DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Interleukin-15 transz-prezentáció vizsgálata

Kenesei Ádám

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Interle	eukin-1	L5 transz-prezentáció vizsgálata	1
Tartal	omjegy	yzék	2
Az érte	ekezés	ben gyakran előforduló rövidítések jegyzéke (angol-magyar)	4
1. Be	evezet	és	5
2. Ir	odalmi	i áttekintés	7
2.1.	Lim	fociták szerepe az immunrendszer működésében	7
2.2.	T-se	ejt populációk és szerepük az immunrendszerben	7
2.3.	Cito	okinek	7
2.4.	IL-2	2 és IL-15	8
2.5.	IL-1	5 expresszió szabályzása	8
2.6.	IL-1	5 immunoterápia	9
2.7.	IL-1	5 transz-prezentáció	10
2.8.	IL-2	és IL-15 jelátvitel	11
2.9.	Ant	igén prezentáció	13
2.10). F	örster rezonancia energiatranszfer	14
2.11	L. F	luoreszcencia korrelációs spektroszkópia	15
3. Ce	élkitűz	és	18
4. A	nyagol	k és módszerek	19
4.1. Sejttenyésztés			
4.2.	Plaz	zmidok	19
4.	.2.1.	PCR (polimeráz láncreakció)	19
4.	.2.2.	Gél elektroforézis	20
4.	.2.3.	DNS extrakció agaróz gélből	20
4.	.2.4.	Restrikciós emésztés	20
4.	.2.5.	DNS tisztítás restrikciós emésztés után	20
4.	.2.6.	Ligálás	20
4.	.2.7.	Escherichia coli transzformálás	21
4.	.2.8.	Plazmid tisztítás	21
4.3.	Tra	nziens transzfekció	21
4.4.	Ret	rovirális transzdukció	22
4.5.	Imn	nunológiai szinapszis képzés	22

	4.6.	Immunfluoreszcens jelölés2	22			
	4.7.	Intenzitás alapú FRET mérés konfokális mikroszkópiával	23			
	4.8.	FLIM-FRET mérés konfokális mikroszkópiával2	24			
	4.9.	A receptorok transzlokációjának számszerűsítése2	26			
	4.10.	Foszforilált STAT5 és CD3ζ áramlási citometriás mérése Jurkat sejtekben2	27			
	4.11. mikros	A γ _c alegységek ko-mobilitásának meghatározása egysík megvilágítású szkópia alapú fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával (SPIM-FCCS)2	27			
	4.12.	Statisztikai elemzés	31			
5.	Erec	dmények	32			
	5.1.	Közvetlen bizonyíték az IL-15 transz-prezentációs komplex összeszerelődésére3	32			
	5.2.	A CD3 és az MHCII csak antigén jelenlétében szerelődik össze	36			
	5.3.	Nincs jelentős cisz-interakció az IL-2/15Rβ és a CD3 között	8			
	5.4. antigé	Az IL-15Rα és az MHC II közötti erős cisz-kölcsönhatást tovább fokozza a SEE n4	10			
	5.4.	Receptor transzlokáció az IS-ba4	13			
	5.5.	A jelátvitelt sikeresen kiváltja az IL-15 TP, amit az AP nem befolyásol4	14			
	5.6.	Az IL-15 TP hatása a T-sejt jelátvitelre4	16			
	5.7.	SPIM-FCCS mérések bizonyítják γ_c homodimer komplexek stabil ko-diffúzióját4	19			
6.	Me	gbeszélés5	6			
7.	Össz	zefoglalás	51			
8.	Sum	nmary6	52			
9.	Irod	lalomjegyzék	53			
	9.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke	53			
	9.2.	Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	58			
10). Ta	árgyszavak7	'0			
11	L. Ko	eyword7	'0			
12	12. Köszönetnyílvánítás71					
13. Függelék						

Az értekezésben gyakran előforduló rövidítések jegyzéke (angolmagyar)

AP	Antigen presentation, antigénprezentáció
CD3(ζ)	Cluster of differentiation $3(\zeta)$, differenciációs csoport $3(\zeta)$
FCCS	Fluorescence cross-correlation spectroscopy, fluoreszcencia kereszt- korrelációs spektroszkópia
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy, fluoreszcencia életidő mikroszkópia
FRET	Förster resonance energy transfer, Förster rezonancia energia transzfer
IL-15(R)	Interleukin-15 (receptor)
IL-2(R)	Interleukin-2 (receptor)
IS	Immunological synapse, immunológiai szinapszis
JAK(1/3)	Janus kinase (1/3), Janus-kináz (1/3)
MHC II	Major histocompatibility complex II, fő hisztokompatibilitási komplex II
SEE	Staphylococcus Enterotoxin E
SPIM	Single plane illumination microscopy, egysík megvilágítású mikroszkópia
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5, jelátviteli és transzkripció aktivátor 5
TCR	T cell receptor, T-sejt receptor
ТР	Trans-presentation, transz-prezentáció

1. Bevezetés

Az interleukin-15 (IL-15) citokin döntő szerepet játszik a T-sejtek hosszú távú túlélésében és az immunológiai memóriában. Receptora három alegységből áll (IL-15Rα, IL-2/15Rβ, γ_{c).} Az IL-15 főként transz-prezentáción (TP) keresztül működik, amely során az IL-15Rα-hoz kötött IL-15-öt kifejező professzionális antigénprezentáló sejt (APC) a ligandot a βγ_c receptor heterodimernek mutatja be egy szomszédos T- vagy NK sejten. Az IL-15 TP az immunológiai memória szempontjából nélkülözhetetlen és számos autoimmun betegségben érintett jelátviteli folyamat. A Thomas A. Waldmann által vezetett munkacsoport 2002-ben fedezte fel az IL-15 TP-t, ami bár széles körben elfogadott, eddig nem létezett közvetlen bizonyíték a létezésére, ami kimutatná a receptorkomplex összeszerelődését. Mivel az antigénprezentáció (AP) szintén APC - T-sejt kölcsönhatáson alapszik, felvetődik a kérdés, hogy az AP-nek van-e bármilyen hatása az IL-15 TP-ra, vagy független folyamatokról van szó. A modell rendszerünk egy IL-15Rα-t kifejező Raji B-sejtvonalból, valamint egy IL-2/15Rβ és γ_c alegységeket kifejező Jurkat T sejtvonalból állt. A Staphylococcus Enterotoxin E szuperantigénnel (SEE) kezelt Raji sejtek stabil immunológiai szinapszist (IS) alkotnak a SEE-kötő MHC II molekulák és a T-sejt receptor (TCR) közötti kölcsönhatás révén a Jurkat sejtekkel. Raji - Jurkat sejtkonjugátumok akkor is kialakulhatnak, ha Raji sejteket IL-15-tel kezeltük. Az IL-2/15Rβ és az IL-15Rα alegységek közötti intercelluláris kölcsönhatás mérésére a szinapszis területén Förster rezonancia energiaátvitelt (FRET) használtunk. A szinapszis területén mindkét alegység feldúsulását és megnőtt FRET értékeket kaptunk, ha a Raji sejteket előkezeltük IL-15-tel, ami közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltat az IL-15 TP-ra. A FRET hatékonysága kis mértékben nőtt, ha a SEE-vel is előkezeltük a Raji sejteket, így lehetővé téve az AP kialakulását. A FRET méréseink azt is kimutatták, hogy a CD3 (a T-sejt ko-receptora) és az MHC II csak szuperantigén jelenlétében szerelődik össze. Megvizsgáltuk az AP és/vagy IL-15 TP alatti "cis" kölcsönhatásokat is az e folyamatokban résztvevő fehérjék között. Az IL-15Rα és az MHC II nagyfokú asszociációt mutatott a magányos Raji sejteken, ez az asszociáció az IS-ben is minden kezelés mellett (IL-15, SEE, mindkettő) fentmaradt, valamint kezeléstől függetlenül, mindkét receptor az IS-be transzlokálódott. Ezzel szemben a Jurkat sejteken az IL-2/15Rβ és a CD3 egymástól függetlenül, csak a saját ligandjuk prezentálása esetén dúsult fel, és nem mutatott asszociációt. Továbbá kimutattuk, hogy az IL-15 TP képes STAT5 foszforilációt indukálni a Jurkat sejtekben, így bizonyítva a modell és az IL-15 teljes értékű jelátviteli

képességét, az IL-15 TP mellett kialakuló AP nem befolyásolta a foszforilált STAT5 mennyiségét. Eredményeink közvetlenül bizonyítják az IL-15 TP létezését, és bár az AP növeli az IL-15 TP komplex asszociációját, nincs jelentős hatása az IL-15 jelátvitelben. Így kijelenthetjük, hogy az IL-15 TP önálló, antigén-független folyamatnak tekinthető.

2008-ban Pillet és munkatársai kimutatták, hogy az IL-2/15R β alegység képes homodimerizálódni és ilyen formában ligandot (IL-2) kötni. Mi ezek alapján a γ_c alegység intercelluláris homodimerizációját mutattuk ki egysík megvilágítású mikroszkópiát (SPIM) és fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiát (FCCS) kombinálva, ezzel elsőként alkalmazva ezt a módszert membránfehérjék asszociációjának és dinamikájának vizsgálatára.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Limfociták szerepe az immunrendszer működésében

A limfociták mind a természetes, mind az adaptív immunitásban kiemelkedő szerepet játszanak. Tagjai a természetes ölő (NK) sejtek, B- valamint T-sejtek, melyek a csontvelőben termelődnek. Az NK sejtek a természetes immunitás részeként felismerik a tumor, illetve vírussal fertőzött sejteket, amiket lízissel vagy apoptózis indukálásával semmisítenek meg. A B-sejtek a csontvelőben képződnek, hemopoetikus őssejtekből. Elsődleges szerepük az antitestek termelése és az antigén prezentáció az adaptív immunitás részeként. A T-sejtek a timuszban fejlődnek, elengedhetetlen komponensei az immunfolyamatok szabályozásának (1).

2.2. T-sejt populációk és szerepük az immunrendszerben

T-sejtek legegyszerűbb csoportosítása a T-sejt receptor (TCR) alapján lehetséges. A TCR két, diszulfid híddal kapcsolt peptidből álló heterodimer, ami lehet $\alpha\beta$ (emberi szervezetben a Tsejtek 90-95%-a) vagy $\gamma\delta$. Mindkét heterodimerhez szükséges a hat polipeptid láncból álló CD3 asszociációja a működőképes TCR komplex kialakulásához. Az $\alpha\beta$ T-sejtek tovább oszthatók három alpopulációra. A T_H sejtek CD4 ko-receptort expresszálnak és elsődleges funkciójuk az olyan immunfolyamatok beindítása, mint a citotoxikus T-sejt prekurzorok fejlődésének elősegítse vagy a B-sejtek segítése különböző osztályú antitestek termelésében, de az immunszuppresszív karakterű T_{reg} sejtek szintén expresszálják a CD4-et. Végül a már említett citotoxikus T-sejtek a CD8 marker alapján különböztethetőek meg a többi T-sejt populációtól (1).

2.3. Citokinek

A citokineknek számos csoportja és alcsoportja van, és általánosságban elmondható, hogy kis fehérjék, amelyek döntő szerepet játszanak az immunrendszer sejtjeinek és a vérsejtek érésének, differenciációjának és aktivitásának szabályozásában. Tagjai: interferonok, a virális fertőzések terjedésének gátlásában vesznek részt; kolónia stimuláló faktorok, a csontvelői sejtek proliferációját és differenciációját szabályozzák; kemokinek, leukociták megfelelő szövetbe való eljuttatását biztosítják; tumor nekrózis faktorok, citotoxikus és gyulladási folyamatok szabályozásában vesznek részt; transzformáló növekedési faktorok,

sejtosztódásért és szövetkárosodás utáni helyreállításért felelősek; valamint interleukinok, amik mind termelődés, mind funkció szempontjából heterogén csoportnak tekinthetők (1).

2.4. IL-2 és IL-15

A dolgozat szempontjából kiemelendő IL-2 és IL-15 a négy α-hélixből álló citokinek családjába tartozik. Az IL-2 citokint Robert Gallo munkacsoportja írta le először (2), ami az első emberben azonosított retrovírus (HTLV) azonosításához vezetett (3), az IL-15 citokint pedig szinte egyidejűleg fedezte fel Thomas A. Waldmann és Kenneth H. Grabstein kutatócsoportja (4, 5). Az IL-2 és IL-15 receptorok (IL-2R, IL-15R) heterotrimer szerkezetűek, melyek tartalmaznak egy citokin specifikus α alegységet, amelyek különböző affinitással kötik a saját ligandjukat. Az IL-15Rα (CD215) nagyobb affinitással (K_d:50 pM) köti az IL-15 citokint, mint az IL-2Rα (CD25) az IL-2 citokint (K_d:10 nM). Az IL-2/IL-15R β alegységet (CD122) valamint a γ_c (CD132) láncot (ami megtalálható az IL-4, IL-7, IL-9 és IL-21 receptorokban is) mindkét receptor használja (6, 7). Mind az IL-15, mind az IL-2 serkenti a T-sejtek proliferációját, indukálja a citotoxikus limfociták (CTL) termelődését és serkenti a természetes ölő (NK) sejtek expanzióját (8-10) Azonban az adaptív immunválaszban az IL-2 és IL-15 különböző szerepet is játszhat. Az IL-2vel ellentétben az IL-15 gátolja az aktiváció indukált sejthalált (AICD), nem aktiválja a T_{reg} sejteket, valamint nem okoz kapilláris szivárgás szindrómát, amit állatkísérletekben és klinikai vizsgálatokban is kimutattak. Az IL-15 elősegíti a CD44^{hi}CD8⁺ effektor/memória T-sejtek fenntartását és a vírusspecifikus CD8⁺ memória T-sejtek túlélését (9, 11, 12). Továbbá az IL-15 kritikus a szöveti memória fenotípus CD103⁺CD28⁺CD8⁺ T-sejtek fejlődéséhez (13).

2.5. IL-15 expresszió szabályozása

Az IL-2-vel ellentétben, amit aktivált T-sejtek termelnek és mRNS szinten van szabályozva az expressziója, az IL-15-öt a dendritikus sejteken, makrofágokon és monocitákon kívül számos más sejttípus is képes előállítani. Northern blot analízissel kimutatták mRNS-ét placentából, vázizomból, veséből, tüdőből, szívből és a bélrendszer epiteliális sejteiből, fibroblasztokból, keratinocitákból. Az IL-15 expressziója a transzkripció, a transzláció és az intracelluláris szállítás szintjén is szabályozva van. Transzkripciós szabályozásáért elsősorban az interferon szabályozó faktor 3 (IRF3) felelős, ami aktivációt (foszforiláció) követően bejut a sejtmagba, és az IL-15 gén promoter régiójában található interferon szabályozó faktor elem (IRF-E) motívumot felismerve kötődik és indukálja a transzkripciót. Emellett kiemelendőek a nukleáris faktor-ĸB (NF-ĸB) transzkripciós faktorok, amelyek az IL-15 géntől szintén upstream

kötődnek be, és a transzkripciós folyamatok elindításához szükséges az aktivációjuk. Azonban az IL-15 elsősorban transzláció és transzlokációs szinten van szabályozva. Az IL-15 mRNS több olyan elemet is tartalmaz, amely gátolja a hatékony transzlációt, ilyen az mRNS 5'-végi AUG szekvenciája, ami 12 upstream AUG-ot tartalmaz. További gátló tényezők a 48 aminosavas szignálpeptid és a "cis" módon ható negatív szabályozó rész a protein C-terminálisán. Az IL-15 expressziót szabályozó komplex gátló mechanizmusok, az IL-15 regulációján keresztül indirekten a tumor nekrózis faktor- α (TNF- α), IL-1, interferon- γ (IFN- γ) és további gyulladási citokinek expresszió szabályozásában, az intracelluláris szállítását is befolyásolja. Két IL-15 izoforma létezik, egy rövid, 21 aminosavból és egy hosszabb, 48 aminosavból álló szignálpeptiddel ellátott IL-15. A rövidebb szignálpeptiddel rendelkező IL-15 nem szekretálódik, ehelyett intracellulárisan raktározódik a sejtmagban és citoplazmatikus komponensekben (14).

2.6. IL-15 immunoterápia

Az immunterápiák célja a szervezet immunrendszerének irányítása olyan módon, hogy az a rákos sejteket felismerje és eltávolítsa. Annak ellenére, hogy az IL-15 hatékonyan indukálja az NK és CD8 T-sejtek proliferációját, monoterápiás alkalmazása sikertelennek bizonyult tumor kezelésben, valószínűleg az immun toleranciát indukáló folyamatai, valamint rövid életideje miatt. Az IL-15 monoterápia sikertelenségét elsősorban elsősorban az NK sejtek gátlása magyarázhatja, az őlő sejt immunoglobulin-szerű receptor (KIR), NKG2A és az MHC I interakción keresztül. Ezzel párhuzamosan az IL-15 által stimulált CD8 T-sejtek is gátlódnak a CD4 T_H sejtekben található citokin jelátvitel szupresszor 3 (SOCS3) által. Azonban az IL-15-öt más rákellenes szerekkel együtt alkalmazva megkerülhetőek ezek a gátló folyamatok. Különösen hatékonynak bizonyult az IL-15 kombinálása anti-CD40-nel, ami tumor specifikus CD8 T-sejtek termelését segítette elő, valamint az IL-15 kombinálása különböző checkpoint gátló szerekkel. Ilyen formában az IL-15 jelentős szerepet kaphat a rosszindulatú metasztázisos tumorok kezelésében (15). Alternatív alkalmazási módja, ha az IL-15-öt az IL-15Rα alegységgel komplexben használják. Ilyen formában már több preparátumot is teszteltek állat- és klinikai kísérletekben. Az IL-15/IL-15Rα komplex alkalmazása több szempontból is hatékonyabbnak bizonyult, mint más IL-15-öt alkalmazó készítmények. Hosszabb a féléletideje (az IL-15R α stabilizáló hatása miatt), mivel megegyezik az endogén

formával, ezért nem termelődik ellene antitest, valamint jobb farmakokinetikai és tumorellenes tulajdonságok jellemzik (16).

