

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **Interleukin receptorok összeszerelődése és működése az endoplazmatikus retikulumtól a sejtmembránig**

**Volkó Julianna**

**Témavezetők: Dr. Vámosi György  
Prof. Dr. Damjanovich László**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2019**

## TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. T limfociták .....	7
2.2. IL-2 és IL-15 citokinek.....	10
2.3. Felnőttkori T-sejtes Leukémia/Limfóma.....	22
2.4. Szekretált és plazmamembrán-fehérjék vezikuláris transzportja .....	23
2.5. MHC fehérjék.....	23
2.6. Fehérjeklaszterek a sejtmembránban.....	25
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	28
4.1. Felhasznált oldatok listája .....	28
4.2. Sejttenyésztés.....	28
4.3. Géncsendesítés RNS interferenciával.....	29
4.4. Plazmidok .....	30
4.5. Klónozás .....	32
4.6. Kompetens sejtek preparálása .....	34
4.7. <i>Escherichia coli</i> transzformálás.....	35
4.8. Plazmid tisztítás.....	35
4.9. Tranziens transzfekeció.....	35
4.10. Retrovirális transzdukció, stabil sejtvonalak létrehozása .....	36
4.11. Antitestek jelölése fluoreszcens festékekkel.....	37
4.12. HeLa-IL-2R $\alpha$ , HeLa- $\beta$ és HeLa- $\gamma_c$ sejtek immunfluoreszcens jelölése.....	38
4.13. FT7.10 sejtek immunfluoreszcens jelölése.....	38
4.14. Kolokalizáció meghatározása konfokális mikroszkópiával.....	39
4.15. FRET hatásfok meghatározása konfokális mikroszkópiával.....	40
4.16. FRET hatásfok meghatározása áramlási citometriával.....	42
4.17. Golgi izolálás ATL sejtekből.....	43
4.18. Fehérjék kimutatása Golgi izolátumokban Western-blot technikával.....	44
4.19. Statisztikai elemzés.....	45
5. EREDMÉNYEK.....	46
5.1 IL-2/15 receptorok intracelluláris összeszerelődése.....	46
5.1.1. A ko-transzfekektált IL-2/15 receptor alegységek részleges kolokalizációt mutatnak az ER és a Golgi területén.....	46

5.1.2.	A konfokális mikroszkópiás FRET mérések során alkalmazott kontrollok.....	53
5.1.3.	Az IL-2/15R $\beta$ lánc asszociál a $\gamma_c$ alegységgel az ER-ben és a Golgi-ban.....	55
5.1.4.	Az IL-2/15R $\beta$ alegység részlegesen asszociál az IL-2R $\alpha$ -val és az IL-15R $\alpha$ -val a szekréciós útvonalon, mielőtt teljesen összeszerelődnek a sejtfelszínen .....	56
5.1.5.	Az IL-2R $\alpha$ és IL-15R $\alpha$ közös klaszterei.....	58
5.1.6.	A $\gamma_c$ alegység homoasszociációja az ER-ben és a Golgi-ban.....	59
5.1.7.	A FRET hatásfokának függése az akceptor/donor aránytól.....	61
5.1.8.	Sejtorganellumok átfedését vizsgáló kontroll mérések .....	61
5.1.9.	ATL sejtek proliferációjának gátlása anti-IL-2R $\alpha$ és anti-IL-2 antitestek alkalmazásával .....	63
5.1.10.	IL-2 jelátvitel az ATL sejtek Golgi apparátusában .....	64
5.2.	Sejtfelszíni MHC I - IL-2R fehérjeklaszterek részleges szétszerelődése .....	66
5.2.1.	Az IL-2/15 receptorok és az MHC glikoproteinek plazmamembránbeli expressziója az MHC I géncsendesítése előtt és után .....	66
5.2.2.	Az MHC I/IL-2R $\alpha$ /IL-15R $\alpha$ klaszterek részleges szétszerelődése, az MHC I homo- és heteroasszociációk mértékének csökkenése .....	67
5.2.3.	A FRET hatásfok függése a donor- és akceptor-jelölt fehérjék expressziós szintjétől .....	68
6.	MEGBESZÉLÉS.....	70
6.1.	Az IL-2/15 receptorok intracelluláris összeszerelődése .....	70
6.2.	A sejtfelszíni MHC I - IL-2R fehérjeklaszterek részleges szétszerelődése.....	75
7.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	76
8.	SUMMARY .....	77
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	78
9.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	78
9.2.	Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények .....	88
9.3.	Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek.....	90
10.	TÁRGYSZAVAK.....	92
11.	KEYWORDS .....	92
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	93
13.	FÜGGELÉK.....	94

## Az értekezésben gyakran előforduló rövidítések jegyzéke (angol-magyar)

AICD	activation induced cell death – aktiváció-indukálta sejthalál
AP-1	activator protein-1 – aktivátor fehérje-1
APC	antigen presenting cell – antigénprezentáló sejt
ATL	adult T cell leukemia/lymphoma – felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma
BFP	blue fluorescent protein – kék fluoreszcens fehérje
CD25	IL-2R $\alpha$ – az interleukin-2 receptor $\alpha$ alegysége
CRE	cAMP responsive element – cAMP/ciklikus adenzin-monofoszfát válaszelem
CREB	cAMP responsive element binding protein – cAMP válaszelem-kötő fehérje
CREM	cAMP responsive element modulator protein – cAMP válaszelem modulátor
EGFP	enhanced green fluorescent protein – fokozott kifejeződésű zöld fluoreszcens fehérje
ER	endoplasmic reticulum – endoplazmatikus retikulum
FRET	Förster resonance energy transfer – Förster típusú rezonancia energiatranszfer
GPI	glycosylphosphatidylinositol – glikozilfoszfatidilinozitol
HAT	humanized anti-Tac – humanizált anti-Tac antitest
HBSS	Hanks' balanced salt solution – Hank-féle pufferolt sóoldat
HTLV-1	human T-cell lymphotropic virus I – humán T-sejt leukémia 1-es vírus
IL-2 (R)	interleukin-2 (receptor)
IL-15 (R)	interleukin-15 (receptor)
IFN	interferon
JAK	Janus kinase – Janus arcú kináz
LB	Luria-Bertani agar or medium – Luria-Bertani agar vagy tápfolyadék
MAPK	mitogen-activated protein kinase – mitogén-aktivált protein kináz
MHC I	major histocompatibility complex I – I. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekula
NFAT	nuclear factor of activated T-cells – aktivált T sejt nukleáris faktor
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells – aktivált B sejt nukleáris faktor kappa-könnyű-lánc-enhancer
NK (cell)	natural killer (cell) – természetes ölüsejt

