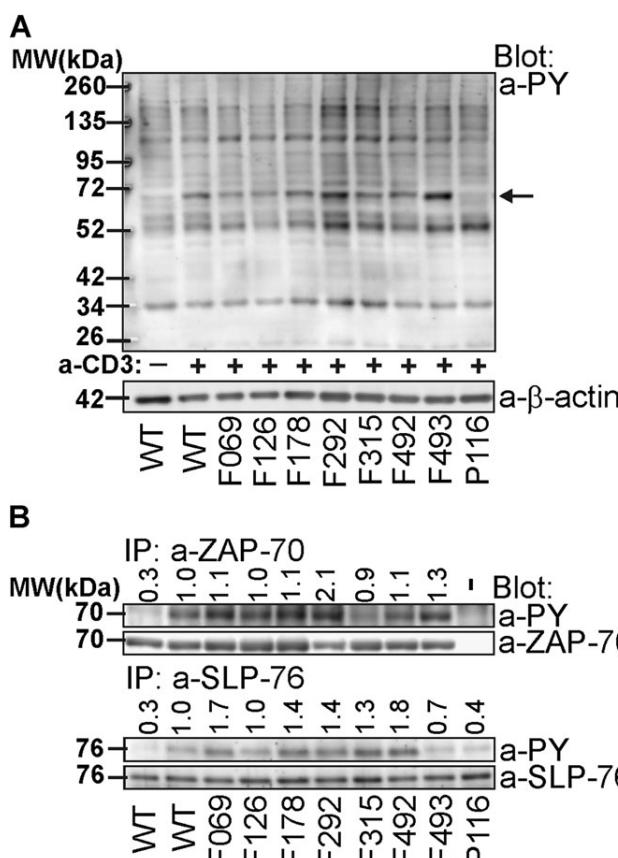


Fig. 3. Anti-CD3-induced phosphorylation in the Y-F mutant ZAP-70-expressing cell lines. (A): Whole cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE and after blotting visualized with anti-phosphotyrosine antibody (upper panel). Arrow indicates the ZAP-70 band. Equal sample loading was verified by reprobing the blot with anti- β -actin antibody (lower panel). (B): The effect of ZAP-70 Y-F mutations on the Y-phosphorylation of ZAP-70 (upper panels) and SLP-76 (lower panels) was analyzed after IP. Blots were first probed with anti-phosphotyrosine antibody and then re-probed with anti-ZAP-70 or anti-SLP-76. Numbers above blot panels indicate the relative phosphorylation of the samples compared with the anti-CD3-activated control.

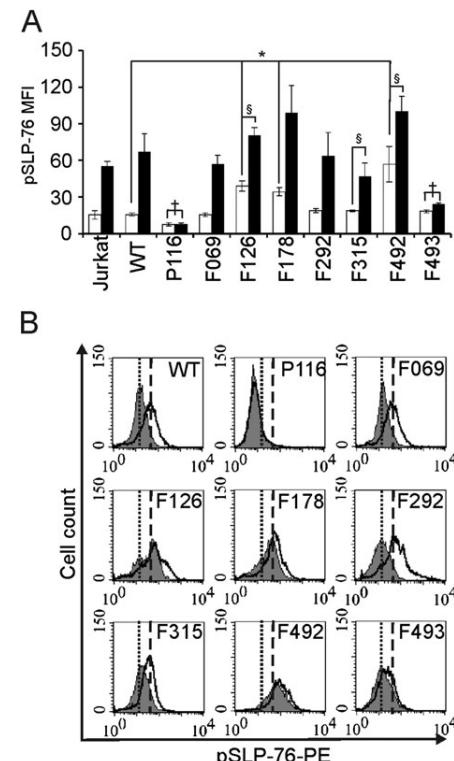


Fig. 4. Analysis of Y-specific SLP-76 phosphorylation changes with Phospho-flow technique in the WT or Y-F point mutant ZAP-70-expressing P116 cells. (A): Phosphorylation of SLP-76 Y128 in resting (white bars) or activated (black bars) cells is presented as pSLP-76 MFI. Bars show mean \pm SEM calculated from the MFI data of three independent experiments. Significantly ($P \leq 0.05$) higher values compared with the 'WT' are indicated (*). The anti-CD3-induced SLP-76 Y128 phosphorylation was completely missing in P116 and F493-ZAP-70 cells (†) and markedly reduced in the F126-, F315- and F492-ZAP-70-expressing cell lines (§). (B): Corresponding representative flow cytometric histogram plots show the basal (gray filled histogram) and anti-CD3-activated (black histograms) pSLP-76 staining of the different cell lines. For easier comparison, MFI values of the basal and activated WT-ZAP-70-expressing (control) cell line are indicated with vertical dotted and dashed lines on all panels, respectively.

ZAP-70 in a Y493-dependent fashion. There was also a marked decrease of anti-CD3-induced Y128 phosphorylation in the F126-, F315- and F492-ZAP-70 cell lines (MFI change: 2.1 ± 0.1 , 2.5 ± 0.6 and 2.0 ± 0.5 , respectively) compared with the WT-ZAP-70-expressing cells (MFI change: 4.5 ± 1.31) (Fig. 4A and B). Interestingly, Y-F mutation at residues 126, 178 and 492 led to the hyperphosphorylation of Y128 of SLP-76 in unstimulated cells (Fig. 4A and B), indicating that these Y residues in ZAP-70 might possess autoinhibitory function.

Discussion

The TCR/CD3 signaling pathway has been extensively characterized in the last 20 years. During this time, there has been a significant shift from the initial theoretical, basic immunological and cell-signaling question toward the unraveling of its potential role in some immunological diseases and more, it became a promising therapeutic target. After the identification of the most important molecules of the TCR/CD3 signaling cascade, the use of mutant T-cell line (Jurkat) derivatives, defective in any of these signaling components, became a very valuable experimental validation process; for example, cell lines defective in the expression of Lck (JCaM1), ZAP-70 (P116), LAT (JCaM2.5) or SLP-76 (J14) have been widely utilized.

ZAP-70 is required for a complete TCR/CD3 signaling as shown by serious functional defects in ZAP-70-deficient cell line (P116) or mice (44, 45); moreover, in humans, defective ZAP-70 function leads to SCID phenotype (47). The function of kinases is regulated through phosphorylation events, therefore, studying the role of their potential phosphorylation sites is of particular interest and these studies can provide fine details of already known signaling pathways. In case of ZAP-70, point mutation studies are of special importance since some of these fine genetic changes lead to pathologic conditions, for example rheumatoid arthritis like disease in the SKG mice (48).

The role of Y292, Y315, Y492 and Y493 in ZAP-70 has been already characterized in previous studies (22); therefore, we included these Y residues into the present study as controls. Y292 and Y492 possess inhibitory role in TCR/CD3 signaling, while Y315 and Y493 are activator residues (24, 32, 49, 50). First, our Ca^{2+} signaling measurements were clearly in line

with these data: mutations of either Y292 or Y492 to F led to increased Ca^{2+} signal amplitude, whereas mutations at Y315 or Y493 inhibited the anti-CD3-elicited Ca^{2+} signal partially or completely, respectively. Importantly, these four mutants exhibited various levels of positive or negative alterations in TCR/CD3 signaling, so, they provided us a basis for a correct comparison of the yet unknown Y residues.

Interestingly, relatively little is known about the function of Y residues found in the SH2 domains or interdomain A of ZAP-70 to date. Despite the fact that in the pioneer mass spectroscopy study of Watts *et al.* in 1994, three Y residues were identified in this region of ZAP-70; too, no further studies were performed either in cell lines or in mice to elucidate the potential regulatory role of these sites. Therefore, the point mutation analysis of Y069, Y126, Y178 and Y238 was of particular interest and importance since this might be the first systematic study where their potential regulatory role in the TCR/CD3 signaling pathway was investigated in detail. Although in the study of Watts *et al.* Y069, Y126 and Y178 were not phosphorylated upon anti-CD3 treatment, they showed that these residues might be phosphorylated by Lck *in vitro*; moreover, Y126 in interdomain A was found to be an autophosphorylation site as well (23).

Here, we found Y-F mutations at positions 069 and 126 had opposing effects on the Ca^{2+} signal: the former increased while the latter decreased the amplitude (Fig. 2, Table 1). Thus, these two Y residues seem to play a role in regulating TCR/CD3 signaling by ZAP-70. Y-F mutation at residue 178, on the other hand, did not alter the Ca^{2+} signal (Fig. 2, Table 1). Interestingly, Y-F mutation at residue 069 also altered the kinetics of the Ca^{2+} signal. Since Y069 is found within the N-terminal SH2 domain of ZAP-70, therefore, its effect on TCR/CD3 signaling might be mediated either through altered binding capacity of the activated ZAP-70 to the CD3 ζ chains (structural explanation) or, alternatively, this residue might impact the kinase activity of the molecule (autoregulatory/functional explanation). However, this question should be addressed in future studies.

Based on our results, Y126 in interdomain A might be a promising candidate in the regulation of ZAP-70 function and tuning of TCR/CD3 signaling. Loss of function mutation of Y126 led to a decreased Ca^{2+} signal, which was very similar to what was observed in case of Y-F mutation at residue Y315 (Fig. 2, Table 1). Based on this analogy, we propose that

Table 1. Summary of the changes in the studied signaling events caused by targeted mutagenesis of selected ZAP-70 tyrosines

Y-F position	Ca^{2+}	ZAP-70 ^a	SLP-76 ^a	SLP-76 ^{Y128}		Function	Autoregulation
				-	+		
a-CD3	+	+	+	—	—	TCR/CD3	
069	↑	—	↑	—	—	Inhibitory	None
126	↓	—	—	↑	↓	Activator	None
178	—	—	↑	↑	—	Part. inhibitory	None
238	NE	NE	NE	NE	NE	?	?
292	↑	↑	↑	—	—	Inhibitory	Negative
315	↓	↓	↑	—	↓	Activator	Positive
492	↑	—	↑	↑	↓	Inhibitory	None
493	↓	↑	↓	—	↓	Activator	Negative

All changes in signaling events were compared with the WT-ZAP-70-transfected (control) cell line. Y residues with previously undefined functions are indicated with italics. ↑, increase; ↓, decrease; —, no change; NE, not evaluated; part., partial.

^aIP.

8 ZAP-70 tyrosines regulate proximal TCR signaling

Y126 in interdomain A could have a similar positive regulatory role in ZAP-70-mediated signaling to Y315 in interdomain B (Table 1). Interestingly, mutation of Y126 in the ZAP-70 led to basal hyperphosphorylation of Y128 in SLP-76 (Table 1). Altered phosphorylation of this adapter molecule could contribute to the decreased anti-CD3-elicited Ca^{2+} signal.

An important implication of our present work was that the effect of specific Y-F point mutations in ZAP-70 on the anti-CD3-induced Ca^{2+} signal seemed to be mediated differentially by SLP-76 or LAT. Phosphorylation and activation of PLC γ are indispensable in T-cell Ca^{2+} signaling; the adaptor proteins SLP-76 and LAT are key activators of PLC γ , and they link ZAP-70 with PLC γ (9, 11, 12). Earlier data showed that regulation of PLC γ activation depends both on LAT and SLP-76 activation (51). In the present study, we could dissect these parallel pathways in more detail. Most Y-F mutations in ZAP-70 led to increased SLP-76 phosphorylation except at the important activator residue 493, which, not surprisingly, caused a decrease, and Y126, which had no effect (Fig. 3B, Table 1). Moreover, we identified that Y126, Y178 and Y492 in ZAP-70 regulate the basal phosphorylation of Y128 in SLP-76 (Fig. 4, Table 1). Phosphorylation of Y128 in SLP-76 recruits non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1, P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 and Wiskott-Aldrich syndrome protein to the activation complex caused by TCR/CD3 stimulation leading to cytoskeleton rearrangement (52). This way ZAP-70 might, through SLP-76, indirectly be involved in cytoskeleton regulation processes, too. Since LAT phosphorylation was not influenced markedly by ZAP-70 point mutations (data not shown), we propose that the fine regulation of ZAP-70 on the Ca^{2+} signal is preferentially mediated through SLP-76 not LAT, as indicated by the fine phosphorylation changes correlating more closely with the Y-F mutations in ZAP-70.

Finally, mutation of Y493 to F led to a serious block in all early signaling steps characterized in the present study to a similar extent to what was observed in the ZAP-70-deficient P116 cells. Therefore, phosphorylation of Y493 is critical in downstream steps of T-cell activation; its loss leads to a 'functional knock-down' state of the TCR/CD3 signaling pathway (Table 1), confirming earlier studies (24, 50). On the other hand, hyperphosphorylation of ZAP-70 could be observed in F493-ZAP-70-expressing cells, most likely due to the hyperphosphorylation of other Y residue(s). This indicates that Y493 phosphorylation has important negative autoregulatory function, too (Table 1); however, this question should be addressed in future experiments.

Our results indicated that Y493 is not the only residue, which might be involved in the autoregulation of ZAP-70. In our opinion, autophosphorylation of the ZAP-70 upon anti-CD3 treatment provides us information about the potential autoregulatory function of Y residues in the kinase: increased phosphorylation of the ZAP-70 in the point-mutated cell lines suggests a negative, while decreased phosphorylation a positive autoregulatory function of the respective tyrosine residue. Accordingly, we found that Y292 had negative autoregulatory role, besides Y493 discussed above: in their absence ZAP-70 was hyperphosphorylated. On the other hand, decreased ZAP-70 phosphorylation was detected in cells expressing F at residue 315, indicating its positive autoregulatory function

(Fig. 3B, Table 1). These data complement previous results of Watts *et al.* about the *in vitro* autophosphorylation of Y126 and Y292 (23) and others suggesting that Y315 and 319 could possess positive autoregulatory function or participate in an 'autoinhibitory switch' regulating thereby the catalytic activity of ZAP-70 (22, 53). However, we are still far from the complete understanding of the fine mechanism and importance of the autoregulation'autophosphorylation of the ZAP-70 kinase.

In conclusion, TCR/CD3 signal transduction is influenced by a fine interplay of signaling molecules and ZAP-70 kinase with its Y residues conducts these early signaling events as summarized in Table 1. Our work confirmed the (auto)regulatory role of Y069, Y126 and Y178 residues of ZAP-70 in TCR/CD3 signaling completing our knowledge about specific phosphorylation sites found in this kinase molecule. Understanding fine details of ZAP-70 tyrosines in T-cell activation could bring us closer to unraveling its pathologic role in leukemia or autoimmune diseases, as well as future drug targeting.

Supplementary data

Supplementary data are available at *International Immunology Online*

Funding

This work was supported in part by the Zoltan Magyary Foundation, European Economic Area and Norway Grants (25/2010 to F.B.); Research Fund of the Faculty of Medicine (ÁOKKA-34039-7/2009 to T.B.); Health Science Council (ETT: 435/2009 to T.B.).

Acknowledgements

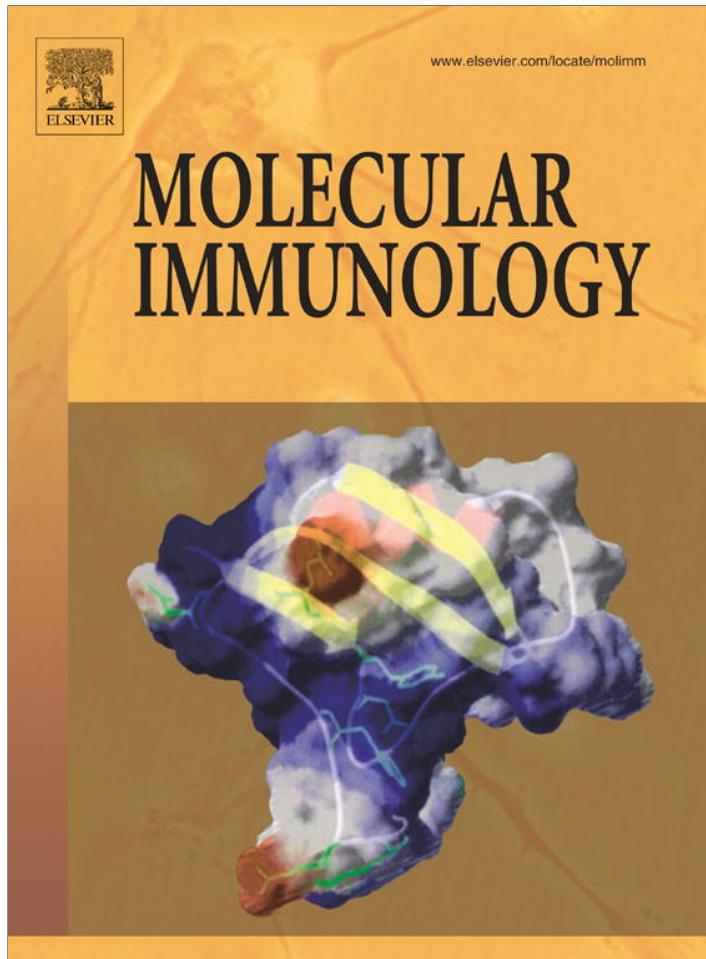
P116 (ZAP-70-deficient Jurkat subclone) and rabbit polyclonal ZAP-70 antibody was a kind gift from Prof. E.M., Szeged, Hungary.

References

- Doherty, P. C. and Zinkernagel, R. M. 1975. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 1:1406.
- Marrack, P., Hannum, C., Harris, M. *et al.* 1983. Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol. Rev.* 76:131.
- Miceli, M. C. and Parnes, J. R. 1991. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Semin. Immunol.* 3:133.
- Bjorgo, E. and Tasken, K. 2010. Novel mechanism of signaling by CD28. *Immunol. Lett.* 129:1.
- Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L. 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* 12:85.
- Palacios, E. H. and Weiss, A. 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23:7990.
- Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M. and Rudd, C. E. 1989. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p.56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:3277.
- Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. and Weiss, A. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71:649.
- Brdicka, T., Černý, J. and Horejsi, V. 1998. T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane micro-domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:356.

- 10 Sommers, C. L., Samelson, L. E. and Love, P. E. 2004. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays* 26:61.
- 11 Koretzky, G. A., Abtahian, F. and Silverman, M. A. 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 6:67.
- 12 Braiman, A., Barda-Saad, M., Sommers, C. L. and Samelson, L. E. 2006. Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *EMBO J.* 25:774.
- 13 Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. and Jordan, M. S. 2009. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27:591.
- 14 Kim, M. J., Kim, E., Ryu, S. H. and Suh, P. G. 2000. The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Exp. Mol. Med.* 32:101.
- 15 Matthews, S. A. and Cantrell, D. A. 2006. The role of serine/threonine kinases in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 18:314.
- 16 Genot, E. and Cantrell, D. A. 2000. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 12:289.
- 17 Isakov, N. and Altman, A. 2002. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 20:761.
- 18 Oh-Hora, M. and Rao, A. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 20:250.
- 19 Savignac, M., Mellstrom, B. and Naranjo, J. R. 2007. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch.* 454:523.
- 20 Serfling, E., Berberich-Siebelt, F. and Avots, A. 2007. NFAT in lymphocytes: a factor for all events? *Sci. STKE* 2007:e42.
- 21 Kepley, C. L., Wilson, B. S. and Oliver, J. M. 1998. Identification of the Fc epsilonRI-activated tyrosine kinases Lyn, Syk, and Zap-70 in human basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:304.
- 22 Au-Yeung, B. B., Deindl, S., Hsu, L. Y. et al. 2009. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol. Rev.* 228:41.
- 23 Watts, J. D., Affolter, M., Krebs, D. L., Wange, R. L., Samelson, L. E. and Aebersold, R. 1994. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 269:29520.
- 24 Kong, G., Dalton, M., Bubeck, W. J., Straus, D., Kurosaki, T. and Chan, A. C. 1996. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol. Cell. Biol.* 16:5026.
- 25 Zhao, Q. and Weiss, A. 1996. Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol. Cell. Biol.* 16:6765.
- 26 Luper, M. L. Jr, Songyang, Z., Shoelson, S. E., Cantley, L. C. and Band, H. 1997. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 272: 33140.
- 27 Wu, J., Zhao, Q., Kurosaki, T. and Weiss, A. 1997. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* 185:1877.
- 28 Gelkop, S., Gish, G. D., Babichev, Y., Pawson, T. and Isakov, N. 2005. T cell activation-induced CrkII binding to the Zap70 protein tyrosine kinase is mediated by Lck-dependent phosphorylation of Zap70 tyrosine 315. *J. Immunol.* 175:8123.
- 29 Di Bartolo, V., Mege, D., Germain, V. et al. 1999. Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 274:6285.
- 30 Williams, B. L., Irvin, B. J., Sutor, S. L. et al. 1999. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J.* 18:1832.
- 31 Gong, Q., Jin, X., Akk, A. M. et al. 2001. Requirement for tyrosine residues 315 and 319 within zeta chain-associated protein 70 for T cell development. *J. Exp. Med.* 194:507.
- 32 Magnan, A., Di, B. V., Mura, A. M. et al. 2001. T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* 194:491.
- 33 Di Bartolo, V., Malissen, M., Dufour, E. et al. 2002. Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* 32:568.
- 34 Pacini, S., Olivieri, C., Di Somma, M. M. et al. 1998. Tyrosine 474 of ZAP-70 is required for association with the Shc adaptor and for T-cell antigen receptor-dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* 273:20487.
- 35 Wange, R. L., Guitian, R., Isakov, N., Watts, J. D., Aebersold, R. and Samelson, L. E. 1995. Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 270:18730.
- 36 Mege, D., Di, B. V., Germain, V. et al. 1996. Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 271:32644.
- 37 Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P. and Kolanus, W. 1998. T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 273:15445.
- 38 Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. and Charneau, P. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173.
- 39 Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J. et al. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J. Virol.* 72:9873.
- 40 Klages, N., Zufferey, R. and Trono, D. 2000. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol. Ther.* 2:170.
- 41 O'Doherty, U., Swiggard, W. J. and Malim, M. H. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J. Virol.* 74:10074.
- 42 Minta, A., Kao, J. P. and Tsien, R. Y. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264:8171.
- 43 Boldizsar, F., Berki, T., Miseta, A. and Nemeth, P. 2002. Effect of hyperglycemia on the basal cytosolic free calcium level, calcium signal and tyrosine-phosphorylation in human T-cells. *Immunol. Lett.* 82:159.
- 44 Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W. et al. 1998. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* 18:1388.
- 45 Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K. et al. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435.
- 46 Bartis, D., Boldizsar, F., Kvell, K. et al. 2007. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:253.
- 47 Elder, M. E., Lin, D., Clever, J. et al. 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 264:1596.
- 48 Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H. et al. 2003. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426:454.
- 49 Di, B. V., Malissen, M., Dufour, E., Sechet, E., Malissen, B. and Acuto, O. 2002. Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* 32:568.
- 50 Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R. et al. 1995. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 14:2499.
- 51 Yablonski, D., Kadlecak, T. and Weiss, A. 2001. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol. Cell. Biol.* 21:4208.
- 52 Wu, J. N. and Koretzky, G. A. 2004. The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin. Immunol.* 16:379.
- 53 Brdicka, T., Kadlecak, T. A., Roose, J. P., Pastuszak, A. W. and Weiss, A. 2005. Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 25:4924.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in T cells

F. Boldizsar^{*,1}, M. Szabo¹, K. Kvell, T. Czompoly, G. Talaber, J. Bjorkan, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki

University of Pecs, Department of Immunology and Biotechnology, H-7624, Pecs, Szigeti ut 12, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2012

Received in revised form 20 July 2012

Accepted 21 July 2012

Keywords:

Non-genomic GC action

ZAP-70

TcR signaling

SLP-76

Cbl

ABSTRACT

ZAP-70 kinase is a key regulator of early T-cell signaling; moreover, it also participates in non-genomic glucocorticoid (GC) signaling. Short-term high-dose GC-analogue treatment induces the phosphorylation of the kinase, and its association with the GC receptor (GR).

In the present work, first, we identified those tyrosine (Y) residues of the ZAP-70 kinase which were involved in non-genomic GC signaling using an array of P116 cells (ZAP-70-deficient Jurkat subclone) lentivirally-transfected with wild type or point-mutated ZAP-70 constructs where Y-residues were replaced with phenylalanine (F) at positions 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 or 493. Then, we characterized the GC-analogue-induced Y-phosphorylation of 3 key substrates of the ZAP-70 kinase: SLP-76, LAT and Cbl. Finally, we studied the cross talk between the non-genomic GC- and TcR/CD3 signaling pathways.

Y-F mutations at positions 315 or 492 abolished the short high-dose Dexamethasone (DX) treatment-induced ZAP-70 phosphorylation suggesting that these Y-residues were involved in ZAP-70-mediated non-genomic GC actions. DX treatment alone induced Y-phosphorylation of LAT, SLP-76 and Cbl; moreover, in F315- and F492-ZAP-70 mutated cells decreased DX-induced Y-phosphorylation of SLP-76 and Cbl was observed indicating that these molecules might transmit downstream non-genomic GC signals in a ZAP-70 dependent manner. Short, high dose DX treatment influenced significantly the anti-CD3-induced signaling events: we observed alterations in LAT, SLP-76 and Cbl Y-phosphorylation and a decreased Ca^{2+} -signal.