2.7. IL-15 transz-prezentáció

Dubois és munkatársai demonstrálták, hogy az IL-2 citokinnel ellentétben az IL-15 hosszabb ideig biztosítja a T-sejtek túlélését, miután egy kezdeti citokin kezeléses fázis után, IL-2 és IL-15 mentes médiumban tenyésztették tovább a sejteket. Azt is kimutatták, hogy a sejt felszínén található IL-15 függ az IL-15Rα expressziójától. Továbbá az endoszomális újrahasznosítás az IL-15Rα/IL-15 komplex jelenlétét igényli. Ez a fajta IL-15 újrahasznosítás a β alegység expressziótól nem, azonban IL-15Rα jelenlététől alapvető módon függ. Legjelentősebb megfigyelésük az volt, hogy az IL-15Ra/IL-15 komplex stimulálta a szomszédos sejtek proliferációját, ezt a folyamatot IL-15 transz-prezentációnak (TP) nevezték (17). Az aktivált monociták felszínén található IL-15Rα/IL-15 komplex a βγc heterodimert expresszáló szomszédos sejtek transz-proliferációját idézte elő. Ezt az egyedi ligand szállítási módot az IL-15Rα magas ligandkötő affinitása teszi lehetővé, amelynek köszönhetően egy stabil IL-15Rα/IL-15 komplex már intracellulárisan összeszerelődik és így kerül a sejtfelszínre. A csak IL-2/15R β és γ_c alegységeket kifejező T-sejtek alacsonyabb affinitással (K_d: 1 nM) kötik az IL-15-öt, és mivel az IL-15 nincs jelen ilyen magas koncentrációban oldott formában *in vivo*, ezek a sejtek alternatív, irányított ligand célbajuttatási módszert igényelnek. Ezért az IL-15-öt elsősorban az IL-15Rα prezentálja ezeknek a sejteknek (17-20). A prezentáció egyik mechanizmusa az, amikor az IL15R-a/IL-15 komplex extracelluláris része proteolitikusan lehasítódik, ami oldható IL-15Rα/IL-15 (sIL-15Rα/IL-15) komplexet eredményez, ezzel indukálva az IL-15 jelátvitelt a reagáló sejteken, mely internalizálja a komplexet (1. ábra) (21-23). Egy másik leírt IL-15 transz-prezentációs módszer a transz-endocitózis, mely során immunszinapszis alakul ki a prezentáló és a reagáló sejtek között, ahol a prezentáló sejt felszínén lévő IL-15Rα prezentálja az IL-15 citokint a reagáló sejten lévő IL-2/15Rβγc heterodimernek. Ezután az egész IL-15Rαβγ_c/IL-15 TP komplex – a prezentáló sejt membránjának egy részével együtt – internalizálódik a reagáló sejtbe (24).



1. ábra: Az IL-15 transz-prezentáció lehetséges és már leírt mechanizmusai. "Klasszikus" IL-15 transz-prezentáció során az IL-15Rα prezentálja az IL-15-öt a célsejten lévő IL-2/15Rβγ_c heterodimernek, "cis" prezentáció során a teljes transz-prezentációs komplex egy sejten található, egy már korábban lehasított IL15Rα/IL-15 komplex prezentálja az IL-15-öt, IL-

 $2/15R\beta\gamma_c$ alegységeknek, valamint a transz-endocitózis folyamata (24, 25)

2.8. IL-2 és IL-15 jelátvitel

Mivel mind az IL-2R, mind az IL-15R ugyanazt a jelátvitelért felelős β és γ_c alegységet tartalmazza, ezért jelátvitelük ugyanazt a három fő útvonalat használja: JAK/STAT, Ras/Raf/mitogén-aktivált protein kináz (Ras/Raf/MAPK) és foszfatidilinozitol 3kináz/Akt/emlős rapamicin-célpont (PI-3K/Akt/mTOR) (2. ábra). A JAK/STAT útvonal aktivációja vezethet proliferációhoz, differenciációhoz, migrációhoz vagy apoptózishoz. Jelátvitele egy viszonylag egyszerű mechanizmust használ. Az alegységek konstitutívan kötik a JAK1/3 (β alegység) és JAK3 (γ_c alegység) tirozin kinázokat. Ligandkötés hatására kettő (vagy több) JAK kináz egymás közelébe kerül, transz-foszforilálják egymást, valamint receptorukat, amihez így kötődhetnek a STAT1, STAT3 vagy STAT5 molekulák, amiket a JAK1/3 kináz szintén foszforilál. A foszforilált STAT 3, illetve STAT5 molekulák dimerizálódnak vagy tetramerizálódnak és az importin α5- és Ran-függő transzporttal a sejtmagba jutnak, ahol specifikus szabályozó régókhoz kötődnek, amivel aktiválhatják vagy gátolhatják célgénjeiket (26, 27). A Ras/Raf/MAPK útvonal a sejtbiológiában az egyik legjobban karakterizált jelátvitel, mivel számos fontos folyamatban vesz részt (pl. sejtciklus szabályozás, integrin jelátvitel, sejt migráció, angiogenezis). A ligandkötés indukálja az inzulin receptor szubsztrát (IRS) tirozin foszforilációját (JAK által), ez lehetővé teszi, hogy a növekedési faktor receptor-kötött fehérje 2 (GRB2) adaptor fehérje felismerje az SHC-t, ami pedig köti a guanin nuleotid cserélő faktort, a SOS-t a sejtmembránhoz. A SOS a Ras-on a GDP-t GTP-re cseréli, aminek következtében konformációs változás következik be, az aktivált Ras a Raf-ot szintén kötni tudja a sejtmembránhoz. Raf aktiváció a jelátviteli kaszkádot a MAPK foszforilációjával stimulálja, ami további downstream fehérjéket foszforilálhat, mint az extracelluláris jel-szabályozott kinázt (ERK), ami a sejtmagba jutva transzkripciós faktorokat aktivál (28). A PI-3K/Akt/mTOR útvonal a már leírt két jelátviteli folyamathoz hasonló funkciókkal rendelkezik (proliferáció, angiogenezis, apoptózis). A szintén JAK által aktivált PI-3-K végzi a foszfatidilinozitol difoszfát (PIP₂) \rightarrow foszfatidilinozitol trifoszfát (PIP₃) átalakítást. A PIP₃ mint másodlagos hírvivő a sejtmembránhoz köti a foszfatidilinozitol-függő kináz-1-et (PDK-1) és ennek a jelátviteli útnak a legjelentősebb fehérjéjét, az AKT-ot. Az AKT számos célfehérjével rendelkezik, amiken keresztül különböző sejtfunkciót képes indukálni (29).



 2. ábra: IL-2 és IL-15 által kiváltott jelátviteli utak. Balról jobbra: PI-3K/Akt/mTOR, JAK/STAT és Ras/Raf/MAPK jelátviteli kaszkádok (30)

2.9. Antigén prezentáció

Az antigén prezentáció (AP) egy jól tanulmányozott immunológiai folyamat, amely elengedhetetlen a T-sejt aktiválásához. A professzionális antigén prezentáló sejtek (APC-k) mint a B-sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek kötik össze a természetes és adaptív immunitást, melyek képesek internalizálni az exogén eredetű antigéneket, amelyeket feldolgoznak, majd fő hisztokompatibilitási komplex II (MHC II) molekulákhoz kötve a sejt felszínére juttatnak, ahol bemutatják azokat a T-sejt receptor-CD3 (TCR/CD3) komplexnek. Ezzel szemben MHC I esetében, a sejt, saját citoszólikus fehérjéinek proteoszómákban degradált peptidjeit prezentálja. (3. ábra). A TCR-MHC II kölcsönhatás során a CD4, a TCR koreceptora is kötődik az MHC II receptorhoz, ezzel tovább erősítve az intercelluláris fehérje komplexet. CD4⁺ T-sejtek esetében a másodlagos jeleket további fehérje-fehérje interakciók biztosítják: a CD28 a T-sejten lévő receptor, amely a prezentáló sejten lévő CD80-hoz vagy CD86-hoz kötődik nélkülözhetetlen a naív T-sejtek aktiváláshoz. További fehérjék, mint az ICOS, 4-1BB és OX40 expressziója a T-sejteken és ezek ligandjai az antigénprezentáló sejteken szabályozhatják a T sejt aktiváció folyamatait. Ezek a ko-stimulusok csak akkor állnak rendelkezésre, ha a bemutató sejt kórokozóval találkozik és azt megfelelően prezentálja (31, 32). További fehérje-fehérje kölcsönhatások, mint a CD40 és CD40L, valamint a limfocita funkció-társult antigén 1/intracelulláris adháziós molekula 1 (LFA-1/ICAM-1) tovább stabilizálják az immunológiai szinapszist (IS) (33). Az IS szerkezete három részre osztható, koncentrikus gyűrűkre, amelyek különböző szegregált fehérjeklaszterekből állnak. A szupramolekuláris aktivációs klaszter (SMAC) három területe: központi SMAC (central SMAC, c-SMAC), perifériás SMAC (periferial SMAC, p-SMAC) és távoli-SMAC (distal SMAC, d-SMAC). Korábbi tanulmányok betekintést engedtek ennek a három területnek a fehérje összetételére. A CD4/CD8-ról kimutatták, hogy a c-SMAC-ben dúsul fel (34). A LFA-1 és a talin citoszkeletális fehérje a p-SMAC-ben koncentrálódik, míg a CD43 és a CD45 a d-SMAC-ben lokalizálódik (34-37). Intézetünk és más kutatócsoportok azt is kimutatták, hogy különböző ioncsatornák, túlnyomórészt a feszültségfüggő Kv1.3 káliumcsatornák is feldúsulnak az IS-ben a

posztszinaptikus sűrűségű fehérje-95 (PSD-95) adapter fehérje segítségével a T-sejt aktiváció korai szakaszában (38-40).



3. ábra: T-sejt aktiváció korai szakasza. Az APC MHC-n keresztül prezentálja az antigént a CD3-CD4/CD8 komplexnek, valamint a ko-stimulust biztosító fehérjék asszociációja is megtörténik (41)

2.10. Förster rezonancia energiatranszfer

A Förster rezonancia energiatranszfer (FRET) lehetőséget ad két fluorofór közötti távolság mérésére, így amennyiben az adott fluorofórokat vizsgálni kívánt komponensekhez csatoljuk, alkalmas az adott komponensek asszociációjának vizsgálatára (4. ábra).

A FRET egy fizikai folyamat, amely során sugárzásmentesen (fotonkibocsájtás nélkül) adódik át energia dipól-dipól kölcsönhatás révén egy gerjesztett donor fluorofór molekuláról egy akceptor molekulára. Ennek egyik legfontosabb feltétele a donor és az akceptor távolsága: az energiatranszfer létrejöttéhez ~2-10 nm-es tartományon belül kell lennie. További feltétel a donor fluoreszcencia emissziós és akceptor abszorpciós spektrumának átfedése, illetve a festékek megfelelő relatív orientációja. Az energiatranszfer során a gerjesztett donor, amennyiben a korábban említett kritériumok teljesülnek, átadja energiáját az akceptornak és visszakerül alap állapotba, majd az akceptor fluoreszcens foton kibocsájtásával (vagy egyéb módon) relaxálódik. Az energiatranszfer hatékonysága:

$$E = \frac{donorról \ akceptorra \ átadott \ energiakvantumok \ száma}{donor \ által \ abszobe ált \ fotonok \ száma}$$
(1)

Mivel az energiatranszfer hatékonysága a donor-akceptor távolság (*R*) hatodik hatványával csökken, ez lehetővé teszi molekuláris távolságok vizsgálatát az alábbi képlet szerint:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6'}$$
(2)

ahol R_0 az a távolság, ahol E=0,5.



4 ábra: Fehérje-fehérje interakció vizsgálata FRET módszerrel, sugárzásmentesen adódik át energia egy gerjesztett donor fluorofór molekuláról egy akceptor molekulára

Az energiatranszfer távolságfüggése miatt ez a módszer kiválóan alkalmas például fehérjefehérje asszociációk vizsgálatára. Áramlási citometriás valamint mikroszkópos alkalmazása esetén is kifejlesztettek több módszert a FRET meghatározására (pl. akceptor fotoelhalványítás, ratiometrikus, donor fluoreszcencia élettartam) (42).

2.11. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiás (FCS) mérés során egy kis megfigyelési térfogatban (~1 fl, azaz ~1 μm³) gerjesztjük a fluorofórokat és detektáljuk a fluoreszcencia fluktuációt, ami jellemzően a fluoreszcens molekulák diffúziójából adódik a megfigyelt

térfogatban. Mivel az ingadozások kinetikája és relatív amplitúdója függ a detektált molekula mobilitásától és koncentrációjától, ezért az FCS alkalmas ezen paraméterek vizsgálatára. A fluktuációk analíziséhez meg kell határozni az autokorrelációs függvényt (ACF, G(τ)), ami megadja, hogy egy adott időpontban a fluoreszcencia intenzitás milyen mértékben korrelál egy későbbi időpontban rögzített intenzitási értékkel (5. ábra):

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2},$$
(3)

ahol *(I)* az időben átlagolt intenzitás és $\delta I(t)$ az intenzitás eltérése az átlagtól. Az autokorrelációs görbe jellemző lecsengési ideje, a τ_D (diffúziós idő, ami a molekula által a térfogatelemben töltött átlagos időtartam) függ a megfigyelt térfogattól és diffúziós koefficienstől (*D*):

$$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D},\tag{4}$$

ahol ω_{xy} a detektálási térfogat laterális rádiusza. Az autokorrelációs függvény amplitúdója fordítottan arányos a detektálási térfogatban lévő részecskék átlagos számával (*N*), ezért a *G*(τ) függvény amplitúdójából 1/N kalkulálható. FCS-sel olyan információk nyerhetőek a mintáról, mint a molekulák mobilitása, koncentrációja, illetve aggregációja és interakciói. Egy különösen jelentős kiterjesztése az FCS-nek a fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS), amivel lehetőség nyílik két spektrálisan (vagy helyileg) különböző fluoreszcencia fluktuációt mérni és további információt kapni a keresztkorrelációs

$$G_{gr}(\tau) = \frac{\langle \delta I_g(t) \cdot \delta I_r(t+\tau) \rangle}{\langle I_g(t) \rangle \cdot \langle I_r(t) \rangle},$$
(5)

ahol $I_g(t)$ és $I_r(t)$ a két csatornában (g és r) mért intenzitások, $\delta I_g(t)$ és $\delta I_r(t)$ pedig a fluktuációjuk. A különböző fluorofórokkal jelölt molekulák CCF-jének amplitúdója arányos a ko-diffundáló hányaddal, aminek maximuma teljes ko-diffúzió és a két detektálási térfogat tökéletes átfedése esetén az ACF amplitúdójával lesz egyenlő.



5. ábra: Az FCCS alapjai, egy dimereket és egy monomereket tartalmazó mintákkal, a detektálási térfogatban mért fluoreszcencia fluktuációból meghatározott auto- és keresztkorrelációs függvény (43)

Relatív dimer hányad számszerűsíthető a két ACF ($G_{gg}(\tau)$ és $G_{rr}(\tau)$) és a CCF ($G_{gr}(\tau)$) segítségével (43).

$$q = \frac{G_{gr}(\tau_{min})}{\min\left(G_{gg}(\tau_{min}), G_{rr}(\tau_{min})\right)} \tag{6}$$

3. Célkitűzés

Mivel mind az IL-15 TP, mind az AP hozzájárul a T-sejt aktiváláshoz, és hasonló sejt-sejt interakción alapul, felmerül a kérdés, hogy ez a két folyamat befolyásolja-e egymás működését vagy független egymástól. Vannak olyan összetevők immunológiai szinapszisokban, nevezetesen a KIR család inhibitor receptorai, amelyeket NK sejtek fejeznek ki, ezek negatívan szabályozzák az IL-15 TP hatását a B- és NK sejtek között (44). Az AP-nak az IL-15 TP-ra gyakorolt lehetséges hatásait azonban még nem vizsgálták. A dolgozatban ismertetett kísérletek az IL-15 TP és az AP kapcsolatát vizsgálják biofizikai módszerekkel. Korábban FRET-tel és más biofizikai módszerekkel már vizsgáltuk az IL-2R és IL-15R asszociációkat és összeszerelődésüket (45-48). Az itt használt B-sejt - T-sejt modell rendszer az AP-hoz és IL-15 TP-hoz szükséges fehérjéket expresszálja, melyeknek mind "transz" (intercelluláris), mind "cisz" (ugyanazon a sejten előforduló) kölcsönhatásait vizsgáltuk. Célul tűztük ki, hogy elsőként közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltassunk az IL-15R alegységek összeszerelődésére, amelyeket a két sejt az IL-15 TP során expresszál, valamint, hogy megállapítsuk az AP-ban és IL-15 TP-ban részt vevő receptorok közös komplexben vagy egymástól függetlenül transzlokálódnak-e az immunszinapszisba. Arra is kerestük a választ, hogy az IL-15 jelátviteli hatékonyságát befolyásolja-e az AP és viszont.