PBS	phosphate buffer solution – foszfátpuffer oldat
PCR	polymerase chain reaction – polimeráz lánreakció
PI-3K	phosphoinositol-3-kinase – foszfoinozitol-3-kináz
siRNA	small interfering ribonucleic acid – kis interferáló ribonukleinsav
STAT	signal transducer and activator of transcription – jelátviteli és transzkripció aktivátor fehérje
TCR	T cell receptor – T sejt receptor
T <sub>c</sub> (cell)	cytotoxic T (cell) – citotoxikus T sejt
T <sub>h</sub> (cell)	helper T (cell) – helper/segítő T sejt
TNF	tumor necrosis factor – tumor nekrozis faktor
T <sub>reg</sub> (cell)	regulatory T (cell) – regulátoros/szabályozó T sejt

## 1. BEVEZETÉS

A T-sejtes immunitásban nélkülözhetetlenek az interleukin-2 és -15 citokinek, melyek központi szerepet játszanak az immunrendszer szabályozásában. Kontrollálják a limfociták túlélését és apoptózisát, meghatározó jelentőségűek különböző neopláziákban és autoimmun betegségekben. Ezen citokinek plazmamembránban kifejeződő receptorai a T sejt proliferáció gátlására irányuló – antiproliferatív – antitest terápiák célpontjai. Dolgozatom fő témája e terápiák sclerosis multiplex-ben és felnőttkori T-sejtes leukémiában való korlátozott hatékonyságának háttérben rejlő okok felfedése, az interleukin receptorok intracelluláris vizsgálata által. Munkám során sikerült kimutatni a receptorok összeszerelődését a szintézisüket követően már az endoplazmatikus retikulum, majd a szekréción ut következő állomásán, a Golgi területén is. Az összeszerelődés ugyan részleges, de a receptorok funkcionálisak, hatékony jelátvitelre képesek a vizsgált organellumban, az IL-2-t termelő sejtekben a citokin az intracellulárisan összeszerelődött receptorokat aktiválhatja és beindíthatja a jelátvitelt. Ez az eddig még felfedezetlen, általunk leírt, új autokrin jelátviteli mechanizmus magyarázatot adhat a sejtfelszínen kifejeződő receptorokat célzó antiproliferatív antitest terápiák hatástalanságára.

Az interleukin receptorok egy másik megközelítésben való vizsgálatát is bemutatom dolgozatom második részében, ami a T sejtek plazmamembránjában létrejövő szupramolekuláris mintázatokban kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatásokról számol be, rávilágítva a klaszterizációs sajátságok alakulására a legnagyobb mennyiségben kifejeződő tag expressziójának megváltoztatásával. S bár magukat a receptorláncokat összetartó kölcsönhatások nem függnék kritikusan a csökkent kifejeződésű fehérje jelenlététől, a klasztert alkotó fehérjék közötti kölcsönhatások átrendeződése hatással lehet a receptor komplexek jelátvivő tulajdonságaira.

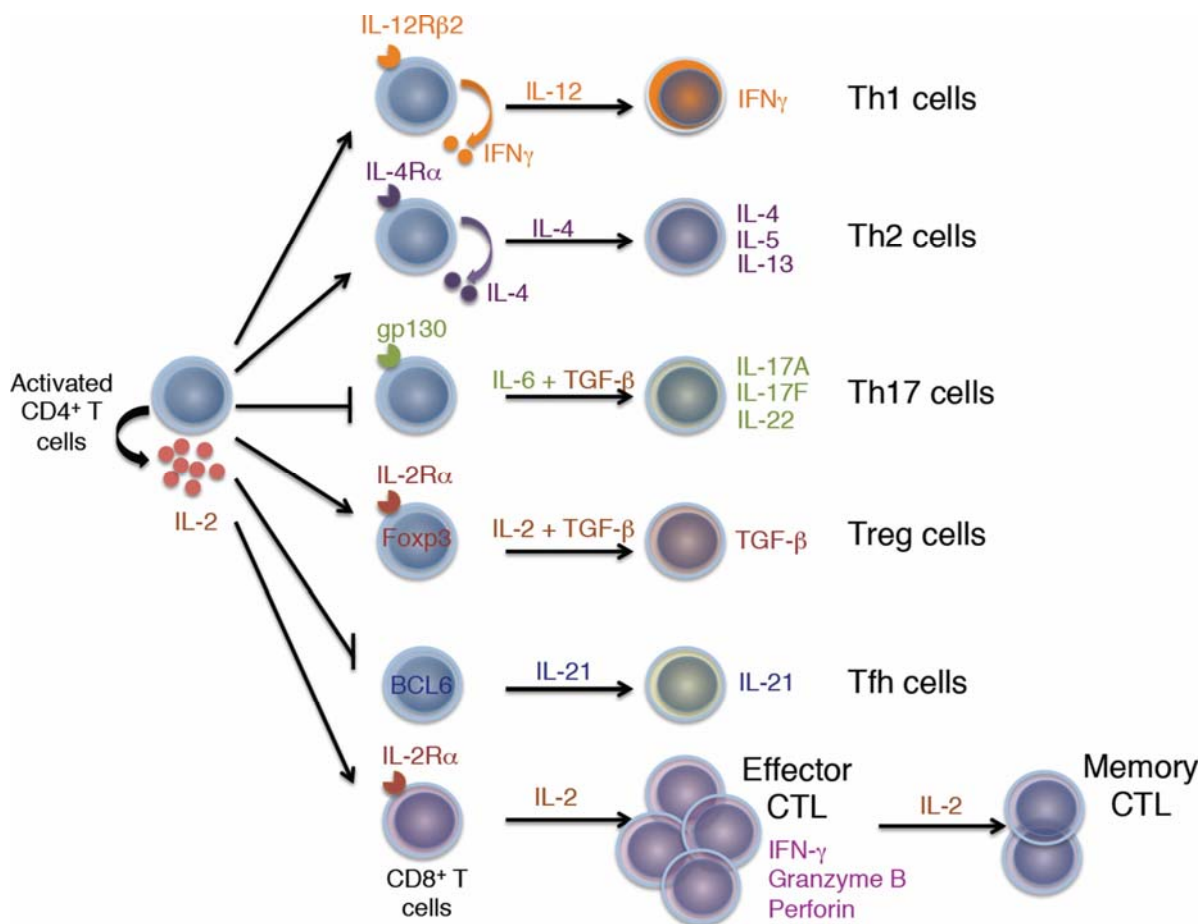
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. T limfociták

Az adaptív immunválaszokban alapvetően az immunrendszer kétféle limfocitája, a B és a T limfociták vesznek részt, melyek kitüntetett képessége az antigének sokaságának felismerése. Utóbbiak a csontvelői hemopoetikus őssejtekből származó, majd a tímuszban (csecsemőmirigyben) fejlődő naiv T limfociták („tímusz dependens limfociták”) vagy röviden T sejtek, a celluláris immunválasz meghatározó résztvevői [1].