These results confirm that ZAP-70 represents an important link between the non-genomic GC and TcR/CD3 signaling pathways. Importantly, the DX-induced effects on resting and activated T-cells are differentially mediated. These fine molecular details help to better understand the complex mechanism of non-genomic GC effects in T-cells.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Physiologically, glucocorticoid (GC) hormones are produced in the adrenal cortex, and their analogues are widely used as

therapeutic agents (Singer, 1972; Swartz and Dluhy, 1978) in the treatment of autoimmune diseases, allergy and asthma, and in the prevention of graft rejection in transplantation (Flammer and Rogatsky, 2011; Krishnan et al., 2009; Hricik et al., 1994) based on their immunosuppressive and anti-inflammatory effects. GC-analogue treatment results in the apoptosis of many cell types in the immune system, especially mature (Th1 or Th2) and immature ($\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ double positive thymocytes) T cells, and, as a consequence, the number of circulating T cells decreases. Moreover, GCs inhibit T cell signaling and cytokine – especially IL-2 – production (Stahn et al., 2007; Zen et al., 2011).

GCs exert most of their effects via the GC receptor (GR) through distinct intracellular signaling pathways (Buttgereit and Scheffold, 2002; Boldizsar et al., 2010). In the classical genomic pathway, ligand molecules induce the dissociation of the GR from chaperone molecules in the cytoplasm and this receptor-ligand complex translocates to the nucleus where it associates to GC responsive elements (GRE) in the promoter region of several genes, leading to changes in the transcription of cells (Nicolaides et al., 2010).

Abbreviations: ATPase, adenosine-triphosphatase; Cbl, Casitas B-lineage Lymphoma; CD, cluster of differentiation; DX, dexamethasone; DMSO, dimethyl sulfoxide; F, phenylalanine; DP, double positive; Fluo-3AM, Fluo-3-acetoxymethyl ester; GC, glucocorticoid; GR, GC receptor; Hsp-90, heat shock protein-90; IP, immunoprecipitation; ITIM, immunoreceptor Y-based inhibitory motif; Itk, IL2-inducible T cell kinase; IL2, interleukin 2; LAT, linker of activated T cells; Lck, lymphocyte-specific protein Y kinase; MAPK, mitogen activated protein kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PLC γ , phospholipase C γ ; PVDF, RPML, Roswell Park Memorial Institute tissue culture medium; RT, room temperature; SH2, Src homology 2; SLP-76, SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa; Syk, spleen Y kinase; TcR, T cell receptor; Th1, T-helper1; Th2, T-helper2; WB, Western blot; WT, wild type; Y, Y; ZAP-70, zeta-chain-associated protein kinase of 70 kDa.

* Corresponding author. Tel.: +36 72 536 288; fax: +36 72 536 289.

E-mail address: ferenc.boldizsar@aok.pte.hu (F. Boldizsar).

¹ These authors contributed equally to the work.

However, not all effects of the GCs can be explained by this genomic mechanism. Recently, accumulating evidence is available about non-genomic GC effects usually precipitated by high-dose GC treatment within a short period of time (Falkenstein et al., 2000). Non-genomic GC effects include: (i) direct effects in the plasma membrane; (ii) interactions between the activated GR and other cytoplasmic signaling molecules; (iii) signals mediated through the membrane GR; or (iv) mitochondrial effects (Buttgereit and Scheffold, 2002; Boldizsar et al., 2010). T lymphocytes are key regulators of the immune response; thus, inhibiting their activation is in the focus of immunosuppressive therapies. Importantly, some of the non-genomic GC effects were originally described in T-cells, which raised the possibility that the T cell suppressive effects of GCs might, at least partially, be mediated by non-genomic effects (Reichardt et al., 2006; Schweingruber et al., 2012).

For example, in activated murine thymocytes GCs inhibited the activation of Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase (Buttgereit and Scheffold, 2002), and the Na^+/H^+ exchange could also be inhibited with GCs (Chang et al., 2010). Membrane GR expression has been observed first in the S-49 mouse T lymphoma cells and the CCRF-CEM human T cell lymphoblast like cell line, and later on human peripheral lymphocytes and monocytes; however, its exact structure and signaling mechanisms are still unclear (Gametchu et al., 1993). According to recent results, the membrane and the cytoplasmic forms of the human GR are both encoded in the same gene, moreover, the mGR induces p38 MAPK phosphorylation upon ligand binding (Strehl et al., 2011).

Mitochondrial translocation of the GR was observed in GC sensitive cells including DP thymocytes upon short time GC treatment (Sionov et al., 2006b,a; Talaber et al., 2009). In activated human CD4 $^+$ T-cells short high dose GC treatment inhibited the phosphorylation of several signaling molecules of the TcR/CD3 pathway, including early participants like Lck and Fyn as well as downstream targets including PKB, PKC and members of the MAPK cascade (Lowenberg et al., 2005). Moreover, GCs disrupted the activation induced TcR-Lck-Fyn complex containing the Hsp-90 and the GR (Lowenberg et al., 2006).

Our earlier observations in Jurkat cells (human T-cell leukemia) showed that short-term high-dose Dexamethasone (henceforth DX) – a widely used synthetic GC-analogue – treatment led to Y-phosphorylation of the ZAP-70 kinase, a key molecule of T-cell activation, and enhanced the association between the ZAP-70 and GR most likely as a consequence of non-genomic GC effect. Moreover DX further increased the anti-CD3 induced Y-phosphorylation of the kinase (Bartis et al., 2006, 2007). This was a rather unexpected result, since Y-phosphorylation of the ZAP-70 is usually associated with T cell activation, whereas GC analogues are used as inhibitors of T cell activation. These observations led us to hypothesize that the non-genomic GC effects or the TcR/CD3 pathways could lead to the phosphorylation of different (possibly inhibitory) Y-residues in the ZAP-70 kinase. These fine Y-phosphorylation pattern differences could, in turn, regulate T cell activation.

In our present work, we aimed to elucidate which Y residues of the ZAP-70 kinase were involved in non-genomic GC actions. For this purpose, we used transgenic P116 cell lines expressing point-mutated ZAP-70, where Y at residues 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 and 493 were replaced with phenylalanine (F). Here, we show that Y315 and Y492 of ZAP-70 kinase are two candidate residues participating in non-genomic GC signaling. Short high dose DX treatment led to the Y-phosphorylation of important downstream ZAP-70 target molecules LAT, SLP-76 and Cbl, which was disrupted by Y-F point mutations at residues 315 and 492. Finally, GC-analogue treatment influenced the CD3 activation-induced phosphorylation of SLP-76, LAT and Cbl and the intracellular Ca^{2+} signal. These results contribute to the better understanding of the fine molecular details of non-genomic GC action in T cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and buffers

All fine chemicals were obtained from Sigma unless otherwise stated.

2.2. Cell lines

We used Jurkat (ATCC TIB-152) or transgenic P116 (ZAP-70 deficient Jurkat subclone, ATCC CRL-2676) cells lentivirally transfected with the WT or point mutated ZAP-70. In the point-mutant cells Ys were replaced with F at residues 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 and 493 as described (Szabo et al., 2012). Cells were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), sodium-pyruvate (1 mM) and glucose (4.5 g/l), penicillin and streptomycin under conventional conditions (37°C , humidified atmosphere, containing 5% CO_2).

2.3. Antibodies

For immunoprecipitation the following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-ZAP-70 (a kind gift from Prof. E. Monostori, Szeged, Hungary), mouse monoclonal anti-SLP-76 (clone F-7; 2 $\mu\text{g}/\text{sample}$), mouse monoclonal anti-LAT (clone 11B.12; 2 $\mu\text{g}/\text{sample}$) and mouse monoclonal anti-Cbl (clone A-9, 2 $\mu\text{g}/\text{sample}$) antibodies from Santa Cruz Biotechnology.

The following antibodies were used for Western blotting: mouse monoclonal anti-phospho-Y (clone PY20, 1:5000) and anti-ZAP-70 (clone 29/ZAP-70 kinase, 1:5000) antibodies from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA); mouse monoclonal anti- β -actin (clone AC-74, 1:50,000) was from Sigma; rabbit polyclonal anti-SLP-76 (1:1000), anti-LAT (1:500) and anti-Cbl (1:500) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA, USA). Mouse monoclonal anti-GR (clone 5E4, 1:2000) was produced in our laboratory (Berki et al., 1998). HRPO conjugated goat anti-mouse IgG (Hunnavix, Hungary, 1:1000) or anti-rabbit IgG (Pierce 1:1000) were used as secondary antibodies.

2.4. DX and anti-CD3 treatment of the cells

Before activation, cells were resuspended in serum free RPMI. DX was added to 10^7 cells in 100 μl RPMI at a final concentration of 10^{-5} M (corresponding to high-dose treatment in human therapy (Buttgereit et al., 2004; Buttgereit and Scheffold, 2002) for 2 min. For the activation of the TcR/CD3 pathway, anti-human-CD3 (clone OKT-3; ATCC CRL-8001) 5 $\mu\text{g}/10^6$ cells was used for 2 min. For combined treatment cells were pre-incubated with DX for 2 min followed by anti-CD3 activation for additional 2 min. Treatments were performed at 37°C under continuous shaking (Thermo Mixer, Eppendorf, Germany). The reactions were stopped in liquid nitrogen. For the intracellular Ca^{2+} measurement, cells were pre-treated with 10^{-5} M DX for 10 min followed by activation with anti-CD3.

2.5. Western blot, immunoprecipitation

Resting (untreated control), DX-, and/or anti-CD3-treated cells were lysed in Triton-X lysis buffer (50 mM HEPES, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 10% glycerol and 1% Triton-X 100, pH 7.3) complemented freshly with protease inhibitor and Na-orthovanadate. Lysis was performed for 30 min on ice then samples centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The supernatant was either used for immunoprecipitation or boiled immediately in SDS sample buffer (125 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.006% Bromo-phenol-blue and 10% mercaptoethanol) for 10 min.

For immunoprecipitation, cell lysates were incubated overnight with the appropriate amount (see in Section 2.3) of precipitating antibodies in blocking buffer (TBS containing 10% BSA and 0.1% NaN_3); then Protein-G (GE Healthcare, UK) was added to the samples and incubated for additional 2 hours. Finally, samples were washed five times in wash buffer (10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween-20, pH 7.4), and immune complexes were removed from the Protein-G by 10 min boiling in SDS sample buffer. Non-specific protein G binding was checked using the appropriate isotype control antibodies in preliminary experiments. None of the used precipitating antibodies showed any unspecific binding (data not shown).

Samples were separated on 10 or 7.5% SDS-polyacrylamide gels using a MiniProtean system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred to nitrocellulose membranes with Trans-Blot equipment (Bio-Rad) overnight. Non-specific binding sites were blocked with 2% BSA or 5% non-fatty dry milk (Bio-Rad) (dissolved in 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride, 0.1% Tween-20, pH 7.4) for 1 h at RT. Next, membranes were incubated with the appropriate dilution of primary antibodies (see in Antibodies section) in 10-times diluted blocking buffer for 2 h at RT. Membranes were washed three times, then, incubated with HRPO-conjugated secondary antibodies for 1 h at RT. Following additional washing, blots were developed using Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA). Signals were detected with the Fuji LAS4000 imaging system (Fuji, Japan). Antibodies were removed using Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce), and after blocking (see above) blots were re-probed with another primary antibody. For quantification, densitometry of the blots was performed using the Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Optical densities measured with the first antibodies were corrected with the density values of the loading control antibodies in corresponding samples.

2.6. Flow cytometric detection of changes in the intracellular Ca^{2+} -level

To detect the effect of DX on the anti-CD3 induced Ca^{2+} -signal, Jurkat cells were loaded with the Ca^{2+} -selective indicator Fluo-3AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Flow cytometric measurements were performed and analyzed with a FACS Calibur flow cytometer using the CellQuest software. Cells were incubated for 10 min with DX, or left untreated. A baseline Ca^{2+} level was measured for 50 s, then OKT-3 was added to the samples, and Ca^{2+} -level was measured for a further 5 min. The changes of FL1 intensity – proportional with the intracellular Ca^{2+} level – were plotted against time (Minta et al., 1989; Boldizsar et al., 2002).

2.7. Statistics

Descriptive statistics was used to determine group means and the standard errors of the means ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Differences between two groups were tested for statistical significance using Student's *t*-test. A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Short-term high-dose DX treatment-induced phosphorylation changes in WT or Y-F point mutant ZAP-70 expressing P116 cells

To explore the fine-details of the DX-induced phosphorylation pattern (non-genomic effects) on ZAP-70, previously, we have generated an array of transgenic P116 cells where Y residues at 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 and 493 positions of the ZAP-70 were

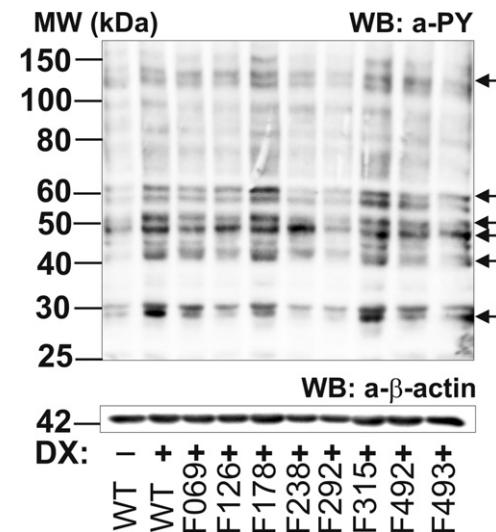


Fig. 1. Short-term high-dose DX treatment-induced changes in the phosphorylation pattern of WT- or Y-F point mutant ZAP-70 expressing cells. Cells were treated with 10^{-5} M DX for 2 min. Whole cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE and after blotting visualized with anti-PY antibody (upper panel). Arrows indicate bands that showed differences among the cell lines. Equal sample loading was checked after stripping and re-probing with anti- β -actin (lower panel). This blot is a representative of four repeated experiments.

replaced with F using a lentiviral transfection system (Szabo et al., 2012). In the control samples P116 was transfected with the WT-ZAP-70 (Szabo et al., 2012).

First, to see if these single Y-F mutations affected short high-dose DX treatment-induced Y-phosphorylation, all cell lines were incubated with 10^{-5} M DX for 2 min. Western blot analysis of whole cell lysates showed altered phosphorylation pattern of the different point mutated cell lines suggesting that Y-F point mutations in ZAP-70, indeed, influenced rapid non-genomic GC signaling (Fig. 1). More specifically, marked differences could be observed in protein bands at approximately 120, 70, 56, 40 and 30 (Fig. 1). These bands could correspond to important T-cell signalling molecules like Cbl (120 kDa), ZAP-70 (70 kDa), Lck (56 kDa) or LAT (36 kDa). To check equal sample loading of the blots, membranes were re-probed with anti- β -actin antibody, too (Fig. 1). To rule out the possibility that these differences in the DX-induced Y-phosphorylation could be caused by alterations in the basal Y-phosphorylation due to the mutations, we checked the basal Y-phosphorylation of all cell lines, too. We found no significant differences in the basal Y-phosphorylation pattern of the cell lines (data not shown).

3.2. Tyrosines 315 and 492 of the ZAP-70 kinase are involved in non-genomic GC signaling

We demonstrated in a previous study, that rapid, high-dose GC treatment alone caused increased phosphorylation of the ZAP-70 kinase (Bartis et al., 2006). To clear which Y residues of the kinase take part in this process, immunoprecipitation of the ZAP-70 was performed on point-mutated cells after 2 min, high dose DX treatment. Confirming our preliminary work (Bartis et al., 2006), the GC analogue exposition induced significant Y-phosphorylation of the ZAP-70 (Fig. 2A and B). Importantly, we observed significantly decreased phosphorylation in the cell lines expressing F315- or F492-ZAP-70 compared to the WT DX-treated sample indicating that these two Y residues might be involved in non-genomic GC actions (Fig. 2A and B). Despite repeated efforts, we could not achieve adequate expression of the F238-ZAP-70 (Szabo et al., 2012), therefore the role of this Y residue in non-genomic GC signaling remains yet unknown. To check equal sample loading of the

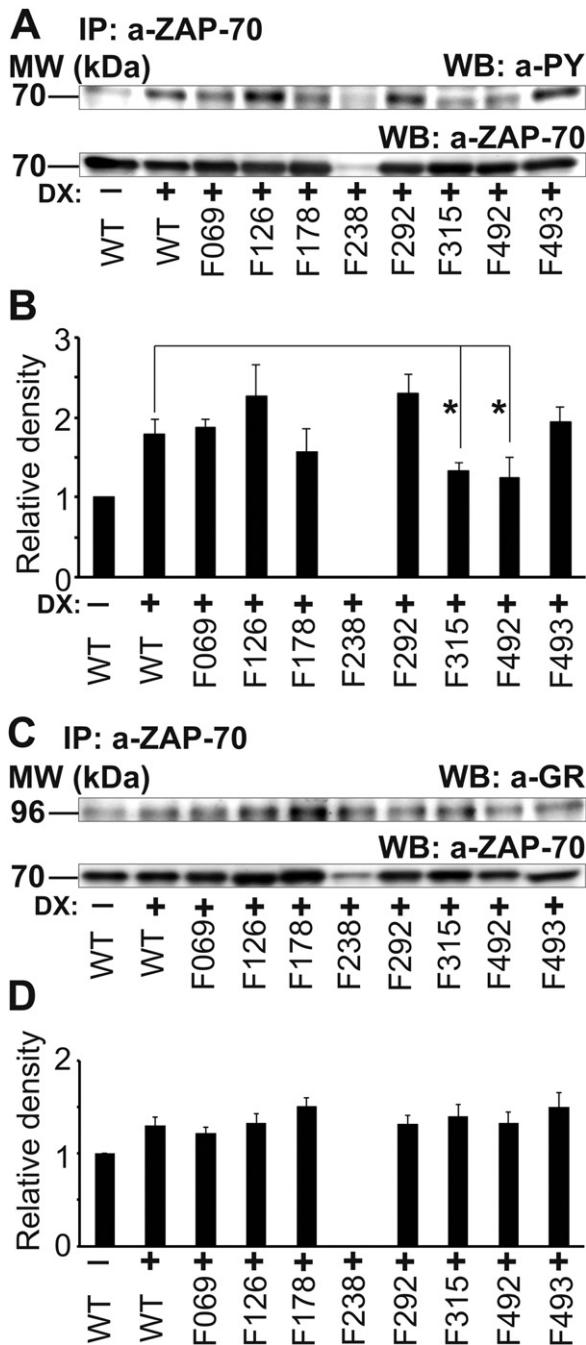


Fig. 2. Short-term high-dose DX-induced phosphorylation and GR association of the ZAP-70 kinase in the different cell lines. (A) After immunoprecipitation with anti-ZAP-70, the blot was developed with anti-PY antibody (upper panel) and re-probed with anti-ZAP-70 (lower panel). (B) Diagram shows the relative phosphorylation changes of ZAP-70 compared to the WT-ZAP-70 expressing cells. Densitometry was performed on three independent Western blots. Bars show the mean \pm SEM values; significant ($p \leq 0.05$) differences are indicated (*). (C) Western blots show the ZAP-70-GR co-precipitation in the different ZAP-70 variant expressing cells. After ZAP-70 precipitation, the blot was developed with anti-GR (upper panel) and, after stripping, re-probed with anti-ZAP-70 (lower panel). (D) Diagram shows the level of association between ZAP-70 and GR compared to the WT untreated cells. Relative densities were calculated by dividing the GR density levels with the ZAP-70 densities of the corresponding samples. Bars show the mean \pm SEM values calculated from three measurements.

blots, membranes were re-probed with anti-ZAP-70 antibody, too (Fig. 2A). To rule out the possibility that these differences in the DX-induced ZAP-70 Y-phosphorylation could be caused by alterations in the basal Y-phosphorylation due to the mutations, we checked the basal ZAP-70 Y-phosphorylation of all cell lines, too. We found no significant differences in the basal tyrosine-phosphorylation of the ZAP-70 kinase of the cell lines (data not shown).

Since the DX-induced ZAP-70 phosphorylation was coupled with an association to the GR (Bartis et al., 2007); next, we checked, if the Y-F point mutations, studied here, impacted this physical interaction. ZAP-70 and GR co-precipitation was examined on Western blot. 2 min DX treatment caused increased association of the GR to the WT ZAP-70 kinase (Fig. 2C and D). Despite of the phosphorylation changes observed in the F315- and F492-ZAP-70 expressing cells, we found no difference in the ZAP-70-GR association among the point-mutant ZAP-70 expressing cell lines (Fig. 2C and D) showing that Y residues are not directly involved in regulating the physical contact between these molecules.

3.3. Effects of short-term high-dose DX treatment on different points of the TcR/CD3 signaling pathway

As a-PY Western blots from the DX-treated whole cell lysates have shown (Fig. 1) the ZAP-70 kinase might not be the only target protein of non-genomic GC actions. Downstream ligands of the ZAP-70 kinase in the T-cell activation cascade include SLP-76, LAT and Cbl. Therefore, next, we examined if 2 min high-dose DX treatment affected the phosphorylation of these 3 molecules in the Jurkat cells. As shown on Fig. 3A–C, DX alone increased the phosphorylation of SLP-76, LAT and Cbl.

From the clinical point of view, cross talk between the TcR/CD3- and non-genomic GC signaling pathways is of special importance, because it is suspected to be in the background of some immunosuppressive effects. We modeled the cross talk between the two pathways by treating the cells with the combination of DX and anti-CD3. In a previous work, when DX treatment was given together with anti-CD3, ZAP-70 was hyperphosphorylated in Jurkat cells when compared to either treatment alone. Here, DX pretreatment did not influence significantly the anti-CD3 induced phosphorylation in SLP-76 or LAT (Fig. 3A and B). Cbl was phosphorylated upon anti-CD3 or combined DX + anti-CD3 treatments, but these did not reach the phosphorylation level after DX treatment alone (Fig. 3C).

Since the Ca^{2+} -signal is a key event in T-cell activation, next, we tested if short-term DX pre-treatment had an effect on the anti-CD3 induced Ca^{2+} -signal (Fig. 3D). 10^{-5} M DX treatment of WT-ZAP-70 expressing cells led to a significant decrease of the Ca^{2+} -signal compared to the anti-CD3 activated sample (Fig. 3D). In conclusion, non-genomic GC effects target different points of the TcR/CD3 pathway, indicating that there are several possible points of cross talk.

3.4. Short-term high-dose DX treatment-induced SLP-76 and Cbl phosphorylation is hampered by Y-F point mutations at residues 315 and 492 in the ZAP-70

As shown above, Y315 and Y492 of the ZAP-70 kinase were involved in non-genomic GC effects. Moreover, we have also seen that SLP-76, LAT and Cbl might be the downstream targets of ZAP-70 in non-genomic GC signaling. To see if the phosphorylation of Y315 and Y492 in ZAP-70 is indeed required for the transmission of non-genomic GC signal to the downstream ligand molecules, in our next experiment, we tested the short-term high-dose DX treatment-induced SLP-76, LAT and Cbl phosphorylation in the F315- and F492-ZAP-70 expressing cell lines (Fig. 4). Immunoprecipitations were performed from lysates deriving from WT control, and DX-treated WT-, F315- and F492-ZAP-70 expressing cells. The

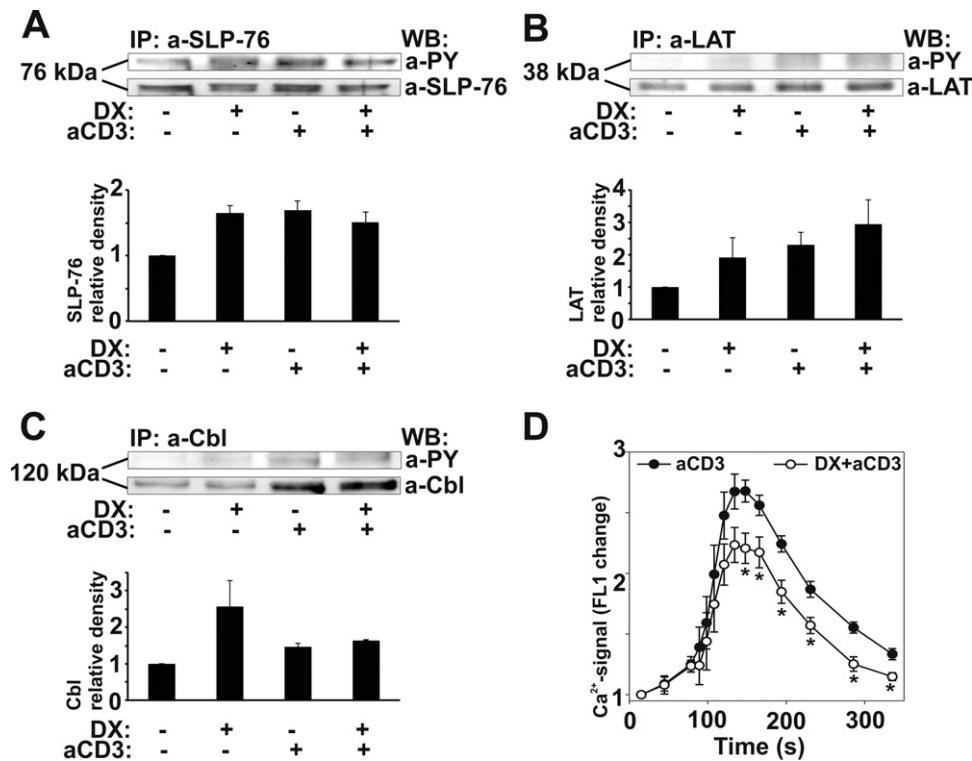


Fig. 3. Effect of short-term high-dose DX treatment on the TcR signaling pathway. Phosphorylation changes of SLP-76 (A), LAT (B) and Cbl (C) were evaluated upon DX, anti-CD3 and combined (DX + anti-CD3) treatment in Jurkat cells. Cells were left untreated, or were treated with DX and/or anti-CD3, then, immunoprecipitation of the samples were performed with anti-SLP-76 (A), anti-LAT (B) or anti-Cbl (C) antibodies. Blots were developed with anti-PY (upper panels) and, after stripping, re-probed with anti-SLP, anti-LAT and anti-Cbl antibodies (lower panels), respectively. Diagrams show the relative phosphorylation changes, based on the densitometry of three independent experiments. Bars represent the mean ± SEM values. (D) The anti-CD3 induced Ca²⁺-signal was partly inhibited by DX in Jurkat cells. The changes in the Ca²⁺-signal were detected by flow cytometry after loading the cells with the Fluo-3AM indicator. Mean FL-1 fluorescent intensities (proportional with intracellular free Ca²⁺ level; y-axis) were plotted against time (x-axis). Ca²⁺-signal of the DX pre-treated, anti-CD3 activated sample (DX – white dots) was compared to the anti-CD3 treated sample (control – black dots). Baseline Ca²⁺-level was measured for 50 s than anti-CD3 was added to the samples and the measurement continued for another 5 min. Diagram values are mean ± SEM calculated from the results of five independent experiments. Significantly ($p \leq 0.05$) different values compared to the anti-CD3-activated sample are indicated (*).