A dolgozat második felében a γ_c alegységek homodimerizációját vizsgáltuk. 2008-ban Pillet és munkatársai leírták, hogy az IL-2/15R β alegység a ligand, illetve γ_c vagy IL-2R α és IL-15R α hiányában is homodimerként van jelen COS-7 sejtek membránjában (49). Ezek alapján adja magát a kérdés, hogy vajon a γ_c alegység hasonlóan viselkedik-e. Munkacsoportunk FRET kísérletekkel sikeresen kimutatta, a γ_c alegységek intracelluláris összeszerelődését HeLa sejtekben (47). Az asszociáció megléte mellett kíváncsiak voltunk a homodimerek intracelluláris dinamikájára, arányára a monomerekhez képest, valamint ezek a lokalizációjára. Ezen kérdések megválaszolásához egysík megvilágítású mikroszkópia alapú fluoreszcencia keresztkorrelációs (SPIM-FCCS) méréseket végeztünk a γ_c alegységen.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejttenyésztés

Az IL-15 transzprezentáció vizsgálatához használt Raji B-sejteket és a Jurkat T-sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), amit kiegészítettünk 10% (v/v) FBS-sel és GlutaMAX-szal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A γ_c alegységek homodimerizációjának vizsgálata HeLa sejtvonalon történt, melyet szintén a korábban leírt médiumban tenyésztettünk. A retrovirális transzdukcióhoz használt HEK293T sejtek DMEM médiumban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a korábban említett kiegészítésekkel együtt voltak fenntartva. Minden sejtet 5% CO₂ párásított légkörben tenyésztettünk 37 °C-on. Azokat a Raji és Jurkat sejteket, amelyek stabilan expresszálták a IL-15 receptor alegységeit, mint: EGFP-IL-15R α , mCherry-IL-15R α , IL-15R α és IL-2/15R β (a továbbiakban: Raji-EGFP-IL-15R α , RajimCherry-IL-15R α , Raji-IL-15R α és Jurkat-IL-2/15R β) Geneticinnel (Merck, Darmstadt, Németország) szelektáltuk.

4.2. Plazmidok

Az IL-15Rα és IL-2Rα cDNS-ét a pEGFP-N1, pmCherry-N1 és pmCherry-C3 expressziós vektorok MCS-ébe (multiple cloning site) klónoztuk. A marha preprolaktin szignálszekvencia C-terminálison jelölt alegységek esetén közvetlenül az alegység génje elé, N-terminálison jelölt alegységek esetén pedig a fluoreszcens fehérje génje elé került (47). A pBMN-Z-IN retrovirális transzfervektorok ORF-jébe (open reading frame) az adott jelölt vagy jelöletlen alegység (EGFP-IL-15Rα, mCherry-IL-15Rα, IL-15Rα, IL-2/15Rβ) génjét BamHI és SalI restrikciós hasító enzimekkel vittük be a LacZ helyére.

4.2.1. PCR (polimeráz láncreakció)

Az EGFP-IL-15R α , mCherry-IL-15R α , IL-15R α , IL-2/15R β géneket pBMN-Z-IN vektorba klónoztuk, amihez a már rendelkezésre álló plazmidokból amplifikáltuk a templátokat PCRral. A szükséges primereket az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) honlapján található Oligo Analyzer (<u>https://eu.idtdna.com/calc/analyzer</u>) segítségével terveztük és ellenőriztük, majd szereztük be. Legalább öt, párhuzamos mintát készítettünk minden klónozandó génhez, ezek mintánként tartalmaztak: 1,5 ng templát DNS-t, 0,5 mM dNTP-t, 1 µM primer-mixet (forward és reverse primerek 1:1 arányú keverékét nukleázmentes vízben),

1×HF puffert és 0,1 μl Phusion DNS polimerázt (Thermo Fisher Scientific) nukleázmentes vízzel 19 μl-re kiegészítve. A PCR készüléket az alábbi beállításokkal futtattuk:

- 98 °C 1 perc
- 30 ciklusban: 98 °C 10 mp (denaturáció) \rightarrow T_m 20 mp (kapcsolódás) \rightarrow 72 °C 15-30 mp (elongáció)
- 72 °C 4 perc

4.2.2. Gél elektroforézis

A PCR reakció után a DNS fragmenteket (templát DNS, forward és reverz primer, PCR termék), valamint a restrikciós emésztés után a hasított vektorok ragadós végű szekvenciáit tartalmazó mintákat 1%-os agaróz gélben elektroforézissel választottuk el egymástól. Agaróz gél készítéséhez 0,8 g agarózt oldottunk be 80 ml 1×TAE pufferbe, majd még szilárdulás előtt 40 µg etídium-bromidot adtunk hozzá. A mintákhoz 6 µl Loading Dye-t (Thermo Fisher Scientific) adtunk, valamint referenciaként felvittünk 1 kb-os DNS létrát (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Az elektroforézist 400 mA-rel, 80 V-on, 45 percig futtattuk.

4.2.3. DNS extrakció agaróz gélből

A gél elektroforézis futtatása után kivágtuk a gélből a PCR terméket tartalmazó részt és NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kittel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) tisztítottuk a gyártó protokollja szerint. A kinyert DNS fragmentet nukleázmentes vízben tartottuk -20 °C-on, restrikciós hasításig.

4.2.4. Restrikciós emésztés

A restrikciós emésztéseket Thermo Fisher Scientific restrikciós endonukleázokkal végeztük 20 μl végtérfogatban, a gyártó ajánlásai alapján 2 órán át, 37 °C-on.

4.2.5. DNS tisztítás restrikciós emésztés után

A DNS extrakció agaróz gél szekcióban használt kit-et használva történt.

4.2.6. Ligálás

Az inzert és vektor ligálásához a DNS koncentrációkat és tisztaságukat NanoDropTM1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. A 20 μl reakció-térfogatba, 50 ng vektorhoz szükséges inzert mennyiséget a következő képlet segítségével számoltuk ki:

$$inzert[ng] = N \frac{inzerthossz[bp]}{vektorhossz[bp]} vektor[ng],$$
(1)

ahol 1≤N≤5 volt. A ligálás két egység T4 DNS ligázzal (Thermo Fisher Scientific), az enzim saját pufferében 16-20 órán át 16°C-on történt. A klónozással elkészített szekvenciákat restrikciós hasítással és szekvenálással ellenőriztük. A szekvenálást az UD-GenoMed (Medical Genomic Technologies) Kft. végezte el.

4.2.7. Escherichia coli transzformálás

Az újonnan létrehozott plazmidokat ultrakompetens Escherichia coli (DH5 α) baktériumba transzformáltuk. A -70°C-on tárolt DH5 α ultrakompetens E. coli törzset jégen felolvasztottuk, majd 200 µl szuszpenzióhoz adtuk a ligált és tisztított plazmidot. A szuszpenziót 30 percig jégen inkubáltuk, majd 1,5 percig 42 °C-os hősokknak tettük ki. Ismét jégen inkubáltuk 5 percig, miután 1 ml SOC oldatban vettük fel és rázattuk (330 RPM) 1 órán át, 37 °C-on. 1100 RPM-en 3 percig centrifugáltuk, majd a felúszót eltávolítottuk, úgy, hogy 20-30 µl maradjon a cső alján. Szuszpendálás után a baktériumokat antibiotikumos, 1,5% agar plate-en szélesztettük szobahőmérsékleten. Az agar plate-et 16-20 órára fejjel lefelé 37°C-os, száraz termosztátba helyeztük. Az inkubálási idő elteltével 1-1 különálló telepet steril pipettaheggyel átoltottunk 5-5 ml folyékony LB (Lysogeny broth) tápoldatba, mely tartalmazta a plazmid rezisztenciájának megfelelő antibiotikumot (25 µg/ml kanamycint vagy 100 µg/ml ampicillint). 16-20 órás, 37°C-on való rázatás (300 RPM) után a baktérium kultúrát 4°C-on tároltuk a további felhasználásig.

4.2.8. Plazmid tisztítás

A baktérium által felszaporított DNS preparálását GenEluteTMPlasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich) segítségével, a gyártó protokollja alapján végeztük. A plazmid koncentrációjának és tisztaságának ellenőrzése NanoDropTM1000 (Thermo Fisher Scientific) spektrofotométer használatával történt.

4.3. Tranziens transzfekció

Az mCherry-IL-2Rα-t és IL-2Rα-mCherry-t kódoló plazmidokat tranziens transzfekcióval (elektroporáció) juttattuk a Raji sejtekbe. Ehhez 1 μg plazmidot adtunk Cell Line Nucleofector Kit V reagensben felvett, 10⁶ Raji sejthez. A transzfekciót Amaxa Nucleofector II eszközzel

végeztük (Lonza Group, Bázel, Svájc) a gyártó által ajánlott (Raji sejtekre optimalizált) protokoll segítségével (M-013 program).

HeLa sejtek esetében 24 órával a transzfekció előtt kitapasztottunk 1,2×10⁵ sejtet kis petriben lévő fedőlemezre, 2 ml RPMI 1640 médiumban. Petrinként 75 ng DNS-sel és 3 μl FuGene HD (Promega, Madison, WI) transzfekciós reagenssel történt a transzfekció.

4.4. Retrovirális transzdukció

A csomagoló sejtekként használt HEK293T sejteket, a szükséges plazmidokat, a retrovirális transzfer vektort (17 μg) (lásd a Plazmid konstrukció részt), a VSVG burok plazmidot (12 μg) és a psPAX2 csomagoló plazmidot (4 μg) összekevertük 875 μl vízzel, 125 μl CaCl₂-vel és 1 ml HEPES pufferolt sóoldattal (150 mM NaCl és 20 mM HEPES 900 ml vízben), valamint 25 μM klorokinnal. A felülúszót 6 óra elteltével friss DMEM-re cseréltük. A retrovírust tartalmazó felülúszót 48 órával a transzfekció után összegyűjtöttük, és 0,45 μm-es szűrőn átszűrtük. A leszűrt felülúszót Raji vagy Jurkat sejtekhez adtuk további 10 μg/ml polibrénnel (Sigma-Aldrich) és 48 órán át inkubáltuk, majd a sejteket immunfluoreszcensen jelöltük a transzdukció hatékonyságának ellenőrzése céljából.

4.5. Immunológiai szinapszis képzés

 10^{5} (mikroszkópos méréshez) vagy 6×10⁵ (áramlási citometriai méréshez) Raji sejthez IL-15-öt (100 nM) és/vagy SEE szuperantigént (1 µg 50 µl RPMI 1640 médiumban) (Toxin Technology Inc., Sarasota, FL) adtunk, és 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Az RPMI 1640 médiumban történő mosás után a Raji sejteket összekevertük Jurkat sejtekkel (10⁵ vagy 6×10⁵), 1 perces 200×g-n történő centrifugálás után 37 °C-on 20 percig inkubáltuk, majd a sejteket jégre helyeztük az immunfluoreszcens jelöléshez.

4.6. Immunfluoreszcens jelölés

A Raji és Jurkat sejteket Alexa Fluor 488-cal vagy Alexa Fluor 546-tal (Thermo Fisher Scientific) konjugált egér monoklonális antitesttel jelöltük a receptorok és receptoralegységek kimutatásához. A jelöléshez a következő antitesteket használtuk: anti-Tac az IL-2Rα esetében, Mikβ3 az IL-2/15Rβ esetében, OKT3 a CD3 esetében és L243 az MHC II (HLA DR) esetében. A sejteket a jelölés előtt egyszer PBS-ben mostuk, majd 30 percen át jégen inkubáltuk 50 µg/ml fluoreszcens mAb-val (monoclonal antibody). A jelölés után a sejteket kétszer megmostuk és

2%-os formaldehiddel fixáltuk, majd 8-lyukú mikroszkópos mintatartó kamrába helyeztük (ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország).

4.7. Intenzitás alapú FRET mérés konfokális mikroszkópiával

A receptor alegységek asszociációját (közelségét a 2-10 nm-es tartományban) FRET mikroszkópiával pixelenként határoztuk meg LSM 880 (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) konfokális mikroszkóppal, C Plan-Apochromat $63 \times / NA 1.4$ olajimmerziós objektívvel. Az Alexa Fluor 488 gerjesztése Ar-ion lézerrel 488 nm-en történt, az mCherry esetében pedig 543-nm-en HeNe lézerrel. 3 csatornában rögzítettük a jeleket: I₁ – donor (gerjesztés: 488 nm, emisszió: 500-560 nm), I₂ – transzfer (gerjesztés: 488 nm, emisszió: 590-700 nm) és I₃ – akceptor (gerjesztés: 543 nm, emisszió: 590-700 nm), melyek a következőképpen fejezhetők ki:

$$I_{1}(488,500 - 560) = I_{D}(1 - E) + B_{1}$$

$$I_{2}(488,590 - 700) = I_{D}(1 - E)S_{1} + I_{A}S_{2} + I_{D}E\alpha + B_{2}$$

$$I_{3}(543,590 - 700) = I_{A} + B_{3},$$
(2)

ahol *E* az átlagos FRET-hatékonyság, *I*_D az 1-es csatorna donor intenzitása, amely a FRET hiányában jelen lenne, az *I*_A pedig a 3-as csatorna akceptor intenzitása. A spektrális átvilágítási faktorokat: $S_1 = (I_2-B_2)/(I_1-B_1)$ és $S_2 = (I_2-B_2)/(I_3-B_3)$, csak Alexa Fluor 488-Mikβ3 (donor) antitesttel jelölt (*S*₁), illetve csak mCherry-IL-15R α -t (akceptor) expresszáló sejtekből (*S*₂) számítottuk. A háttérkorrekció az átlagos autofluoreszcencia intenzitások (*B*₁, *B*₂, *B*₃) kivonásával történt, jelöletlen Raji sejtmembránban mérve. Az α faktor az *I*₂ csatornában mért tiszta akceptor jel és az *I*₁ csatornában FRET hiányában mért donor jel hányadosa azonos mennyiségű gerjesztett akceptor és donor fluorofór esetén (50, 51). Az α faktor meghatározásához a Raji sejteket tranziensen transzfektáltuk IL-2R α -mCherry-t kódoló plazmiddal, és a kifejeződött receptor alegységeket Alexa Fluor 488-antiTac antitesttel jelöltük, így minden receptor alegység egy akceptort és egy donor antitestet hordozott. Mivel az mCherry az intracellulárisan elhelyezkedő C-terminálison van, az antitest pedig az extracelluláris doménhez kötődik, a várható *E* = 0. A α faktort, illetve az akceptor/donor arány meghatározásához szükséges *Q* faktort az alábbi képletekkel számítottuk ki:

$$\alpha = \frac{S_2 \left((I_1 - B_1) S_1 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{A488(488)}}{\varepsilon_{mCh(488)}} \right) (I_3 - B_3) S_2 - (I_2 - B_2) \right)}{(I_1 - B_1) S_2} \times L_D,$$
(3)

$$Q = \frac{I_3 - B_3}{(I_1 - B_1)/L_D},\tag{4}$$

ahol $\varepsilon_{A488}(488)^{55831}$ M⁻¹cm⁻¹, $\varepsilon_{mCh}(488)^{5564}$ M⁻¹cm⁻¹ az Alexa Fluor 488 és mCherry moláris abszorpciós koefficiensei a donor gerjesztési hullámhosszán (488 nm) és L_D az Alexa Fluor 488-anti-Tac antitest fluorofór/fehérje jelölési aránya, amit abszorpciós fotometriával határoztunk meg. A FRET hatékonyságát pixelenként számítottuk ki az alábbi képlettel:

$$E = 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha} \left(\frac{(I_2 - B_2) - S_2(I_3 - B_3)}{(I_1 - B_1)} - S_1 \right)}$$
(5)

A számításokat olyan régiókban végeztük (ROI, region of interest), melynek pixeleiben az intenzitás értékek egy küszöbérték felett voltak az 1. és 3. csatornában is (a dinamikus küszöbértéket az egyes képek maximális pixelintenzitásának 10%-ára állítottuk be, 5x5 pixeles gauss-i simítás után). A küszöbölést követően a ROI-kat transzmissziós felvétel alapján, manuálisan tovább szűkítettük, hogy azok csak a szinaptikus területeket tartalmazzák. A kiválasztott pixelekre kapott FRET hatékonyságokat átlagoltuk, így egy adott szinapszisra jellemző értéket nyertünk.

Az akceptor/donor arány (N_A/N_D) befolyásolja a FRET hatásfokot, ezért ezt is meghatároztuk az alábbi egyenlettel (52):

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{(I_3 - B_3)(1 - E)}{(I_1 - B_1)/(L_D Q)}$$
(6)

4.8. FLIM-FRET mérés konfokális mikroszkópiával

A FRET-et a donor molekulák fluoreszcencia élettartam csökkenésébőll is meghatároztuk, amit egy A1-es (Nikon, Tokió, Japán) konfokális mikroszkópon mértünk, 60×/NA 1,27 vízimmerziós objektívvel és egy időkorrelált, egyedi fotonszámláló (time correlated single photon counting, TCSPC) kiegészítővel (PicoQuant, Berlin, Németország). Időkorrelált egyedi foton számlálás során periodikus impulzusgerjesztéssel az adatgyűjtés több gerjesztési és emissziós ciklusra is kiterjeszthető. A sok cikluson keresztül gyűjtött egyedi foton-detektálási események sokaságából rekonstruálható a fluoreszcencia lecsengésnek időfüggése. A módszer alapja az egyes fotonok beérkezési idejének regisztrálása. A gerjesztés és az emisszió közötti időkülönbséget stopperóraként működő elektronika méri (6. ábra) (53).