Az érett, naiv T sejtek halmozódási helyük, jellemző sejtfelszíni molekuláik és az effektor folyamatokban betöltött szerepük alapján különböző alpopulációkba sorolhatók. A tímuszt elhagyó, érett,  $\alpha\beta$  TCR-t (T sejt receptort) hordozó limfociták két, jól elkülöníthető alcsoportba oszthatók: az egyik a CD4 koreceptorral rendelkező, meghatározott citokinek termelésére képes helper vagy „segítő” T limfociták ( $T_h$  sejtek), a másik a CD8-at hordozó, sejtpusztító aktivitással rendelkező citotoxikus effektor T limfociták (CTL vagy  $T_c$  sejtek) csoportja. A klasszikus  $T_h$  és  $T_c$  sejtek mellett egyéb, különleges fenotípussal rendelkező alpopulációk is léteznek. Ide sorolhatók a  $\gamma\delta$  TCR-t kifejező, általában citotoxikus aktivitással rendelkező limfociták és a klasszikus populációktól eltérő sejtfelszíni molekulákat hordozó egyéb T limfociták [2].

A  $CD4^+$  helper T sejtek az MHC II (fő hisztokompatibilitási komplex II. osztályába tartozó fehérje) molekulákkal asszociált exogén eredetű, idegen fehérjékből származó peptideket ismerik fel. A  $T_h0$  sejtekből az aktivációs ingerek hatására  $T_{h1}$ ,  $T_{h2}$ ,  $T_{h17}$ ,  $T_{reg}$  vagy  $T_{fh}$  típusú effektor sejtek differenciálódnak, amelyek működését jellegzetes limfokin mintázat jellemzi (1. ábra). Ezek a sejtek az általuk termelt citokinek révén szabályozzák az immunválasz jellegét, effektor folyamatait.



**1. ábra: Az IL-2 jelentősége a különböző effektor T sejt differenciációban [3]**  
 (activated CD4<sup>+</sup> T cells: aktivált CD4<sup>+</sup> T sejtek, IFN $\gamma$ : interferon- $\gamma$ , TGF $\beta$ : tumor nekrozis faktor- $\beta$ , Effector CTL: effektor citotoxikus T limfocita, Memory CTL: memória T sejt, IL: interleukin)

A T<sub>h</sub>1 sejt differenciációhoz esszenciális az IL-12 (interleukin-12) citokin és a STAT4 transzkripció faktor. Ezek a sejtek főként IFN $\gamma$ -t (interferon- $\gamma$ ), TNF $\alpha$ -t és TNF $\beta$ -t (tumor nekrozis faktor  $\alpha$  és  $\beta$ ) termelnek és nagy mennyiségben saját növekedési faktorukat, az interleukin-2-t (IL-2) is expresszálják. Elsősorban a késői típusú túlérzékenységi reakció kiváltásáért és a citotoxikus T limfociták aktiválásáért felelősek. A T<sub>h</sub>1 sejtek aktiválódása gyulladással és szöveti károsodással jár együtt [4]. A T<sub>h</sub>2 sejtek csekély mennyiségben termelnek IL-2-t (növekedési és differenciálódási faktorként leginkább IL-4-et szecernálnak), a más forrásból származó IL-2 azonban stimulálja osztódásukat. Az IL-4 mellett termelnek IL-5-öt és IL-13-at. Ezek a limfociták az ellenanyag-termelés fő segítői.

A T<sub>h</sub>1 és T<sub>h</sub>2 típusú CD4<sup>+</sup> T sejteken kívül megkülönböztetünk további alcsoportokat, a T<sub>h</sub>17 sejtek, T<sub>h</sub> sejtek és a T<sub>reg</sub>-ek (regulátoros T sejtek) csoportját.

A  $T_{h17}$  sejtek naiv  $CD4^+$  T sejtekből differenciálódnak IL-6 és TGF $\beta$ 1 (transzformáló növekedési faktor  $\beta$ 1) hatására, IL-17 és IL-22 citokineket termelnek és a ROR $\gamma$ t (retinoid-related orphan receptor- $\gamma$ t) receptort expresszálják. Az IL-17 a fibroblasztokon, epitél sejteken vagy keratinocitákon megjelenő IL-17 receptorhoz kötődik, mely által olyan citokinek termelését indukálja, amik gyulladást okozó sejteket rekrutálnak. Autoimmun betegségek esetén – Crohn betegség, reumatoid arthritis, psoriasis – a  $T_{h17}$  sejtek felhalmozódnak az érintett szövetekben, ahol a jelenlévő T sejteknek akár a 30%-át is képviselhetik. Egészséges emberekben pro-inflammatorikus szerepük van a fertőzés során bekövetkező adaptív immunválaszban. [1]. Alternatív úton, IL-6, IL-1 $\beta$  és IL-23 hatására is differenciálódhatnak  $T_{h17}$  sejtek [5]. Az IL-2-nek összetett hatása van: bár a  $T_{h17}$  irányú differenciációt gátolja [6], de ha már differenciálódtak a sejtek, elősegíti expanziójukat. HIV-1 fertőzött felnőttek IL-2 kezelése például hozzájárul a perifériás  $T_{h17}$  sejtek számának fenntartásához [7].

A  $T_{fh}$  fenotípussal rendelkező (follikuláris helper T) sejtek differenciálódásához IL-6 és IL-21 szükséges, utóbbi citokint maguk is szekretálják; a csíráközpontokban található, a B sejt ellenanyagok izotípusváltását és affinitásérését segítik elő [8]. Az IL-2 gátolja a differenciálódásukat és a germinális centrum kialakulását [9], így kritikus faktornak tekinthető mind a  $T_{fh}$  sejtek fejlődésében, mind pedig a B sejt közvetítette immunválaszokban [10].

A  $T_{reg}$ -eket a többi helper T sejtől megkülönbözteti az IL-2R $\alpha$  (CD25) sejt felszíni expressziója és a „forkhead-winged-helix” családba tartozó FoxP3 transzkripciós represszor protein kizárólagos használata [1]. Annak ellenére, hogy a  $T_{reg}$ -ek felhasználják az IL-2 ligandot és nagy mennyiségben expresszálják a CD25-öt, ezek a sejtek IL-2-t nem termelnek [11]. Az önreaktív immunválaszok szabályozóiként, a perifériás immuntolerancia fenntartásában alapvető szereppel bírnak, az egészséges emberben a  $CD4^+$  T sejt populáció 5-10%-át képviselik. A tímusz-eredetű természetes  $T_{reg}$  sejtek mellett a naiv perifériás  $CD4^+$  T sejtek is  $CD4^+$ FoxP3 $^+$  - indukálható  $T_{reg}$  sejtekké válhatnak anti-CD3, TGF $\beta$  és IL-2 stimuláció hatására, ahol kialakulásukat és expanziójukat tekintve az IL-2 mellett az IL-15 is kritikus szereppel bír [12-14].