DX-induced Y-phosphorylation of the SLP-76 and Cbl molecules was abolished in F315 and F492-ZAP-70 expressing cell lines when compared to the DX-treated WT cells (Fig. 4A and C). Interestingly, in case of LAT, neither of these point mutations influenced the DX induced phosphorylation changes (Fig. 4B). These experiments have been repeated three times with similar results, but, unfortunately, statistical significance could not be confirmed.

4. Discussion

Non-genomic GC effects have been intensively examined in the last decades (Buttgereit and Scheffold, 2002; Boldizsar et al., 2010; Falkenstein et al., 2000), especially in T-lymphocytes, because such mechanisms might be responsible for some of the immunosuppressive effects of GC-analogues (Lowenberg et al., 2007). The molecular background of non-genomic GC effects on some components of the T-cell receptor signaling pathway have already been described: for example, DX treatment inhibited the activation induced increased phosphorylation of some important early and downstream T-cell signaling molecules (Lowenberg et al., 2005; Bartis et al., 2006).

ZAP-70 kinase, a member of the Syk family, is not only a central molecule in early T-cell activation but also participates in mediating non-genomic GC effects (Au-Yeung et al., 2009; Boldizsar et al., 2010) (Fig. 5); it consists of two SH2- and a kinase domain, linked by interdomains-A and -B. Among 31 Y (Y) residues of the ZAP-70 11 are involved in T-cell receptor signaling pathway with activator (126, 315, 493) or inhibitory (Y69, 178, 292, 492) function (Szabo et al., 2012; Au-Yeung et al., 2009; Watts et al., 1994). Briefly, upon engagement of the TcR, ZAP-70 associates with other

signaling molecules including two adapter molecules LAT and SLP-76, which play important roles in the transmission of the activation cascade to PLC γ (Smith-Garvin et al., 2009). ZAP-70 also associates with the negative regulator Cbl which regulates the activation of the kinase through Y292 (Meng et al., 1999; Rao et al., 2000); moreover, interaction between Cbl-b and PLC γ was also observed (Paolino and Penninger, 2010). Following phosphorylation events, a key event of the T-cell activation is the increase of the free intracellular Ca²⁺-level. ZAP-70 plays an important role in the development of this Ca²⁺-signal via adapter and regulator molecules, as shown by the fact that in its absence the Ca²⁺-signal is impaired (Williams et al., 1998).

In our present work, first, we clarified which Y residues of the ZAP-70 kinase might participate in non-genomic GC actions, and how this signal is transmitted to downstream target molecules. The use of transgenic cells with single Y-F point mutations provided us an excellent tool to examine the role of Y residues individually (Szabo et al., 2012). Short-term high dose DX treatment led to decreased ZAP-70 phosphorylation in the F315- and F492-ZAP-70 expressing cells, implicating that these two Y residues of the ZAP-70 kinase take part in non-genomic GC signaling (Fig. 5). Interestingly, these two Y residues have opposing roles in T-cell receptor signaling: Y315 has activator, while Y492 possesses an inhibitory function (Au-Yeung et al., 2009). These data indicate that there are fine differences in the Y-phosphorylation pattern of the ZAP-70 kinase induced by the non-genomic GC- or the T-cell receptor signaling pathways. The GC-induced association of the ZAP-70 and the GR has been described earlier (Bartis et al., 2007); thus, it could have been a tempting explanation for the

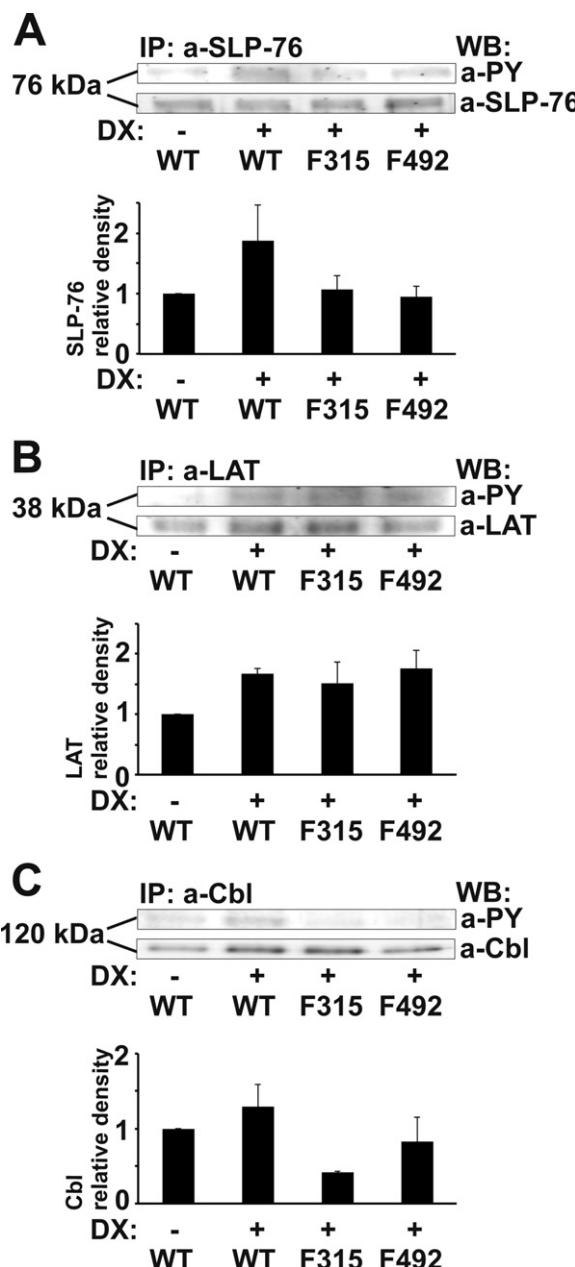


Fig. 4. Point mutations at Y315 and Y492 of the ZAP-70 influence the DX-induced phosphorylation increase of SLP and Cbl but not LAT. Immunoprecipitation of SLP-76 (A), LAT (B) or Cbl (C) was performed on WT untreated and WT, F315- and F492-ZAP-70 expressing DX-treated samples. Blots were developed with anti-PY (upper panels) and re-probed with anti-SLP-76, LAT or Cbl antibodies (lower panels). Diagrams show the relative phosphorylation changes. Values are mean \pm SEM calculated from the densitometry results of three independent experiments.

above described fine phosphorylation changes if alterations in this molecular interaction occurred as a consequence of the Y-F point mutations at positions 315 and 492. However, no difference could be observed in the ZAP-70-GR association, which turns the attention towards alternative mechanisms, for example altered kinase activity of the ZAP-70 or the involvement of other proximal T cell receptor signaling molecules (e.g. p56-Lck).

Here, we also characterized the phosphorylation of three substrates of the ZAP-70, the adapter molecules LAT and SLP-76 and the inhibitory regulator Cbl upon DX treatment. All three molecules showed increased phosphorylation upon short-term high-dose DX treatment, suggesting, that these three molecules might be involved in transmitting non-genomic GC effects from the ZAP-70

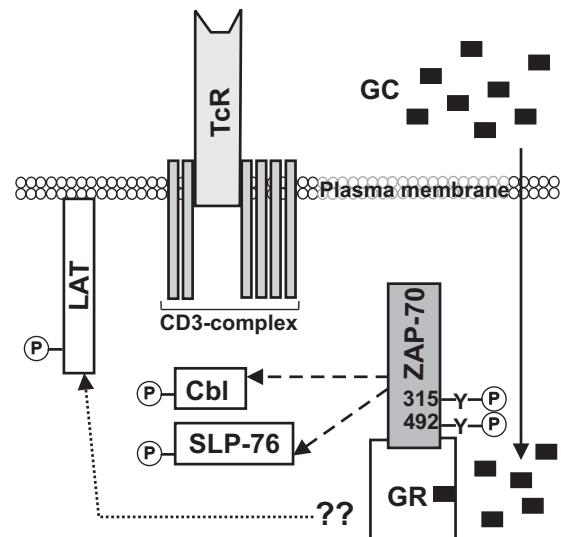


Fig. 5. Putative scheme of rapid non-genomic GC effects on proximal elements of the TcR signaling pathway. GCs reach the cytoplasmic GR via diffusion (solid arrow). The ligand activated GR associates with ZAP-70 leading to the phosphorylation of Y315 and Y492. SLP-76 and Cbl are then Y phosphorylated in a ZAP-70-dependent (dashed arrows), while LAT in a ZAP-70-independent (dotted arrow) manner (upstream regulator of LAT in non-genomic GC pathway is not yet clarified). Note: no TcR signal is present.

to downstream targets (Fig. 5). To confirm that the phosphorylation of Y315 and Y492 of the ZAP-70 were indeed involved in non-genomic GC signaling, next, we checked if point mutations at these residues influenced downstream phosphorylation events of LAT, SLP-76 or Cbl. In case of SLP-76 and Cbl, both mutations abolished the DX induced phosphorylation, but none of these point mutations influenced the phosphorylation of LAT. These data indicate that non-genomic GC effects mediated through the ZAP-70 kinase are further transmitted by SLP-76 and Cbl, but not LAT (Fig. 5). LAT can not only be phosphorylated by the ZAP-70 kinase, but also by Itk and Lck and it might be possible that non-genomic GC effects on LAT are induced through these molecules (Perez-Villar et al., 2002) (Fig. 5).

After elucidating the fine molecular details of the non-genomic GC signaling, we went on to investigate how the effects of DX modified T cell activation, eventually, leading immunosuppression. Therefore, we performed combined (DX + anti-CD3) treatments and examined the three substrates of the kinase: SLP-76, LAT and Cbl and also followed the effect of DX on the anti-CD3 induced Ca^{2+} -signal. Similarly to ZAP-70 (Bartis et al., 2006), Y-phosphorylation of LAT and Cbl increased further upon the combined treatment, whereas DX partly inhibited the anti-CD3-induced phosphorylation of SLP-76. This suggests that in the presence of non-genomic GC signal the molecules of the TcR-signaling pathway show modified Y-phosphorylation. According to Lowenberg et al, phosphorylation of Y171 in LAT decreased in DX pre-treated, anti-CD3 and -CD28 activated primary T lymphocytes (Lowenberg et al., 2005). This interesting difference between their and our results might be due to the use of different cells (primary cells versus cell line) and/or to the different cell activation protocol (using anti-CD3 and -CD28 versus anti-CD3 only). Moreover, Y171 is not the only Y of LAT that takes part in T-cell activation, residues in the C-terminal of the molecules are also involved in the process (Aguado et al., 2006; Paz et al., 2001).

Besides the phosphorylation changes, increase in the intracellular Ca^{2+} -level is a key event in T-cell activation which is mediated by PLC γ and IP $_3$ and regulated by adapter molecules. The anti-CD3 induced Ca^{2+} -signal could be reduced with short-term

high-dose DX pre-treatment similar to the phosphorylation of SLP-76. These data might be in line with our earlier observation, that Ca^{2+} -signal in Jurkat T cells is regulated through SLP-76 (Szabo et al., 2012). Alternatively, DX treatment could impact Ca^{2+} -signal through membrane effect, for example by influencing membrane ion-channels. In either case, suppression of the Ca^{2+} -signal could lead to subsequent inhibition of the calcineurin-NFAT axis.

In conclusion, specific Y residues of the ZAP-70 and substrates of the kinase are involved in mediating non-genomic GC effects in T cells (Fig. 5). TcR- or GC-induced signaling events are transmitted in a slightly different manner through the fine interplay of proximal T cell signaling molecules; moreover, the GC signal modifies the signaling of activated T-cells in a complex manner. These novel findings about the fine details of molecular interactions contribute to the better understanding of the complex mechanism of non-genomic GC effects. However, we are still far from understanding the complete mechanism and molecular details of GC-mediated immunosuppressive effects in T-lymphocytes.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Zoltan Magyary Foundation, European Economic Area and Norway Grants [25/2010 to F.B.]; Research Fund of the Faculty of Medicine [ÁOKKA-34039-7/2009 to T.B.]; and Health Science Council [ETT: 435/2009 to T.B.]. P116 (ZAP-70 deficient Jurkat subclone) and rabbit polyclonal ZAP-70 antibody was a kind gift from Prof. E. Monostori, Szeged, Hungary).

References

- Aguado, E., Martinez-Florensa, M., Aparicio, P., 2006. Activation of T lymphocytes and the role of the adapter LAT. *Transplant Immunology* 17, 23–26.
- Au-Yeung, B.B., Deindl, S., Hsu, L.Y., Palacios, E.H., Levin, S.E., Kuriyan, J., Weiss, A., 2009. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunological Reviews* 228, 41–57.
- Bartis, D., Boldizsar, F., Kvell, K., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P., Monostori, E., Berki, T., 2007. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 253–258.
- Bartis, D., Boldizsar, F., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P., Berki, T., 2006. Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 98, 147–154.
- Berki, T., Kumanovics, G., Kumanovics, A., Falus, A., Ujhelyi, E., Nemeth, P., 1998. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *Journal of Immunological Methods* 214, 19–27.
- Boldizsar, F., Berki, T., Miseta, A., Nemeth, P., 2002. Effect of hyperglycemia on the basal cytosolic free calcium level, calcium signal and tyrosine-phosphorylation in human T-cells. *Immunology Letters* 82, 159–164.
- Boldizsar, F., Talaber, G., Szabo, M., Bartis, D., Palinkas, L., Nemeth, P., Berki, T., 2010. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 215, 521–526.
- Buttgereit, F., Scheffold, A., 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529–534.
- Buttgereit, F., Straub, R.H., Wehling, M., Burmester, G.R., 2004. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis and Rheumatism* 50, 3408–3417.
- Chang, C.P., Wang, S.W., Huang, Z.L., Wang, O.Y., Huang, M.I., Lu, L.M., Tarn, D.C., Chien, C.H., Chien, E.J., 2010. Non-genomic rapid inhibition of Na^+/H^+ -exchange 1 and apoptotic immunosuppression in human T cells by glucocorticoids. *Journal of Cellular Physiology* 223, 679–686.
- Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M., 2000. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews* 52, 513–556.
- Flammer, J.R., Rogatsky, I., 2011. Minireview: glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Molecular Endocrinology* 25, 1075–1086.
- Gametchu, B., Watson, C.S., Wu, S., 1993. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB Journal* 7, 1283–1292.
- Hricik, D.E., Almawi, W.Y., Strom, T.B., 1994. Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation. *Transplantation* 57, 979–989.
- Krishnan, J.A., Davis, S.Q., Naureckas, E.T., Gibson, P., Rowe, B.H., 2009. An umbrella review: corticosteroid therapy for adults with acute asthma. *American Journal of Medicine* 122, 977–991.
- Lowenberg, M., Tuynman, J., Bilderbeek, J., Gaber, T., Buttgereit, F., van Deventer, S., Peppelenbosch, M., Hommes, D., 2005. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106, 1703–1710.
- Lowenberg, M., Verhaar, A.P., Bilderbeek, J., Marle, J., Buttgereit, F., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J., Hommes, D.W., 2006. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing Lck and Fyn. *EMBO Reports* 7, 1023–1029.
- Lowenberg, M., Verhaar, A.P., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2007. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends in Molecular Medicine* 13, 158–163.
- Meng, W., Sawasdikosol, S., Burakoff, S.J., Eck, M.J., 1999. Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase. *Nature* 398, 84–90.
- Minta, A., Kao, J.P., Tsien, R.Y., 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 8171–8178.
- Nicolaeles, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., Charmandari, E., 2010. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75, 1–12.
- Paolino, M., Penninger, J.M., 2010. Cbl-b in T-cell activation. *Seminars in Immunopathology* 32, 137–148.
- Paz, P.E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., Abo, A., 2001. Mapping the ZAP-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochemical Journal* 356, 461–471.
- Perez-Villar, J.J., Whitney, G.S., Sitnick, M.T., Dunn, R.J., Venkatesan, S., O'Day, K., Schieven, G.L., Lin, T.A., Kanner, S.B., 2002. Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav. *Biochemistry* 41, 10732–10740.
- Rao, N., Lupher Jr., M.L., Ota, S., Reedquist, K.A., Druker, B.J., Band, H., 2000. The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells. *Journal of Immunology* 164, 4616–4626.
- Reichardt, H.M., Gold, R., Luhder, F., 2006. Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Review of Neurotherapeutics* 6, 1657–1670.
- Schweingruber, N., Reichardt, S.D., Luhder, F., Reichardt, H.M., 2012. Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Journal of Neuroendocrinology* 24, 174–182.
- Singer, B., 1972. Adrenal corticosteroids-physiological considerations. *British Medical Journal* 1, 36–39.
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E., 2006a. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 203, 189–201.
- Sionov, R.V., Kfir, S., Zafir, E., Cohen, O., Zilberman, Y., Yefenof, E., 2006b. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5, 1017–1026.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S., 2009. T cell activation. *Annual Review of Immunology* 27, 591–619.
- Stahn, C., Lowenberg, M., Hommes, D.W., Buttgereit, F., 2007. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275, 71–78.
- Strehl, C., Gaber, T., Lowenberg, M., Hommes, D.W., Verhaar, A.P., Schellmann, S., Hahne, M., Fangradt, M., Wagegg, M., Hoff, P., Scheffold, A., Spies, C.M., Burmester, G.R., Buttgereit, F., 2011. Membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis and Rheumatism* 63, 3779–3788.
- Swartz, S.L., Dluhy, R.G., 1978. Corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 16, 238–255.
- Szabo, M., Czompoly, T., Kvell, K., Talaber, G., Bartis, D., Nemeth, P., Berki, T., Boldizsar, F., 2012. Fine-tuning of proximal T cell receptor (TcR) signaling by ZAP-70 tyrosine-residues in Jurkat cells. *International Immunology* 24, 79–87.
- Talaber, G., Boldizsar, F., Bartis, D., Palinkas, L., Szabo, M., Berta, G., Setalo Jr., G., Nemeth, P., Berki, T., 2009. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *International Immunology* 21, 1269–1276.
- Watts, J.D., Affolter, M., Krebs, D.L., Wange, R.L., Samelson, L.E., Aebersold, R., 1994. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *Journal of Biological Chemistry* 269, 29520–29529.
- Williams, B.L., Schreiber, K.L., Zhang, W., Wange, R.L., Samelson, L.E., Leibson, P.J., Abraham, R.T., 1998. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Molecular and Cellular Biology* 18, 1388–1399.
- Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., Ramonda, R., Iaccarino, L., Doria, A., 2011. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmunity Reviews* 10, 305–310.

A glukokortikoid hormon nem genomikus hatásai a T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára

PRENEK LILLA, UGOR EMESE, PAPP RAMÓNA, BOLDIZSÁR FERENC, BERKI TÍMEA

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

A klinikai gyakorlatban a glukokortikoid hormon analógok (GC) autoimmun betegségek, malignus hematológiai kórképek, allergiás folyamatok kezelésében széles körben alkalmazott szerek. Klasszikus, genomikus hatásaik mellett, melyek a ligandkötött glukokortikoid-receptor (GR), mint transzkripciós faktor által elindított génaktiváció és -gátlás következtében kialakuló folyamatok, az utóbbi évtizedben felismerésre kerültek a gyors GC-hatásokat eredményező ún. nem genomikus jelátviteli útvonalak. Ezek egyrészt direkt membránhatások, másrészt bizonyos sejtjeken membrán-GR jelenlétével, vagy más receptorok jelátviteli útvonalával történő interakciókkal, ill. a GR mitokondriális transzlokációjával magyarázhatók. Jelen közleményben intézetünkben az elmúlt években a nem genomikus GC jelátviteli folyamatok területén végzett kísérleteink eredményeit foglaljuk össze, különös tekintettel a T-sejt receptor (TcR) és glukokortikoid-receptor (GR) jelátvitel közötti kapcsolatra, illetve a GC-nek a thymocyták apoptózisában betöltött szerepére, a mitokondriális GR transzlokáció jelentőségét kiemelve.

Kulcsszavak: glukokortikoid-receptor, glukokortikoid hormon, T lymphocyte, thymus, nem genomikus GC-hatások, mitokondrium, apoptosis

NON-GENOMIC EFFECTS OF GLUCOCORTICOID HORMONES ON SIGNAL TRANSDUCTION AND APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES

Glucocorticoids (GC) are widely used drugs in the treatment of autoimmune diseases, haematological malignancies and allergic reactions. Besides their classic genomic effects new GC signalling pathways were also observed in the last decade, referred to as non-genomic signalling pathways, which, importantly, appear more rapidly than the genomic effects. In our present work we summarise our results in the field of non-genomic GC signalling mechanisms. We discuss the interplay between T cell receptor (TcR) and glucocorticoid receptor (GR) signalling pathways, and the role of GC in the apoptosis of thymocytes, paying special attention to the importance of mitochondrial translocation of the GR.

Keywords: glucocorticoid receptor, glucocorticoid hormone, T lymphocyte, thymus, non-genomic mechanism, mitochondria, apoptosis

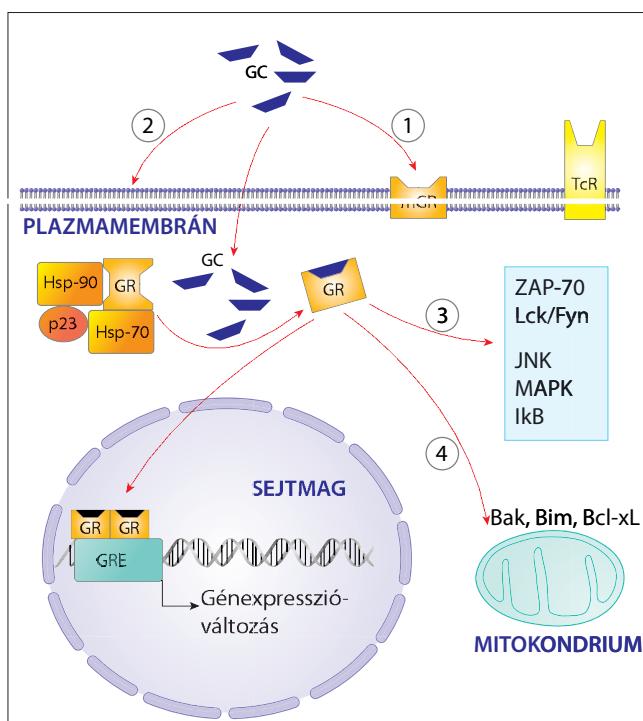
Bevezetés

A glukokortikoid hormon (GC) hatására elinduló jelátviteli útvonalak legrégebb óta ismert formája a ligandkötött glukokortikoid-receptor (GR) sejtmagba való transzlokációja, ahol a DNS glukokortikoid válaszelemeihez (GRE) kötődve transzkripciós faktorként génexpressziós változásokat eredményez [1, 2]. A GR a szteroidreceptor szupercsalád tagja. Három fő doménje van: (1) a hormonkötő, (2) a DNS-kötő és (3) az N-terminális domén [3]. Nyugalmi állapotban a GR a citoplazmában hősokkfehérjékhez kötődve található [4]. A ligandkötőést követően a GR felveszi aktív konformációját, és dimerizálódik. Ez a homodimer transzlokálódik a sejtmagba [1], ahol sejttípustól függően 10–100 gén működését sza-

bályozza [5]. Genomikus hatásaikból következik a glukokortikoid-analógok széles körű alkalmazása a minden napjai orvosi gyakorlatban, amely főleg gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív folyamatokban nyilvánul meg [6].

A nem genomikus hatások (1. ábra) főleg nagy dózisú GC-kezelés során létrejövő gyors, génesszessziótól független mechanizmusok [7]. Négy ilyen, alternatív GC jelátviteli útvonalat írtak le eddig: (1) membránhoz kapcsolt GR által közvetített útvonal, (2) GC direkt membránra kifejtett hatása, (3) interakció más citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel [8] és (4) a GR mitokondriumba való transzlokációja [9–13].