6. ábra: A start-stop idők mérése az időfelbontású fluoreszcencia mérésnél TCSPC-vel (53)

A stopperóra leolvasásait egy hisztogramba rendezi, amely egy sor rövid idő-ablakból ("binből") áll. A bin-ek szélessége általában megfelel a stopperóra felbontásának (néhány ps). Az időfüggő fluoreszcencia-kísérletek tipikus eredménye egy olyan hisztogram, amelyben a beütések száma exponenciálisan csökken az idő múlásával (7. ábra) (53).



 7. ábra: Az 6. ábra alapján felvett fotonok hisztogramja, ami alapján a lecsengési görbe ábrázolható (53) A gerjesztéshez egy 485 nm-es pikoszekundumos impulzus-lézert használtunk, amelynek impulzusszélessége impulzusszélessége <100 ps volt. A donor emissziót egy 520/35 nm-es emissziós szűrőn keresztül detektáltuk egy PMA Hybrid 40 fotoelektron-sokszorozóval (Picoquant).

Az adatokat 3-5 percig gyűjtöttük. Az így kapott fluoreszcencia lecsengési görbéket (7. ábra) a SymphoTime 64 szoftverrel egy multiexponenciális rekonvolúciós modellel illesztettük, két élettartam komponenssel:

$$y(t) = \sum_{i=1}^{2} IRF \otimes |_{Bkgr_{IRF}|Shift_{IRF}} A[i] \exp\left(\frac{-t}{\tau[i]}\right) + Bkgr_{Dec}, \tag{7}$$

$$\tau_{AvAmp} = \frac{\sum_{i=1}^{2} A[i] \tau[i]}{\sum_{i=1}^{2} A[i]},$$
(8)

ahol A[i] az amplitúdója, $\tau[i]$ pedig az életideje az *i*-edik komponensnek, a Bkgr_{Dec} a lecsengés háttér korrekciója, a Bkgr_{IRF} háttérkorrekció a műszer válaszfüggvénye (IRF), a Shift_{IRF} az IRF időbeli eltolódásának korrekciója, A_{Sum} a fluoreszcencia intenzitása a nulla időpontban, és τ_{AvAmp} az amplitúdóval súlyozott átlagos élettartam. A FRET-hatékonyságot a következő egyenlettel határozhatjuk meg:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D},\tag{9}$$

ahol τ_{DA} és τ_D a donor amplitúdósúlyozott átlagos fluoreszcencia élettartama akceptor jelenlétében, illetve akceptor hiányában, de ugyanabban a környezetben (54).

4.9. A receptorok transzlokációjának számszerűsítése

A receptorok transzlokációjának mértékét a konfokális képek alapján értékeltük ki az immunológiai szinapszison belüli átlagos pixelintenzitás és a teljes sejtmembrán átlagos pixel intenzitás arányának kiszámításával a MATLAB program segítségével az alábbiak szerint:

$$\langle I_{IS,norm} \rangle = \frac{\sum I_{IS} / N_{IS}}{\sum I_{tot} / N_{tot}},$$
(10)

ahol I_{is} egy adott pixel intenzitása az IS-ben, N_{IS} az adott IS-ben található pixelek száma, I_{tot} a sejtmembrán teljes területén található pixelintenzitás (beleértve az IS-t) és N_{tot} membránból származó pixelek száma.

4.10. Foszforilált STAT5 és CD3ζ áramlási citometriás mérése Jurkat sejtekben

Az immunológiai szinapszisok kialakulását megelőzően a Jurkat sejteket Alexa Fluor 546-W6/32 mAb-val jelöltük a Raji sejtektől való megkülönböztethetőség érdekében. Az IS kialakulása után a sejteket 37 °C-on 5 percig tripszines emésztéssel választottuk el egymástól. A sejteket 2% formaldehidben fixáltuk 10 percig, és 90% metil-alkohollal permeabilizáltuk 30 percig. A mosást (2×) festő pufferben végeztük, ami 10 ml FBS-t (a nem specifikus kötődés blokkolása érdekében) és 0,5 g Na-azidot (Merck, Darmstadt, Németország) tartalmaz 490 ml PBS-ben. A sejteket ezután Alexa Fluor 647-anti pSTAT5 mAb-val vagy IgG₁ κ izotípus kontrollal jelöltük (BD, Franklin Lakes, NJ) (10 μL + 40 μL festő puffer, 50 perc, szobahőmérsékleten). A méréseket egy Novocyte 3000 (Agilent, Santa Clara, CA) áramlási citométeren végeztük el 488 nm-es (EGFP), 561 nm-es (mCherry) és 640 nm-es (Alexa Fluor 647) gerjesztéssel. Az EGFP (a Raji-EGFP-IL-15Rα-ból), az Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647 jeleket (a Jurkat sejtből) 530/30, 586/20 és 660/20 nm emissziós szűrőkön keresztül detektáltuk. A Jurkat sejteket az Alexa Fluor 546 pozitív és EGFP negatív jel alapján kapuztuk; a pSTAT5 szintet az Alexa Fluor 647 jel alapján határoztuk meg. A pSTAT jelet egy kétkomponensű lognormális eloszlású modellel illesztettük, amely egy válaszadó és egy nem válaszadó populációt különít el. Az IL-15- és kettős kezelésű minták esetében csak a válaszadó, az alap pSTAT5 szinttől eltérő populációt használtuk fel az átlagintenzitások meghatározásához.

A TCR által kiváltott jelátvitel mértékének megállapításához a pSTAT5-höz hasonlóan áramlási citometriai kísérleteket végeztünk, p-CD3ζ szint méréssel. A sejteket allofikocianin jelölővel ellátott anti-p-CD3ζ mAb-val vagy IgG₂b κ izotípus kontrollal jelöltük (Thermo Fisher Scientific). Az allofikocianin fluoreszcens fehérjét 640 nm-en gerjesztettük, és 660/20 nm-en detektáltuk. A kiértékelés során a T sejteket és a T sejt - B sejt konjugátumokat az Alexa Fluor 546-W6/32 pozitív jel alapján, a p-CD3ζ szintet az allofikocianin intenzitásából határoztuk meg.

4.11. A γ_c alegységek ko-mobilitásának meghatározása egysík megvilágítású mikroszkópia alapú fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával (SPIM-FCCS)

A receptor alegységek ko-mobilitását SPIM-FCCS mérésekkel végeztük, amit képalkotó FCCSnek is neveznek. Ez a módszer képes a fluoreszcens részecskék stabil ko-diffúziójának kimutatására a megfigyelési időablakon belül (a részecskék diffúziós ideje a detektálási térfogatban). A méréseket egy a heidelbergi DKFZ-ben (Deutsches Krebsforschungszentrum) épített SPIM készüléken hajtottuk végre (43). A kísérleteket szobahőmérsékleten (~25 °C) végeztük transzfektált HeLa sejteken. A γ_c alegységek homodimerizációjának tanulmányozásához γ_c -EGFP + γ_c -mCherry ko-transzfekciót alkalmaztunk. Az EGFP és az mCherry gerjesztésére 491 nm (Cobolt Calypso, Svédország, 25 mW) és zöld 561 nm (Cobolt Jive, Svédország, 25 mW) lézereket használtunk. Az egyesített nyalábokból egy hengeres lencse körülbelül 1,3 µm vastagságú fénysíkot képezett, amely megvilágította a sejteket. A poli-L-lizinnel kezelt tárgylemezt, amire a HeLa sejtek kitapadtak, a fénysíkhoz képest ~45°-os szögben rögzítettük a mintatartóra (8. ábra). A mintakamrát Hanks-féle sóoldattal töltöttük fel. A mintából származó fluoreszcenciát egy nagy munkatávolságú vízimmerziós objektívvel (Nikon CFI Apo-W NIR 60x / NA 1,0) gyűjtöttük össze, amelynek optikai tengelye merőleges volt a gerjesztő fénysíkra. Az összegyűjtött fluoreszcenciát zöld (500-550 nm) és vörös (>593 nm) komponensre osztottuk DualView DV2 nyalábosztóval (Photometrics, Tucson, AZ) egy dikroikus tükör és két emissziós szűrő segítségével az EGFP és az mCherry detektálásához. A zöld és vörös képeket egymás mellé vetítettük egy 128x128 pixeles EMCCD kamerára (iXon X3 860, Andor, Belfast, Egyesült Királyság), amelynek pixelmérete 400x400 nm² volt a tárgysíkban. A két kép rögzítéséhez és a két színcsatorna megfigyelési térfogatának maximális átfedéséhez a nyalábosztót egy elektronmikroszkópos rács segítségével úgy igazítottuk, hogy a kamera egyik felére vetített zöld kép 64 pixellel eltolva minél jobban egybeessen a kép másik, vörös felével. A mérési terület 128x20 pixelre korlátozódott a gyűjtési sebesség növelése érdekében. A pont válaszfüggvények (PSF) hosszirányú komponensének (w_z) meghatározásához agaróz gélbe ágyazott fluoreszcens gyöngyökről (100 nm TetraSpeck multicolor microspheres, Invitrogen, Waltham, MA) vettünk fel szeletelt képeket, az így készült 3D képeken lokalizált gyöngyökre 3D Gauss illesztést végeztünk, ebből nyertük wz értékét. A PSF w_{xy} laterális sugarának meghatározásához pedig vizes közegben mértük az ismert diffúziós állandóval rendelkező gyöngyök diffúziós idejét (a gyöngyök diffúziós együtthatója $D=3,1 \mu m^2/s 20$ °C-on (43)).

$$w_{xy} = \sqrt{4D\tau_d}, w_z, \tag{11}$$

ahol τ_d a mért diffúziós idő.

A laterális és hosszirányú PSF alapján meghatározható az effektív detektálási térfogat:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} w_{x,y}^2 w_z \tag{12}$$

A laterális PSF paraméterek a következők voltak: $w_{xy,g} = (619\pm62)$ nm és $w_{xy,r} = (669\pm66)$ nm, míg a hosszirányú PSF paraméterek $w_{z,g} = (1288\pm121)$ nm és $w_{z,r} = (1249\pm133)$ nm voltak a zöld, illetve vörös csatornákban.



8. ábra: Egysík megvilágítású mikroszkóp (SPIM) sematikus felépítése és optikai útja (43)

Minden sejtről 100 000 képet rögzítettünk 2000 kép/s sebességgel, és további 2000 képet lézer gerjesztés nélkül a háttérkorrekcióhoz. A fluoreszcencia képekből kiszámoltuk az egyes csatornák autokorrelációs függvényeit, valamint a két csatorna keresztkorrelációs függvényét minden pixelre a QuickFit 3 szoftver segítségével (55). Az összes képponton globálisan illesztettük az auto- és keresztkorrelációs függvényeket (56). A következő modellfüggvényt alkalmaztuk egy vagy két diffúziós komponens szabad 3 dimenziós diffúzióját feltételezve:

$$G_{\gamma}(\tau) = \sum_{\chi} \frac{\rho_{\chi}}{\langle N_{\gamma} \rangle} \cdot \left\{ erf\left(\frac{a}{\sqrt{4D_{\chi}\tau + w_{\gamma}^{2}}}\right) + \frac{\sqrt{4D_{\chi}\tau + w_{\gamma}^{2}}}{a \cdot \sqrt{\pi}} \cdot \left[exp\left(-\frac{a^{2}}{4D_{\chi}\tau + w_{\gamma}^{2}}\right) - 1\right] \right\}^{2} \cdot \left(1 + \frac{4D_{\chi}\tau}{z_{\gamma}^{2}}\right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (13)$$

ahol G az auto- vagy keresztkorrelációs függvény, τ a késleltetési idő, a γ (zöld vagy vörös) a mikroszkóp színcsatornáját jelöli, (N) a (zöld vagy vörös) részecskék átlagos száma a megfigyelési térfogatban (Veff,y), amiből az egyes komponensek c koncentrációi kiszámíthatók, ho_{χ} a diffúziós komponensek rész-amplitúdója χ , D_{χ} ezek diffúziós együtthatója, erf a hibafüggvény, α a pixelméret a tárgysíkban, w_{ν} az objektív laterális PSF szélessége és z_{ν} a fénysík vastagsága. A triplet állapotot nem kellett figyelembe venni a modellbe, mert az EGFP és az mCherry triplet korrelációs ideje (mikroszekundumos tartomány) két nagyságrenddel rövidebb, mint a rendszer ~0,5 ms-os időbeli felbontása. Az értékelés során először intenzitási küszöbértékkel maszkoltuk a fluoreszcencia képeket, hogy kizárjuk a sejteken kívül eső és fluorofórt nem tartalmazó pixeleket. Az illesztést, az adott sejt minden kiválasztott pixelére elvégeztük. Az EGFP-mCherry fúziós fehérje (pozitív kontroll), ahol a plazmid vektor mind a két fehérje génjét tartalmazza, amit egy linker régió köt össze (RDPPV). Az EGFP + mCherry (negatív kontroll) mintákhoz két szabadon diffundáló komponens egyenletét használtuk mind az autokorrelációs függvények (ACF), mind a keresztkorrelációs függvények (CCF) illesztésekor. A yc-yc minta az ACF-eket szintén a kétkomponensű modellel illesztettük, míg CCF-jét egyetlen diffúziós komponenssel. A diffúziós együtthatókat és a zöld-vörös dimer frakciók arányát az illesztési paraméterekből kaptuk.

A zöld-vörös komplexben lévő molekulák, azaz az egymással kölcsönhatásban lévő fehérjék hányadának modellfüggetlen meghatározásához kiszámítottuk a relatív keresztkorrelációs függvény (RCCF) amplitúdóját is a kiválasztott pixelekre:

$$RCCF(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^{n} G_{CCF(x, y)}(\tau_i)}{\sum_{i=1}^{n} G_{ACF(x, y)}(\tau_i)},$$
(14)

ahol a G_{CCF,(x,y)} és a G_{ACF,(x,y)} a kereszt- és autokorrelációs függvények értéke a τ_i időben és az *x,y* pixelkoordinátákban. A számításban *n* azon korrelációs csatornák (τ_i értékek) száma a korrelációs görbék elején, amelyekre átlagoltunk (n = 5-öt használtunk). Az RCCF arány dinamikus tartományát a negatív kontroll (koexpresszált EGFP és mCherry) és a pozitív kontroll (EGFP-mCherry fúziós fehérje) értékei határozzák meg. Csak azokat a pixeleket vettük figyelembe, amelyek értéke -1 <RCCF <1.

4.12. Statisztikai elemzés

A Student-féle t-próbákat a GraphPad Prism 8 szoftverrel végeztük el (San Diego, CA). A szignifikancia szinteket a következőek szerint jelöltük: *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001. A doboz diagramokon a minimum, 25. percentilis (Q1), medián (vízszintes volnal), átlag (+ szimbólum), 75. percentilis (Q3) és maximum értékek vannak feltüntetve.

5. Eredmények

5.1. Közvetlen bizonyíték az IL-15 transz-prezentációs komplex összeszerelődésére

Az IL-15 TP és az AP tanulmányozásához az alábbi ábrán látható modellrendszert használtuk (9. ábra).



9. ábra: Az IL-15 TP és AP egymásra gyakorolt hatásainak megfigyelésére használt modell rendszer. (A) Raji B-sejtek mint prezentáló sejtek, stabilan transzdukálva voltak IL-15Rα alegységgel, Jurkat T-sejtek mint célsejtek szintén stabil transzdukció révén expresszálták a IL-2/15Rβ alegységet (a γ_c alegységet endogén módon expresszálja a sejt). A B-sejteket SEE szuperantigénnel és/vagy IL-15 citokinnel kezeltük, mielőtt hozzájuk adtuk a T-sejteket. Az

AP-ben és IL-15 TP-ben kritikus fehérjék egymással történő asszociációját és transzlokációját, valamint jelátvitelüket az immunológiai szinapszis kialakulása után mértük.

(B) A FRET-hez szükséges metodikai pozitív kontrollként a B sejteket tranziensen transzfektáltuk az N-végen mCherry fluoreszcens fehérjével jelölt (akceptor) IL-2Rα alegységgel, amit Alexa 488-anti-Tac mAb (donor) antitesttel is megjelöltünk. A negatív kontroll esetében az mCherry az IL-2Rα C végén helyezkedett el.

A prezentáló sejt virális transzdukcióval módosított, jelölt (mCherry vagy EGFP az Nterminálison) vagy jelöletlen IL-15Rα alegységet expresszáló Raji B-sejt volt. A célsejt egy szintén virálisan módosított, jelöletlen IL-2/15R β alegységet expresszáló (a γ_c alegységet endogén módon kifejező) Jurkat T-sejt volt.

Áramlási citométerrel ellenőriztük a különböző sejteken az IL-15 TP-ban vagy AP-ban résztvevő receptorok, illetve receptor alegységek expresszióját (10. ábra). Méréseink alapján a Raji B-sejteken az MHC II rendelkezik a legmagasabb expressziós szinttel, amit az IL-15Rα követ ~50× alacsonyabb expresszióval, ami összevethető a Jurkat T-sejteken mért CD3 expresszióval. Ez utóbbiak hozzávetőlegesen 3× magasabbak, mint az IL-2/15Rβ alegységé. A γ_c alegység expressziója két nagyságrenddel alacsonyabb, mint az IL-2/15Rβ-é.



10. ábra: A vizsgált receptorok és alegységek relatív expressziós szintjei a modellrendszerben használt sejteken. Az áramlási citometriával kapott fluoreszcencia intenzitásokat az antitestek F/P értékével korrigáltuk.