A különböző  $T_{h}$  sejt populációkra kifejtett hatásain túl, az IL-2 a naiv  $CD8^+$  T sejtek effektor és memória  $T_c$  limfocitákká történő fejlődését is elősegíti, fertőzés vagy gyulladás általi antigénstimulációval [15]. A  $CD8^+$  T sejtek MHC I molekulákkal asszociált, főként endogén eredetű fehérjékből származó peptideket ismernek fel. Legfontosabb funkciójuk a vírussal fertőzött és a tumor sejtek elpusztítása. Kis mennyiségben maguk is termelik a szaporodásukhoz szükséges IL-2-t, de az általuk termelt citokin mennyisége nem elegendő a sejtproliferáció

biztosításához, ezért osztódásukhoz és érésükhöz a  $T_{h1}$  sejtek közreműködése is szükséges, azonban érésük a  $T_{h1}$  sejtektől függetlenül is végbemehet.

A limfociták egy része az NK sejt markerként ismert NK1 molekulát és a T sejt receptort is kifejezi. A perifériás T sejtek 5-15%-a tartozik ebbe a típusba, többségük CD4-koreceptort és csekély változatosságot mutató  $\alpha\beta$  TCR-t hordoz. Ezen NKT vagy NT (természetes T) sejtek CD28 koreceptortól és IL-2-től függő aktiválódása általában nagymértékű IL-4 termeléssel jár. Emellett  $IFN\gamma$ -t is termelnek, így immunfolyamatokat szabályozó funkciójuk elsősorban apoptózist indukáló, ill. a  $T_{h1}$  és  $T_{h2}$  sejtek fejlődését befolyásoló tulajdonságukkal függ össze.

Az autoreaktív T sejtek és a funkcionálisan szükségtelenné vált (pl. a rövid életű effektor T) sejtek is apoptózis útján távolítódnak el, amit a TCR útján közvetített jelek vagy éppen azok hiánya idézhet elő. Az immunválasznak abban a szakaszában, amikor az antigén még nagy koncentrációban van jelen, a T limfociták ismételt, hosszantartó antigén-specifikus aktiválása aktivációindukált sejthalálhoz (AICD) vezet. Az AICD az érett  $CD4^+$  T sejtekre jellemző, a FAS receptor (a halálreceptorok családjába tartozó apoptózis antigén 1 (APO-1) vagy CD95) és (annak ligandja) a FASL (CD95L) együttes megjelenésétől, továbbá nagy mennyiségű IL-2 szekréciójától függ. Az IL-2 tehát a T sejtek túlélését és proliferációját elősegítő citokin, de az AICD-hez is nélkülözhetetlen [2].

## **2.2. IL-2 és IL-15 citokinek**

Az I-es típusú citokinek családjába tartozó interleukin-2 szerkezetileg négy alfa hélixet tartalmazó [16], 15,5 kDa tömegű glikoprotein, melyet 1976-ban fedeztek fel, mint a csontvelői eredetű T limfociták növekedési faktorát [17]. A citokincsaládból elsőként klónozták génjét 1983-ban [18], illetve receptorának génjét egy évvel később [19, 20], majd kristályszerkezetét 1992-ben határozták meg [16].

Az interleukin-15-öt egymástól függetlenül 2 kutatócsoport is azonosította 18 évvel az IL-2 felfedezése után, azon sajátosága alapján, hogy az IL-2-függő CTLL-2 T-sejtvonal proliferációját neutralizáló anti-IL-2 antitestek jelenlétében is stimulálja [21]. Az egyik csoport majom vese epitél sejtvonal felülűszójából tisztította és IL-15-nek nevezte el [22], míg egy másik kutatócsoport egy humán T-sejt leukémia 1-es vírusos (HTLV-1) sejtvonal, a HuT-102 felülűszójából nyerte ki és azonosította, majd IL-T néven írta le [23, 24].

Az IL-2-t elsősorban  $CD4^+$  T limfociták termelik az antigén stimulációt követően [25], de kisebb mennyiségben  $CD8^+$  T sejtek [26], NK T sejtek [27], aktivált dendritikus sejtek [28] és

hízósejtek [29] is szekretálják, makrofágok azonban egyáltalán nem [30]. Egyaránt tekinthető autokrin és parakrin növekedési faktornak, mivel visszahat az őt termelő sejtre, de ugyanakkor a környezetében lévő más T sejtek növekedését is elősegíti. Emellett pleiotrop hatást fejt ki más sejttípusokra, pl. növeli az NK sejtek citolitikus aktivitását vagy elősegíti a B sejtek immunglobulin termelését [31].

Míg az IL-15 kiemelkedő jelentőségű a konvencionális  $T_h$  sejtek túlélésében és proliferációjában [32], az IL-2 közvetítette szignálok a CTL-eken és  $T_h$  sejteken kifejtett hatásain túl, a  $T_{reg}$ -ek homeosztázisának fenntartásához esszenciálisak [33]. Az IL-2 fő szerepe *in vivo* a  $T_{reg}$ -ek fejlődésének és homeosztázisának mediálásában, ezáltal a perifériás immuntolerancia fenntartásában nyilvánul meg, a tímuszbeli éréshez nem esszenciális. A B sejtek proliferációjának és ellenanyag-termelésének elősegítésében az IL-2 és az IL-15 is szerepet játszik. Mindkét citokin stimulálja az NK sejtek fejlődését és proliferációját is [34]. Az AICD folyamatát az IL-2 elősegíti, míg az IL-15 gátolja azt [35]. Utóbbi citokin ugyanakkor a  $CD8^+$  memória T sejtek túlélésében is meghatározó faktor [36].

IL-15-öt termelnek a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, sztróma sejtek és néhány epitél sejt [36]. Ezen citokin transzkripciója, translációja és szekréciója sokrétű, komplex mechanizmusok által szabályozott [37, 38]. Receptorának alfa alegységével együtt szimultán ko-expresszálják az aktivált monociták és dendritikus sejtek [21]. A citokin az endoplazmatikus retikulumban hozzákötődik az IL-15 $R\alpha$ -hoz aztán együtt transzportálódnak a sejtfelszínre [39], lehetővé téve a transzprezentációt (*lásd később*). Az alternatív splicing során kétféle humán IL-15 mRNS izoforma jön létre, melyek két citokin izoformát kódolnak, a szignálpeptidjük hosszából adódó eltéréssel [40]. A rövid (21 aminosavas) szignálpeptiddel rendelkező IL-15 intracelluláris, sejten belüli szabályozó szerepet tölthet be vagy sérülés esetén a felszínre kerülhet, mint stressz citokin. Ezzel szemben a hosszú (48 aminosavas) szignálpeptiddel rendelkező belép az ER-be és a vezikuláris transzport során az IL-15 $R\alpha$ -val együtt a sejtfelszínre exportálódik.