A membránkötött GR-t többek között humán lymphoid sejtvonalakban figyelték meg [14–16], melynek fokozott expresszióját rheumatoid arthritisben, SLE-ben és spondylitis



1. ábra

A glukokortikoid hormon (GC) lehetséges hatásmechanizmusai T-lymphocytákon [7]. A lipofil GC bejut a citoplazmába, és kapcsolódik a glukokortikoid-receptorhoz (GR), amely konformációváltozást követően leválik a citoplazmatikus Hsp komplexről, dimerizálódik, és bevándorol a sejtmagba, ahol az ún. genomikus hatásmechanizmus révén génexpresszió-változásokat okoz. Nagy dózisú GC-kezelés hatására létrejövő gyors, nem genomikus hatások: a membránhoz kapcsolt GR (mGR) által közvetített útvonal (1), a GC direkt membránstabilizáló hatása (2), a GR kapcsolódásával citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel (3) és a GRmitokondriumba való transzlokációja, amely az intrinszik apoptotikus útvonal aktivációját váltja ki (4)

ankylopoeticában is megtalálták, ami felvett szerepet a betegségek kialakulásában [17–19]. Másrészt, a GC direkt (nem receptorfüggő) membránhatását mutatja, hogy nagy dózisú GC-kezelést követően emlős tumorsejtekben megváltozik a membránlipid-mobilitás [20].

A harmadik nem genomikus hatás a ligandkötött GR-nek más jelátviteli molekulákkal való kapcsolódása, melyet például a GR és T-sejt receptor (TcR) jelátviteli fehérjéi között figyeltek meg [21]. Az eddigi kutatási eredmények szerint a ligandkötött GR asszociálódik az Lck-, Fyn-molekulákkal a TcR-aktivációt követően, és gátolja a TcR-aktiváció által indukált Lck/Fyn foszforilációt [22, 23]. Végül, Sionov és munkatársai in vitro tenyészített folyamatos sejtvonalakon és thymocytákban írták le a GC-GR komplex mitokondriumba való transzlokációját, ami összefüggésbe hozható az adott sejttípus GC-indukált apoptóziskészségevel [9–13].

A GC-k nem genomikus hatásainak támadáspontjai

A T-lymphocita-aktiváció gátlása

A GC-k T-sejt jelátvitelre gyakorolt hatását humán T-sejt-leukémia sejtvonalon (Jurkat) vizsgálták 2-5 perces, nagy dózisú dexamethason- (DX-) kezelést követően. Megfigyeltük, hogy a GC-kezelés önmagában is, a TcR jelátviteli út egyik kulcsmolekuláján, a ZAP-70-en tirozinfoszforilációt okoz (1. táblázat) [24]. Ez a változás a GR-antagonista RU486-tal gátolható volt [24]. Ezt követően megvizsgáltuk a kapcsolatot a ZAP-70, GR és Hsp-90 között DX-kezelt Jurkat-sejtek citoplazmájában. A nagy dózisú DX-kezelés hatására a GR koprecipitálódott, ill. kolokalizálódott a ZAP-70-molekulával [25], mely magyarázhatja a korábban tapasztalt gyors GC-indukált ZAP-70-foszforilációt (1. táblázat). Ugyanakkor a ZAP-70 Hsp-90-nel való kapcsolódása is megfigyelhető volt, függetlenül a GR-agonista jelenlétéktől, de a kapcsolódást meg lehetett gátolni Hsp-antagonista geldanamycinnel (GA) (1. táblázat) [25]. Eredményeinkkel az elsők között világítottunk rá a DX-nek a ZAP-70-molekulára kifejtett direkt hatására az aktivált GR-en keresztül [25]. A GC-indukált ZAP-70 tirozinfoszforiláció alapján feltételezhető, hogy a GC-k ezen a ponton lehetséges gátlói a T-sejt-funkcióknak. A ZAP-70-nek négy aktiváló (Y315, Y319, Y474, Y493) és négy gátló (Y292, 492, 597, 598) foszforilációs helyét írták le korábban [26]. Intézetünkben ZAP-70 pontmutatás Jurkat-sejtvonalakkal végzett kísérleteink során azt találtuk, hogy rövid idejű DX-kezelés hatására csökken a ZAP-70 foszforilációja az F315- és F492-ZAP-70-molekulát expresszáló sejtekben [27]. Ezt követően ugyanezen mutáns ZAP-70-molekulák szubsztrátjait vizsgáltuk, és megfigyeltük, hogy DX hatására a mutáns sejtekben nem foszforilálódott az SLP-76 és a Cbl, de egyik mutáció

1. táblázat. Rövid idejű, nagy dózisú glukokortikoid hormon hatására létrejövő változások a T-sejt jelátviteli útvonal fehérjéiben ([23] és [26] alapján)

Célmolekula:	GC hatás
ZAP-70	Y-foszforiláció ↑, GR- és Hsp-90-asszociáció
LAT	Y-foszforiláció ↑
Cbl	Y-foszforiláció ↑*
SLP-76	Y-foszforiláció ↑*
TcR-aktiváció + GC hatás	
LAT	Y-foszforiláció ↑
Cbl	Y-foszforiláció –
SLP-76	Y-foszforiláció ↑
Ca ²⁺ -jel	↓

* ZAP-70 Y315- és Y492-függő változás

sem befolyásolta a LAT foszforilációját (1. táblázat) [27]. Ez arra enged következtetni, hogy a ZAP-70-kinázon keresztül végbemenő nem genomiális GC-hatást inkább az SLP-76 és a Cbl közvetíti, és nem a LAT (1. táblázat) [26]. Megvizsgáltuk azt is, hogyan befolyásolja a DX a T-sejt-aktivációt, és fejti ki immunszuppresszív hatását. A LAT és SLP-76 megnövekedett, míg a Cbl csökkent foszforilációját sikerült detektáltunk, továbbá a DX csökkentette az anti-CD3 által indukált Ca^{2+} -jelet is (1. táblázat) [27]. Ez az eredmény korrelál azzal a korábbi megfigyelésünkkel, mely szerint a Jurkat-sejtekben a Ca^{2+} -jelet az SLP-76 szabályozza [28].

Kettős pozitív thymocyták GC-indukált mitokondriális apoptózis útvonala

A GC-k nemcsak az érett, de a differenciálódó, éretlen T-sejtekre is hatnak. Régóta ismert, hogy a thymus elsvorad magas GC hormon szintek esetén, míg ezen hormonok hiánya a thymus megnagyobbodását okozza [29]. Intézetünkben végzett korábbi vizsgálatok szerint a kettős pozitív (DP) thymocyták a legérzékenyebbnek a GC-indukált apoptózisra [30–32], ugyanakkor ezekben a sejtekben a legalacsonyabb a GR-expresszió mind fehérje, mind RNS szinten [30–33]. Ez a látszólagos ellentmondás felvette a GC-k-nek a thymocyták differenciálódásában betöltött, nem hagyományos jelátviteli útvonalon keresztül megvalósuló szerepére. Ezt a feltevést erősítette, hogy *in vivo* sem a DP sejt depletáló hatását, sem pedig a nagy dózisú szteroid korai proapoptotikus hatást nem tudtuk gátolni GC-antagonista RU486-tal [31, 33]. Az RU486 hatása ugyanis abban nyilvánul meg, hogy megakadályozza a GR ligandkötést követő transzlokációját a sejtmagba [34]. Ezek alapján a GC-k proapoptotikus hatása a DP sejtekben függetlenek tűnik az aktivált GR nukleuszba való transzlokációjától, amely felveti a lehetőséget a nem genomikus jelátviteli folyamatoknak ezekben a sejtekben.

Ebből kiindulva sikerült igazolnunk, hogy a DP thymocy-

tákban rövid idejű GC-kezelést követően a GR inkább a mitokondriumba vándorol, mint a sejtmagba [13]. A mitokondriális transzlokáció ezen sejtekben arányban volt a sejtek GC által indukált apoptózisérzékenységével [13]. A pontos folyamat, amely révén a transzlokálódott, aktivált GR apoptotikus kaszkádot indít el, még nem teljesen ismert. Ezért vizsgáltuk a GC-k hatását egér thymocyták apoptózis útvonalainak aktiválódására és a GR Bcl-2 fehérjescalád tagjaival való interakcióját (2. táblázat; eddig nem publikált eredmény). Azt találtuk, hogy rövid idejű DX-kezelés hatására a thymocytákban aktiválódott az intrinszik apoptotikus útvonal, amit a citokróm C, az aktivált kaszpáz-3, -9 koncentrációjának emelkedése jelzett (2. táblázat). Megfigyeltük továbbá, hogy a GR asszociálódott a Bim- és a Bcl-xL-fehérjékkel, valamint ezen fehérjék mennyisége megnövekedett a mitokondriumban a DX-kezelést követően. A GR Bax-fehérjével nem kapcsolódott, azonban ez a fehérje is felhalmozódott a mitokondriumban DX hatására (2. táblázat). Így valószínűleg az aktivált GR a Bcl-2-fehérjékkel való asszociációja révén befolyásolhatja a thymocyták apoptózisát oly módon, hogy úgy változtatja meg ezen fehérjék között az egyensúlyt, hogy az proapoptotikus irányába tolódjon el.

Megbeszélés

A nem genomiális GC jelátviteli útvonalak felismerése új, érdekes és izgalmas irányt nyitott a kutatásban. A lymphoid sejtek nagy dózisú GC hormon kezelésre adott gyors válaszreakciói nem magyarázhatók a viszonylag lassan bekövetkező géntranszkripció mechanizmusokkal. A T-lymphocyták aktiváció gátlása a TcR jelátviteli útvonal fehérjéivel való közvetlen GR asszociáció útján, míg a DP thymocyták GC-indukált gyors apoptózisa a GR mitokondriális pro- és antiapoptotikus fehérjékkel való kapcsolódással, azok egyensúlyának módosítása révén zajlik. A thymusban található sejtek közel 80%-a DP thymocyták, melyek lokális GC-termelő sejtek környe-

2. táblázat. Rövid idejű glukokortikoid-kezelés hatására bekövetkező thymocyták apoptózis útvonal fehérjéinek aktivációja és lokalizációjának változása

Célmolekula	Citoplazma	Mitokondrium	GR-rel való asszociáció
Citokróm C	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-3	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-8	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-9	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaszpáz-12	nem változott nincs adat	nincs adat nincs adat	nincs adat +
Bak			
Bax	↓	↑	–
Bim	↓	↑	+
Bcl-xL	↓	↑	+



zetében differenciálódnak. Feltételezhető, hogy ez az oka, hogy a többi thymocita sejtcsoportozhoz képest bennük a leg-alacsonyabb a GR-expresszió, mégis ebben a differenciálódási stádiumban érzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra [31]. Ezt erősíti azon megfigyelésünk is, hogy ebben a sejtcsoportban magas a Dig2 (DX-indukált gén) és alacsony a Bcl-2 expressziója [33], valamint in vivo alkalmazott szintetikus GC hatására is a DP sejtek számának jelentős csökkenését és a mitokondriális membránpotenciál redukálódását figyeltük meg, a Bcl-2-expresszió párhuzamos mérséklődéssével [32]. Irodalmi adatokkal összhangban, a GC-k fokozni tudták a thymocyták pozitív szelekcióját, amikor egyidejűleg TcR-aktiváció is történt [31, 35], amit a CD69-expresszió megnövekedése jelez a DP és CD4+ egyszeresen pozitív sejtekben (SP), amit nagyobb mértékű érett CD4+ sejt kibocsátás kísért [31, 35].

Az ezen a területen végezett vizsgálatok eredményei tovább bővítenek ismereteinket a GC-k hatásairól, hozzájárulnak új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.

IRODALOM

- [1] Drouin J, Sun YL, Tremblay S, et al.: Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1299-1309.
- [2] Berg JM: DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; 57: 1065-1068.
- [3] Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
- [4] Smith DF, Toft DO: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 4-11.
- [5] Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM: Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* 2004; 500: 51-62.
- [6] Buttgereit F, Burmester GR, Lipworth BJ: Optimised glucocorticoid therapy: The sharpening of an old spear. *Lancet* 2005; 365: 801-803.
- [7] Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, et al.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (gc) signalling in t cells. *Immunobiology* 2010; 215: 521-526.
- [8] Buttgereit F, Scheffold A: Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002; 67: 529-534.
- [9] Sionov RV, Cohen O, Kfir S, et al.: Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 2006; 203: 189-201.
- [10] Sionov RV, Kfir S, Zafir E, et al.: Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: A novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 2006; 5: 1017-1026.
- [11] Du J, Wang Y, Hunter R, et al.: Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3543-3548.
- [12] Psarra AM, Solakidi S, Trougakos IP, et al.: Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma hepg2 and saos-2 osteosarcoma cells: Presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2544-2558.
- [13] Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, et al.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thy-
- mocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol* 2009; 21: 1269-1276.
- [14] Gametchu B: Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: Correlation to cell lysis. *Science* 1987; 236: 456-461.
- [15] Gametchu B, Chen F, Sackey F, et al.: Plasma membrane-resistant glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 1999; 64: 107-119.
- [16] Evans SJ, Murray TF, Moore FL: Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2000; 72: 209-221.
- [17] Bartholome B, Spies CM, Gaber T, et al.: Membrane glucocorticoid receptors (mgcr) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18: 70-80.
- [18] Spies CM, Schaumann DH, Berki T, et al.: Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65: 1139-1146.
- [19] Tryc AB, Spies CM, Schneider U, et al.: Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33: 2249-2253.
- [20] Van Bommel T, Marsen T, Bojar H: Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in cama-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res* 1987; 7: 1217-1223.
- [21] Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW: Glucocorticoid signaling: A nongenomic mechanism for t-cell immunosuppression. *Trends in Molecular Medicine* 2007; 13: 158-163.
- [22] Lowenberg M, Tuynman J, Bildereek J, et al.: Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Ick and fyn. *Blood* 2005; 106: 1703-1710.
- [23] Lowenberg M, Verhaar AP, Bildereek J, et al.: Glucocorticoids cause rapid dissociation of a t-cell-receptor-associated protein complex containing Ick and fyn. *EMBO Rep* 2006; 7: 1023-1029.
- [24] Bartis D, Boldizsar F, Szabo M, et al.: Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of zap-70 in jurkat cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 98: 147-154.
- [25] Bartis D, Boldizsar F, Kvell K, et al.: Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, zap-70 kinase, and hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 253-258.
- [26] Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A: The structure, regulation, and function of zap-70. *Immunol Rev*, 2009 vol. 228, no. 1, pp. 41-57.
- [27] Boldizsar F, Szabo M, Kvell K, et al.: Zap-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (gc) effects in t cells. *Molecular Immunology* 2013; 53: 111-117.
- [28] Szabo M, Czompoly T, Kvell K, et al.: Fine-tuning of proximal tcr signaling by zap-70 tyrosine residues in jurkat cells. *Int Immunol* 2012; 24: 79-87.
- [29] Selye H: Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 234-248.
- [30] Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, et al.: Cd4(+)/cd8(+)tcr(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors



- while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 2001; 31: 2293-2301.
- [31] Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P: Glucocorticoid (gc) sensitivity and gc receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 2002; 14: 463-469.
- [32] Palinkas L, Talaber G, Boldizsar F, et al.: Developmental shift in tcr-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*, 2008; 213: 39-50.
- [33] Boldizsar F, Palinkas L, Czompoly T, et al.: 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: 785-796.
- [34] Distelhorst CW, Howard KJ: Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone ru486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry* 1990; 36: 25-31.
- [35] Boldizsar F, Palinkas L, Bartis D, et al.: Antigen and glucocorticoid hormone (gc) induce positive selection of dp thymocytes in a tcr transgenic mouse model. *Immunology Letters* 2003; 90: 97-102.

(Dr. Berki Tímea, PTE, KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12. Tel: 72-536-291, fax:72-536-289, e-mail: berki.timea@pte.hu)

dc_1343_16

Regulatórikus T-sejtek glukokortikoidhormon-érzékenységének vizsgálata

UGOR EMESE¹, SIMON DIÁNA¹, PAP RAMÓN¹, KRALIK NIKOLA², NÉMETH PÉTER¹, BOLDIZSÁR FERENC¹, BERKI TIMEA¹

¹ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs

² Institute of Public Health for the Osijek-Baranja County, Croatia

CÉLKITŰZÉS: A regulatórikus T-sejtek (Treg) kulcsfontosságú tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. A klinikumban széleskörűen alkalmaznak glukokortikoidhormon- (GC-) analógokat gyulladás-csökkentő és immunszuppresszív aktivitásuk, lymphocyttaapoptózist indukáló képességük miatt, mégis keveset tudunk a Treg-ekre gyakorolt hatásairól. Munkánk célja a perifériás és centrális nyirokszervekben a természetes és indukált Treg-ek arányának és GC-érzékenységének, valamint glukokortikoidreceptor- (GR-) expressziójuk változásának nyomon követése volt. **MÓDSZEREK:** Kísérleteinkben 4–6 hetes BALB/c egereket kezeltünk 1–4 napon át nagy dózisú dexamethsonnal. Ezt követően az állatok thymusából, mesenterialis nyirokszerviból, lépéből és a Peyer-plakkokból sejteket izoláltunk, és jelöltünk sejtfelszíni (anti-CD4; anti-CD25) és intracelluláris (anti-Foxp3; anti-Helios; anti-GR) antitestekkel, majd áramlási citometriával mértük a természetes ($CD4^+CD25^+Foxp3^+Helios^+$) és indukált ($CD4^+CD25^+Foxp3^+Helios^-$) Treg-ek arányát, abszolút számát és GR-expressziójukat. **ERedmények:** A kezeletlen állatok thymusában alacsonyabb a Treg-sejtek aránya (<1,0%), mint a perifériás nyirokszervekben (7–15%). A thymusban a Treg-sejtek több, mint 90%-a, a lépben a sejtek 2/3-a, míg a többi perifériás nyirokszervben kb. a fele természetes Treg-sejt. Többszöri, nagy dózisú DX-kezelés hatására a thymusban a Treg-sejt-arány több mint tízszeresére emelkedik ($p < 0,001$) az abszolút Treg-szám változása nélkül, miközben a GR upregulációja figyelhető meg a sejtekben. Ezt a thymusban jelen lévő legalacsonyabb GR-expressziójú, és GC-kezelésre legérzékenyebb kettős pozitív sejtek pusztulása kíséri. A perifériás nyirokszervekben ezzel ellentétesen a Treg-ek száma jelentősen csökkent, de arányuk csak kissé változott meg GC-kezelés hatására, ami GR downregulációval járt. **KÖVETKEZTÉSEK:** Kísérleteink alapján elmondható, hogy a Treg-ek viszonylag rezisztensek a GC-kezelés által indukált apoptózisra, ami hozzájárulhat a GC-k immunszuppresszív hatásához. Perifériás nyirokszervekben a természetes Treg-ek mellett indukált Treg-ek is előfordulnak, amelyek feltételezhetően másiképp reagálnak szteroidexpozícióra.

Kulcsszavak: regulatórikus T-sejt, glukokortikoidhormon, glukokortikoidreceptor, thymus, tolerancia

INVESTIGATION OF GLUCOCORTICOID HORMONE SENSITIVITY OF REGULATORY T CELLS

INTRODUCTION: Regulatory T cells (Treg) are key players of the regulation of immune response and peripheral tolerance. Glucocorticoid (GC)-analogues are widely used to treat different diseases because of their anti-inflammatory and immunosuppressive activity, and their ability to induce lymphocyte apoptosis. Despite the long-established medical use of GC-analogues, the mechanism of GC action on Tregs, is still incompletely understood. The goal of our work was to determine the changes in the ratio of natural and induced Treg cells in peripheral and central lymphoid organs, to investigate the effect of GC treatment on Treg cell composition and to follow the alterations in their glucocorticoid receptor (GR) expression. **METHODS:** In our experiments we treated 4–6-week old BALB/c mice for 1–4 days with high dose Dexamethasone. Cells were isolated from the thymus, mesenteric lymph nodes, spleen and Peyer's patches and were stained with cell surface (anti-CD4; anti-CD25) and intracellular (anti-Foxp3; anti-Helios; anti-GR) antibodies. We determined the ratio, absolute cell number and GR expression of natural ($CD4^+CD25^+Foxp^+$) and induced ($CD4^+CD25^+Foxp3^+Helios^-$) Treg cells using flow cytometry. **RESULTS:** In the thymus of untreated mice the ratio of Tregs was lower (<1,0%) than in the peripheral lymphoid organs (7–15%). More than 90% of the Treg cells found in the thymus, 2/3 of them in the spleen, and approximately half of them in the other peripheral lymphoid organs examined were natural Treg cells. After multiple, high dose DX treatment we observed a more than tenfold increase ($p < 0,001$) in the ratio of Tregs in thymus, without changes of the absolute cell number and with upregulation of the GR. These changes were associated with the apoptosis of double positive cells, which have the lowest GR expression and are the most sensitive



cell population to GC treatment. In contrast, in the peripheral lymphoid organs the total Treg cell number decreased, but the ratio changed only slightly after GC treatment, accompanied by GR downregulation. **CONCLUSION:** Based on our experiments, we suggest that nTreg cells are relatively resistant to GC treatment induced apoptosis, which can serve as a base for the immunosuppressant actions of GC. In peripheral lymphoid organs beside nTreg cells iTreg cells are also present, which respond to steroid exposition presumably otherwise.

Keywords: regulatory T cells, glucocorticoid hormone, glucocorticoid receptor, thymus, tolerance

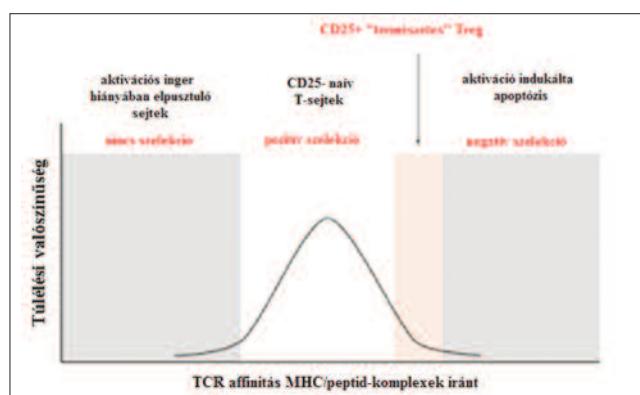
Az immunológiai tolerancia az immunrendszer antigénspecifikus válaszképtelensége, mely a saját antigénekre vonatkozóan a centrális nyirokszervekben az autoreaktív B- és T-lymphocita előalakok klonális deléciójával, míg a periférián a regulatórikus T-sejtek (Treg) általi szuppresszióval valósul meg. A Treg-ek mellett mind az endogén, mind a terápiásan alkalmazott glukokortikoidhormonok (GC) fontos szabályozói az immunválasznak és a perifériás tolerancia fenntartásának, ugyanakkor keveset tudunk a Treg-sejtekre gyakorolt hatásukról.

A leginkább ismert Treg-ek CD4⁺CD25⁺ sejtfelszíni és Foxp3⁺ intracelluláris markerekkel jellemezhetők [1]. Az anergiával, ignoranciával és delécióval szemben az általuk előidézett szuppresszió aktív toleranciamechanizmus. A Treg-sejtek kialakulásáról több elmelet is létezik. Az „affinitásmodell” szerint a thymusban lezajló negatív szelekció során aktivációinduktált apoptózissal elpusztulnak azok a T-sejtek, amelyek túl nagy affinitással kötődnek a saját MHC-peptid komplexhez. Ugyanakkor azok a T-sejtek, amelyeknek nagy az affinitása, de a negatív szelekció értelmében még nem szanálódnak, természetes regulatórikus T-sejtek lesznek

(nTreg) (1. ábra) [2]. A másik elmelet, az ún. „kölcsönös antagonizmus” modell szerint nemcsak a TCR jelátviteli útvonal vesz részt a pozitív szelekcióban, hanem a folyamat a TCR- és GC-indukált apoptózist elindító jelátviteli útvonal antagonizmusának eredménye. Azoknál a T-sejteknél, amelyeknek közepes az affinitása, a TCR- és glukokortikoidreceptor- (GR-) szignál neutralizálják egymást, így nem pusztulnak el, hanem Treg-gé alakulnak [2–6].

Az nTreg-sejtek CD4-pozitivitásuk mellett nagy denzitásban IL-2-receptor α -láncot (CD25) is expresszálnak [7, 8]. Jellemző rájuk az X-kromoszóma által kódolt „Forkhead box” családba tartozó Foxp3 transzkripciói faktor jelenléte [7–10], melynek funkciója még ismeretlen, de hiánya IPEX-szindrómához vezet [11, 12]. A thymusból a perifériára kerülve az nTreg-sejtek az effektorsejteket direkt sejt-sejt kapcsolódás és citokintermelés (IL-10, TGF β) révén gátolják [13]. Az nTreg-sejtek exogén IL-2 és megfelelő TCR-stimuláció hatására proliferálnak. A Treg-sejtek keletkezési mechanizmus szerinti másik ismert típusa az induált Treg-sejtek (iTreg) [9, 14], melyek a periférián alakulnak ki, ún. „tolerogén mikrokörnyezetben” antigénfelismerés hatására (pl. kostimuláció hiánya) naiv, CD4⁺ sejtekből [13]. Citokintermelésük alapján tovább csoportosíthatók T_R1, T_H3 (orális tolerancia) [15, 16] és Foxp3⁺ iTreg-sejtekre (2. ábra). Az effektorsejteket citokintermelésük révén gátolják [17, 18]. Az nTreg és iTreg el-különítésére irodalmi adatok szerint az Ikaros családba tartozó Helios transzkripciói faktor használható [8, 19], melynek expressziója a T-lymphocita sejtvonalra korlátozódik [20, 21]. Funkcionális szerepe ismeretlen, bár kimutatták, hogy a Foxp3 promóterhez kapcsolódva fokozza a Foxp3-expressziót [8, 22], valamint a Helios-expresszió a Treg-ekben korrelál a szuppressor funkcióval [22]. Más irodalmi adatok szerint a Helios nemcsak a thymuseredetű nTreg-sejtekre jellemző, mert T-sejt-aktiváció és -proliferáció során is megjelenik, nyugvó sejtekben pedig csökken az expressziója [23, 24].