Raji sejteket az MHC II-höz kötődő SEE szuperantigénnel és/vagy az IL-15Rα-hoz kötődő IL-15tel kezelve nagy gyakorisággal alakultak ki IS-ok a Jurkat sejteken lévő T-sejt receptor/CD3 komplexszel, valamint az IL-2/15R β és a γ_c receptor alegységekkel való kölcsönhatások révén. Ligand kezelés hiányában nagyon ritkán alakultak ki Raji - Jurkat sejt konjugátumok.



11. ábra: Intenzitás alapú FRET mérés az IL-2/15Rβ és IL-15Rα közötti intercelluláris asszociáció meghatározásához. Konfokális képek a FRET donorról (1. oszlop), akceptorról (2. oszlop), transzmissziós és fluoreszcens kompozit (3. oszlop), FRET térkép, illetve hisztogram (4. és 5. oszlop) az adott sejtekről. 1. sor: pozitív kontroll, Raji sejt tranziensen transzfektálva mCherry-IL-2Rα-val (mCherry az N terminálison), majd jelölve A488-anti-Tac mAb-val; 2. sor:

negatív kontroll, Raji sejt tranziensen transzfektálva IL-2Rα-mCherry-vel (mCherry az C terminálison), majd jelölve A488-anti-Tac mAb-val (A488 és mCherry ellentétes oldalon); 3-5. sor: IL-2/15Rβ (Jurkat sejten, A488-Mikβ3 mAb-val jelölve) és mCherry-IL-15Rα (Raji sejten) közötti asszociáció mérése SEE és/vagy IL-15 kezelés mellett. Az in vitro vizsgálatok már korábban utaltak az IL-15 TP meglétére, ezek a kísérletek azonban többnyire az IL-15 hatásaira összpontosítottak, mint az IL-15Rα/IL-15 komplexet expresszáló prezentáló sejtek által kiváltott proliferáció a célsejteken. Az IL-15R α /IL-15 - IL-2/15R β komplex molekuláris szintű összeszerelődésének közvetlen megfigyelésére, valamint az APnak az IL-15 TP-ra gyakorolt hatásának tanulmányozása érdekében raciometrikus FRET kísérleteket végeztünk (11. ábra). Minden FRET-mérésnél az alacsonyabb szinten expresszált fehérjét alkalmaztuk donorként, a magasabb expresszióval rendelkezőt, pedig akceptorként, így növelve annak valószínűségét, hogy minden donorra jut legalább egy akceptor. A FREThatékonyságot pixelenként értékeltük ki. Az IL-15 kezelés *E* = 8,7%±2,4% FRET hatékonyságot eredményezett az A488-Mikβ3 mAb-val ellátott IL-2/15Rβ és az mCherry-IL-15Rα között, jelezve az IL-15 receptor alegységek és a ligand alkotta komplex összeszerelődését az IS-ban. Az IL-15-tel és a SEE szuperantigénnel való kettős kezelés tovább növelte az *E*-t 10%±0,2%-ra. A csak SEE-vel végzett kezelés esetén az alacsony *E* = 1,3%±2,7% érték azt mutatta, hogy IL-15 hiányában a vizsgált alegységek között nem volt szignifikáns asszociáció (12A. ábra); legfeljebb véletlenszerű FRET fordulhat elő a magas N_A/N_D akceptor-donor molekuláris arányok miatt (12B. ábra). (Minél több akceptor jut ugyanis egy donorra, annál nagyobb valószínűséggel adja át egy donor az akceptornak a gerjesztési energiát). Összefoglalva, közvetlen biofizikai bizonyítékokat szolgáltattunk az IL-15 TP-ra vonatkozóan; az AP önmagában nem tudta előidézni az IL-15 TP komplex összeszerelődését, azonban növelte az asszociáció mértékét, amikor az IL-15 is jelen volt.



12. ábra: FRET eredmények az IL-2/15Rβ és IL-15Rα közötti asszociációról, Raji sejtek előkezelve (20 perc) IL-15-tel (100 nM) és/vagy SEE-vel (20 µg/m), majd 20 percig inkubálva a Jurkat sejtekkel. (A) Átlagos FRET hatékonyságok; a magas E (a negatív kontrollhoz viszonyítva) jelzi az IL-2/15Rβ és IL-15Rα asszociációt IL-15 jelenlétében. A kettős kezelés (IL-15 + SEE) tovább növelte az IL-15 által indukált asszociációt. Az mCh-IL-15Rα (akceptor) és az A488-Mikβ3 jellel ellátott IL-2/15Rβ (donor) akceptor-donor molekuláris arányai az IS-nél.
(B) A csak SEE-vel kezelt minta esetében a FRET hatékonysága a magas N_A/N_D arány ellenére alacsony maradt, ami a komplexképződés hiányát jelzi. **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba). N = 25-33 sejt minden mintához.

Pozitív kontrollként Raji sejteket használtunk, amelyek tranziensen fejezték ki az mCherry-vel (N-terminálison) jelölt IL-2R α -t, amit Alexa 488-antiTac mAb-val jelöltünk. Ebben az esetben a FRET átlagos hatásfoka = 13%±3%; a negatív kontroll esetében, melynél az IL-2R α -n az mCherry az intracelluláris (C-terminálison) helyezkedett el, *E* = 0,8% ±1,2% transzfer hatásfokot kaptunk.

5.2. A CD3 és az MHCII csak antigén jelenlétében szerelődik össze

Annak ellenőrzésére, hogy létrejön-e az AP a modellrendszerünkben, az IS-ban a CD3 és az MHC II közötti asszociációt mértük FLIM-FRET-tel, ehhez a CD3-at Alexa488-OKT3, az MHC II-t pedig Alexa546-L243 mAb-val jelöltük (13. ábra).


13. ábra: Konfokális képek a CD3 és MHC II eloszlásokról szinapszist képző Jurkat és Raji sejteken. 1. oszlop: FRET donor; 2. oszlop: akceptor; 3. oszlop: kompozit, transzmissziós és fluoreszcens kép.

Ha csak IL-15-tel kezeltük a Raji sejteket, nem volt jelentős transzfer hatásfok ($E = 1,5\%\pm3\%$) a két fehérje között annak ellenére sem, hogy magas volt az N_A/N_D arány. SEE kezeléssel azonban a FRET hatékonysága jelentősen megnőtt ($E = 5,3\%\pm2,4\%$), bár ekkor az N_A/N_D az IL-15 kezeléssel mért érték felére esett vissza. A kettős kezelésnek nem volt további hatása (E =5,2%±3,1%) a csak SEE-vel végzett kezeléshez képest, amiből arra a következtethetünk, hogy az antigén önmagában szükséges és elegendő a hatékony AP-hoz (14A. ábra).



14. ábra: FRET eredmények a CD3 és MHC II közötti asszociációról, Raji sejtek előkezelve (20 perc) IL-15-tel (100 nM) és/vagy SEE-vel (20 μg/m), majd 20 percig inkubálva a Jurkat sejtekkel. (A) FRET mérés a Jurkat sejten lévő, Alexa488-OKT3-mal (donor) jelölt CD3 és a Raji sejten lévő, Alexa546-L243-mal (akceptor) jelölt MHC II között. Az antigénprezentációs komplex csak azoknál a mintáknál alakult ki, ahol a Raji-t előkezeltük SEE-vel. N_A/N_D az akceptor-donor molekuláris arányokat mutatja. (B) Donor fluoreszcenciaintenzitásra illesztett biexponenciális lecsengési görbék a CD3-MHC II fehérjék közötti asszociáció mérésből. Az SEE (lila) és IL-15+SEE (kék) kezelt, kétszeresen jelölt minták gyorsabb lecsengése a csak donoros (fekete) mintához képest magas FRET-et jelez. Az IL-15 (kék) kezelt minta lecsengési görbéje egybeesik a csak donoros minta görbéjével, ami 0 vagy nagyon alacsony FRET-et jelent. ***: p<0,001 (t-próba). N = 17-34 sejt minden mintánál.</p>

5.3. Nincs jelentős cisz-interakció az IL-2/15Rβ és a CD3 között

Felmerülhet a kérdés, hogy az IS-be transzlokálódó fehérjék a T sejten együtt vagy egymástól függetlenül mozognak a szinapszisba. Az IL-2/15Rβ alegység és a CD3 közötti kölcsönhatára se AP, se IL-15 TP során nem találtunk bizonyítékot (15. ábra).





Először meghatároztuk a FRET hatékonyságát magányos T-sejteken, amelyeket nem kezeltünk semmilyen liganddal, illetve nem találkoztak B-sejtekkel; itt *E* = 2,3%±3,4%-ot kaptunk. Ezután az IS-ban történő méréskor, az IL-15-tel kezelt minták *E* = 0,5%-±3,1%-ot adtak, az SEE kezelés után *E* = 3%±4,3%-ot, a kettős kezelés után pedig *E* = 2,3%±3,4%-ot mértünk. Az SEE kezelés során a kissé emelkedett *E*-t valószínűleg a megnövekedett N_A/N_D arány (~5) okozza, amely magasabb a többi mintánál tapasztaltnál (16A. ábra); ezt a CD3 ligand-indukált feldúsulása okozza, amit az IL-15 hiánya miatt nem követ az IL-2/15R β transzlokációja az IS-ba. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy nincs jelentős asszociáció az IL-2/15Rβ és a CD3 között sem a magányos, sem IS-ban lévő sejteken.



16. ábra: FRET eredmények az IL-2/15Rβ és CD3 közötti asszociációról, Raji sejtek előkezelve (20 perc) IL-15-tel (100 nM) és/vagy SEE-vel (20 µg/m), majd 20 percig inkubálva a Jurkat sejtekkel. (A) IL-2/15Rβ A488- Mikβ3-mal jelölve (donor) és CD3 A546-OKT3-mal jelölve (akceptor) Jurkat sejteken. Általánosságban alacsony FRET hatásfokokat mértünk. N_A/N_D: akceptor-donor molekuláris arányok. (B) Illesztett lecsengési görbék azokből a pixelekből, melyek a Raji sejtekkel képzett szinapszis területéről származnak. A majdnem teljesen egybeeső görbékből 0 vagy nagyon alacsony FRET hatásfokra lehet következtetni. *: p<0,05 (t-próba). N = 17-34 sejt minden mintánál.</p>

5.4. Az IL-15R α és az MHC II közötti erős cisz-kölcsönhatást tovább fokozza a SEE antigén

Az a megállapításunk, hogy az AP fokozta az IL-15Rα és az IL-2/15Rβ alegységek asszociációját, valamint az a korábbi eredmény, hogy az MHC II és az IL-15Rα komplexet alkot FT7.10 T-sejteken (45, 46) felveti a kérdést, hogy az IL-15Rα és az MHC II kölcsönhatásba lépnek-e egymással B-sejteken is. FLIM-FRET kísérletekkel vizsgáltuk az IL15Rα és az MHC II közötti cisz kölcsönhatást az IS-ban (17. ábra).



17. ábra: Konfokális képek az IL-15Rα és MHC II eloszlásáról, Raji sejteken. 1. oszlop: FRET donor; 2. oszlop: akceptor; 3. oszlop: fluoreszcencia élettartam térkép; 4-5. oszlop: FRET hatásfok térkép és hisztogram.

Ehhez EGFP-IL-15 α -t (mint donor) expresszáló Raji sejteken A546-L243-mal (akceptor) jelöltük az MHC II-t. Először magányos B-sejteken mértünk FRET-et és E = 8%±0,1%-ot kaptunk, ami arra utal, hogy ezek a molekulák ligand hiányában is komplexet képeznek. Ezután megmértük a FRET-et az IS-ban. Az IL-15- és a kettős kezelésű minták hasonló eredményeket mutattak, E = 8,1%±2,4% és E = 9,3%±1,8%; azonban a csak SEE-vel kezelt minta lényegesen magasabb értéket eredményezett, E = 13%±2,1% (18A. ábra), az N_A/N_D értékek nem különböztek az eltérő kezelések hatására, ezért ez a tényező nem magyarázza meg a SEE kezeléskor kapott magasabb E értéket. Kiszámítottuk a FRET hatékonyságát a sejtmembrán szinaptikus régióján kívül is. Az eredmények hasonló tendenciát mutattak, mint amit az IS-ban megfigyeltünk: az IL-15 kezeléssel E = 6% ±3,5%, SEE kezelés mellett E = 10,2% ±3,5% és E = 7,9% ±2,7% a kettős kezelés után (18B. ábra).



18. ábra: FRET eredmények az IL-15Rα és MHC II közötti asszociációról, Raji sejtek előkezelve IL-15-tel (100 nM) és/vagy SEE-vel (20 μg/m), majd 20 percig inkubálva a Jurkat sejtekkel. EGFP-IL-15Rα (donor) és A546-L243-mal (akceptor) jelölt MHC II Raji sejteken. A FRET hatásfokot az IS-en belül (A) és kívül (B) is megmértük. Az IL-15Rα és az MHC II minden esetben egymás közelében helyezkedik el. Az asszociáció mértéke SEE kezelés során volt a legmagasabb. N_A/N_D: akceptor-donor molekuláris arányok. (C) Donor fluoreszcencia intenzitása alapján illesztett lecsengési görbék az IL-15Rα és az MHC II fehérjék közötti asszociáció méréséből, az IS-en kívül vagy IS-ben lévő pixelekben. A csak donoros mintából (fekete) kapott lecsengési görbéhez képest az összes minta gyorsabb lecsengést mutatott, magasabb FRET értékeket jelezve. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba). N = 17-34 sejt minden mintánál.</p>

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IL15Rα és az MHC II közös komplexben van jelen mind magányos, mind IS-t képző sejteken. Amikor az MHC II megköti a szuperantigént, konformációs változás következhet be, amely hatással lehet az epitópok közelségére, ezáltal megváltoztatva a donor és az akceptor molekulák közötti távolságot. Az is lehetséges, hogy az IL-15 kezelés hatására kialakuló IL-15Rα/IL-15Rβ komplex térfoglalása csökkenti az IL-15Rα-MHC II kapcsolat kialakulását.

5.4. Receptor transzlokáció az IS-ba

Az AP-ban és IL-15 TP-ban résztvevő fehérjék IS-ban való feldúsulását az (*I_{IS.norm}*) paraméter segítségével számszerűsítettük, amely megadja a vizsgált molekula IS-ban mért átlagos pixelenkénti intenzitását a sejtmembrán egészében mért átlagintenzitáshoz képest. Az IL-15Rα változatlan, 1,5-1,9-szeres feldúsulást mutat az IS-ban (19A. ábra), mindhárom kezelés esetében. Az IL-2/15Rβ alegység az IL-15Rα-val ellentétben csak akkor dúsult fel az IS-ban, amikor az IL-15Rα prezentálta az IL-15-öt: IL-15 TP esetén az IL-2/15Rβ alegységek száma az IS-ban 4,2-4,4-szeresre emelkedett (19B. ábra). Az MHC II az IL-15Rα alegységhez hasonlóan viselkedett, az összes kezeléskor alacsony, de állandó mértékű feldúsulást mutatott: az IL-15 kezelés esetében 1,4-szeres, SEE kezeléssel 1,6-szoros, kettős kezeléssel pedig 1,7-szeres (19C. ábra). A CD3 az IL2/15Rβ-hez hasonlóan csak akkor transzlokálódott a szinaptikus régióba, amikor az MHC II prezentálta az antigént. Ebben az esetben a feldúsulás 2,4-2,7szeres volt (19D. ábra). A kapott transzlokációs eredmények tovább erősítik a FRET-tel kapott asszociációs eredményeket, amelyekből arra a következtethetünk, hogy az IL-15Rα és az MHC II már a magányos B-sejteken is komplexet alkotva helyezkednek el, és ha a komplex bármely tagja prezentálni tudja ligandját a célsejten lévő komplementer receptornak vagy alegységnek, akkor a transzlokáció során az IL-15Rα és az MHC II együtt dúsul fel az IS-ban. E két prezentáló fehérje viszonylag alacsony feldúsulása az expressziós szintjükkel magyarázható, amelyek magasabbak, mint a T-sejten lévő partnereiké; így a teljes IL-15Rα és az MHC II populációnak csak egy töredéke talál transz-interakciós partnert az IS-ban. Ezzel szemben az IL-2/15Rβ és a CD3 egymástól függetlenek, és az IS-nál csak akkor dúsulnak fel, ha saját ligandjuk prezentálásra kerül.



19. ábra: A relatív feldúsulás mértéke az IS-ben, a "normált átlag pixelintenzitás" mérések alapján. Feldúsulás hiányában (homogén eloszlás a membránban) 1 körüli érték várható (piros szaggatott vonal). (A) Az IL-15Rα alegység hozzávetőleg 2-szeres feldúsulást mutat minden kezelés során. Az IL-2/15Rβ alegység csak akkor transzlokálódik az IS-be, ha az IL-15Rα prezentálja az IL-15-öt. (B) Az IL-2/15Rβ nagyobb mértékű feldúsulást mutat, mint az IL-15Rα. Ennek oka feltehetően az IL-2/15Rβ alacsonyabb expressziós szintje. (C) Az MHC II az IL-15Rα alegységhez hasonlóan minden kezelés során feldúsul kis mértékben. (D) A CD3 - csakúgy, mint az IL-2/15Rβ - csak akkor transzlokálódik a szinapszisba, ha az MHC II

prezentálja az SEE szuperantigént. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba). N=22-42 sejt, minden mintánál.