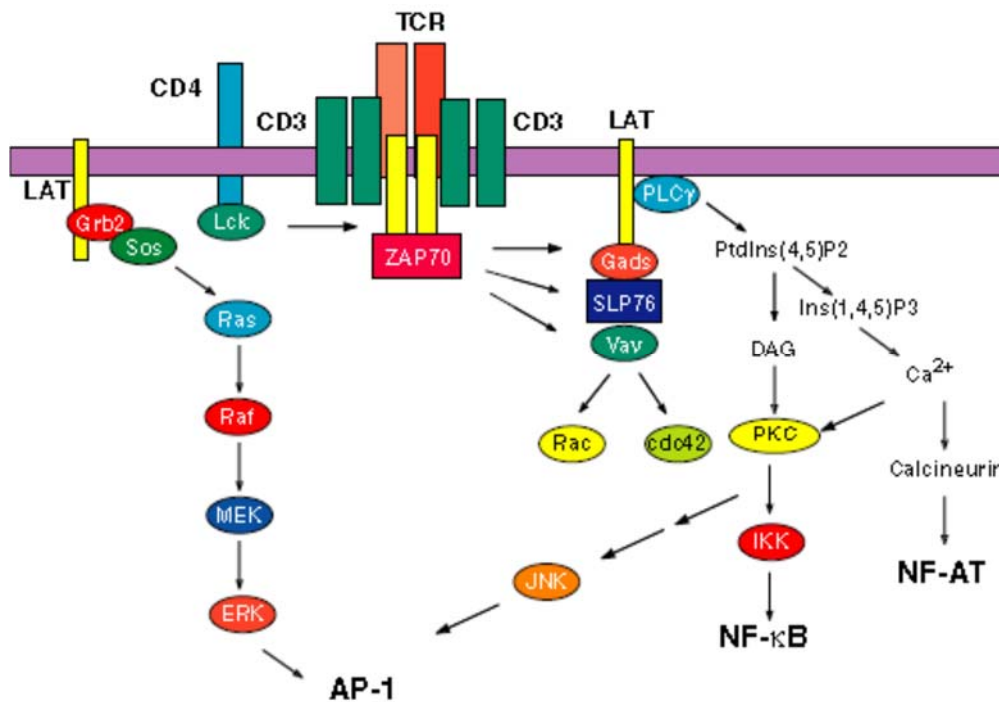
Három elsődleges ellenőrző pontot azonosítottak, ami szabályozza az IL-15 mRNS-ének translációját: többszörös start kodon (AUG-k) az 5' nem-transzlált végén, a nem szokványos rövid vagy hosszú szignálpeptiddel (SSP, LSP) és egy negatív regulátor (retenciós szignál) a C-terminálishoz közel. A szokatlanul hosszú leader peptid általi szekréció nem túl hatékony, így annak helyettesítése más szignálpeptiddel (ami egyben a többszörös start kodon eltávolítását jelenti) vagy az érett IL-15 fehérje C-terminálisának fúziója egy FLAG-epitóp

résszel (vagy akár GFP tag-gel), a szintézis és szekréció mértékét mintegy 250-szeresére növelheti [40, 41].

## IL-2 expresszió szabályozás

Az IL-2 génje emberben a 4-es (egérben a 3-as) kromoszómán helyezkedik el, expressziójának szabályozása – ahogyan a legtöbb citokin esetén – több szinten zajlik (negatív és pozitív szabályozás alatt áll). A legjobban tanulmányozott és egyben legjelentősebb a transzkripcionális szabályozás, mivel annak upregulációja a T sejt receptorok általi jelátvitel fő végpontja.

A T sejt receptoron keresztül történő aktiváció olyan jelátvitelt idéz elő, melynek hatására három fontos transzkripciós faktor család is aktiválódik: az NFAT (aktivált T sejt nukleáris faktor), az NF $\kappa$ B (aktivált B sejt nukleáris faktor  $\kappa$ -könnyű-lánc-enhancer) és az AP-1 (aktivátor protein-1) (2. ábra).



**2. ábra: IL-2 termeléshez vezető, T sejt receptor által aktivált jelátviteli utak T<sub>H</sub> sejtekben [42]:** Az antigén MHC II-vel való kölcsönhatása (nincs ábrázolva itt) után a T sejt receptor (TCR)/CD3 komplex CD4<sup>+</sup> ko-receptort rekrutál, ami a p56-Lck kinázzal asszociál, majd a CD3 komponens citoplazmatikus részét foszforilálja, ami pedig a ZAP70 kináz toborzását vonja maga után. Ezt változatos adaptor fehérjék (pl. LAT- linker for activated T cells) és a foszfolipáz-C (PLC) $\gamma$  foszforilációja követi. A LAT bekapcsolja a Ras-Raf útvonalat, ami hozzájárul az AP-1 komplex formációjához. A PLC $\gamma$  aktivitás diacilglicerol (DAG) és intracelluláris Ca<sup>2+</sup> termeléshez vezet, előbbi a PKC (protein kináz C) működésén keresztül AP-1 és NF $\kappa$ B aktivációhoz, utóbbi pedig a calcineurin révén NFAT aktivációhoz vezet.

Az IL-2 transzkripciójának indukciója naiv T sejteken két jel együttes meglétét igényli: 1) a T sejt receptor + CD3 koreceptor komplex szignálja és a 2) CD28 kostimulációs szignál [43]. Előbbi nemcsak nem elégséges a maximális IL-2 szekrécióhoz, hanem ez az antigén-specifikus szignál magában naiv T sejtek esetén többnyire anergiát okoz. A kostimulációs szignál a TCR szignáljával együtt nagymértékben fokozza az NFκB és az AP-1 aktivációját. Ezek a transzkripciós faktorok a T sejteken konstitutívan kifejeződő Oct-1 (oktamer-kötő fehérje-1) fehérjékkel közreműködve vezetnek az IL-2 génjének transzkripciójához.

A proximális promotor két kötőhelyet tartalmaz az oktamer transzkripciós faktorok (Oct-1 és Oct-2) számára és szintén kettőt az NFAT fehérjéknek, mely utóbbi 5 típusa közül az NFATc1 és az NFATc2 expressziója jelentős limfocitákon [44] és ezek vesznek részt a szabályozásban is [45]. A T sejt aktivációt megelőzően az NFAT-k a citoplazmában helyezkednek el és a Ca<sup>2+</sup>-dependens foszfátazon, a kalcineurinon keresztül történő jeltovábbítás eredményeként transzlokálódnak a sejtmagba. A kalcineurin, illetve az mTOR célpontja számos potens immunszuppresszív szernek (ciklosporin-A, rapamycin), melyek az IL-2 szekréció gátlásán át vezetnek a T sejt aktiváció elfojtásához [46].