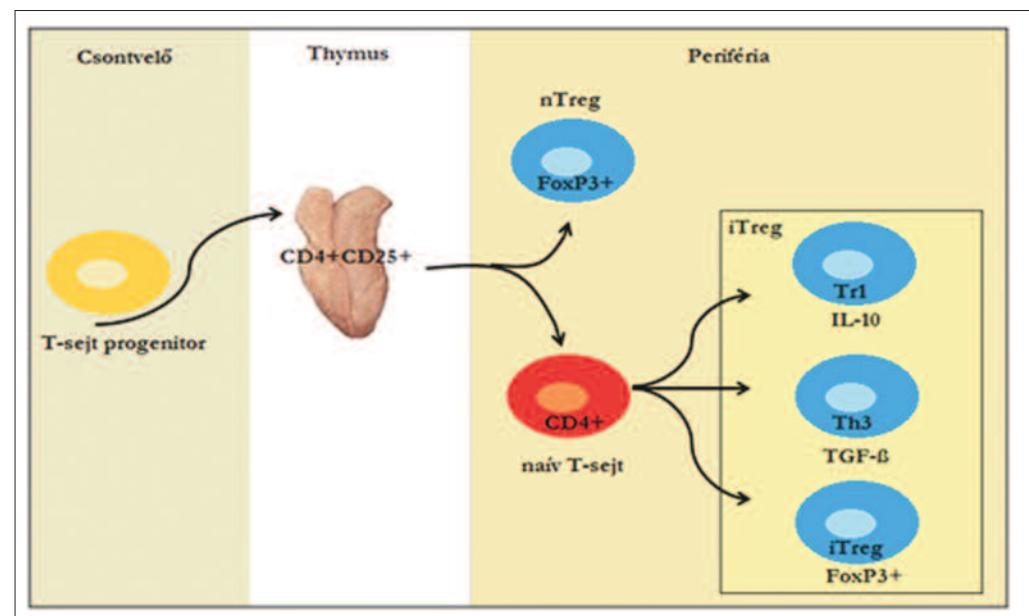
A Treg-ek szerepét egyre több betegségben bizonyítják, de pontos hatásmechanizmusuk még nem ismert. Az effektor- és szuppressorfunkció egyensúlyának megbomlása esetén, ha a Treg-ek kerülnek túlsúlyba, nagyobb az esélye a daganatok kialakulásának, gyakoribbak a fertőzések (pl. HIV-fertőzés). Daganatos betegek perifériás vérében és a tumorban a Treg-ek felhalmozódnak, és az immunválasz elnyomása révén elősegítik a tumor növekedését, így rossz prognózist jeleznek [25]. Treg hiányában pedig autoimmun betegségek,



1. ábra

Az elsődleges T-sejt-érés szelekciós szakaszai.

A thymus kéreg/velőállomány határán a kettős pozitív thymocita fejlődési szakaszban történnek a pozitív és negatív szelekciós lépések. A pozitív szelekció jelentősége, hogy megakadályozza a nem funkcionális T-sejtek felhalmozódását. A negatív szelekció során az autoreaktív T-lymphocyták aktivációinduktált apoptózisa zajlik. Azok a CD4⁺ T-lymphocyták, amelyeknek viszonylag nagy az affinitása a saját MHC-II/saját peptid iránt, de a negatív szelekció során még nem pusztulnak el, CD4⁺/CD25⁺ természetes regulatórikus T-sejtek lesznek. Módosítva Schütt és Bröker (2011) után



2. ábra

A regulatórikus T-sejtek kialakulása a csontvelőből a thymusba lépő T-sejt-előalakokból történik. A természetes Treg-sejtek a negatív szelekció során túlélő CD4⁺-sejtek egy alcsoporthoz, amely a CD25 upregulációja és Foxp3 transzkripció faktor hatására alakul ki, és kerül a perifériára; míg az indukált Treg-sejtek antigén hatására aktiválódó, naiv CD4⁺-sejtekből alakulnak ki a periférián

allergia, graftkilökődés, gyulladásos bélbetegség (IBD), IPEX-szindróma jöhet létre. Sclerosis multiplex (SM) esetén a Tregek csökkent számát és funkciózavarát írták le [26]. Az SM egérmodelljében a Treg-ek „kivédik” a betegséget azáltal, hogy az autoreaktív TH₁-sejtek proliferációját és proinflammatoryis citokintermelését elnyomják [27]. 1-es típusú diabeteses betegek Treg-sejteinél is hibás működést találtak [28]. Gyulladásos bélbetegségben szenvedőknél a csökkent perifériás Treg-szám korrelál a betegség aktivitásával [29]. Ugyancsak összefüggés mutatható ki SLE-s betegekben a betegség aktivitása és a Treg-sejt-szám között [9, 30]. A betegség fellángolásakor a Treg-ek mennyisége csökken [31].

A GC-k fontos tényezői az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. A klinikumban igen széles körűen alkalmaznak különböző betegségek kezelésében GC-analógokat [pl. dexamethason (DX) allergiás állapotok, autoimmun betegségek, transplantáció átesett betegek, hematológiai rosszindulatú betegségek kezelésére], amelyek világzerte az egyik leggyakrabban felírt gyógyszerek gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív aktivitásuk, lymphocytapoptózist indukáló képességük miatt, mégis keveset tudunk a Treg-ekre gyakorolt hatásairól. Irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a klinikumban szisztemásan adott GC-k segítik a Treg-ek működését, ezáltal új megvilágításba helyezve a GC-mediált immunszuppressziót [32]. Munkánk célja a perifériás és centrális nyirokszervekben a Treg-sejtek arányának meghatározása volt, majd a GC-kezelés hatásának vizsgálata a thymus és a lép szöveti alapszerkezetére és a Treg-ek összetételére, illetve azok GR-expresszió változásának vizsgálata.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok és kezelésük

4–6 hetes BALB/c egereket kezeltünk 20 mg/kg/nap (nagy dózisú) dexamethasonnal (Oradexon[®], Organon) vagy PBS-sel 1–4 napon át ip., majd 24 órával az utolsó kezelés után az állatokat feláldoztuk, és vizsgáltuk a lymphoid szerveket. Ebben az életkorban még nem kezdődik el a thymus involúciója, így sejtes összetétele jól vizsgálható. A thymus, lép, mesenterialis nyiroksomók (mLN) és Peyer-plakkok (PP) eltávolítása után azokat mechanikusan homogenizáltuk RPMI médiumban, majd nejlonszűrőn átszűrtük, és tripánkéfeszék-kizárasós tesztel megszámoltuk a sejteket. Az egerek tar-tása és kezelése a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bi-zottsága által jóváhagyott engedély alapján történt (#BA 02/2000-2/2006).

Immunhisztológiai jelölés

Fagyaszott (7–10 µm vastag), jághideg acetonban fixált, 5% BSA-val blokkolt metszeteken a lépben a B-sejtek azonosítására anti-B220-Alexa647 (PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, IBI), a T-sejtekre anti-Thy1-FITC (PTE KK IBI) antitestet használtunk. A thymusban a sejtmagokat DAPI (Sigma), a Treg-sejteket anti-Foxp3-PE (eBioscience) antitesttel jelöltük. A minták kiértékelése Olympus BX61 CCD kameralvel és AnalySIS szoftverrel ellátott fluoreszcens mikroszkóppal, 200-szoros nagyítással történt.



Áramlási citometria

A thymus, lép, mLN és PP sejtjeinek áramlási citometriás mérésnél a Treg-sejtek azonosítására anti-CD4-FITC vagy anti-CD4-AlexaFluoro647 (PTE KK IBI) és anti-CD25-PE-Cy5 (BioLegend) sejtfelszíni antitesteket, illetve anti-Foxp3-PE (Exbio, Klón: 3G3) anti-Helios-APC (BioLegend) és anti-GR-FITC (klón: 5E4/B1, PTE KK IBI33) intracelluláris antitesteket használtunk. A 10^6 sejt/minta sejtfelszíni jelölés után a mintákat PBS-ben mostuk, majd a Foxp3 jelölő kit (e-Bioescience) instrukciói szerint végeztük az intracelluláris jelöléseket. A mérést FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose CA) áramlási citométeren, az analízist pedig az FCS Express 4 Flow Research Edition programmal végeztük. Mintánként 10 000 eseményt mértünk a lymphocita kapuból, majd a CD4⁺ lymphocytákon belül mértük a Treg-alcsoportokat és azok átlagos anti-GR-FITC fluoreszcenciaintenzitását.

Statisztika

Munkánk során a mért adatok átlagát és az átlagok standard hibáját (\pm SEM) ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai analízise SPSS 11.0 szoftver segítségével történt. Az adatok értékkeléséhez a Student-féle t-tesztet használtuk, és a $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) és $p < 0,001$ (***) értéknél fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Treg-sejtek előfordulása a lymphoid szervekben

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a kezeletlen állatok primer és szekunder nyirokszerveiben milyen a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-ek megoszlása. A thymusban a Treg-ek aránya 0,5% körüli, míg a perifériás nyirokszervekben ez az arány lényegesen magasabb: a lépben a legtöbb (15%), az mLN-ben ennél kevesebb (10%), és a PP-ben a legkevesebb (6-7%) a Foxp3⁺ Treg-ek aránya (1. táblázat).

A természetes és indukált Treg-sejtek megoszlása

A Foxp3/Helios kettős pozitivitás jellemző a thymuseredetű nTreg-ekre, míg az iTreg-ek Helios-negatívak. A kezeletlen állatok thymusában a Treg-ek 87%-a Helios-pozitív, vagyis tartható nTreg-nek. A perifériás nyirokszervek közül a lépben 65%, az mLN-ben 53%, a PP-ben pedig 48%, vagyis a sejtek közel fele nTreg (1. táblázat).

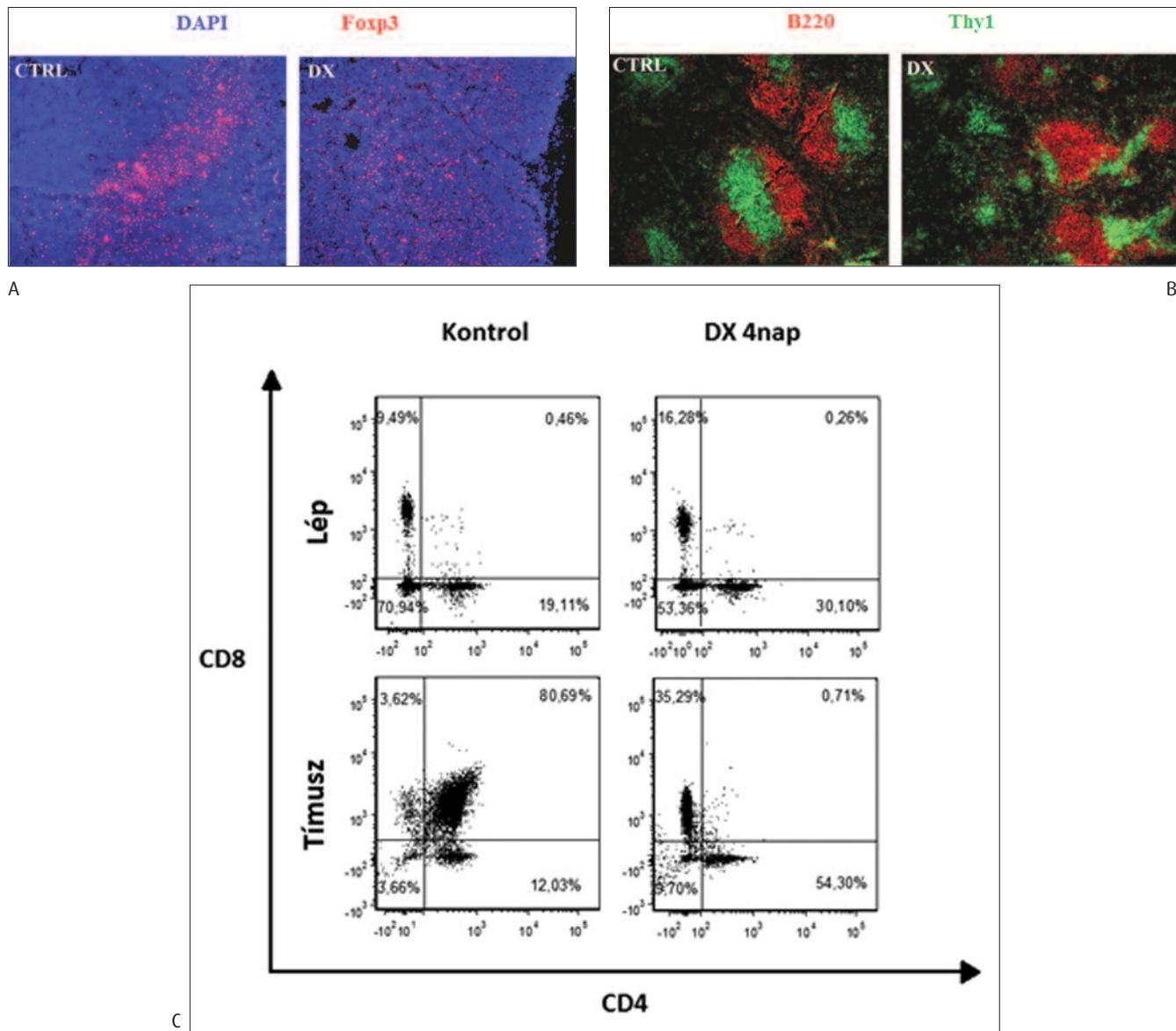
A thymus és a lép szerkezetének és sejtes összetételének változása DX-kezelés hatására

A GC-k egyik régóta ismert hatása, hogy a thymus involúcióját okozzák. In vivo egyszeri, nagy dózisú (20 mg/kg) GC-kezelés után 24 órával a thymusban a kéreg-velőállomány szöveti organizáció felbomlása figyelhető meg, az addig homogén csoportban elhelyezkedő Foxp3⁺ Treg-ek elhelyezkedése diffúzzá válik (3. ábra A). A lép fehér pulpájában DX-kezelés hatására ugyancsak megváltozik a normális lymphoid szerkezet, amely főleg a T-sejt-zónát (PALS) érinti, szerkezte diffúzzá válik (3. ábra B). Ismételt (4 napos) DX-kezelés után a lépben a CD4/CD8 arány megtartott, ugyanakkor csökkent a nem T-sejtek aránya, és a T-helper-sejtek aránya 19%-ról 30%-ra, míg a citotoxikus T-sejteké 9,5%-ról 16%-ra emelkedett (3. ábra C). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a lépben az érett T-sejtek kevésbé érzékenyek a DX-hatásra, mint a nem T-sejtek. Ez az átrendeződés a lép teljes lymphocytaszámának csökkenésével is járt. Ezzel szemben a thymusban szinte eltűnnék az érett kettős pozitív (DP) thymocyták, arányuk 80%-ról 1% alá csökken, míg a kettős negatív legéretlenebb és az érett CD4, ill. CD8 egyszeresen pozitív sejtek aránya lényegesen megemelkedik (3. ábra C). Mindez a DX-érzékeny, DP thymocyták pusztulásának következménye, ami a thymus teljes sejtszámának drasztikus (tized részére) csökkenésével is jár (5. ábra).

1. táblázat. Természetes (nTreg) és indukált (iTreg) regulatórikus T-sejtek aránya a lymphoid szervekben

Treg % (átlag \pm SEM)	Thymus	Lép	Nyiroksomó	Peyer-plakk
Összes Treg	$0,53 \pm 0,06$	$15,09 \pm 0,43$	$10,10 \pm 0,61$	$6,78 \pm 0,51$
Természetes: nTreg	$0,46 \pm 0,05$	$9,83 \pm 0,28$	$5,38 \pm 0,29$	$3,30 \pm 0,24$
nTreg : iTreg arány	87 : 13	65 : 35	53 : 47	48 : 52

Kezeletlen állatok centrális és perifériás nyirokszerveiben jelentősen eltér a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg- és CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺ nTreg-sejtek előfordulási aránya. A thymusban jellemző az nTreg-sejtek dominanciája, míg a perifériás nyirokszervekben eltérő nTreg/iTreg arány figyelhető meg



3. ábra

Dexamethasonkezelés hatása a thymus és a lép szöveti szerkezetére és sejtes összetételere.

(A) A thymusban jellemzően a kéreg-velő határon található Treg-sejtek (Foxp3-PE – piros) elhelyezkedése (K: kontroll) már egyszeri DX-kezelés hatására diffúzzá válik (kék: DAPI).

(B) A lépben is megfigyelhető a kezeletlen mintához képest a T-sejt-zóna diffúzzá válása DX-kezelés hatására (piros: B220-Alexa647 – B-sejt-zóna; zöld: Thy1-FITC ~ T-sejt-zóna) (PALS).

(C) Ismételt (4 napos) DX-kezelés hatására a lép és a thymus lymphoid sejtes összetevői megváltoznak. Anti-CD4-FITC és anti-CD8-APC antitesttel történő jelöléssel a lépben emelkedik a T_h - és T_c -sejt-arány, vagyis a nem T-sejtek nagyobb arányú fogyása figyelhető meg a kezelés hatására. A thymusban a kettős pozitív sejtek csaknem teljes eltűnése (depléciója) miatt emelkedett a kettős negatív és egyszeres pozitív, érett sejtek aránya

A DX-kezelés hatása a Treg-sejtekre

Megvizsgáltuk a nagy dózisú DX-kezelés hatását a különböző nyirokszervekben előforduló Treg-ek arányára és az abszolút sejtszáma is. 48 órás (kétszeri) DX-kezelés után a thymusban a Treg-ek aránya szignifikánsan, közel tízszeresére emelkedett (4. ábra). Ez a változás a DP, GC-érzékeny, éretlen thymocyták jelentős pusztulásának következtében kialakuló re-

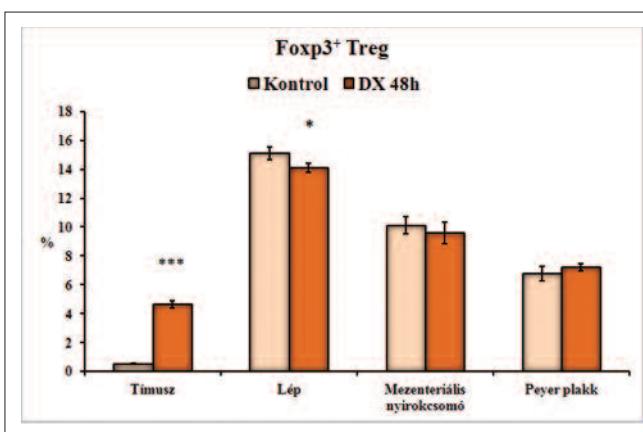
latív sejtarány emelkedés, az abszolút Treg-sejt-szám enyhe, de nem szignifikáns növekedésével (2. táblázat), ami azt bizonyítja, hogy a thymusban a Treg-ek rezisztensek a DX által indukált apoptózisra. A perifériás nyirokszervek közül a lépben tapasztaltunk enyhe, de szignifikáns Treg-arány-csökkenést, ugyanakkor sem az mLN-ben, sem a PP-ben a Treg-arány nem változott (4. ábra). Ugyanakkor a perifériás nyirokszervekben GC-kezelés hatására az összlymphocytaszám,



1. táblázat. A regulatórikus T-sejtek abszolút számának változása 4 napos glukokortikoidhormon-kezelés hatására

Treg-sejt-szám x 105 (átlag ± SEM)	Thymus	Lép	Nyirokcsomó	Peyer-plakk
Kezeletlen	4,24 ± 0,92	83,92 ± 16,72	4,42 ± 0,11	0,48 ± 0,07
Dexamethason (4 nap)	5,05 ± 1,35	26,93 ± 5,13***	2,24 ± 0,39***	0,23 ± 0,06*

4 napos nagy dózisú (20 mg/kg) dexamethason kezelés hatására a perifériás nyirokszervekben szignifikánsan csökkent a Treg-sejt-szám (*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001), míg a thymusban inkább enyhe, de nem szignifikáns Treg-sejt-szám-emelkedés volt megfigyelhető

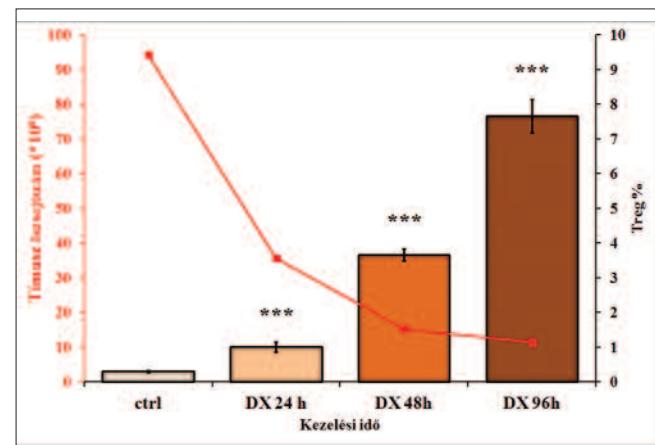


4. ábra

Treg-sejt-arányok változása 48 órás nagy dózisú DX-kezelés hatására a centrális (thymus) és a perifériás nyirokszervekben. A thymusban a Treg-sejt-arány szignifikáns ($p <0,001$) emelkedését figyeltük meg, míg a lépben enyhe sejtaránycsökkenés történt ($p <0,05$). Az mLN-ben és PP-ben nem történt szignifikáns Treg-arány-változás.

és ezzel együtt a Treg-sejt-szám is szignifikánsan csökkent (2. táblázat), ami a szervek méretének látványos kisebbedésével is járt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a perifériás nyirokszervekben az érett T-sejtek és a Treg-ek GC-érzékenysége hasonló.

Megvizsgáltuk külön a Helios-pozitív nTreg- és Helios-negatív iTreg-ek GC-érzékenységét is. A thymusban az nTreg-ek aránya szignifikánsan emelkedett, 0,4%-ról 4%-ra ($p <0,001$) (10-szeres emelkedés), míg a perifériás nyirokszervek közül a lépben 9,8%-ról 9,0%-ra ($p <0,05$), az mLN-ben pedig 5,4%-ról 4,3%-ra ($p <0,01$) csökkent ez az arány. A PP-ben szignifikáns változás nem történt. A Helios-negatív iTreg-ek a kezeletlen állatok thymusában mindenkorban 0,09%-ban vannak jelen, ami 0,6%-ra nőtt (7-szeres emelkedés), míg a perifériás nyirokszervekben 5% körüli arányban fordultak elő, ami a kezelést követően nem változott (ábrán nem mutatjuk).



5. ábra

Ismételt DX-kezelés hatása a thymus abszolút thymocita sejtszámára és a Treg-arányra CD4/CD25/FoxP3 jelölés után. Az oszlopdiagramon a Treg-arányok szignifikáns növekedése látható ($p <0,001$), míg a vonaldiagram a teljes thymocita sejtszám drasztikus csökkenését mutatja ($p <0,001$) az idő függvényében

DX-kezelés hatásának időkinetikája a thymusban

Vizsgáltuk a GC-kezelés időfüggését is a thymusban, ismételt (1-4 napos) DX-kezelést követően. A kezeletlen állatok thymusában a Treg-ek aránya 0,5%, amely 24 órás nagy dózisú DX-kezelés hatására 2%-ra nő, majd a kezelés hosszával párhuzamosan tovább növekszik közel 8%-ra. Ha az összsejtszámot vizsgáljuk, a kezeletlen thymusban az jellemzően 9.5×10^7 , ami kétszeri DX-kezelést követően 3.6×10^7 -re csökken, 4 napi kezelés után pedig 1.1×10^7 sejtszám figyelhető meg (5. ábra), vagyis a thymus sejtes állománya közel a tizedére csökken, miközben a Treg-sejt-szám nem változik, csak az arányuk 16-szorosára emelkedik.

A GR-expresszió változása

Egy sejt GC-érzékenységét jelentősen meghatározza, hogy milyen mértékben expresszájla a GR-t. Ezért a továbbiakban



a Treg-re jellemző viszonylagos szteroidrezisztencia, valamint a GR-expresszió közötti összefüggést kerestük. Ehhez az intézetünkben már korábban is alkalmazott intracelluláris áramlási citometriás GR-jelölést használtuk, amely korrelál a sejtek GR-tartalmával mind fehérje-, mind RNS-szinten [33].

Eredményeink szerint a thymusban és a perifériás nyirokszervekben található CD4⁺ T-sejtek és a Treg-ek GR-szintje (MFI: átlagos fluorescenciantenzitás) nem mutat szignifikáns különbséget (nincs ábrázolva). Ugyanakkor a szerveket összehasonlítva, a thymusban és a PP-ben szignifikánsan alacsonyabb a Treg-ek GR-szintje, mint a lépben vagy az mLN-ben (6. ábra A).

Kétszeri (48 órás) nagy dózisú, in vivo DX-kezelés után a thymusban túlélő (GC-rezisztens) Treg-ek GR-expressziója a kontrollhoz képest növekedett. Ezzel szemben a perifériás nyirokszervekben a korábbi humán vizsgálatainkban is tapasztalt GR-expresszió-csökkenés volt megfigyelhető a DX-kezelést követően. Ez a változás csak a lépben volt szignifikáns. Ezek alapján úgy tűnik, hogy DX-kezelés hatására a thymusban a túlélő Treg-ekben az eredetileg alacsony GR-szint emelkedik, a lépben pedig az érett T-sejtekre jellemző GR downreguláció figyelhető meg (6. ábra B).