5.5. Az IL-15 TP sikeresen kiváltja a jelátvitelt, amit az AP nem befolyásol

Annak tanulmányozására, hogy az IL-15 TP valóban kiválthat-e jelátvitelt a célsejtben, és hogy megállapítsuk, hogy az AP-nak volt-e erre hatása, a foszforilált STAT5 mennyiségét mértük áramlási citométerrel, magányos és a különbözően kezelt Raji sejteknek kitett Jurkat

sejtekben (20A. ábra). Izotípus jelöléssel zártuk ki az esetleges nem specifikus kötődést. Azt találtuk, hogy a magányos, kezeletlen (Raji sejtnek ki nem tett) Jurkat sejtek rendelkeznek egy alap pSTAT5 szinttel, ami a SEE kezelés során kis mértékben emelkedett. Az IL-15-tel kezelt Raji sejtekkel való kölcsönhatás nagymértékben növelte a pSTAT5 mennyiségét, de ezzel együtt végzett SEE kezelés hatására már nem volt jelentős növekedés (20B. ábra). Az utóbbi két kezelésnél egy reagáló és egy nem reagáló populációt észleltünk, és egy kétkomponensű lognormális függvényt illesztettünk a hisztogramokra (piros görbék) (20C. ábra). A pSTAT5 szintek összehasonlításához a reagáló populációk értékeit használtuk, amelyekből levontuk a magányos Jurkat sejtek alap pSTAT5 szintjének értékét (20D. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IL-15 TP önmagában is kiválhatja a jelátvitelt, és az AP-nak nincs jelentős hatása erre a folyamatra.



20. ábra: STAT5 foszforiláció Jurkat T-sejtekben, áramlási citometriával mérve. Jurkat T-sejteken jelöltük az MHC I-et (A546-W6/32-vel), míg a Raji B-sejtek az EGFP-IL-15Rα

alegységet expresszálták, ez alapján különböztettük meg a két sejttípust. A Raji sejteket előkezeltük (20 perc) IL-15-tel (100 nM) és/vagy SEE-vel (20 μg/m), majd 20 percig inkubáltuk Jurkat sejtekkel, az inkubáció után tripszines emésztéssel választottuk el egymástól a konjugátumokat. Permeabilizálás után, Alexa647-anti-pSTAT5 mAb-val jelöltük a sejteket. **(A)** A bal felső populáció (magas Alexa546 intenzitás és alacsony EGFP intenzitás) kapuztuk ki további elemzésre. **(B)** pSTAT5 hisztogram: csak SEE prezentálása esetén (lila) megnőtt a pSTAT5 szintje az alap foszforilációs szinthez képest (piros, magányos, kezeletlen T-sejtek). Az IL-15 (zöld) szignifikánsan megnövelte a pSTAT5 mennyiségét, amit a kettős IL-15+SEE kezelés (kék) nem növelt tovább. **(C)** Az IL-15-tel és IL-15+SEE-vel kezelt minták hisztogramját két komponensű lognormál eloszlással illesztettük, így elkülönítve egy reagáló és egy nem reagáló al-populációt; az SEE-vel kezelt minta egyszeres lognormál eloszlással

volt illesztve (piros vonal). **(D)** IL-15-tel és/vagy SEE-vel kezelt minták átlagos pSTAT5 intenzitása (a reagáló alpopulációból), 4 független mérésből, alap foszforilációs szinttel korrigálva. ***: p<0,001 (t-próba).

5.6. Az IL-15 TP hatása a T-sejt jelátvitelre

Az IL-15 TP-nak az AP-indukálta T-sejt jelátvitelre gyakorolt lehetséges hatását áramlási citometriával és Western-blottal vizsgáltuk a TCR/CD3 komplex CD3ζ lánca foszforilációjának mérésével (21A. ábra). Először megmértük a foszforilált CD3ζ szinteket Jurkat sejtekben (21A. ábra), amelyek különbözőképpen kezelt Raji sejteknek voltak kitéve (SEE, IL-15, SEE+IL-15), kivéve a kezeletlen mintát, ami csak Jurkat sejteket tartalmatott, az alap foszforilációs szint meghatározásához, áramlási citometriával (21B. ábra). Az izotípus kontroll (nem specifikus jelölés kizárásaként alkalmazva) jeléhez viszonyítva egy nem nulla pCD3ζ szint már kimutatható volt magányos Jurkat sejtekben és olyan mintákban, ahol csak IL-15 TP fordult elő. Az AP önmagában (SEE kezelés) jelentősen megemelte a pCD3ζ szintjét. A kettős (SEE + IL-15) kezeléskor mért jel viszont valamivel alacsonyabb volt, mint önmagában az SEE kezelésnél, bár a különbség statisztikailag nem szignifikáns (21C. ábra). A mintaelőkészítés során, a mechanikai igénybevétel miatt az IS-t formáló sejtek szétszakadhatnak, membránfragmenseket hátrahagyva egymáson, amely torzíthatja az IS-ban feldúsult membránfehérjék, például a pCD3ζ sejtenkénti meghatározását (22AB. ábra).



21. ábra: CD3ζ foszforiláció Jurkat T-sejtekben, áramlási citometriával valamint Western blottal mérve. A Jurkat T-sejteken jelöltük az MHC I-et (Alexa546-W6/32-vel), míg a Raji Bsejtek az EGFP- IL-15Rα alegységet expresszálták, a két sejttípus megkülönböztethetőségét segítve. A Raji sejteket előkezeltük (20 perc) IL-15-tel (100 nM) és/vagy SEE-vel (20 μg/m), majd 20 percig inkubáltuk Jurkat sejtekkel, az inkubáció után tripszines emésztéssel választottuk el egymástól a konjugátumokat. Permeabilizálás után allofikocianin-anti-pCD3ζ mAb-val jelölést alkalmaztunk. **(A)** A T sejteket az Alexa546 intenzitás alapján kapuztuk ki további elemzésre. **(B)** pCD3ζ hisztogram: a kezeletlen (piros) vagy IL-15-tel kezelt (zöld) minták alacsony alap foszforilációs jelet mutattak. Azok a T-sejtek, melyeknek a B-sejtek prezentálták az SEE-t (lila), megnövekedett pCD3ζ szinttel rendelkeztek. Amennyiben az SEE mellett IL-15 kezelés is történt (kék), némileg csökkent a pCD3ζ szint. **(C)** Átlag AP indukált pCD3ζ szintek 5 független kísérletből, alap foszforilációs szinttel korrigálva. **(D)** Reprezentatív Western-blot a pCD3ζ és GAPDH fehérjékről. Teljes sejt lizátumból, ahol az IL-15-tel és/vagy SEE-vel előkezelt Raji B-sejteket Jurkat T-sejtekkel kevertük össze. **(E)** Denzitometriás értékek mutatják az átlagos, integrált optikai denzitást a GAPDH-ra normálva (N=5). **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba).

Ezért a CD3ζ foszforilációt a sejtpopuláció szintjén is vizsgáltuk, Western blot-tal (21D. ábra). Ezek a kísérletek hasonló tendenciát mutattak, a legerősebb pCD3ζ sávokat az SEE-vel kezelt Raji+Jurkat minta adta. A Western blot megerősítette, hogy a szimultán IL-15 TP - bár nem statisztikailag szignifikánsan -, de csökkenti az AP által kiváltott TCR-jelátvitel hatékonyságát (21E. ábra). Az ötször megismételt kísérletben mindig ugyanezt a tendenciát tapasztaltuk.



22. ábra: Mintaelőkészítés során a korábban kialakult IS-ek szétszakadhatnak, így membránfragmenteket hagyva a másik sejten. (A) Jurkat T-sejt membránjának maradéka Raji B-sejten. (B) Raji B-sejt membránjának maradéka Jurkat T-sejten.

5.7. SPIM-FCCS mérések bizonyítják a γ_c homodimer komplexek stabil ko-diffúzióját.

A FRET egy pillanatképet rögzít a molekuláris együttállásokról. Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával demonstrálhatjuk az asszociált molekulák ko-diffúzióját, amennyiben azok stabil komplexet képeznek, és a femtoliteres detektálási térfogatban együtt mozognak a diffúzió ideje alatt (jellemzően néhány tíz vagy száz ms membránfehérjék esetében). A fluoreszcencia intenzitásának időbeli auto- és keresztkorrelációs függvényeinek (ACF, CCF) elemzése feltárja a molekulák mobilitását, valamint a komplexet alkotó molekulák hányadát. Korábban mi és mások konfokális FCCS segítségével bizonyítottuk az IL-2R α + IL-15R α láncok (45) és az IL-2/15R β + γ_c láncok (57) stabil ko-diffúzióját T-sejtek membránjában. A γ_c láncok FRET mérésekkel detektált intracelluláris homoasszociációjának (47) megerősítéséhez SPIM-FCCS-t használtunk.

Pozitív kontrollként EGFP-mCherry fúziós fehérjével transzfektált sejteken végeztünk kísérleteket, negatív kontrollként külön EGFP-t és külön mCherry-t kódoló plazmidokkal kotranszfektált sejteket használtunk. A γ_c láncok homo-oligomerizációjának kimutatására γ_c -EGFP-vel és γ_c -mCherry-vel ko-transzfektált HeLa sejteken mértünk.



23. ábra: A SPIM-FCCS eredmények a γ_c alegységek stabil kodiffúzióját mutatják homomer komplexekként a citoplazmában. Auto- és keresztkorrelációs függvények (ACF, CCF) SPIM-FCCS mérésekből. Zöld: EGFP ACF; piros: mCherry ACF; kék: CCF. A folytonos vonal a kísérleti eredményeket mutatja, a szaggatott vonal az illesztett görbe, két diffúziós komponenst feltételezve. Pozitív kontrollként EGFP-mCherry fúziós fehérjét használtunk, negatvív kontrollként pedig EGFP és mCherry volt koexpresszeálva.

A méréseket a citoplazmában elhelyezkedő belső membránokon végeztük, ami egyértelműen megkülönböztethető volt a plazmamembrántól. A γ_c - γ_c minták ACF és CCF görbéinek hosszabb lefutási ideje egyértelműen jelzi a receptorláncok lassabb diffúzióját a citoplazmában található, szabad kontrollokhoz képest. A CCF görbe emelkedett amplitúdója bizonyítja a zöld és piros jelöléssel ellátott fehérjék ko-diffúzióját (23. ábra). A pozitív és negatív kontrollok szolubilis fehérjéi egyenletesen oszlottak el az egész citoplazmában, míg a γ_c láncok kisebb területekre korlátozódtak (24A. ábra). A dimerizáció mértékének becsléséhez az RCCFg arány (17. egyenlet) modellfüggetlen értékét számítottuk ki a CCF keresztkorrelációs függvény és a zöld csatorna ACFg korrelációs függvény első öt mérési pontjának átlagából (24B. ábra).



24. ábra: A dimerizáció mértékének becsléséhez az RCCFg arány meghatározása reprezentatív mintákból **(A)** Felső sor: fluoreszcencia Intenzitások és transzmissziós kép, az

FCCS-sel analizált ROI-t a sárga vonalak fogják közre; alsó sor: RCCFg relatív keresztkorrelációs függvény amplitúdóinak térképe, ami a zöld-vörös dimer frakciót jellemzi. (B) RCCFg hisztogramok a ROI-ból származó pixelekből.

A pixelenkénti RCCFg eloszlására pozitív kontroll esetében 0,26±0,11, a negatív kontrollnál 0,06±0,07, a γ_c -EGFP + γ_c -mCherry minták esetében pedig 0,15±0,1 értéket kaptunk (25A. ábra). A γ_c -EGFP + γ_c -mCherry minta *RCCFg* értéke alacsonyabb volt, mint a pozitív kontroll értéke, de lényegesen magasabb, mint a negatív kontrollé, így ezek az eredmények azt mutatják, hogy az intracelluláris γ_c alegységek legalább egy része dimer (vagy oligomer) formában létezik. A korrelációs görbék illesztéséből (11. egyenlet) kinyerhető az egyes molekulapopulációk koncentrációja. A zöld-piros dimer frakció $c_{gr}/(c_g+c_r+c_{gr})$ az illesztett ACF és CCF görbékből kiszámítható (25B. ábra).



25. ábra: (A) Átlag RCCFg értékek. (B) Átlag zöld-vörös dimer frakció értékei az illesztett ACF és CCF alapján. (C) Diffúziós együtthatók az ACF és CCF-ből. (D) A gyors (D1) és lassú (D2) populációk átlagos diffúziós együtthatója, valamint a lassú komponens hányada (ρ2). *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba). N=11-13 sejt, minden mintához.</p>

Ez a dimer hányad a negatív kontroll esetében volt a legalacsonyabb, 0,05±0,04, a pozitív kontroll eredményezte a legnagyobb, 0,19±0,1 értéket, a γ_c -EGFP + γ_c -mCherry mintára egy köztes, de a negatív kontrollal összehasonlítva szignifikánsan magasabb, 0,14±0,14 dimer hányadot kaptunk. A modellfüggetlen becsléssel és a diffúziós modellhez történő illesztéssel kapott dimer/monomer koncentráció hányadosok tehát egyaránt a γ_c -lánc homodimerizációjára utalnak.

Végül meghatároztuk az ACF és CCF függvényekből a részecskék mobilitását (25CD és 26. ábra). Az összes minta ACF-jét és a kontrollok CCF-jeit két komponensű diffúziós modellel illesztettük. Az ACF-ekből származó gyors és lassú diffúziós együtthatók átlagértékei hasonlóak mind a kontrollok, mind a γ_c -EGFP + γ_c -mCherry minta esetében. Azonban a γ_c - γ_c dimer lassú komponensének hányadosa ($\rho_2 = 0,58$ és 0,85 a zöld és piros ACF-ből) sokkal nagyobb, mint a szolubilis kontrolloké (0,28–0,37), ami a γ_c alegységek lassabb diffúzióját mutatja a citoplazma membránrendszereiben. A γ_c - γ_c minta CCF-jének illesztéséhez egykomponensű modellt használtunk, mivel nem volt kimutatható gyors frakció, ami arra utal, hogy az összes γ_c dimer lassan diffundál. A CCF D értéke 0,12±0,08 µm²/s, ami hasonló az ACF lassú komponenséhez, amely D₂ = 0,13±0,03 és 0±11±0,04 µm²/s a két csatornában. A pozitív kontroll CCF-jét két komponenssel is lehetett illeszteni, ahol a lassú komponens D₂ értéke gyorsabb volt, 0,20±0,05 µm²/s, mint a γ_c dimeré, hányada pedig csak 0,52±0,26 volt. SPIM-FCCS méréseink megerősítették a γ_c dimerek vagy oligomerek létezését a citoplazmában, és bizonyították lassú ko-diffúziójukat.



26. ábra: Diffúziós paraméterek a SPIM-FCCS mérésekből. (A) EGFP-mCherry fúziós *fehérje*,
(B) *koexpresszált* EGFP + mCherry és (C) γ_c-EGFP + γ_c-mCherry minták. 1. oszlop:
transzmissziós és fluoreszcencia intenzitá képek; 2. oszlop: 2D térkép a gyors komponens diffúziós együtthatójáról és hozzá tartozó hisztogram; 3. oszlop: 2D térkép a lassú

komponens diffúziós együtthatójáról és hozzá tartozó hisztogram; 4. oszlop: a lassú komponens hányada. N=5 sejt, minden mintához.

6. Megbeszélés

Az IL-15 egy pleiotróp citokin, amely számos sejttípust és funkciót stimulál, azonban patológiás szerepet is játszik, több szervspecifikus immunbetegségben (58-60). Felmerül a kérdés, hogy a γ_c citokinek közül miért csak az IL-15R α /IL-15 alkalmazza a TP mechanizmusát. Az IL-15 TP olyan esetekben alakul ki, ahol az IL-15-re sejt-sejt kapcsolat kontextusában van szükség (8, 61). Az IL-15Rα/IL-15 komplex antigén-prezentáló (monocita, makrofág és dendritikus) sejtekben termelődik IFN-y, toll-like receptor (TLR) stimuláció, vagy CD40 ligandkötés hatására (17, 19, 62). Az IL-15 jelátvitel a legtöbb esetben más jelátviteli útvonalakkal, például a CD40/CD40L, TCR/antigén-MHC és CD28/CD86 komplexek által indukált jelátvitellel szimultán alakul ki, és az IL-15Rα/IL-15 más maga receptorokkal/ligandokkal koordináltan jelenik meg az APC-k felszínén (17, 63). Az IL-15 TP interakció elsősorban CD44^{hi} CD8⁺ memória T sejtek kialakulásában játszik fontos szerepet, amik az immunológiai memória fő funkcionális elemei (23, 64).

Egy másik színtéren az IL-15 TP elengedhetetlen a természetes ölő (NK) sejtek túléléséhez és proliferációjához. Megfigyelték, hogy az NK-sejtek nem alakultak ki olyan egerekben, amelyekben vagy az IL-15, vagy az IL-15R három alegysége közül akár egy is hiányzott. Ebben az esetben is IL-15R α /IL-15 jelenik meg a prezentáló sejteken, mint a stromasejtek és dendritikus sejtek, és alakítja ki az IL-15 TP-t a $\beta\gamma_c$ alegységeket expresszáló NK sejtekkel (65-67).