A „forkhead-winged-helix” családba tartozó FoxP2 kooperálva az NFAT-vel IL-2 expressziót vált ki, míg a FoxP3 gátolja e folyamatot, miközben CD25 és CTLA4 T<sub>reg</sub> sejt markerek kifejeződését indukálja [47]. A FoxP3 közvetlen inhibícióját mutatták ki nemcsak az NFAT, de az NFκB aktivitásával kapcsolatban is [48], s ez a repressziós hatása magyarázhatja azt, hogy a CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> sejtek képtelenek az IL-2 termelésre.

Az NFκB transzkripciós faktor család mind az öt tagja fontos szereppel bír több, az immunrendszert érintő gén szabályozásában [49]. Az IL-2 promotor két NFκB kötőhelyet tartalmaz, melyek közül az egyik egy AP-1 helyet is tartalmazó összetett elem (CD28RE/AP). Stimuláció hiányában egyes NFκB molekulák a citoplazmában helyezkednek el az IκB inhibitor molekulának köszönhetően. A CD3/CD28 szignál által az inhibitor foszforilálódik, ami a fehérje ubikvitinációjához majd degradációjához vezet. Következésképp az NFκB felszabadul a gátlás alól, a magi lokalizációs szignálja exponálódik, ami lehetővé teszi a magba történő gyors transzlokációt [50].

Az AP-1 transzkripciós faktor dimer molekula, jellemzően c-Jun és c-Fos fehérjékből épül fel. Előbbi a JNK (Jun N-terminális kináz) jelúton foszforilálódik, ami így lehetővé teszi a c-Fos asszociációját (ezáltal a heterodimer kialakulását). Termelődéséhez a Ras-Raf-Erk jelátviteli út vezet [31]. Az IL-2 promóterén elhelyezkedő AP-1 kötőhelyre nemcsak az AP-1 kötődhet.

Anergias sejtekben a CREB/CREM kötődik az AP-1 helyett. A CREB (cAMP válaszelem kötő fehérje) dominánsan negatív formája nagymértékben csökkenti a TCR-indukált IL-2 expressziót [51]. A CREM (cAMP válaszelem modulátor) transzkripció represszor - míg a CREB aktivátor molekula. Nagyfokú szekvencia homológiával rendelkeznek. Homo- és heterodimereket formálva kötődnek olyan szabályozó DNS szekvenciákhoz, mint a CRE (cAMP-válaszelem) [52]. A CREM direkt kötődése az IL-2 promóterén található CRE kötéshelyhez a citokin transzkripciójának gátlásában betöltött központi szerepét támasztja alá. Indukciót követően a CREM fokozatosan kicseréli a foszforilált CREB-et a CRE szekvencián és a p300 és CBP (CREB-kötő fehérje) transzkripció ko-aktivátorokat toborozza, de nem aktiválja azok hiszton-acetiláz képességét. Következésképp kromatin átrendeződés és csökkent transzkripció történik [53].

Az IL-2 transzkripció gátlásának fontossága indukálhatóságának, tranziens voltának és szövet-specifikus expressziójának magyarázatában rejlik. Ez a gátlás összefüggésbe hozható a T sejt anergiával, mely mechanizmusban a válaszképtelen T sejtek kevésbé fogékony állapotban, de hosszabb időszakra életben maradnak.

A B-limfocita-indukált érési protein-1 (BLIMP-1) azon transzkripció faktorok egyike, melyek a B sejtek terminális differenciációjának szabályozásában fontos szerepet játszanak. Ugyanakkor leírták jelentőségét a T sejt differenciációban is [54, 55], az érett plazmasejtek által kifejezett mennyiséggel összevethető szintű expresszióban jelenik meg a TCR stimulációt követően CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T sejteken is, valamint Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-eken. Ezen limfocitákon kifejtett egyik fontos funkciója az antigén-stimuláció általi IL-2 termelés csökkentése, amit kétféle módon is kiválthat: közvetlenül represszálja az IL-2 génjét, de közvetve is kifejthet gátló hatást a c-Fos génjének gátlásán keresztül [56]. A BLIMP-1 aktivitásának jelentősége így a citokin depriváció-indukált sejthalál folyamatában és antigén-specifikus válaszokban a T sejt proliferáció gyengítésében nyilvánul meg (melyet kimutattak *in vitro* és *in vivo* is).

Az AhR transzkripció faktor ugyancsak IL-2 szuppressziót okoz, ami T<sub>h</sub>1 és T<sub>h</sub>0 sejtekben nem, kizárólag T<sub>h</sub>17 sejtekben fordul elő, a protein az IL-2 lókuszt csendesítve elősegíti a sejtek T<sub>h</sub>17 irányú differenciációját (*in vitro* és *in vivo* egyaránt). Ennek indukciója STAT3-függő és AhR-függő (aryl hydrocarbon receptor) módon történik [57].

MikroRNS-ek szintén részt vesznek az IL-2 expresszió szabályozásában, úgymint a miR-146a, miR-9 és a miR-184. A miR-146a TCR stimulációt követően indukálódik primer T sejtekben, gyengítve az AP-1 termelést és IL-2 expressziót [58], míg a miR-9 indukciója a TCR stimuláció

által IL-2 termelés fokozódást vált ki a BLIMP-1 gátlásán keresztül [59]. A miR-184 - köldökszinórvérből származó CD4<sup>+</sup> T sejteken végzett kísérletek alapján - az IL-2 represszióját erősíti az NFAT-1 transzkripció faktor blokkolása által [60].

Az IL-2 saját expresszióját egyébként klasszikus negatív visszacsatoláson keresztül, STAT5-függő módon is gátolja [61].

Az IL-2 gén expressziójának érdekes jellemvonása, hogy néha monoallélikus módon történik. IL-2 null-mutációra heterozigóta egér CD4<sup>+</sup> T sejtekkel végzett egyedi sejt analízis során az IL-2 termelő sejtek relatív gyakorisága megközelítőleg a felére csökkent, ami az IL-2 monoallélikus expressziójára utal [62]. Hasonlót tapasztaltak az IL-4 génjét illetően is [63]. Más tanulmányok viszont az IL-2 expresszió bi-allélikus voltát támasztják alá [64, 65]. Valószínűsíthető, hogy mindkét mód létezik, sejt-kontextustól és a stimuláció erősségétől függően.