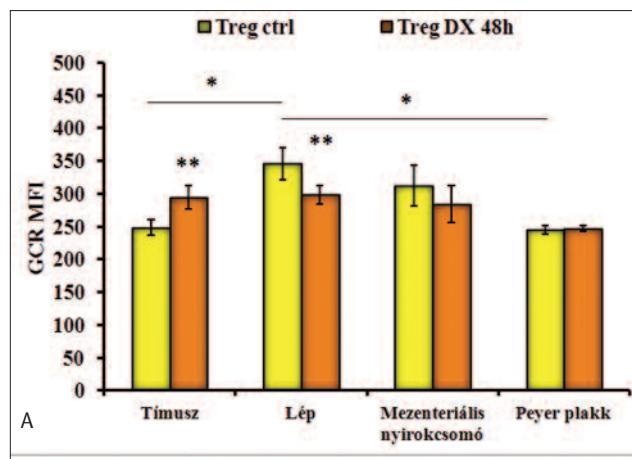
Megbeszélés

Az allo- és autoantigénekkel szembeni immunválasz gátlásával a Treg-sejtek fontos tényezői és terápiás célpontjai az immunválasz szabályozásának és a perifériás tolerancia fenntartásának. Gyulladásos, autoimmun betegségek és transzplantáció átesett betegek kezelésének egyik legfontosabb eszközei a GC-analógok, mégis keveset tudunk a Treg-sejtekre kifejtett hatásairól.

Munkánk során a GC-kezelés centrális és perifériás nyirokszervekben előforduló nTreg- (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺) és iTreg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻) sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. Nagy dózisú DX-kezelés hatására a thymus és a lép szerkezete is megváltozott, a lépben a T-sejt-zóna difúzzá vált, ugyanúgy, mint a thymusban az Treg-sejtek eloszlása is. A thymusban a nTreg-sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, a kezelés hosszával párhuzamosan pedig tovább nőtt, miközben a thymocyták száma drámaiabon csökkent, ami a DP, GC-érzékeny thymocyták pusztulásával magyarázható. Eközben az abszolút Treg-sejt-szám nem változott, így az arány tapasztalt növekedése kizárolag azok túléléséből adódik. Ez arra enged következtetni, hogy a thymusban többségen jelen levő nTreg-sejtek rezisztensek a GC-indukált apoptotikus hatásra.

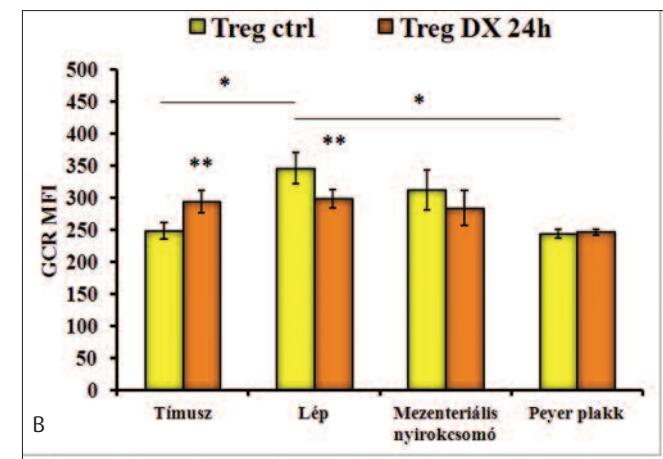
A perifériás nyirokszervekben sokkal magasabb a Treg-ek aránya, de 45–60%-uk iTreg. Ismételt DX-kezelés hatására a lépben és az mLN-ben kismérvű Treg-sejt-arány-csökkenés volt megfigyelhető, miközben az összsejtszámok is csökkenek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a periférián előforduló iTreg-ek és nTreg-ek másképp reagálnak GC-expozícióra.

Mivel az nTreg-ek a thymusban jönnek létre, joggal feltételezhető, hogy előfordulásuk ott a leggyakoribb. A thymusban a vártnak megfelelően igen magas a Helios-pozitivitás a Treg-sejtekben belül. Meglepő azonban, hogy a perifériás nyirokszervekben is a Treg-ek fele Helios-pozitív. Ez az eredmény kétséget ébreszt, hogy a Helios jó markerként használható-e az nTreg és iTreg alcsoportok elkülönítésére [22]. Ha a periférián valóban ilyen magas az nTreg-sejtek előfordulása, akkor az összsejtszám csökkenése mellett a Treg-ek arányának – azok szteroidrezisztenciája miatt – növekednie kellett volna, de ez egyik perifériás nyirokszervben sem történt



6. ábra

A regulatórikus T-sejtek glukokortikoidreceptor- (GR-) expressziója (A) és annak változása 48 órás nagy dózisú DX-kezelés hatására (B). A különböző nyirokszervekből izolált sejteket CD4/CD25 sejtfelszíni és Foxp3/GR intracelluláris jelölést követően analizáltuk, és a GR átlagos fluorescenciantenzitásokat (MFI) hasonlítottuk össze. A kezeletlen thymusban és PP-ben alacsonyabb a Treg-sejtek GR-szintje, mint a lépben ($p < 0,05$). GC-kezelés hatására a thymusban a GR upregulációja ($p < 0,01$), míg a lépben downreguláció ($p < 0,01$) volt megfigyelhető.





meg, sőt, a lépben és az mLN-ben még szignifikáns csökkenést is tapasztaltuk. Eredményeink inkább azt a megállapítást támasztják alá, hogy a periférián a Helios T-sejt-aktivációs marker, és bár kétségtelen, hogy centrálisan magasabb a Helios-pozitivitás a Treg-eken belül, expressziója mégsem kizárálag nTreg-re jellemző.

Egy adott sejt GC-érzékenysége függ annak GR-expressziós szintje mellett a sejtet érő egyéb jelátviteli útvonalak párbeszédétől is. Az intézetünkben végzett korábbi kísérletek szerint a thymusban a DP thymocyták mutatják a legalacsonyabb GR-expressziót [33], és ennek ellenére a legérzékenyebben reagálnak a GC-indukált apoptózisra. Eredményeink alapján ez azzal magyarázható, hogy a DP thymocytákban a ligandkötés hatására a GR elsősorban nem a sejtmagba, hanem a mitokondriumba transzlokálódik, és ott proapoptotikus fehérjék akkumulációját és az intrinsic apoptotikus útvonal elindítását közvetíti [34]. Az érett, perifériás lymphocyták rezisztensebbek a GC-analóg adására, és bennük a GR szignifikáns downregulációját figyelhetjük meg [35]. Kísérleteinkben a kezeletlen állatok thymusában és a Peyer-plakkokban található Treg-sejtek GR-expressziója alacsonyabb, mint a lépben, ami a lokális mikrokörnyezeti hatások (lokális GC-termelés) következménye lehet. GC-kezelés hatására a GR-expresszió a thymusban található nTreg-sejtekben növekszik, míg a lépben downreguláció figyelhető meg. Ez összefügg a thymusban és perifériás szervekben található Treg-sejtek eltérő GC-érzékenységével. Treg-sejtekben a GC által elindított jelátviteli útvonalak tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Támogatás: A munka az OTKA K105962 és a CABCOS II. HUHR/1001/2.1.3/0007 pályázat támogatásával készült

IRODALOM

- [1] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–87.
- [2] Schütt C, Bröker B: Grundwissen Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [3] Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM: Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63: 60–72.
- [4] Godfrey DI, Purton JF, Boyd RL, Cole TJ: Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol Today* 2000; 21: 606–11.
- [5] Vacchio MS, Ashwell JD: Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med* 1997; 185: 2033–8.
- [6] Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD: Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J Immunol* 1999; 163: 1327–33.
- [7] Zheng Y, Rudensky AY: Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007; 8:457–62.
- [8] Zabransky DJ, et al: Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One* 2012; 7: e34547.
- [9] Lourenço EV, La Cava A: Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* 2011; 44: 33–42.
- [10] Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253–7.
- [11] Brunkow ME et al: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68–73.
- [12] Bennett CL, et al: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20–1.
- [13] Josefowicz SZ, Rudensky A: Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009; 30: 616–25.
- [14] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ: Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626–35.
- [15] Weiner HL: Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207–14.
- [16] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237–40.
- [17] Bevan MJ: In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. *Immunity* 1997; 7:175–8.
- [18] Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É: Az immunológia alapjai. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.
- [19] Thornton AM, et al: Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184: 3433–41.
- [20] Hahm K, et al: Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 1998; 12: 782–96.
- [21] Kelley CM, et al: Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 1998; 8: 508–S1.
- [22] Getnet D, et al: A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47: 1595–600.
- [23] Serre K, et al: Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One* 2011; 6: e20731.
- [24] Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW: Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011; 6: e24226.
- [25] Deng L, et al: Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4105–12.
- [26] Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA: Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971–9.
- [27] Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD: Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002; 169: 4712–6.
- [28] Lindley S, et al: Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 92–99.
- [29] Maul J, et al: Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+CD25high T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868–1878.



- [30] Chavele K-M, Ehrenstein MR: Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 2011; 585: 3603-10.
- [31] Mellor-Pita S, et al: Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 553-4.
- [32] Stary G, et al: Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF- β and expand regulatory T cells. *J Immunol* 2011; 186: 103-12.
- [33] Berki T, Pálinkás L, Boldizsár F, Németh P: Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 2002; 14: 463-9.
- [34] Talabér G, et al: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol* 2009; 21: 1269-1276.
- [35] Du J, et al: Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R108.

(Dr. Berki Timea, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12., tel: 72-536-291, fax: 72-536-289, e-mail: berki.timea@pte.hu)

APOPTOSIS 2016. (közlésre elfogadva)

The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells

Lilla Prenek*, Ferenc Boldizsár*, Réka Kugyelka*, Emese Ugor*, Gergely Berta†, Péter Németh*, Timea Berki*

*Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs Medical Center, 7624, Pecs, Szigeti út. 12., Hungary

†Department of Medical Biology, University of Pécs Medical School, 7624, Pecs, Szigeti út. 12., Hungary

E-mail addresses:

LP: prenek.lilla@pte.hu

FB: boldizsar.ferenc@pte.hu

RK: kugyelka.reka@pte.hu

EU: ugor.emese@pte.hu

GB: gergely.berta@aok.pte.hu

PN: nemeth.peter@pte.hu

TB: berki.timea@pte.hu

Corresponding author:

Timea Berki MD, PhD

e-mail: berki.timea@pte.hu

Tel: +36-72-536-288 Fax: +36-72-536-289

Acknowledgements:

This work was supported by research grants from the Hungarian National Scientific Research Fund for T. Berki (OTKA K 105962) and F. Boldizsár (OTKA K 101493). F. Boldizsár received a Janos Bolyai Scholarship (BO/00086/12/5) from the Hungarian Academy of Sciences. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Abstract

Glucocorticoids (GC) are important in the regulation of selection and apoptosis of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes. The pronounced GC-sensitivity of DP thymocytes, observed earlier, might be due to the combination of classical (genomic) and alternative (non-genomic) glucocorticoid receptor (GR) signaling events modifying activation or apoptotic pathways. In particular, the previously demonstrated mitochondrial translocation of activated GR in DP thymocytes offered a fascinating explanation for their pronounced GC-induced apoptosis sensitivity. However, the fine molecular details how the mitochondrial translocation of GR might regulate apoptosis remained unclear. Therefore, in the present study, we intended to examine which apoptotic pathways could be involved in GC-induced thymocyte apoptosis. Furthermore we investigated the potential relationship between the GR and Bcl-2 proteins.

Using an *in vitro* test system, thymocytes from four-week-old *BALB/c* mice, were treated with the GC-analogue dexamethasone (DX). Bax accumulated in mitochondria upon DX treatment. Mitochondrial GR showed association with members of the Bcl-2 family: Bak, Bim, Bcl-xL. Elevated Cytochrome C, and active caspase-3, -8, and -9 levels were detected in thymocytes after DX treatment.

These results support the hypothesis that in early phases of GC-induced thymocyte apoptosis, the mitochondrial pathway plays a crucial role, confirmed by the release of Cytochrome C and the activation of caspase-9. The activation of caspase-8 was presumably due to cross-talk between apoptotic signaling pathways. We propose that the GC-induced mitochondrial accumulation of Bax and the interaction between the GR and Bim, Bcl-xL and Bak could play a role in the regulation of thymocyte apoptosis.

Key Words: Glucocorticoid receptor · Non-genomic pathway · Mitochondria · Thymocyte apoptosis · Bcl-2 proteins

1. Introduction

Despite their multiple side effects and broad organ-specificity, high-dose synthetic glucocorticoid hormone (GC) analogues are frequently used in the therapy of autoimmune diseases, hematological malignancies and allergies [1,2]. GC analogues have been shown to promote apoptosis of leukemic cells and to trigger complex anti-inflammatory actions by targeting both the molecular and cellular components of the immune system [3,4]. GCs induce apoptotic death of immature, developing thymocytes and also some groups of mature, activated T-cells [5]. In mouse models, GCs cause robust thymocyte depletion, primarily by the induction of CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) thymocyte apoptosis [6-9].

Most of the GCs therapeutic actions are the results of their genomic effects mediated by the ligand-induced nuclear translocation of the cytoplasmic glucocorticoid receptors (GR) leading to the transactivation or - repression of numerous genes [10-13]. However, some effects, especially those at high GC concentrations, for example, used for intravenous pulse therapy or intraarticular injections, are too rapid to be mediated by changes at the genomic level which take hours or even days to develop. These “non-genomic”/alternative GC actions include the physicochemical interactions of the GC hormone with biological membranes [14] and the effects mediated by the glucocorticoid-glucocorticoid receptor (GC-GR) complex. These latter involves non-nuclear actions like rapid eNOS (endothelial nitrogen oxide synthase) activation or alterations in signaling events and effector mechanisms of the cells [15], for example the interaction of the activated GR with cytoplasmic proteins like NF-κB (nuclear factor-kappaB) [16], or with molecules of the TCR (T-cell receptor) signaling pathway like Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), Fyn [17] and ZAP-70 (zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa) [18]. The third non-genomic GC action is the translocation of GR to the mitochondria, which correlates to the sensitivity of a given cell type to GC-induced apoptosis [19,20]. The GC-induced mitochondrial apoptotic pathway leads to the disruption of the mitochondrial membrane-potential and the release of key apoptosis inducing factors like Cytochrome C [21,22]. This study focuses on this third type of accidental apoptotic cell death and its regulation.

The mitochondrial, or intrinsic, apoptotic pathway is regulated by pro-and anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family at the level of the mitochondria [23]. Within the pro-apoptotic members of the Bcl-2 family there are the Bcl-2 homology 3 (BH3)-only group proteins such as Bim, Bid, Bad, PUMA, Noxa, which transmit the apoptotic stimuli by activating Bax and Bak. The anti-apoptotic members such as Bcl-2 and Bcl-x_L counteract this process by binding and neutralizing the pro-apoptotic proteins. After Bax and Bak formed pores on the mitochondrial outer membrane, Cytochrome C is released and it participates in the formation of the

apoptosome with Apaf1 and caspase-9 and activates caspase-3 [24,23]. Caspase-3 can also be activated by caspase-8 after the initiation of the extrinsic apoptotic pathway [25,26].

In a preliminary work, in a TCR transgenic mouse model, we have shown that thymocytes surviving during T cell selection up-regulated their mitochondrial anti-apoptotic Bcl-2 protein, suggesting that the mitochondria were directly involved in the regulation of thymocyte apoptosis [22]. Other studies with murine models have demonstrated the importance of Bax, Bak, Bim and Bcl-x_L in mediating dexamethasone (DX)-induced apoptosis [27,28]. Previously we have shown, that upon short-term *in vitro* exposure of DP thymocytes to GCs the GR translocated to the mitochondria within 30 minutes, having a direct effect on the mitochondrial function and decreasing the mitochondrial membrane potential [6]. Taking these preliminary data together, we hypothesize that the mitochondrial GR translocation could play an important role in the GC-induced apoptosis of thymocytes. On the other hand the relation of Bcl-2 family proteins like Bak, Bax, Bim or Bcl-x_L with the GR has not been investigated so far in the GC-induced mitochondrial apoptotic pathway of thymocytes.

Therefore, in this study, we analyzed the short term *in vitro* DX treatment-induced interactions between the GR and Bcl-2 family member proteins in mouse thymocytes, paying special attention to their distribution between the cytoplasm and mitochondria. Parallel with this we characterized the activation of different caspases as markers of apoptosis. Here, we provide evidence for the activation of the mitochondrial apoptotic pathway as well as direct association between the GR and Bak, Bim, and Bcl-x_L after short term GC analogue treatment in thymocytes.

2. Materials and Methods

2.1. Mice

Three to four weeks old *BALB/c* mice (obtained from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were kept under conventional conditions and provided with pelleted rodent chow and water ad libitum. All animal experiments were carried out in accordance with the regulations of Committee on Animal Experimentations of University of Pécs (#BA 02/2000-16/2015).

2.2. Short-term *in vitro* GC-analogue treatment of isolated thymocytes

After sacrifice, thymi were removed and homogenized mechanically in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) followed by filtration through nylon mesh. Cell viability was determined by trypan-blue dye exclusion test using a hemocytometer. 5×10^7 thymocytes were treated with 10^{-6} M DX (synthetic steroid

compound, which has primarily GC-like effects, 10⁻² M stock dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), both from Sigma-Aldrich) in serum-free RPMI for 1 and 3 hours for western blotting, 0.5 hour for confocal microscopy and for 0.5, 1, 2 and 3 hours for flow cytometry at 37°C. Control samples were kept under the same conditions for the same time in the presence of the solvent alone. The treatment was stopped by adding ice-cold phosphate buffered saline (PBS), containing 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich).

2.3. Antibodies

The following antibodies (Abs) were used for flow cytometry: anti-CD4-Phycoerythrin-Cyanine5 (PE-Cy5) (clone# RM4-5) and anti-CD8-Phycoerythrin (PE) (clone# 53-6.7) (all from BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), for analysis of activated (cleaved) caspases rabbit anti-caspase-3 (clone# 5A1E), rabbit anti-caspase-8 (clone# D5B2) and rabbit anti-caspase-9 (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were used with anti-rabbit IgG-Fluorescein (FITC) (Sigma-Aldrich) as secondary Ab.

For confocal microscopy the following Abs were used: anti-CD4-Pacific Blue (clone# RM4-5, BD Pharmingen), anti-CD8-Pacific Orange (clone# 5H10, Life Technologies, Waltham, MA, USA), anti-GR-FITC (clone# 5E4-B1, produced in our laboratory) [29] and rabbit anti-Bak, -Bax, -Bcl-x_L (all from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and -Bim (clone# C34C5, Cell Signaling Technology) with goat anti-rabbit IgG-Cyanine3 (Cy3) secondary Ab and goat anti-rabbit IgG-FITC secondary Ab (Sigma-Aldrich).

For western blot analysis of the activated (cleaved) caspases in the subcellular fractions the following Abs were used: rabbit anti-caspase-3, -8, and -9 (all from Cell Signaling Technology) in 1:1000 dilutions. The pro-apoptotic proteins were detected with mouse anti-Cytochrome C (clone# 7H8.2C12, BD Pharmingen) in 1:2000 dilution, rabbit anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology) in 1:500 dilution. For reprobing mouse anti-beta-actin (clone# AC-74, Sigma-Aldrich) in 1:5000 dilution and anti-Cytochrome C Abs were used.

For immunoprecipitation, anti-GR (clone# 8E9, produced in our laboratory) [29] was used. For western-blot analysis of immunoprecipitated samples the following primary Abs were used: anti-Bak, anti-Bax (both from Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Bcl-x_L (BD Pharmingen) in 1:1000 dilution, rabbit anti-Bim (Cell Signaling Technology) in 1:1000 dilution and mouse anti-GR (clone# 5E4, produced in our laboratory) in 1:2000 dilution [29].

For visualization of the western blots peroxidase conjugated anti-mouse- or anti-rabbit IgG (produced in our laboratory) were used as secondary Abs in 1:1000 dilutions.

2.4. Subcellular fractionation

Mitochondria Isolation Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) was used to separate cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fraction from thymocytes, according to manufacturer's instructions, with minor modifications according to Stasik et al. [30]. Briefly, isolated solvent control and DX-treated thymocytes were washed in cold PBS-azide (PBS containing 0.1% NaN₃) and lysed. After centrifugation at 800 x g for 10 min, the nuclear pellet was separated. The post-nuclear supernatant was centrifuged first at 3000 x g for 15 min and then at 12 000 x g for 5 min. The pellet containing mitochondria was either dissolved in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (125 mM Tris, 4% SDS, 10% mercaptoethanol, 0.006% bromo-phenol-blue (all from Sigma-Aldrich) and 10% glycerol (Molar Chemicals, Budapest, Hungary)) or used for immunoprecipitation and the clear supernatant was used as a cytosolic fraction. The supernatant was either used for immunoprecipitation or boiled immediately in SDS sample buffer for 10 minutes. To use mitochondria for immunoprecipitation the pellet was lysed in TEGM lysis buffer (10 mM Tris base, 4 mM EDTA (all from Sigma-Aldrich), 50 mM sodium chloride, 20 mM sodium molibdate (Molar Chemicals), 10% glycerol, pH 7.6) complemented freshly with protease inhibitor and Na-orthovanadate (both from Sigma-Aldrich). The samples were frozen and thawed five times in liquid nitrogen and then incubated for 30 minutes on ice and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and the supernatant was used for immunoprecipitation.

2.5. Immunoprecipitation

For immunoprecipitation, the cytosolic and mitochondrial fractions were incubated overnight under continuous rotation with the appropriate amount of precipitating antibodies (see in antibodies section) in blocking buffer (10 mM Tris, 100 mM sodium chloride, pH 7.4 containing 10% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich)); then Protein-G (Santa Cruz Biotechnology) was added to the samples and they were incubated for additional 2 hours under continuous rotation. Finally, samples were washed five times in PBS and immune complexes were removed from the Protein-G with boiling for 3 min in SDS sample buffer.

2.6. Western blotting

Cell fractions were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10 or 15% gel. The gels were blotted for two hours to nitrocellulose membranes using Mini Trans-Blot Cell blotting equipment (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After transfer, nitrocellulose membranes were soaked in blocking buffer (2% BSA or 1% non-fat dry milk (Bio-Rad), 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride

and 0.1% Tween 20 (Molar Chemicals), pH 7.4) and then incubated with the appropriate primary antibodies. Anti-beta-actin and anti-Cytochrome C antibodies were used to control the equal loading and purity of the fractions. Blots were then probed with the appropriate secondary Abs. Blots were washed in a buffer containing 10 mM Tris, 100 mM sodium chloride and 0.1% Tween 20 (pH 7.4). Western blot visualization was performed by enhanced chemiluminescence as described in the manufacturer's instructions (SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate, Pierce). Luminescent light signals were detected with Fujifilm LAS 4000 blot documentary system.

2.7. Analysis of blots

Densitometry of blots was done with the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Densitometric data was calculated using the original, unmodified images. Relative densities of caspases and cytoplasmic Bax blots were normalized to the relative densities of beta-actin, the mitochondrial fraction of Bax to Cytochrome C to determine the relative expression in the subcellular fractions. Relative densities of Bim, Bak, and Bcl-x_L immunoprecipitation blots were normalized to the relative densities of GR. Brightness and contrast of representative images have been adjusted.

2.8. Labeling cells for confocal laser scanning microscopy

After 30 min DX treatment CD4-Pacific Blue and CD8-Pacific Orange labeling of thymocytes was performed in binding buffer (PBS containing 0.1% BSA and 0.1% NaN₃) then cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and washed in permeabilization buffer (PBS containing 0.1% BSA, 0.1% NaN₃ and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich)). The intracellular labeling of the cells was performed in saponin buffer with rabbit anti-Bak, Bax, Bcl-x_L, and Bim as primary Abs and anti-rabbit IgG-Cy3 as secondary Ab then with 1 µg/ml anti-GR-FITC antibody [29]. The cells were incubated for 1 hour with the Abs and washed twice in saponin buffer. After the labelling the cells were washed again twice in saponin buffer and once with PBS then cytospined onto slides. The excess fluid was carefully aspirated and the slides were covered using Promofluor Antifade Reagent (PromoKine, Heidelberg, Germany).

2.9. Mitotracker chloromethyl-X-rosamine (CMX-Ros) staining of mitochondria for confocal laser scanning microscopy

CMX-Ros (Invitrogen, Waltham, MA, USA) is a cell-permeant lipophilic reagent, which diffuses through the plasma membrane and accumulates in active mitochondria due to normal mitochondrial membrane potential [31]. Briefly, 10^6 thymocytes were incubated in 1 ml serum-free RPMI containing 10 μ l CMX-Ros stock solution (1 μ g/ml in DMSO) for 30 min at 37 °C, following the manufacturer's instructions, parallel with 1 μ M DX treatment. Cell surface labelling with anti-CD4-Pacific Blue and anti-CD8-Pacific Orange and intracellular labeling with rabbit anti-Bax as primary Ab, and anti-rabbit IgG-FITC as secondary Ab was performed as indicated in 2.8.