A Jabri és Abadie által felvetett harmadik funkcióként az IL-15 veszélyjelzőként működik, hogy ezzel szabályozza a szöveti rezidens T-sejteket és a szövetkárosodást (68). Az IL-15 a többi γ_c citokinnel összehasonlítva rendkívül széles előfordulással rendelkezik, hematopoietikus és egyéb sejttípusok is kifejezhetik. Az IL-15Rα/IL-15 ezekben a változatos szövetekben sejtfertőzéssel és steril gyulladással csakúgy indukálható, mint autoimmun betegségekben. Bármilyen legyen is az IL-15 rendszer, sejtkontaktusfüggő módon működik, gyakran a szöveti rezidens T-sejteket szabályozva (69). Az IL-15 által indukált effektor citotoxikus sejtek csak akkor működnek lokálisan, ha folyamatban van egy olyan aktív szöveti "vészjel", amit vagy fertőző, vagy nem fertőző stresszjel szabályoz. Így, amint azt Jabri és Abadie javasolta, a TP csak akkor segíti elő a citotoxikus T-sejtek szöveti pusztítását, ha a szövetek "ölj meg" jelzést adnak nekik. Bár egyes sejtszintű fertőzésekben ez a gazdaszervezet számára értékes, ez áll

olyan autoimmun betegségek hátterében is, mint a gluténérzékenység, az 1-es típusú cukorbetegség, a foltos hajhullás, a gyulladásos bélbetegség és a szarkoidózis (68).

Az IL-15 TP fent leírt szerepének fényében érdekes kérdés volt, hogy az IL-15 TP egy APC és egy T-sejt között autonóm módon, vagy csak az AP kísérőjeként fordulhat-e elő. Mind az IL-15 TP, mind az AP kritikusan függ a ligandok által vezérelt intercelluláris fehérje-fehérje kölcsönhatásoktól, és egy T-sejtes modellrendszerben korábban kimutattuk a két prezentáló fehérje, az IL-15Rα és az MHC II közötti kölcsönhatást (45, 46). Itt közvetlen bizonyítékot találtunk az IL-15 TP létrejöttére az IL-2/15Rβ és IL-15Rα alegységek asszociációjának vizsgálata révén, mind AP hiányában, mind annak jelenlétében.

Eredményeink szerint az IL-15R heterotrimer receptor csak akkor szerelődik össze, amikor az IL-15Rα a kötött IL-15-öt bemutatja az IL-2/15Rβγ_c komplexnek. Az IL-15 TP során mindegyik IL-15R alegység részben transzlokálódott az IS-ba, azonban – valószínűleg az expressziós arányok különbsége miatt – az alacsonyabban expresszált IL-2/15Rβ feldúsulása jelentősebbnek bizonyult, mint az IL-15Rα-é, és csak akkor következett be, amikor az IL-15 jelen volt. Az IL-15 jelátvitel hatékonyságának ellenőrzéséhez meghatároztuk a STAT5 foszforiláció szintjét a T-sejtekben. Az eredmények azt mutatták, hogy az IL-15 TP önmagában indukálja a JAK/STAT útvonalat, és ez a folyamat független az AP-tól. A Jurkat sejtek kifejezik az IL-2-t, ami autokrin vagy intrakrin módon indíthatja el a JAK/STAT jelet, ez magyarázhatja az emelkedett alap STAT5 foszforilációt kezeletlen, magányos T-sejtekben (47, 70). Érdekes jelenség, hogy amikor az AP az IL-15 TP-val párhuzamosan történt, az IL-2/15Rβ és az IL-15Rα alegységek közötti asszociáció növekedett; ez magyarázható az AP miatti erősebb IS és/vagy a korábban bemutatott MHC II és IL-15Rα együttállása révén, amit ezen a modellrendszeren is demonstráltunk. Kísérleteink igazolták az MHC II és IL-15Rα asszociációját az általunk használt Raji B-sejteken; ezek a molekulák együtt transzlokálódtak a szinaptikus területre, amikor IL-15 vagy antigén volt jelen. Ezenkívül azt találtuk, hogy amennyiben az MHC II kötötte az SEE szuperantigént, az IL-15Rα és az MHC II közötti FRET hatékonyság nemcsak a szinaptikus régióban, hanem az IS-on kívül, valamint a magányos B-sejteken is nőtt. Az SEE szuperantigén a cink-koordinált családba tartozik (71). Két MHC II kötőhelyet tartalmaz, így homodimerizációt, keresztkötést indukálhat (72); ez a szerkezetváltozás az MHC II/IL-15Ra komplex konformációs változásához vezethet, ami miatt a donor és az akceptor molekulák közelebb kerülhetnek egymáshoz. Viszont, mikor az AP mellett szimultán IL-15 TP, vagy csak

IL-15 ligandkötés is történik, az asszociáció mértéke csökken, E = 13%±2,1%-ról E = 9,3%±1,8%-ra IS-ben mérve, illetve E = 10,2%±3,5%-ról, E = 7,9%±2,7%-ra, IS-on kívül (18AB. ábra). Figyelemre méltó az is, hogy míg az MHC II klaszterekben jelenik meg JY B sejteken (73), addig a TCR monomerként van jelen T sejteken, véletlenszerű eloszlást mutatva (74, 75).

Az IL-15 TP-hoz hasonlóan közvetlen bizonyítékot szolgáltattunk az antigén-prezentációs komplex összeszerelésére is, CD3 és MHC II közötti intercelluláris FRET méréssel. A várakozásoknak megfelelően ezeknek a molekuláknak az asszociációja csak akkor következett be, amikor a B-sejteket SEE antigénnel kezeltük. Megvizsgáltuk a JAK/STAT jelátvitelt az AP során is, és megállapítottuk, hogy a STAT5 foszforilációja alacsony, de az alap foszforilációs szinthez képest szignifikáns mértékben nőtt. Ezt az IL-15 és a TCR jelátvitel átfedése okozza, az IL-15 esetében a STAT5-öt a JAK1 vagy JAK3 foszforilálja, míg a TCR-jelátvitel során ezt az Lck limfocita-specifikus tirozin-kináz (76) végzi. Ezzel szemben a CD3ζ alegység SEE által kiváltott foszforilációja (Lck-n keresztül) mérsékelten csökkent IL-15 TP egyidejű jelenlétében. Elképzelhető, hogy az IL-15R α és a $\beta\gamma_c$ heterodimer asszociációja gátolja az IL-15R α -hoz kapcsolódó MHC II és a TCR közötti kölcsönhatást, vagy esetleg intracellulárisan korlátozhatja a CD3ζ foszforilációs hely hozzáférhetőségét; ennek a jelenségnek a tisztázásához azonban további kutatásokra van szükség.

Modellrendszerünkben – hasonlóan az IL-15 TP résztvevőihez – az AP-ban résztvevő fehérjék is különböző expressziós szintekkel rendelkeztek. Ezért nem meglepő módon az alacsonyabb expresszióval rendelkező CD3 nagyobb mértékű transzlokációt mutatott az IS-ba, mint az MHC II. Az IL-2/15R β alegységhez hasonlóan a CD3 csak akkor dúsult fel a szinaptikus régióban, ha az MHC II antigént prezentált. A Kv1.3 káliumcsatorna döntő fontosságú a T-sejt aktivációjában, melynek a CD3-mal való ko-lokalizációját szintén kimutatták, csakúgy, mint feldúsulását az IS-ban (77, 78) Megvizsgáltuk, hogy az IL-2/15R β alegységek hasonló kapcsolatban voltak-e a TCR/CD3 komplexszel, mint az MHC II, az IL-15R α -val, FRET méréseink azonban nem mutattak szignifikáns cisz-asszociációt az IL-2/15R β és a CD3 között. Az MHC II – IL-15R α és az IL-2/15R β – CD3 együttmozgása a célsejten eltérő viselkedést mutat: az előbbi pár közösen transzlokálódik az IS-ba, míg az utóbbi kettő egymástól függetlenül.

Eredményeink azt sugallják, hogy az IL-15 TP az APC-k és a T-sejtek között nemcsak az AP kíséretében történhet meg, hanem önállóan is kialakulhat. Így az IL-15 transz-prezentációra

autonóm, önálló folyamatként tekinthetünk, ami hozzájárul a memória T sejtek túléléséhez, ha ezek a sejtek interakcióba lépnek IL-15-prezentáló sejtekkel az életciklusuk alatt.



27. ábra: Eredményeink összefoglalója: a transz- és cisz-interakciók molekuláris modellje, a transzlokáció mértéke és a jelátviteli hatékonyság

Eredményeinket az 27. ábrán foglaltuk össze. Az IL-15 TP és AP tehát autonóm folyamatok, melyek önmagukban vagy egyidejűleg is előfordulhatnak. Ha az egyik ligand (IL-15 vagy antigén) jelen van, a B és T sejtek megfelelő receptorai transzlokálódnak a szinapszisba, és sejt-sejt kölcsönhatást hoznak létre egy sejtközi fehérjekomplex kialakításával. A B-sejten lévő IL-15Rα és MHC II egymással konstans kapcsolatban állnak; így amikor a ligandot kötő fehérje transzlokálódik az IS-ba, a másik fehérje követi azt és szintén feldúsul ott. Ezzel szemben a T- sejten lévő IL-2/15R β és a CD3 nem lép kölcsönhatásba egymással; ezért csak az a fehérje kerül a szinapszisba, amelynek ligandját a B-sejt prezentálja, a másik fehérje pedig csak abban az esetben dúsul fel, ha a saját ligandja is jelen van az IS-ban. Az IL-15 TP önmagában is képes a T-sejtben jelátvitelt indukálni, és bár az IL-2/15R β és IL-15R α asszociációját az AP fokozza, az IL-15 TP által kiváltott JAK/STAT jelátvitel hatékonyságát nem befolyásolja. Szinergista hatás nem tapasztalható a TCR és az IL-15 jelátvitel között: sőt, az IL-15 TP kismértékben csökkenti az antigén-indukálta CD3ζ foszforilációt.

Az IL-15R heteromer szerkezete mellett homomer komplexeket is kimutattak, az IL-2/15Rβ alegység dimert is alkothat a sejtmembránban (27), ennek a funkciója azonban még nem tisztázott. A γ_c alegységről pedig kimutatták, hogy in vitro trimereket alkothat (28). SPIM-FCCS méréseink kimutatták a γ_c komplexek stabil asszociációját és ko-diffúziójukat az intracelluláris membránrendszerben. Méréseink azt is bizonyították, hogy a γ_c alegységek mobilitása hasonló a Golgi-rezidens fehérjékéhez, amiknek FRAP (54) és FCS kísérlettel is kimutatták anomális diffúzióját (55). Adataink alapján a γ_c láncok egy gyors és egy lassú diffúziós alpopulációval rendelkeznek, de a dimer/oligomer forma teljes mértékben a lassú populációhoz tartozott. Az ilyen komplexek diffúziós együtthatója (~0,1 µm²/s) hasonló volt az IL-2Rα és IL-15Rα alegységek (36, 56) plazmamembránban mért értékeihez, ami intracelluláris membrándiffúzióra utal. A monomer γ_c gyors frakciójának diffúziós együtthatója két nagyságrenddel magasabb volt, hasonlóan a szolubilis kontrollok: az EGFP, mCherry és EGFP-mCherry fúziós fehérjékéhez. Feltételezhetjük, hogy a γ_c láncok egy része nem membránhoz kötött formában létezik, pl. hibás folding miatt, a receptorlánc egy chaperon fehérjével komplexben lehet jelen, miközben a proteaszómákba szállítódik.

7. Összefoglalás

Az interleukin-15 kulcsszerepet játszik a T-sejtek és az immunológiai memória hosszú távú fenttartásában. Receptora három alegységből áll (IL-15Rα, IL-2/15Rβ, γ_c). Az IL-15 elsősorban transz-prezentáción (TP) keresztül működik, melynek során az IL-15-öt kötő IL-15Ra alegységet expresszáló antigén prezentáló sejt (APC) a βγc receptor-heterodimernek mutatja be a ligandumot egy szomszédos T/NK-sejten. A mai napig nincs közvetlen biofizikai bizonyíték az IL-15R heterotrimer intercelluláris összeszerelésére. Az antigén prezentáció (AP), a T-sejt aktiválásának kezdeti lépése szintén az APC-T-sejt kölcsönhatáson alapul. Felvetődik a kérdés, hogy az AP-nek van-e hatása az IL-15 TP-re, vagy független folyamatok. Raji B-sejt – Jurkat T-sejt modellrendszerünkben az IL-15 TP és AP receptor komplexek kialakulásakor tanulmányoztuk az inter/intracelluláris fehérje kölcsönhatásokat Förster rezonancia energiatranszfer mérésekkel. Ha a Raji-sejteket IL-15-tel előkezeltük, az IL-15Ra és IL-2/15Rβ feldúsulását tapasztaltuk a szinapszisnál és közöttük pozitív FRET-hatékonyságot mértünk, ami közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltat az IL-15 TP-ra. Az IL-15Rα és az MHC II komplexként jelenik meg, és együtt transzlokálódik az immunológiai szinapszisba, bármelyik ligandum jelenlétében. Ezzel szemben az IL-2/15Rβ és a CD3 egymástól független feldúsulást mutatott. Az IL-15 TP a Jurkat sejtekben STAT5 foszforilációt váltott ki, amit az AP nem befolyásolt. Tanulmányaink azt bizonyítják, hogy modellrendszerünkben az IL-15 TP és az AP önállóan is előfordulhat, és bár az AP fokozza az IL-15R összeszerelődést, nincs jelentős hatása az IL-15 jelátvitelre a TP során. Így az IL-15 TP autonóm, antigénfüggetlen folyamatnak tekinthető.

A heteromer komplexek mellett az IL-15 receptor alegységei homomerként is megjelenhetnek a sejtfelszínen. SPIM-FCCS mérések segítségével sikeresen kimutattuk az ilyen homomer komplexek létezését a γ_c alegység esetében. Az EGFP- γ_c és mCherry- γ_c expresszáló HeLa sejteket végzett kísérletek, a különböző jelöléssel ellátott alegységek asszociációját mutatták. Ezek az adatok azt is bizonyítják, hogy a homomer komplexek intracellulárisan alakulnak ki, és a citoplazmatikus membránkompartmenteken belül, a fehérjeszintézis alatt és után is ko-lokációt mutatnak.

8. Summary

Interleukin-15 plays a pivotal role in the long-term survival of T-cells and immunological memory. Its receptor consists of three subunits (IL-15R α , IL-2/15R β , γ_c). IL-15 functions mainly via trans-presentation, during which an APC expressing IL-15 bound to IL-15Ra presents the ligand to the $\beta\gamma_c$ receptor-heterodimer on a neighbouring T/NK cell. To date, no direct biophysical evidence for the intercellular assembly of the IL-15R heterotrimer exists. Antigen presentation (AP), the initial step of T-cell activation is also based on APC – T-cell interaction. We were compelled to ask whether AP has any effect on IL-15 TP, or they are independent processes. In our Raji B-cell – Jurkat T-cell model system we monitored inter/intracellular protein interactions upon formation of IL-15 TP and AP receptor complexes by Förster resonance energy transfer measurements. We detected enrichment of IL-15R α and IL-2/15R β at the synapse and positive FRET efficiency if Raji cells were pre-treated with IL-15, giving direct biophysical evidence for IL-15 TP. IL-15Ra and MHC II interacted and translocated jointly to the immunological synapse when either ligand was present, whereas IL-2/15Rβ and CD3 moved independently of each other. IL-15 TP initiated STAT5 phosphorylation in Jurkat cells, which was not further enhanced by AP. Conversely, IL-15 treatment attenuated antigeninduced phosphorylation of the CD3ζ chain. Our studies prove that in our model system IL-15 TP and AP can occur independently, and although AP enhances IL-15R assembly, it has no significant effect on IL-15 signalling during TP. Thus, IL-15 TP can be considered an autonomous, antigen-independent process.

In addition to the heteromeric complexes, the subunits of the IL-15 receptor may appear as homomers on the cell surface. With the help of SPIM-FCCS measurements, we successfully showed the existence of such homomeric complexes in the case of the γ_c subunit. The experiments, conducted on EGFP- γ_c and mCherry- γ_c expressing HeLa cells, indicated the association of the differently labelled subunits, as a dimer or even multimer complex. This data also proves, that the homomer complexes form intracellularly, and shows a joint motion within the cytoplasmatic membrane compartments, during and following the protein synthesis.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

- 1. Male, D., J. Brostoff, D. B. Roth, and I. Roitt. 2013. Immunology. *Elsevier*.
- 2. Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, and R. Gallo. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. DOI: 10.1126/science.181845.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* DOI: 10.1073/pnas.77.12.7415.
- Burton, J. D., R. N. Bamford, C. Peters, A. J. Grant, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler, and T. A. Waldmann. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.91.11.4935.
- Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh, and et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. DOI: 10.1126/science.8178155.
- 6. Rochman, Y., R. Spolski, and W. J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol.* DOI: 10.1038/nri2580.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman, and D. Anderson. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.*
- 8. Purton, J. F., J. T. Tan, M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J. Sprent, and C. D. Surh. 2007. Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med.* DOI: 10.1084/jem.20061805.
- 9. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol.* DOI: 10.1038/nri1901.
- 10. Wang, X., P. Lupardus, S. L. Laporte, and K. C. Garcia. 2009. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090616.
- 11. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol.* DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090727.
- 12. Marcais, A., J. Cherfils-Vicini, C. Viant, S. Degouve, S. Viel, A. Fenis, J. Rabilloud, K. Mayol, A. Tavares, J. Bienvenu, Y. G. Gangloff, E. Gilson, E. Vivier, and T. Walzer. 2014. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat Immunol.* DOI: 10.1038/ni.2936.
- Allez, M., J. Brimnes, I. Dotan, and L. Mayer. 2002. Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. DOI: 10.1053/gast.2002.36588.
- 14. Waldmann, T. A., and Y. Tagaya. 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.19.
- 15. Waldmann, T. A., S. Dubois, M. D. Miljkovic, and K. C. Conlon. 2020. IL-15 in the Combination Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00868.
- 16. Guo, S., R. B. Smeltz, A. Nanajian, and R. Heller. 2020. IL-15/IL-15Ralpha Heterodimeric Complex as Cancer Immunotherapy in Murine Breast Cancer Models. *Front Immunol.* DOI: 10.3389/fimmu.2020.614667.
- 17. Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2002. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity*. DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00429-6.