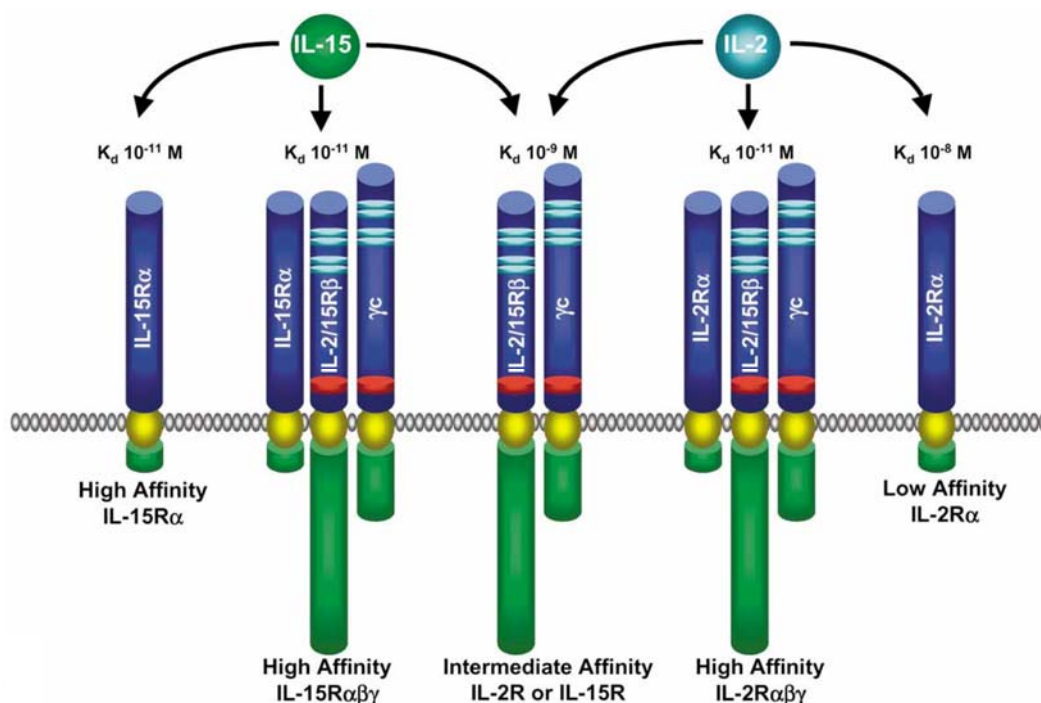
A transzkripcionális szabályozás mellett az IL-2 expresszió mRNS szinten is kontrollált. Az mRNS stabilitásának szabályozása jellemző az IL-2 mellett több más citokinre is, úgymint az interleukin-6-ra, a GM-CSF-re (granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor) vagy az interleukin-3-ra [66]. Az IL-2 mRNS-e jónéhány olyan AU-gazdag elemet tartalmaz, melyek a gyors degradációhoz céltranszkriptként szolgálnak [67]. Az mRNS féléletideje csupán 30-60 perc, ami megkétszereződik a T sejt jelátvitelének során. Az IL-2 génje legalább két olyan cisz elemet tartalmaz mindkét UTR (nemtranszlált) régióban (a 3' és az 5' végen is), amik a transzkript stabilitását szabályozzák [18, 68]. A citokin túltermelődését megakadályozandó annak mRNS-e szükségszerűen instabil. A fenntartott IL-2 szekréció viszont az mRNS stabilizációját igényli, ami főként a CD28 általi kostimulációs szignál közvetítésével történik. Eredményképpen a T sejtek IL-2 termelése 20-30-szorosára növekszik. A transzkripció faktorok aktivációjával még megháromszorozódik a transzkripció ráta, ami a kostimulációnak köszönhetően így nagyjából 100-szorosára növelt IL-2 szintézist jelent [1].

### **Citokin receptorok: IL-2R és IL-15R**

Az IL-2 és az IL-15 is (a többi citokinhez hasonlóan) membrán receptoraikon keresztül fejtik ki biológiai hatásaikat. A három alegységből felépülő receptorok a  $\beta$  (CD122) és a  $\gamma_c$  (CD132) alegységeket közösen használják [69, 70], melyek a jelátviteli folyamatokhoz szükségesek [71, 72]. Saját, ligand-specifikus  $\alpha$  láncok (az IL-2R $\alpha$  vagy CD25 és az IL-15R $\alpha$  vagy CD215) a citokin nagy affinitású megkötéséért felelősek. Alegység-összetételüktől

függően, a receptorok különböző ligandkötő affinitással rendelkező komplexeket alkothatnak a sejtmembránban (3. ábra). Az IL-2R $\alpha$  tranziensen expresszálódik a T sejt receptor aktivációt vagy az IL-2-nek a többi alegységhez való kapcsolódását követően. Önmagában alacsony affinitással köti a citokint ( $K_d=10^{-8}$  M), szignál továbbítása nélkül. A heterodimer IL-2/15R $\beta\gamma_c$  közepes affinitással köti az IL-2-t vagy az IL-15-öt ( $K_d=10^{-9}$  M), míg a heterotrimer IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  és IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$  nagy ligandkötő affinitású ( $K_d=10^{-11}$  M). A heterodimerek és a heterotrimerek hatékony jelátvitelre képesek. Az IL-2R $\alpha$ -val ellentétben az IL-15R $\alpha$  önmagában is nagy affinitással köti a ligandját ( $K_d=10^{-11}$  M) [73].

A  $\beta$  láncot az IL-2-n kívül csak az IL-15 használja (IL-2/15R $\beta$ ), míg a  $\gamma_c$  lánc az IL-15-ön kívül része még az IL-4, IL-7, IL-9 és az IL-21 receptorának is [74-78].



**3. ábra: Az IL-15 és IL-2 receptor komplexek összetételének sematikus ábrázolása** [79]: magas ligandkötő affinitású IL-15R $\alpha$  monomer, IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$  és IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  heterotrimer, közepes affinitású  $\beta\gamma_c$  heterodimer, alacsony affinitású IL-2R $\alpha$  monomer

A három receptorlánc expressziója független szabályozás alatt áll. Az IL-2R $\alpha$  transzkripcionális indukciója bekövetkezhet nemcsak a T sejt receptoron keresztüli stimuláció hatására, de mitogének és lektinek által is, amelyek az antigén stimulációt utánozzák. Különböző citokinek (IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ), vírusfehérjék, mint a Tax, TaxII (a HTLV-1, HTLV-2 transzaktivátor proteinjei) vagy az EBNA-1, EBNA-2 (az Epstein-Barr vírus nukleáris antigénjei B limfóma sejteken) és a protein kináz C aktivátorai is [31]

kiválthatják e receptor alegység génjének expresszióját. A vírusfertőzéskor létrejövő immunválasz során termelődő IFN- $\alpha$  is beindítja az  $\alpha$  lánc génjének átírását [80]. A CD4 természetes, szolubilis ligandja, az IL-16  $\alpha$  és  $\beta$  lánc expressziót indukál [81]. A nyugvó T sejtek nem fejezik ki az IL-2R $\alpha$ -t, de az antigén-specifikus aktivációkor bekövetkezik a receptor gén átírása, emellett az IL-2 szekréciójának indukciója is megtörténik, ami megnöveli és meghosszabbítja IL-2R $\alpha$  expressziót, így a citokin a saját nagy affinitású receptorának kifejeződésében pozitív visszacsatolást szabályozó faktorként vesz részt [82, 83]. Ez a pozitív autoregulációs hurok az IL-2/IL-2R rendszerben jelentős szerepet tölt be a T-sejtes immunválasz erősségének és időtartamának szabályozásában.