2.10. Confocal microscopic image acquisition and analysis

Visualization and analysis of the samples were carried out using an Olympus Fluoview 300 confocal microscope with an Olympus Fluoview FV1000S-IX81 image acquisition software system. Data were collected in four separate channels, including differential interference contrast (DIC), UV for CD4, virtual red for CD8, FITC for GR, red for Bak, Bax, Bcl-x_L, and Bim or red for mitochondria and FITC for Bax. Sequential scanning was used for image acquisition. Signals were collected from cells in 3–3 frames and Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim–GR and CMX-Ros–Bax morphological association was analyzed with the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) using co-localization plug-in. Co-localization data was calculated using the original, unmodified images. Based on the analysis of pixel fluorescence intensities, ranging from 0 to 255, specific staining was distinguished from background by using a threshold value of 50 as described elsewhere [32,33]. Then, co-localized pixels between Cy3–GR and CMX-Ros–Bax were counted. One hundred DP cells per sample were analyzed altogether using this approach. Brightness and contrast of representative images have been adjusted.

2.11. Labeling cells for flow cytometry

10^6 cells were treated with DX for 0.5, 1, 2 and 3 hours. Cell surface labelling with CD4-PECy5 and CD8-PE and intracellular labelling with rabbit anti-caspase-3, -8, -9 as primary antibodies and with anti-rabbit IgG-FITC as secondary antibody was performed as indicated in 2.8. followed by flow cytometric analysis.

2.12. Flow cytometric data acquisition and analysis

Samples were measured and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using the CellQuest Pro software. Thymocyte subpopulations were analyzed separately based on their cell

surface CD4/CD8 expression for FITC intensity detected in the FL1 channel. Fluorescent histogram plots were used to compare the ratio of active caspase-3,-8,-9 expressing cells (FITC positive) of different samples.

2.13. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. GraphPad Prism (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA) program was used to create the artwork and perform the statistical analysis using Student's *t*-test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. DX-induced changes in the co-localization between GR and members of Bcl-2 protein family

Previous studies have shown the importance of Bax, Bak and Bim in mediating DX-induced apoptosis [27,28,34-36] and in our preliminary work, in a TCR transgenic model, we have observed that thymocytes, surviving T cell selection, up-regulated their Bcl-2 protein level [22]. We have also shown, that upon *in vitro* exposure of DP thymocytes to GC the activated GR translocated to the mitochondria within 30 minutes which was followed by the decrease of the mitochondrial membrane potential [6], indicating the importance of non-genomic effects and the mitochondrial apoptotic pathway in the GC-induced apoptosis of thymocytes. Therefore, now we set out to find potential molecular partners for the activated GR in the mitochondrial apoptotic pathway. To this end we investigated possible protein interactions between the GR and Bcl-2 family proteins, which are responsible for the control of the mitochondrial membrane potential [37]. To test our hypothesis the co-localization of GR and Bak, Bax, Bcl-xL or Bim was analyzed in DP thymocytes before and after 30 minutes of high dose DX treatment (Figure 1). We found that the GR co-localized to some extent with all four investigated Bcl-2 family proteins (Fig. 1A1-D1). Upon DX treatment the GR–Bak association showed minimal change (Fig. 1A1), the GR–Bax, –Bcl-xL association decreased (Fig. 1B1, C1), while the GR–Bim association increased (Fig. 1D1).

To quantify the rate of co-localization, we calculated and compared the number of co-localized pixels in individual DP cells after 30 minutes of DX treatment to their controls. After DX treatment the co-localized pixel number minimally changed between Bak and GR (1463 ± 76 versus 1342 ± 65 in the control) (Fig. 1A2) but decreased slightly between Bax and GR (937 ± 77 versus 1156 ± 44 in the control) (Fig. 1B2). The co-localization between GR and Bcl-xL decreased significantly after DX treatment (234 ± 19 versus 314 ± 1 in the

control) (Fig. 1C2). We observed a remarkable, but statistically not significant, increase in the co-localization of Bim and GR upon 30 min DX treatment (719 ± 159 versus 501 ± 60 in the control) (Fig. 1D2).

3.2. The GR interacts with members of the Bcl-2 protein family in the cytoplasm and the mitochondria of thymocytes

To confirm our confocal microscopic results, we investigated the interaction of the GR with Bcl-2 family member proteins: Bak, Bax, Bcl-x_L and Bim proteins in thymocytes using co-immunoprecipitation with anti-GR antibody. We also wanted to elucidate whether the high dose DX treatment changed the active GR–Bcl-2 family protein complexes' subcellular distribution. Therefore, we performed subcellular fractionation and isolated cytoplasmic and mitochondrial fractions from 30 minutes DX or vehicle-treated, unseparated thymocytes. After subcellular fractionation immunoprecipitation was performed with anti-GR antibody and then the samples were further analyzed by western blot to visualize the co-precipitated Bcl-2 family proteins. Densitometric quantification of western blots was carried out. The Bcl-2 family protein levels were compared in both untreated and DX-treated samples. Note: although thymocytes were not separated, based on their cell surface phenotype, in these experiments, 70-80% of the cells are DP in 3-to-4-week-old *BALB/c* mice [38]; therefore the results from our immunoprecipitation and western blot experiments give a good impression about the DP cells. Results of representative experiments are shown in Figure 2. Confirming our confocal microscopic data (see 3.1.), association of the GR with Bak, Bim, Bcl-x_L proteins could be observed both in the cytoplasmic and mitochondrial fractions of both untreated and DX-treated thymocytes (Fig. 2A, B, C, respectively), however, Bax protein did not show any direct association with the GR (data not shown).

Bak co-precipitated with the GR, and upon DX treatment the Bak–GR co-precipitation increased in the cytoplasmic and slightly changed in the mitochondrial fraction (Fig. 2A). We also observed the co-precipitation of Bim with the GR (Fig. 2B). Bcl-x_L also co-precipitated with GR (Fig. 2B). The rate of their co-precipitation increased in the cytoplasmic and decreased in the mitochondrial fraction upon DX treatment in comparison to the control (Fig. 2B). Finally, the GR–Bim association changed only minimally in the cytoplasmic fraction, but remarkably increased in the mitochondrial compartment (Fig. 2C). This pronounced mitochondrial accumulation of Bim suggests its potential role in the mitochondrial (intrinsic) apoptotic pathway in the GC-induced thymocyte apoptosis.

3.3. DX treatment-induced mitochondrial accumulation of Bax

Bax is a key pro-apoptotic protein in the mitochondrial apoptotic pathway. It has been shown earlier, that Bax has a constant turnover between the mitochondrial membrane and the cytoplasm [39] and it has also been demonstrated to be important in GC-induced apoptosis together with Bak [27,28,34]. In the case of Bax we could not confirm the co-localization, observed by confocal microscopy, with co-immunoprecipitation (data not shown). Therefore, we investigated whether the high dose DX treatment caused any redistribution of Bax between the cytoplasmic and mitochondrial fractions of thymocytes, and we have found that Bax accumulated in the mitochondrial fraction after 30 min of DX treatment, compared to the control (Figure 3A). This result was confirmed by confocal microscopy (Figure 3 B1); the number of Bax–CMX-Ros co-localized pixel number increased upon 30 minutes of DX treatment (910 ± 68 versus 626 ± 33 in the control) (Figure 3 B2).

3.4. Kinetics of caspases' activation in DP thymocytes

Preceding studies with knock-out (KO) models have shown the importance of the intrinsic apoptotic pathway in GC-induced apoptosis of thymocytes [40,41]. However, others have emphasized the role of caspase-8 and the extrinsic pathway in this process [42,43]. In our previous research, with DP thymocytes, we have shown that the translocation of GR to the mitochondria was followed by the decrease of the mitochondrial membrane potential [6], which supported the significance of the mitochondrial apoptotic pathway in DP thymocyte apoptosis induced by GCs.

Hence, now to investigate the activation of caspases in DP thymocytes, separately from other thymocyte subpopulations, we examined the activation of caspase-3,-8, and -9 after 0.5, 1, 2 and 3 hours of DX treatment in DP thymocytes (Fig. 4). The ratio of DP cells containing cleaved caspase-9 increased significantly after 2 and 3 hours of DX treatment (Fig. 4C). The percentage of DP cells in which active caspase-3 was detected showed increase already after 1 hour of DX treatment, and after 2 and 3 hours of DX treatment the rate of DP cells having active caspase-3 increased significantly (Fig. 4D). The activation of caspase-9 together with the cleavage of caspase-3 implied the activation of the intrinsic, mitochondrial apoptotic pathway upon DX treatment. The ratio of active caspase-8 containing DP cells was slightly elevated upon 0.5 and 1 hour of DX treatment, and this increase continued and became significant after 2 and 3 hours DX treatment showing a similar tendency to the active caspase-9 (Fig. 4E). The changes in caspase-9 activation seemed to be more pronounced than in the case of caspase-8 after 2 and 3 hours of DX treatment, which may suggest a pivotal role of caspase-9 in DX-induced thymocyte apoptosis.

3.5. DX-induced caspase activation in thymocytes and the release of Cytochrome C to the cytoplasm

To confirm our flow cytometric results we performed western blot analysis of activated caspases in unseparated thymocytes (70-80% of the cells are DP [38]) upon 3 hours of DX treatment (which was the peak activation seen with flow cytometry, see Fig. 4) together with the analysis of Cytochrome C release to the cytoplasm after 1 h DX treatment. Cell lysates of untreated, control, and *in vitro* DX-treated thymocytes were compared for active caspase-3,-8,-9 and Cytochrome C levels (Fig. 5). One hour, high dose DX treatment caused the significant increase of Cytochrome C level in the cytoplasm (Fig. 5A). We observed the significant elevation of active caspase-9,-3 levels (Fig. 5B and C, respectively) compared to the control after 3 hours of high dose DX treatment which are characteristic signs of the activation of the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway. Interestingly, the initiator caspase-8 of the extrinsic pathway was also significantly elevated upon DX treatment (Fig. 5D), which might reflect a cross-talk between the intrinsic- and extrinsic pathways or may indicate the activation of another parallel apoptotic pathway.

Discussion

Glucocorticoid receptor (GR) signaling plays an important regulatory role in the selection and apoptosis of thymocytes [6,8,7]. Besides the nuclear-, mitochondrial translocation of the ligand-bound GR might dictate GC-induced apoptosis sensitivity of the cells [44-49,6]. In a previous study, we followed the ligand-induced GR trafficking in GC-sensitive CD4⁺CD8⁺ DP thymocytes [50-52] upon short term *in vitro* GC treatment and demonstrated the GR translocation into the mitochondria, which correlated well with their pronounced GC-induced apoptosis sensitivity [6,51]. However, the molecular events following the short-term GC treatment-induced mitochondrial translocation remained to be elucidated. In our present work we clarified that the GR regulates the mitochondrial apoptotic pathway of thymocytes in close collaboration with the Bcl-2 family proteins.

We observed both co-localization and direct molecular association of Bak with GR (Figures 1 and 2). After DX treatment this association was unchanged in the mitochondrial fraction but increased in the cytoplasm of thymocytes upon high-dose short-term DX treatment. Upon apoptotic stimuli, Bax translocates to the mitochondria where it forms a complex with Bak leading to mitochondrial pore formation [24]. Our findings suggest that Bax has a primary role in the early phase of DX-induced apoptosis of thymocytes, although not associating directly with the GR. We cannot rule out the possibility that Bak also plays a role in GC-induced apoptosis, but probably joins at a later stage than we examined in our work. This is supported by earlier

observations in thymocytes from Bax/Bak double KO mice which were completely resistant to GC-induced apoptosis, whereas Bax or Bak single KO mice thymocytes were still sensitive to GCs [34]. These studies, with knock-out mice, have strengthened the importance of Bak in GC-induced apoptosis, but also have suggested that Bax and Bak may compensate for each other [34].

Our results showed the association of Bim, a BH3-only protein, with GR and their interaction increased especially in the mitochondrial fraction upon DX treatment (Figs. 1 and 2). Bim^{-/-} knock-out mice showed impaired GC-induced apoptosis [35,36] showing its important but not exclusive participation in this death process. This is also supported by the results of other research groups [53]. GCs have been found to induce the expression of Bim in murine thymocytes after 2 or 3 hours of DX treatment [47,54]. Increased expression of Bim has correlated with increased sensitivity to GC-induced apoptosis [55,56], dysregulation of its gene expression has been found in solid and hematopoietic malignancies [57], where reduced expression correlated with increased disease risk [58], and single nucleotide polymorphisms have been associated with impaired responsiveness to anticancer therapies [59-61]. Our results also support that Bim plays a crucial role in the initiation of GC-induced apoptosis of DP thymocytes; the increased association of Bim with the GR in the mitochondria may promote the activation and oligomerization of Bax in the mitochondrial outer membrane.

Interestingly, we also observed interaction between Bcl-x_L, an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, and the GR during the DX-induced apoptotic processes. Bcl-x_L has been shown to retrotranslocate Bax from the mitochondria to the cytoplasm by binding to it and thus inhibiting its pro-apoptotic activity [62]. We hypothesize that the interaction between the GR and Bcl-x_L would cause the inhibition of this particular Bcl-x_L function. After 30 minutes DX treatment the GR bound ratio of Bcl-x_L increased in the cytoplasmic but decreased in the mitochondrial fraction (Fig. 2) which suggests that Bcl-x_L, after translocating to the cytoplasm from the mitochondria, binds to the GR, and this sequestration could abolish its antagonistic effect on the apoptotic process. This hypothesis about the inhibitory effect of the GR on Bcl-x_L is supported by the result of another research group where it has been observed that the expression of Bcl-x_L decreased significantly after 2 or 3 hours of DX treatment [54]. However, the co-localization between Bcl-x_L and the GR decreased significantly after DX treatment (Fig. 1), which might be due to the fact that the co-localization results are only from DP cells and it gives the overall ratio of co-localization, both in the cytoplasm and the mitochondria, while unseparated thymocytes were used for the co-immunoprecipitation experiment and the cytoplasmic and mitochondrial fractions were analyzed separately.

The rate of co-localization between Bax and the GR slightly changed upon DX treatment (Fig. 1), but

we could not confirm the co-localization, observed by confocal microscopy, with co-immunoprecipitation experiments. Co-localization expresses molecular proximity, but does not reflect necessarily direct molecular interaction between two molecules. In the case of Bax, where the co-localization with the GR was not confirmed by co-immunoprecipitation, the results suggest that the two molecules were very close to each other, but there were no direct interaction between them. According to our results GR, a 94 kDa molecule, associates with other members of the Bcl-2 protein family, which are in the vicinity of Bax. It is known from the work of others [63-[65](#),[62](#)] that these Bcl-2 proteins interact with each other, which may explain the proximity of the GR to Bax without direct association. Besides we detected a clear redistribution of Bax from the cytoplasm to the mitochondria (Fig. 3) which correlated with the results of others [27,[28](#)] suggesting the central role of Bax in DX-induced apoptosis of thymocytes. Bax trafficking between the mitochondrial outer membrane and the cytoplasm is a key regulator of the intrinsic (mitochondrial) pathway of apoptosis [[39](#),[66](#),[24](#)]. Bax oligomerization in the mitochondrial membrane leads to the formation of a permeability pore, which causes the decrease of the mitochondrial membrane potential [[24](#)], as it has been detected in our previous experiments [6].

Caspases are important effectors of both, intrinsic and extrinsic, apoptotic pathways [[26](#),[23](#)]. In our experiments we analyzed the kinetics of caspases' activation from 0.5 to 3 hours of DX treatment. We observed significantly increased number of DP thymocytes containing active, cleaved caspase-3, -8, -9 after 2 and 3 hours of DX treatment. After 1 hour of DX treatment, the caspase-3 activation was probably the result of caspase-9 activation following the decrease of the mitochondrial membrane potential observed after 30 minutes DX treatment in our previous work [6]. But the activation of caspase-3 after 1 hour of DX treatment may be partially the result of the activation of parallel apoptotic pathways. These include ceramide and sphingosine generation which were reported to be able to induce caspase-3 activation in a mitochondria independent manner [[42](#),[67](#)]. The prominent caspase-9 activation after 2 hours DX treatment was followed by remarkable caspase-3 activation after 3 hours DX treatment. The number of DP cells containing activated caspase-9 was almost doubled after 2 hours and the number of cleaved caspase-8 containing DP cells increased significantly but to a lesser extent than caspase-9. This observation suggests that the activation of caspase-9 may be prior to caspase-8 activation and strengthen the importance of the mitochondrial apoptotic pathway in DX-induced apoptosis of DP thymocytes.

Our results are supported by the work of other research groups. Several knock-out models have been generated already, where one or more members of the Bcl-2 family or caspases were inactivated and thus, the deficiency of these proteins can be studied effectively. These models have provided an important insight into the different apoptotic pathways. For example, caspase-9^{-/-} KO thymocytes have been found to be resistant to DX-

induced apoptosis, but remained sensitive to apoptosis induced by TNF- α , α -CD95 [40]. Apaf $^{-/-}$ KO thymocytes have shown only partial resistance to DX-induced apoptosis and impaired procaspase-8 processing, but were sensitive to apoptosis induced by Fas ligation [41]. GC-induced thymocyte apoptosis has been unaffected in Bid-deficient mice suggesting the dispensable role of the extrinsic apoptotic pathway in GC mediated cell death [68]. On the other hand, using small peptide inhibitors of caspases have shown the importance of caspase-3 and -8 in GC-induced thymocyte apoptosis [42,43], but the specificity of these inhibitory molecules might be unclear [69-71]. Some results have suggested the primary role of caspase-9 in GC-induced apoptosis [40,41]. However, others have not supported these findings [72,42]. The activation of caspase-8 could also be the result of the activation of caspase-9 either through the release of cathepsin B from lysosomes leading to caspase-8 activation [73] or through the activation of caspase-3 and -6, which then cleaves caspase-8 [74]. But the activation of caspase-8 can be the result of the induction of other apoptotic pathways activated by GCs including; ceramide and sphingosine production, Cyclin-dependent kinase 2 activation, or as already mentioned above, the lysosomal release of cathepsin B [42,72,73,75].

In conclusion, our results demonstrate the complexity of early steps of the DX-induced mitochondrial apoptotic pathway in GC sensitive, DP thymocytes (Fig. 6). In the absence of its ligand some association could be observed between the GR and members of the Bcl-2 family (Bak, Bim, Bcl-x_L) proteins. There is a constant turnover of the pro-apoptotic Bax between the mitochondrial outer membrane and the cytoplasm. When no apoptotic stimuli are present Bcl-x_L retrotranslocates Bax from the mitochondrial outer membrane, thus the majority of Bax is located in the cytoplasm in an inactive conformation [62]. Upon high dose GC treatment the liganded GR changes the equilibrium between the Bcl-2 family proteins, in such a way, which promotes apoptosis. GR translocates to the mitochondria where its interaction increases especially with Bim. Bim presumably activates Bax leading to the accumulation and permeability pore formation of Bax in the mitochondrial outer membrane, causing the decrease of the mitochondrial membrane potential [6], the release of Cytochrome C and the activation of caspase-9 (Fig. 6). The pore formation of Bax in the mitochondrial outer membrane might be supported by the increased cytoplasmic association of the activated GR with Bcl-x_L, which interferes with the latter's inhibitory effect on the mitochondrial pore formation by Bax. The role of the GR–Bak association needs further investigations. Caspase-8 activation (extrinsic pathway) may be the result of the interaction of GR and other apoptotic pathways [42,72,73,75]. Taken together, our results emphasize the importance of the mitochondrial apoptotic pathway and the non-genomic effects in GC-induced thymocyte apoptosis.

References

1. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST (2002) Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* 8 (6):1681-1694
2. Ahmad N, Kumar R (2011) Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 300 (1):1-9. doi:10.1016/j.canlet.2010.09.008
3. Ramamoorthy S, Cidlowski JA (2016) Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am* 42 (1):15-31, vii. doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002
4. Petta I, Dejager L, Ballegeer M, Lievens S, Tavernier J, De Bosscher K, Libert C (2016) The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combating Inflammatory and Infectious Diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 80 (2):495-522. doi:10.1128/mmbr.00064-15
5. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM (2006) Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63 (1):60-72. doi:10.1007/s00018-005-5390-y
6. Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, Palinkas L, Szabo M, Berta G, Setalo G, Jr., Nemeth P, Berki T (2009) Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunopharmacol* 21 (11):1269-1276. doi:10.1093/intimm/dxp093
7. Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E (2006) Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 203 (1):189-201. doi:10.1084/jem.20050433
8. Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW (2007) Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* 13 (4):158-163. doi:10.1016/j.molmed.2007.02.001
9. Talaber G, Tuckermann JP, Okret S (2015) ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids. *Faseb j* 29 (6):2526-2534. doi:10.1096/fj.14-268508
10. Drouin J, Sun YL, Tremblay S, Lavender P, Schmidt TJ, de Lean A, Nemer M (1992) Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 6 (8):1299-1309
11. Berg JM (1989) DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57 (7):1065-1068

12. Xavier AM, Anunciato AK, Rosenstock TR, Glezer I (2016) Gene Expression Control by Glucocorticoid Receptors during Innate Immune Responses. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:31. doi:10.3389/fendo.2016.00031
13. Meijssing SH (2015) Mechanisms of Glucocorticoid-Regulated Gene Transcription. *Adv Exp Med Biol* 872:59-81. doi:10.1007/978-1-4939-2895-8_3
14. Van Bommel T, Marsen T, Bojar H (1987) Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in CAMA-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res* 7 (6):1217-1223
15. Stahn C, Buttigereit F (2008) Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4 (10):525-533. doi:10.1038/ncprheum0898
16. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, De Bosscher K (2013) How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol* 380 (1-2):41-54. doi:10.1016/j.mce.2012.12.014
17. Talaber G, Jondal M, Okret S (2013) Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 380 (1-2):89-98. doi:10.1016/j.mce.2013.05.007
18. Bartis D, Boldizsar F, Kvell K, Szabo M, Palinkas L, Nemeth P, Monostori E, Berki T (2007) Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun* 354 (1):253-258. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.211
19. Sionov RV, Kfir S, Zafrir E, Cohen O, Zilberman Y, Yefenof E (2006) Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5 (10):1017-1026
20. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T (2010) Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 215 (7):521-526. doi:10.1016/j.imbio.2009.10.003
21. Buttigereit F, Grant A, Muller M, Brand MD (1994) The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur J Biochem* 223 (2):513-519
22. Palinkas L, Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, Nemeth P, Berki T (2008) Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology* 213 (1):39-50. doi:10.1016/j.imbio.2007.06.004

23. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol.* doi:10.1007/s13277-016-5035-9
24. Shamas-Din A, Brahmbhatt H, Leber B, Andrews DW (2011) BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813 (4):508-520. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.11.024
25. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013) Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (6). doi:10.1101/cshperspect.a008672
26. Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14 (1):32-43. doi:10.1038/sj.cdd.4402060
27. Hoijman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A (2004) Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 145 (1):418-425. doi:10.1210/en.2003-0764
28. Tan YJ, Teng E, Ting AE (2003) A small inhibitor of the interaction between Bax and Bcl-X(L) can synergize with methylprednisolone to induce apoptosis in Bcl-X(L)-overexpressing breast-cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 129 (8):437-448. doi:10.1007/s00432-003-0464-4
29. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P (1998) Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods* 214 (1-2):19-27
30. Stasik I, Rapak A, Ziolo E, Strzadala L (2008) The mitochondrial localization of RelB and NFATx in immature T cells. *Cell Mol Biol Lett* 13 (4):493-501. doi:10.2478/s11658-008-0019-4
31. Pendergrass W, Wolf N, Poot M (2004) Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 61 (2):162-169. doi:10.1002/cyto.a.20033
32. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freimark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM (2006) Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 116 (10):2610-2621. doi:10.1172/jci24612
33. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, Hu-Lowe DD, Shalinsky DR, Thurston G, Yancopoulos GD, McDonald DM (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 165 (1):35-52. doi:10.1016/s0002-9440(10)63273-