- Kobayashi, H., S. Dubois, N. Sato, H. Sabzevari, Y. Sakai, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya.
 2005. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood.* DOI: 10.1182/blood-2003-12-4187.
- 19. Mortier, E., T. Woo, R. Advincula, S. Gozalo, and A. Ma. 2008. IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med.* DOI: 10.1084/jem.20071913.
- Bergamaschi, C., J. Bear, M. Rosati, R. K. Beach, C. Alicea, R. Sowder, E. Chertova, S. A. Rosenberg, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 2012. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. *Blood.* DOI: 10.1182/blood-2011-10-384362.
- Tamzalit, F., I. Barbieux, A. Plet, J. Heim, S. Nedellec, S. Morisseau, Y. Jacques, and E. Mortier. 2014. IL-15.IL-15Ralpha complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* DOI: 10.1073/pnas.1405514111.
- 22. Mortier, E., J. Bernard, A. Plet, and Y. Jacques. 2004. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol.* DOI: 10.4049/jimmunol.173.3.1681.
- 23. Stonier, S. W., L. J. Ma, E. F. Castillo, and K. S. Schluns. 2008. Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation. *Blood.* DOI: 10.1182/blood-2008-05-156307.
- 24. Anton, O. M., M. E. Peterson, M. J. Hollander, D. W. Dorward, G. Arora, J. Traba, S. Rajagopalan, E. L. Snapp, K. C. Garcia, T. A. Waldmann, and E. O. Long. 2020. Transendocytosis of intact IL-15Ralpha-IL-15 complex from presenting cells into NK cells favors signaling for proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.1911678117.
- 25. Stonier, S. W., and K. S. Schluns. 2010. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett.* DOI: 10.1016/j.imlet.2009.09.009.
- 26. Rawlings, J. S., K. M. Rosler, and D. A. Harrison. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* DOI: 10.1242/jcs.00963.
- Zhu, M. H., J. A. Berry, S. M. Russell, and W. J. Leonard. 1998. Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1independent functional recruitment of Jak3 to II-2Rbeta. *J Biol Chem.* DOI: 10.1074/jbc.273.17.10719.
- 28. Molina, J. R., and A. A. Adjei. 2006. The Ras/Raf/MAPK pathway. J Thorac Oncol.
- 29. Xu, F., L. Na, Y. Li, and L. Chen. 2020. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* DOI: 10.1186/s13578-020-00416-0.
- 30. Liao, W., J. X. Lin, and W. J. Leonard. 2013. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity.* DOI: 10.1016/j.immuni.2013.01.004.
- 31. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* DOI: 10.1038/nri1148.
- 32. Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115839.
- 33. Bacso, Z., L. Bene, A. Bodnar, J. Matko, and S. Damjanovich. 1996. A photobleaching energy transfer analysis of CD8/MHC-I and LFA-1/ICAM-1 interactions in CTL-target cell conjugates. *Immunol Lett.* DOI: 10.1016/s0165-2478(96)02665-x.
- Lee, K. H., A. D. Holdorf, M. L. Dustin, A. C. Chan, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*. DOI: 10.1126/science.1067710.
- 35. Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. DOI: 10.1038/25764.

- 36. Delon, J., K. Kaibuchi, and R. N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity.* DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00231-x.
- 37. Freiberg, B. A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D. M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol.* DOI: 10.1038/ni836.
- 38. Panyi, G., G. Vamosi, A. Bodnar, R. Gaspar, and S. Damjanovich. 2004. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends Immunol.* DOI: 10.1016/j.it.2004.09.002.
- Papp, F., P. Hajdu, G. Tajti, A. Toth, E. Nagy, Z. Fazekas, S. Kovacs, G. Vamosi, Z. Varga, and G. Panyi. 2020. Periodic Membrane Potential and Ca(2+) Oscillations in T Cells Forming an Immune Synapse. *Int J Mol Sci.* DOI: 10.3390/ijms21051568.
- 40. Szilagyi, O., A. Boratko, G. Panyi, and P. Hajdu. 2013. The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse. *Pflugers Arch.* DOI: 10.1007/s00424-013-1256-6.
- 41. Cavanagh, M., and E. Gwyer Findlay. T-cell activation. *British Society for Immunology*.
- 42. Szollosi, J., S. Damjanovich, P. Nagy, G. Vereb, and L. Matyus. 2006. Principles of resonance energy transfer. *Curr Protoc Cytom.* DOI: 10.1002/0471142956.cy0112s38.
- 43. Krieger, J. W., A. P. Singh, N. Bag, C. S. Garbe, T. E. Saunders, J. Langowski, and T. Wohland. 2015. Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. *Nat Protoc.* DOI: 10.1038/nprot.2015.100.
- 44. Anton, O. M., S. Vielkind, M. E. Peterson, Y. Tagaya, and E. O. Long. 2015. NK Cell Proliferation Induced by IL-15 Transpresentation Is Negatively Regulated by Inhibitory Receptors. *J Immunol.* DOI: 10.4049/jimmunol.1500414.
- 45. Vamosi, G., A. Bodnar, G. Vereb, A. Jenei, C. K. Goldman, J. Langowski, K. Toth, L. Matyus, J. Szollosi, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.0403916101.
- Mocsar, G., J. Volko, D. Ronnlund, J. Widengren, P. Nagy, J. Szollosi, K. Toth, C. K. Goldman,
 S. Damjanovich, T. A. Waldmann, A. Bodnar, and G. Vamosi. 2016. MHC I Expression
 Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells. *Biophys J.* DOI: 10.1016/j.bpj.2016.05.044.
- Volko, J., A. Kenesei, M. Zhang, P. Varnai, G. Mocsar, M. N. Petrus, K. Jambrovics, Z. Balajthy, G. Muller, A. Bodnar, K. Toth, T. A. Waldmann, and G. Vamosi. 2019. IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Ralpha therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* DOI: 10.1073/pnas.1901382116.
- Nagy, E., G. Mocsar, V. Sebestyen, J. Volko, F. Papp, K. Toth, S. Damjanovich, G. Panyi, T. A. Waldmann, A. Bodnar, and G. Vamosi. 2018. Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells. *Biophys J.* DOI: 10.1016/j.bpj.2018.04.038.
- 49. Pillet, A. H., O. Juffroy, V. Mazard-Pasquier, J. L. Moreau, F. Gesbert, P. Chastagner, J. H. Colle, J. Theze, and T. Rose. 2008. Human IL-Rbeta chains form IL-2 binding homodimers. *Eur Cytokine Netw.* DOI: 10.1684/ecn.2008.0120.
- 50. Tron, L., J. Szollosi, S. Damjanovich, S. H. Helliwell, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. 1984. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys J.* DOI: 10.1016/S0006-3495(84)84240-X.
- 51. Szaloki, N., Q. M. Doan-Xuan, J. Szollosi, K. Toth, G. Vamosi, and Z. Bacso. 2013. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A*. DOI: 10.1002/cyto.a.22315.
- 52. Vamosi, G., N. Baudendistel, C. W. von der Lieth, N. Szaloki, G. Mocsar, G. Muller, P. Brazda, W. Waldeck, S. Damjanovich, J. Langowski, and K. Toth. 2008. Conformation of the c-Fos/c-

Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys J.* DOI: 10.1529/biophysj.107.120766.

- 53. Wahl, M. 2014. Time-Correlated Single Photon Counting. *PicoQuant Technical Note*.
- 54. Orthaus, S., V. Buschmann, A. Bülter, S. Fore, M. König, and R. Erdmann. 2009. Quantitative in vivo imaging of moleculardistances using FLIM-FRET. *PicoQuant Application Note.*
- 55. Krieger, J. W., and J. Langowski. 2015. QuickFit 3.0 (status: beta, compiled: 29 Oct 2015, SVN: 4465, accessed: 29 Oct 2015): A data evaluation application for biophysics. https://github.com/jkriege2/QuickFit3.
- 56. Krieger, J. W., A. P. Singh, C. S. Garbe, T. Wohland, and J. Langowski. 2014. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). *Opt Express*. DOI: 10.1364/OE.22.002358.
- 57. Pillet, A. H., V. Lavergne, V. Pasquier, F. Gesbert, J. Theze, and T. Rose. 2010. IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. *J Mol Biol.* DOI: 10.1016/j.jmb.2010.08.056.
- 58. Yokoyama, S., N. Watanabe, N. Sato, P. Y. Perera, L. Filkoski, T. Tanaka, M. Miyasaka, T. A. Waldmann, T. Hiroi, and L. P. Perera. 2009. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* DOI: 10.1073/pnas.0908834106.
- 59. Cepero-Donates, Y., G. Lacraz, F. Ghobadi, V. Rakotoarivelo, S. Orkhis, M. Mayhue, Y. G.
 Chen, M. Rola-Pleszczynski, A. Menendez, S. Ilangumaran, and S. Ramanathan. 2016.
 Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*.
 DOI: 10.1016/j.cyto.2016.01.020.
- Ciszewski, C., V. Discepolo, A. Pacis, N. Doerr, O. Tastet, T. Mayassi, M. Maglio, A. Basheer, L. Q. Al-Mawsawi, P. H. R. Green, R. Auricchio, R. Troncone, T. A. Waldmann, N. Azimi, Y. Tagaya, L. B. Barreiro, and B. Jabri. 2020. Identification of a gammac Receptor Antagonist That Prevents Reprogramming of Human Tissue-resident Cytotoxic T Cells by IL15 and IL21. *Gastroenterology*. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.10.006.
- 61. Schluns, K. S., E. C. Nowak, A. Cabrera-Hernandez, L. Puddington, L. Lefrancois, and H. L. Aguila. 2004. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.0307442101.
- Neely, G. G., S. M. Robbins, E. K. Amankwah, S. Epelman, H. Wong, J. C. Spurrell, K. K. Jandu, W. Zhu, D. K. Fogg, C. B. Brown, and C. H. Mody. 2001. Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis. *J Immunol.* DOI: 10.4049/jimmunol.167.9.5011.
- Zhang, M., B. Wen, O. M. Anton, Z. Yao, S. Dubois, W. Ju, N. Sato, D. J. DiLillo, R. N. Bamford, J. V. Ravetch, and T. A. Waldmann. 2018. IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.1811615115.
- 64. Sato, N., H. J. Patel, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2007. The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.0610115104.
- Huntington, N. D., N. Legrand, N. L. Alves, B. Jaron, K. Weijer, A. Plet, E. Corcuff, E. Mortier,
 Y. Jacques, H. Spits, and J. P. Di Santo. 2009. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med.* DOI: 10.1084/jem.20082013.
- 66. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002.
 Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.* DOI: 10.1084/jem.20010938.
- 67. Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele, and A. Diefenbach. 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.03.006.

- 68. Jabri, B., and V. Abadie. 2015. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol*. DOI: 10.1038/nri3919.
- 69. Castillo, E. F., and K. S. Schluns. 2012. Regulating the immune system via IL-15 transpresentation. *Cytokine*. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.06.017.
- Pawelec, G., A. Borowitz, P. H. Krammer, and P. Wernet. 1982. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. *Eur J Immunol.* DOI: 10.1002/eji.1830120506.
- 71. Rodstrom, K. E., P. Regenthal, and K. Lindkvist-Petersson. 2015. Structure of Staphylococcal Enterotoxin E in Complex with TCR Defines the Role of TCR Loop Positioning in Superantigen Recognition. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0131988.
- 72. Al-Daccak, R., K. Mehindate, F. Damdoumi, P. Etongue-Mayer, H. Nilsson, P. Antonsson, M. Sundstrom, M. Dohlsten, R. P. Sekaly, and W. Mourad. 1998. Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors. *J Immunol.*
- 73. Jenei, A., S. Varga, L. Bene, L. Matyus, A. Bodnar, Z. Bacso, C. Pieri, R. Gaspar, Jr., T. Farkas, and S. Damjanovich. 1997. HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.94.14.7269.
- Brameshuber, M., F. Kellner, B. K. Rossboth, H. Ta, K. Alge, E. Sevcsik, J. Gohring, M. Axmann,
 F. Baumgart, N. R. J. Gascoigne, S. J. Davis, H. Stockinger, G. J. Schutz, and J. B. Huppa. 2018.
 Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition. *Nat Immunol.* DOI: 10.1038/s41590-018-0092-4.
- 75. Rossboth, B., A. M. Arnold, H. Ta, R. Platzer, F. Kellner, J. B. Huppa, M. Brameshuber, F. Baumgart, and G. J. Schutz. 2018. TCRs are randomly distributed on the plasma membrane of resting antigen-experienced T cells. *Nat Immunol.* DOI: 10.1038/s41590-018-0162-7.
- 76. Welte, T., D. Leitenberg, B. N. Dittel, B. K. al-Ramadi, B. Xie, Y. E. Chin, C. A. Janeway, Jr., A. L. Bothwell, K. Bottomly, and X. Y. Fu. 1999. STAT5 interaction with the T cell receptor complex and stimulation of T cell proliferation. *Science*. DOI: 10.1126/science.283.5399.222.
- 77. Panyi, G., M. Bagdany, A. Bodnar, G. Vamosi, G. Szentesi, A. Jenei, L. Matyus, S. Varga, T. A. Waldmann, R. Gaspar, and S. Damjanovich. 2003. Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.0438057100.
- 78. Panyi, G., G. Vamosi, Z. Bacso, M. Bagdany, A. Bodnar, Z. Varga, R. Gaspar, L. Matyus, and S. Damjanovich. 2004. Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.0307421100.

9.2. Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: Tárgy:

DEENK/231/2022.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kenesei Ádám Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Kenesei, Á., Volkó, J., Szalóki, N., Mocsár, G., Jambrovics, K., Balajthy, Z., Dóczy-Bodnár, A., Tóth, K. Á., Waldmann, T. A., Vámosi, G.: IL-15 Trans-Presentation Is an Autonomous, Antigen-Independent Process. *J. Immunol. 207* (10), 2489-2500, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2100277 IF: 5.422 (2020)

 Volkó, J., Kenesei, Á., Zhang, M., Várnai, P., Mocsár, G., Petrus, M. N., Jambrovics, K., Balajthy, Z., Müller, G., Dóczy-Bodnár, A., Tóth, K., Waldmann, T. A., Vámosi, G.: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2R[alfa] therapies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116* (42), 21120-21130, 2019.

DOI: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1901382116 IF: 9.412





DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

 Borbásné Sebestyén, V., Nagy, É., Mocsár, G., Volkó, J., Szilágyi, O., Kenesei, Á., Panyi, G., Tóth, K. Á., Hajdu, P., Vámosi, G.: Role of C-Terminal Domain and Membrane Potential in the Mobility of Kv1.3 Channels in Immune Synapse Forming T Cells. *Int. J. Mol. Sci. 23* (6), 1-16, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms23063313 IF: 5.923 (2020)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,757 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 14,834

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.04.29.



10. Tárgyszavak

IL-15 receptor, transz-prezentáció, antigénprezentáció, T-sejt aktiváció, homodimer, Förster rezonancia energiatranszfer, fluoreszcencia életidő mikroszkópia, egysík megvilágítású mikroszkópia, fluoreszcencia kereszt-korrelációs spektroszkópia

11. Keywords

IL-15 receptor, trans-presentation, antigen presentation, T cell activation, homodimer, Förster resonance energy transfer, fluorescence lifetime imaging microscopy, single plane illumination microscopy, fluorescence cross-correlation spectroscopy

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vámosi Györgynek, hogy PhD hallgatóként segített elsajátítani a helyes kutatás metodikai alapjait, ötletei és tanácsai rendkívüli támogatást biztosítottak. Továbbá szeretném megköszönni, hogy tanulhattam és a kutatócsoport tagjaként hozzájárulhattam a csoport kutatási tevékenységéhez.

Köszönettel tartozom a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatóinak, Prof. Dr. Panyi Györgynek és Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy intézetükben elsajátíthattam számos biofizikai módszert.

Köszönöm Dr. Volkó Juliannának a TDK hallgatóként eltöltött közel 5 év alatti témavezetését, amely során szinte felsorolhatatlan módszert segített elsajátítani az alapvető laboratóriumi munka mellett. Külön köszönetet érdemel türelme, amit személyiségemmel sűrűn próbára tettem.

Köszönöm a munkacsoportunk asszisztensének, Nagy Edinának a TDK hallgató korom óta tartó önzetlen segítségét és fáradhatatlan munkáját.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk jelenlegi és korábbi tagjainak, kiemelve Dr. Mocsár Gábort, Dr. Szalóki Nikolettát, Dr. Hegedűs Évát, Dr. Lina Fadelt és Dr. Rehó Bálintot.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet minden munkatársának, külön kiemelve Dr. Szendi-Szatmári Tímeát, Dr. Erfaneh Firouzi Niakit és Gyöngy Zsuzsannát, a szakmai és személyes támogatásukat.

Köszönöm Dr. Jambrovics Károlynak és Dr. Balajthy Zoltánnak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetből, a hozzáértő és gyors segítségüket.

Köszönettel tartozom a németországi kollaborációs partnereinknek, Prof. Dr. Jörg Langowskinak és Dr. Tóth Katalinnak szakmai támogatásukért, valamint Gabriele Müllernek a technikai segítségért, amit a Német Rákkutató Központban biztosítottak.

Köszönöm Prof. Dr. Thomas A. Waldmann-nak a rendkívül szakavatott tanácsait, ötleteit.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak, amely nélkül nem juthattam volna el idáig.

13. Függelék