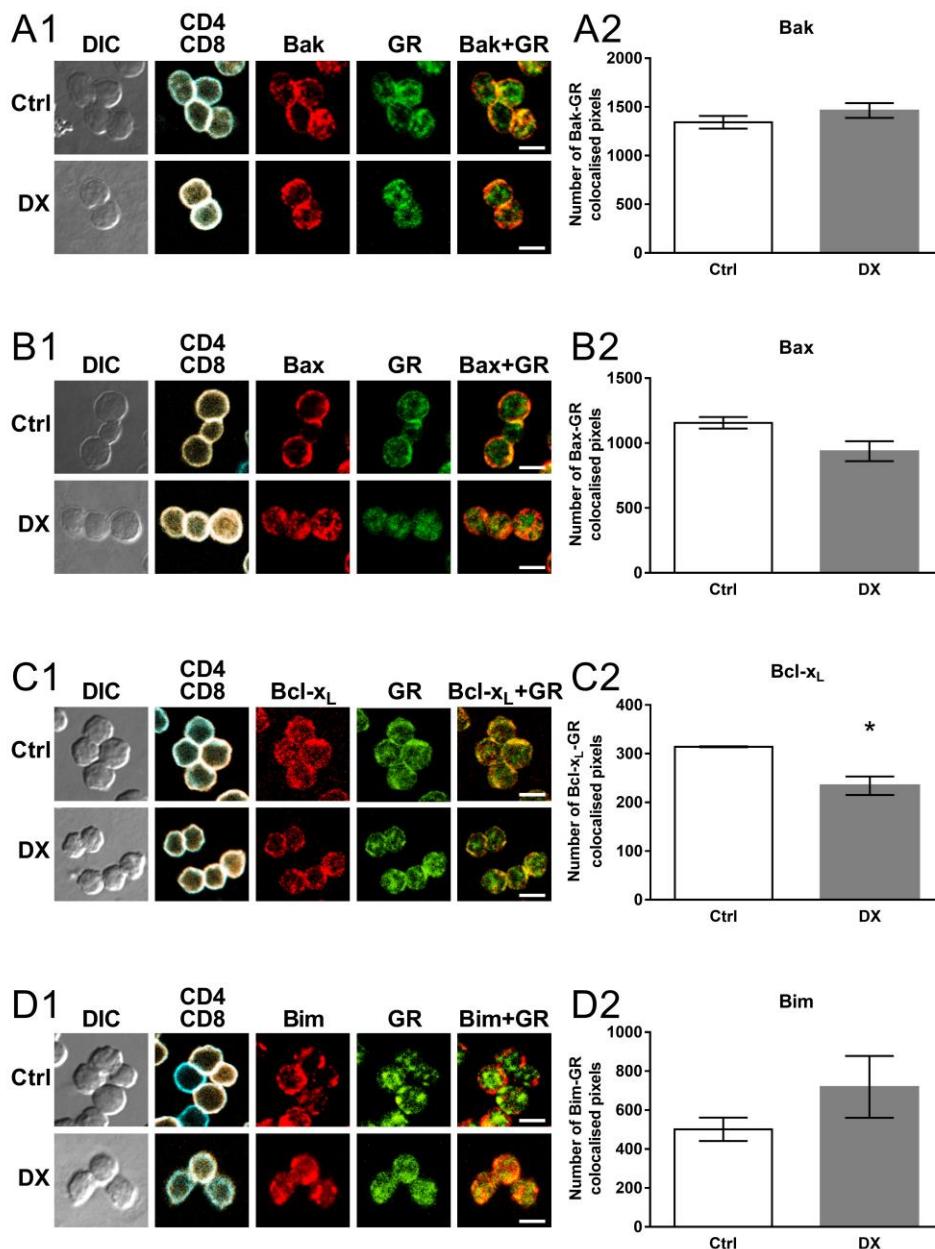
34. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB (2002) Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* 3 (10):932-939. doi:10.1038/ni834
35. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286 (5445):1735-1738
36. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106 (13):4131-4138. doi:10.1182/blood-2005-04-1595
37. Marsden VS, Strasser A (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 21:71-105. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141029
38. Oh SH, Kim K (1999) Expression of interleukin-1 receptors in the later period of foetal thymic organ culture and during suspension culture of thymocytes from aged mice. *Immunol Cell Biol* 77 (6):491-498. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00852.x
39. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139 (5):1281-1292
40. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94 (3):339-352
41. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94 (6):739-750
42. Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C (2003) Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 101 (2):585-593. doi:10.1182/blood-2002-06-1779
43. McColl KS, He H, Zhong H, Whitacre CM, Berger NA, Distelhorst CW (1998) Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bc1-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol* 139 (1-2):229-238
44. Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, Inobe M, Iwabuchi K, Miyazaki T, Onoe K, Iwata M, Uede T (2003) Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Int Immunol* 15 (6):741-749

45. Malone MH, Wang Z, Distelhorst CW (2004) The glucocorticoid-induced gene ttag8 encodes a pro-apoptotic G protein-coupled receptor whose activation promotes glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279 (51):52850-52859. doi:10.1074/jbc.M408040200
46. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F, Distelhorst CW (2003) Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem* 278 (29):27053-27058. doi:10.1074/jbc.M303723200
47. Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS, Distelhorst CW (2003) Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278 (26):23861-23867. doi:10.1074/jbc.M301843200
48. Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E (2004) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem* 279 (53):55809-55817. doi:10.1074/jbc.M411767200
49. Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T (2001) Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (20):11318-11323. doi:10.1073/pnas.201208798
50. Boldizsar F, Palinkas L, Czompoly T, Bartis D, Nemeth P, Berki T (2006) 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* 211 (10):785-796. doi:10.1016/j.imbio.2006.06.005
51. Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P (2002) Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 14 (5):463-469
52. Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R, Wick G (2001) CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 31 (8):2293-2301. doi:10.1002/1521-4141(200108)31:8<2293::aid-immu2293>;3.0.co;2-i
53. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z (2015) Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget* 6 (27):23058-23134. doi:10.18632/oncotarget.5492
54. Bianchini R, Nocentini G, Krausz LT, Fettucciari K, Coaccioli S, Ronchetti S, Riccardi C (2006) Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 319 (2):887-897. doi:10.1124/jpet.106.108480

55. Harada M, Pokrovskaja-Tamm K, Soderhall S, Heyman M, Grander D, Corcoran M (2012) Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 53 (10):2041-2050. doi:10.3109/10428194.2012.678004
56. Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW (2011) Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17~92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Mol Endocrinol* 25 (3):409-420. doi:10.1210/me.2010-0402
57. Pinon JD, Labi V, Egle A, Villunger A (2008) Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* 27 Suppl 1:S41-52. doi:10.1038/onc.2009.42
58. Kelly JL, Novak AJ, Fredericksen ZS, Liebow M, Ansell SM, Dogan A, Wang AH, Witzig TE, Call TG, Kay NE, Habermann TM, Slager SL, Cerhan JR (2010) Germline variation in apoptosis pathway genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19 (11):2847-2858. doi:10.1158/1055-9965.epi-10-0581
59. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC, Jr., Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK, Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT, Ruan Y, Ong ST (2012) A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 18 (4):521-528. doi:10.1038/nm.2713
60. Akiyama T, Dass CR, Choong PF (2009) Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther* 8 (12):3173-3180. doi:10.1158/1535-7163.mct-09-0685
61. Faber AC, Ebi H, Costa C, Engelman JA (2012) Apoptosis in targeted therapy responses: the role of BIM. *Adv Pharmacol* 65:519-542. doi:10.1016/b978-0-12-397927-8.00016-6
62. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ (2011) Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145 (1):104-116. doi:10.1016/j.cell.2011.02.034
63. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292 (5517):727-730. doi:10.1126/science.1059108

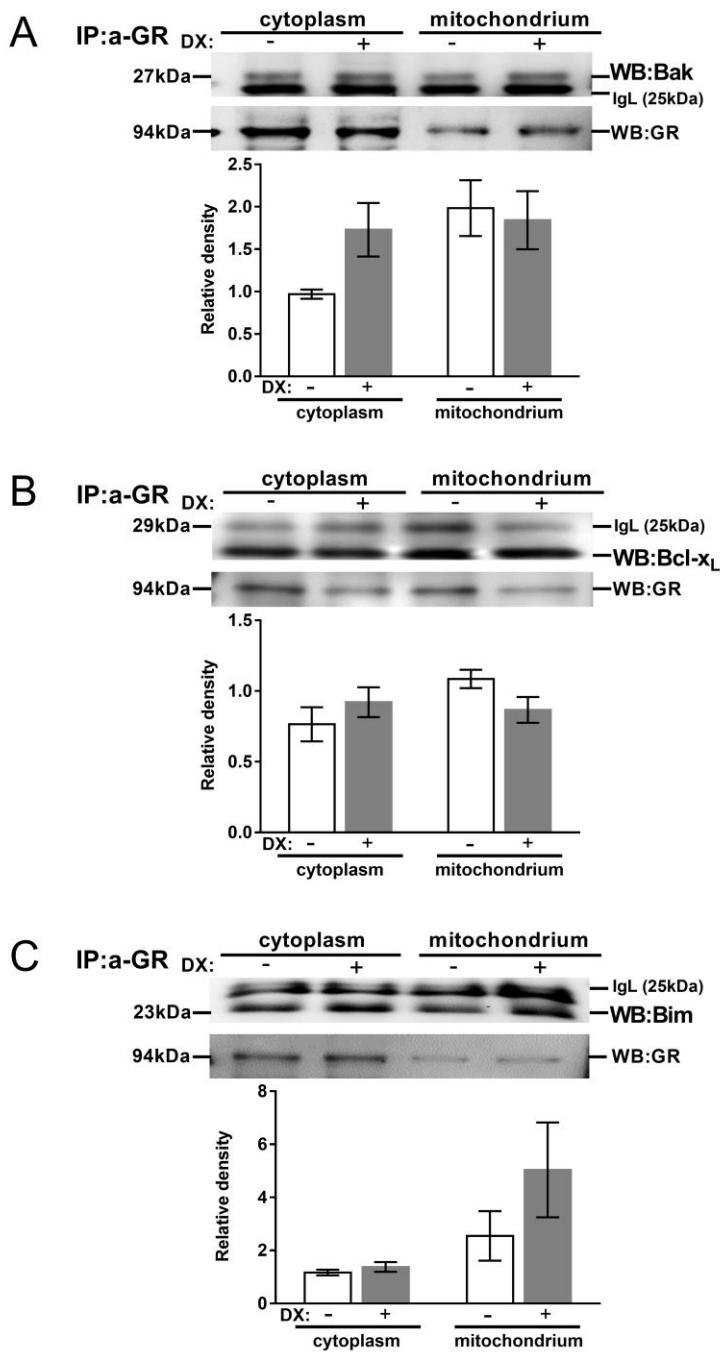
64. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8 (3):705-711
65. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17 (4):525-535. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.003
66. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276 (15):11615-11623. doi:10.1074/jbc.M010810200
67. Wang J, Zhen L, Klug MG, Wood D, Wu X, Mizrahi J (2000) Involvement of caspase 3- and 8-like proteases in ceramide-induced apoptosis of cardiomyocytes. *J Card Fail* 6 (3):243-249. doi:10.1054/jcaf.2000.9502
68. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400 (6747):886-891. doi:10.1038/23730
69. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272 (15):9677-9682
70. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272 (29):17907-17911
71. Poreba M, Strozyk A, Salvesen GS, Drag M (2013) Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (8):a008680. doi:10.1101/cshperspect.a008680
72. Lepine S, Lakatos B, Courageot MP, Le Stunff H, Sulpice JC, Giraud F (2004) Sphingosine contributes to glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes independently of the mitochondrial pathway. *J Immunol* 173 (6):3783-3790
73. Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM (2006) Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 176 (3):1695-1702
74. Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM (2009) Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ* 16 (7):1053-1061. doi:10.1038/cdd.2009.29

75. Granes F, Roig MB, Brady HJ, Gil-Gomez G (2004) Cdk2 activation acts upstream of the mitochondrion during glucocorticoid induced thymocyte apoptosis. *Eur J Immunol* 34 (10):2781-2790.
doi:10.1002/eji.200425154

**Fig. 1**

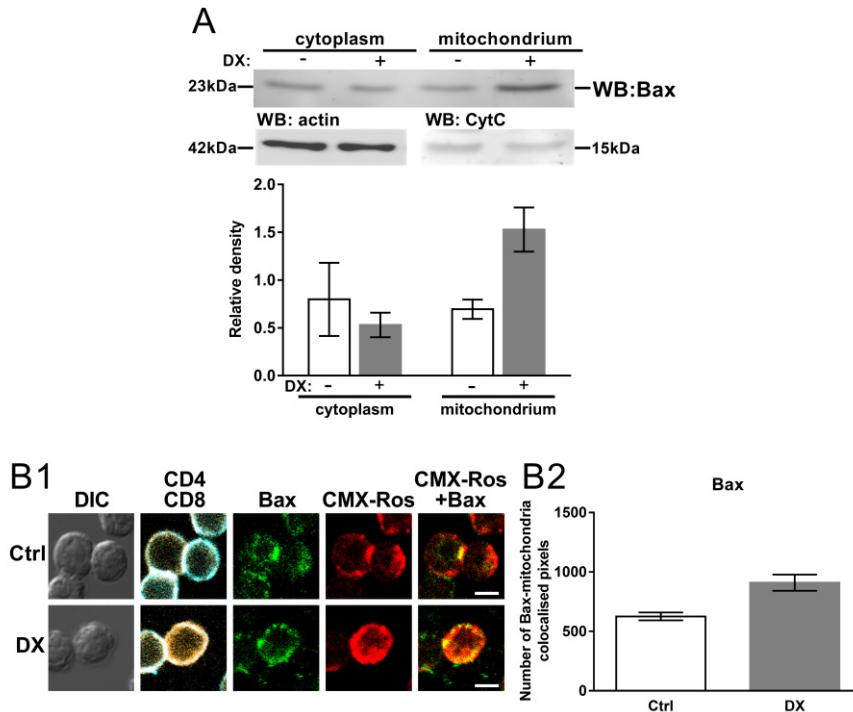
Co-localization of the GR with members of the Bcl-2 family proteins: Bak, Bax, Bcl-x_L and Bim co-localization in DP thymocytes.

Representative confocal microscopic images from at least three independent experiments showing GR-Bak (A1), GR-Bax (B1), GR-Bcl-x_L (C1) and GR-Bim (D1) co-localization in control (Ctrl) and 30 minutes DX-treated cells. DIC, CD4 (blue channel) and CD8 (virtual red channel) overlaid, intracellular GR (green channel) and Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim (red channel) images are shown. The co-localization of the GR with Bak, Bax, Bcl-x_L and Bim (GR-Bak, Bax, Bcl-x_L, Bim merged images) is indicated by the yellow areas. Scale bars are 8 μ m each. Bar diagrams show the quantification of the changes in the GR-Bak (A2), GR-Bax (B2), GR-Bcl-x_L (C2) and GR-Bim (D2) co-localization in DP thymocytes after *in vitro* DX treatment. Bars represent the number of co-localized pixels per cell as calculated by the co-localization plugin of the ImageJ software. The mean \pm SEM was calculated from the data of 100 DP cells per treatment, respectively. Significant changes ($p < 0.05$) values in DX-treated cells *versus* controls are indicated by asterisk

**Fig. 2**

Association of the GR with members of the Bcl-2 family in thymocytes.

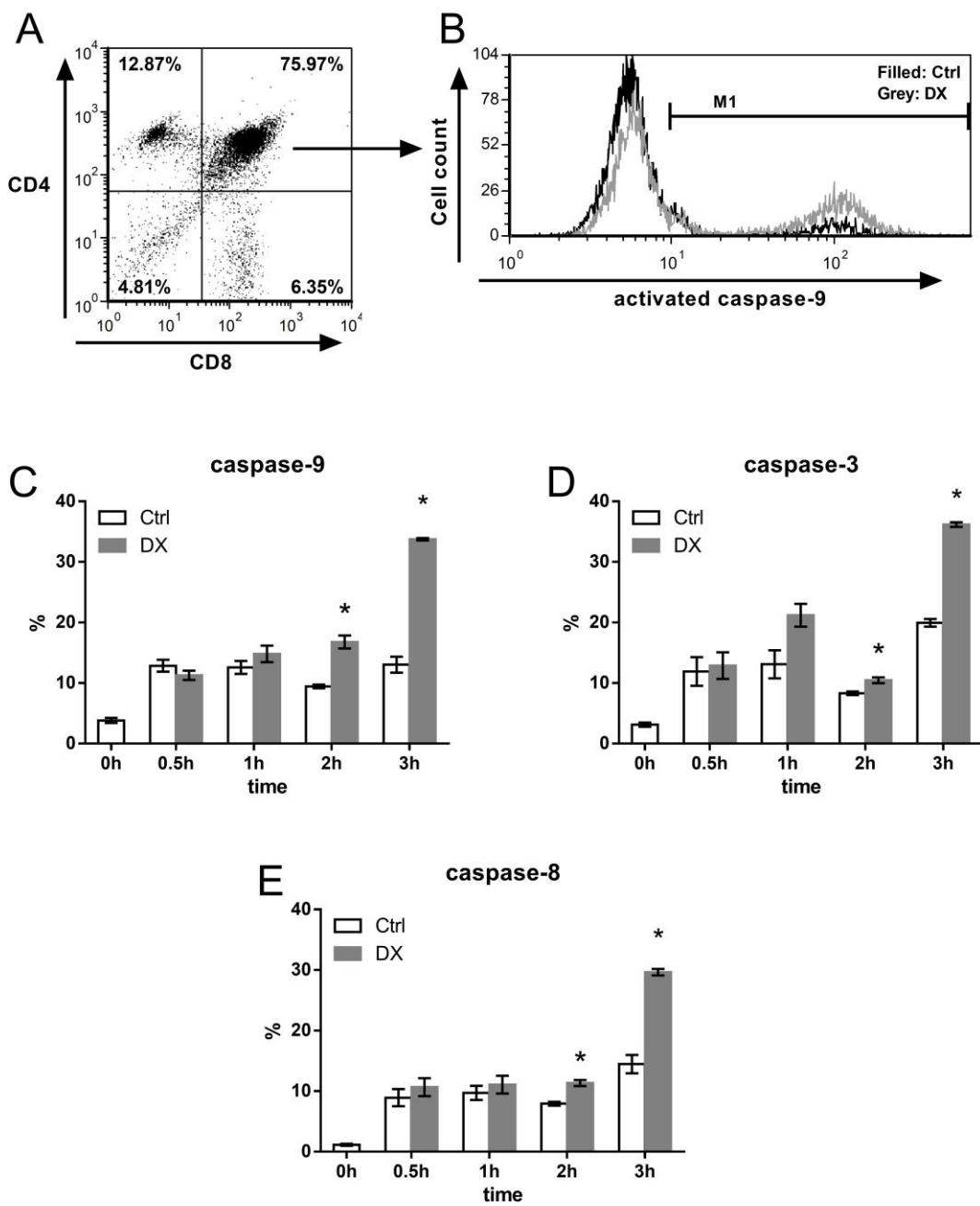
Anti-Bak (A), Bcl-xL (B) and Bim (C) western blots are shown from cytoplasmic and mitochondrial fractions of thymocyte lysates after anti-GR precipitation with or without DX treatment. Blots were reprobed with anti-GR antibody to confirm equal loading of the samples. The figure shows representative blots and densitometry data of at least three independent experiments. Diagrams below each blot show the relative Bak, Bcl-x_L and Bim levels in the cytoplasm (normalized to GR) and the mitochondria (normalized to GR). Bars represent the mean \pm SEM of relative densities compared with the controls. IgL: immunoglobulin light chain

**Fig. 3**

Subcellular distribution of Bax in thymocytes upon DX treatment.

A: Western blot shows the DX treatment-induced redistribution of Bax between the cytoplasmic and mitochondrial fractions of thymocytes. Blots were reprobed with anti- β -actin or anti-Cytochrome C (Cyt C) antibodies to confirm the purity of the cytoplasmic and mitochondrial fractions, respectively. The figure shows a representative blot and the densitometry data of at least three independent experiments. The diagram shows the relative Bax expression in the cytoplasm (normalized to β -actin) and the mitochondria (normalized to Cytochrome C). Bars represent the mean \pm SEM of relative densities compared to the controls.

B: Mitochondrial translocation of Bax in DP thymocytes. **B1:** Representative confocal microscopic images of at least three independent experiment showing CMX-Ros–Bax co-localization in control (Ctrl) and 30 minutes DX-treated cells. DIC, CD4 (blue channel) and CD8 (virtual red channel) overlaid, mitochondria (CMX-Ros, red channel) and Bax (green channel) images are shown. The co-localization of mitochondria with Bax (CMX-Ros–Bax merged images) is indicated by yellow areas. Scale bars are 8 μ m each. **B2:** Quantification of the changes in the CMX-Ros–Bax co-localization in DP thymocytes after *in vitro* DX treatment was performed using the co-localization plugin of the ImageJ software. Bars represent the number of co-localized pixels. The mean \pm SEM was calculated from the data of 100 DP cells per treatment, respectively

**Fig. 4**

Flow cytometric analysis of the kinetics of caspase activation in DP thymocytes upon 30 minutes to 3 hours of DX treatment.

A: Thymocyte subpopulations were gated based on their CD4/CD8 expression. **B**: The representative fluorescent histogram plot shows the active caspase-9 positive percentage of DP thymocyte subpopulation before and after 3 hours of DX treatment. Bar diagrams show the mean \pm SEM of cleaved, active caspase-9 (**C**), -3 (**D**) and -8 (**E**) positive percentage of cells (calculated from the data of three animals) in the DP thymocyte population and its changes upon 30 minutes to 3 hours of DX treatment. Significant ($p < 0.05$) differences compared to the untreated controls are indicated by asterisk

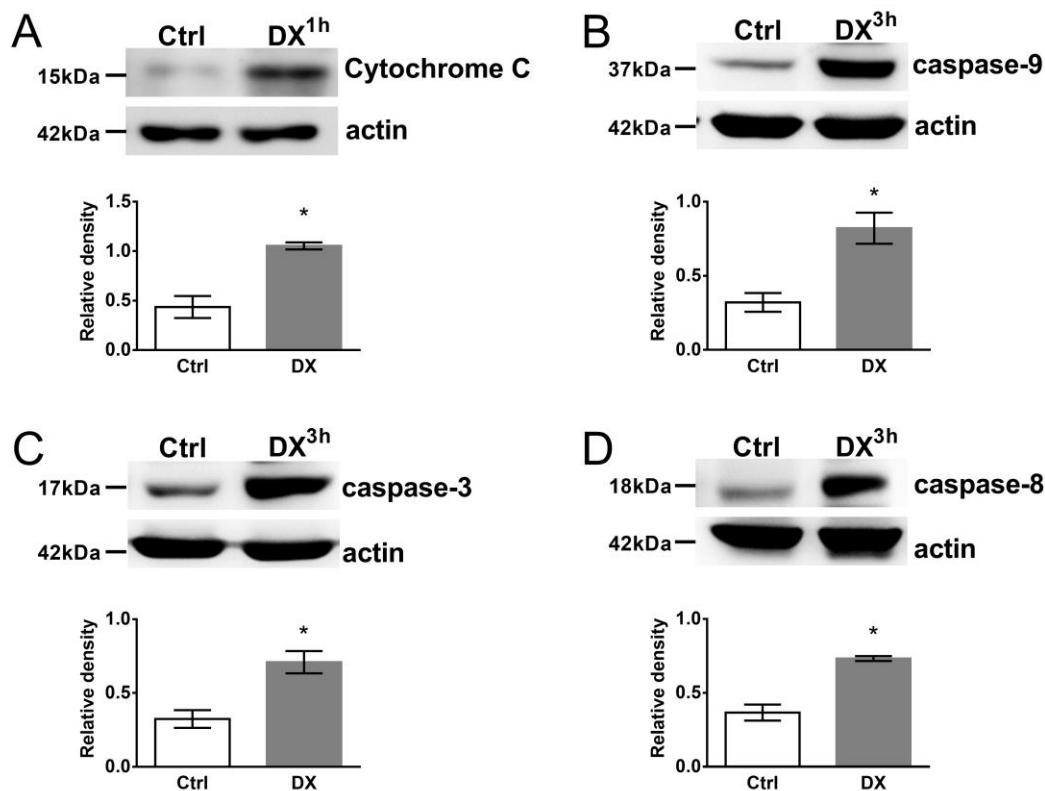


Fig. 5. Western blot analysis of DX treatment induced caspase-3,-8,-9 activation and Cytochrome C release in the cytoplasm of thymocytes.

The cytoplasmic presence of Cytochrome C (A), active (cleaved)-caspase-9 (B),-3 (C) and-8 (D) were detected in thymocyte lysates by western blot. Blots were reprobed with anti-β-actin antibody to confirm equal loading of the samples. The figure shows representative blots and the densitometry data of at least three independent experiments. Diagrams below each blot show the relative Cytochrome C and caspase-9,-3,-8 levels (normalized to β-actin). Bars represent the mean ± SEM of relative densities compared to the untreated controls. Significant ($p < 0.05$) differences are indicated by asterisk

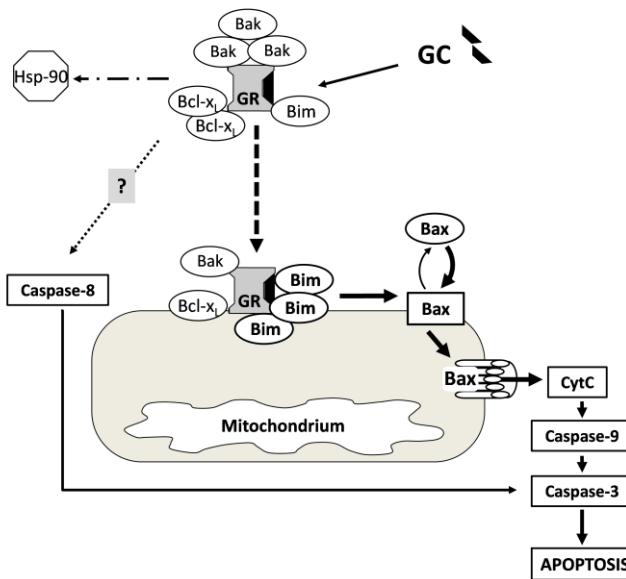


Fig. 6. Hypothetical model of the GC-induced apoptosis in thymocytes through the regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by members of Bcl-2 protein family.

Upon high dose GC treatment the GR translocates to the mitochondria (dashed arrow) where its interaction increases with Bcl-2 family proteins, especially with Bim. Then Bax is presumably activated by Bim, leading to permeability pore formation in the mitochondrial outer membrane, and the leakage of Cytochrome C into the cytoplasm, which triggers the caspase-cascade. The accumulation of Bax in the mitochondrial outer membrane is most likely further enhanced by the increased cytoplasmic association of the liganded GR and the Bcl-x_L which suspends the latter's inhibitory effect on the mitochondrial pore formation by Bax. The role of the GR–Bak association remains to be elucidated. Caspase-8 activation (extrinsic pathway) may be the result of the interaction between the GR and other apoptotic pathways (dotted arrow)

dc_1343_16