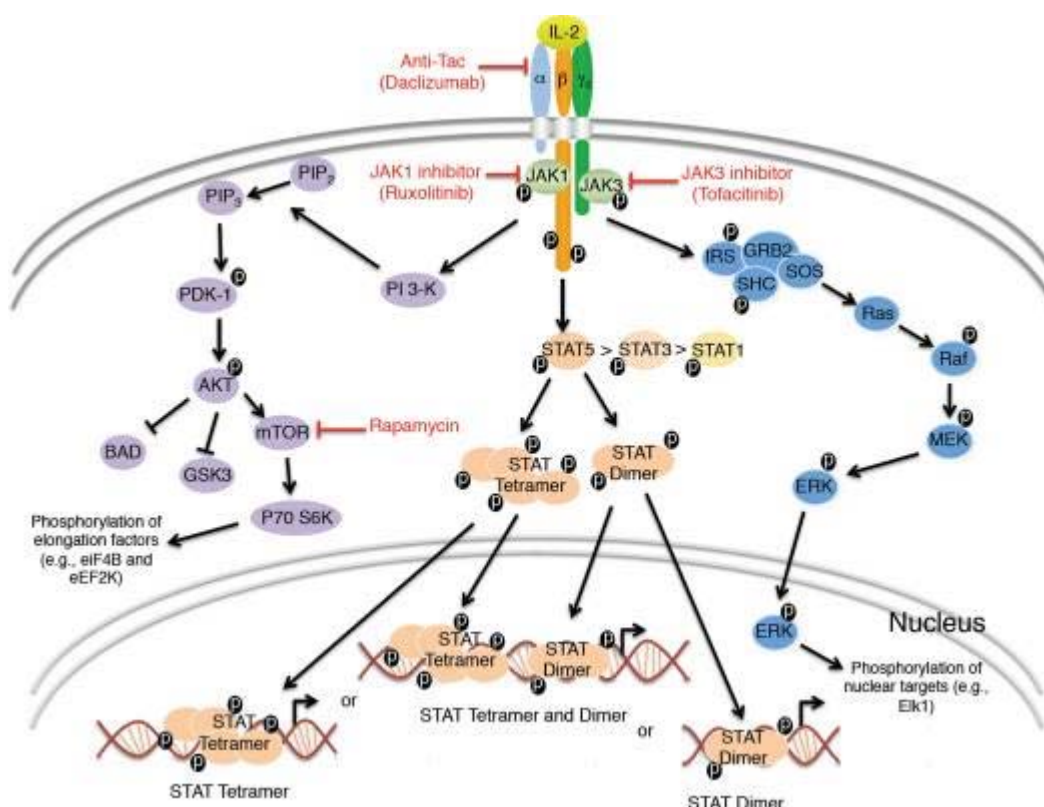
A T sejt fejlődés alatt az IL-2R $\alpha$  a dupla negatív CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> timocitákon kifejeződik (ahol a T sejt vonal irányú elkötelezettség megalapozott), a dupla pozitív CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sejteken viszont drasztikusan lecsökken a mennyiségük. Az IL-2R $\alpha$  expresszió eltérően szabályozott az elsődleges és a másodlagos nyirokszervekben [84]. Monociták, NK sejtek, illetve a B sejt receptor stimulációját követően érett B sejtek is kifejezik.

A  $\beta$  láncot a sejtek számos lymphohematopoietikus populációja kifejezi konstitutívan, többek közt az NK sejtek [85], nyugvó T sejtek, B sejtek, monociták [86], dendritikus epidermális sejtek [87] és neutrofilek [88]. A T sejt aktiváció során számos esetben stimulus által megemelkedett  $\beta$  lánc kifejeződés mutatható ki mRNS- és protein szinten is. Ilyen stimulus lehet mitogén, mint a phytohemagglutinin (PHA) [89], anti-CD3, anti-CD28 [90], anti-CD2 és anti-CD28 antitestek együtt, a protein kináz C aktivátor PMA (phorbol myristate acetát) [91, 92], az IL-2 [85] vagy az IL-4 [93]. A  $\beta$  lánc expresszió transzkripcionálisan és poszt-transzkripcionálisan egyaránt szabályozott.

A közös  $\gamma_c$  alegység kifejeződése kizárólag lymphohematopoietikus sejtekre jellemző [94]. Megjelenik az összes perifériás limfocita populáció felszínén, beleértve az NK sejteket, monocitákat és a granulocitákat is [95]. A T sejt fejlődés során a differenciáció összes szintjén detektálható [96]. Bár az expresszió konstitutív, a promóter aktivitása PMA-val és PHA-val fokozható [97]. Humán monocitákon az IL-2 és az IFN- $\gamma$  növeli, míg a TGF- $\beta$ 1 gátolja a  $\gamma_c$  lánc expresszióját [98].

## IL-2 transzmembrán jelátvitel

A legtöbb receptor típus esetén a ligand bekötődése az adott receptor azonnali plazmamembránbeli intermolekuláris átrendeződését váltja ki. A citokin kötődése után az IL-2 receptor komplex gyorsan internalizálódik, az IL-2R $\alpha$  a korai transzferrin<sup>+</sup> endoszómákba kerül, melyek segítségével recirkulálódik a plazmamembránba, míg a  $\beta$  és a  $\gamma_c$  láncok a Rab7<sup>+</sup> vezikulákba helyeződve a degradáció sorsára jutnak [99]. A receptorhoz való kötődést követően az IL-2 – és mivel a jelátvitelben résztvevő receptor alegységeket közösen használgják, így az IL-15 is – több jelátviteli utat aktivál (4. ábra). A  $\beta$  és a  $\gamma_c$  láncok citoplazmatikus doménjének heterodimerizációja a Janus család tirozin kinázainak (JAK1, JAK3) aktivációjához vezet, a JAK1 a  $\beta$  alegységgel, míg a JAK3 a  $\gamma_c$ -vel asszociál [100, 101]. Leírták a JAK3 kölcsönhatását a  $\beta$  alegységgel is [102]. A kinázok aktiválják egymást és foszforilálják a receptorláncokat. Az Y338 foszforiláció a  $\beta$  láncon lehetővé teszi az SHC adaptor fehérjével való asszociációt, ami platformot szolgáltat a Ras-MAP kináz aktivációhoz és elősegíti a sejtnövekedést. Az Y392 és Y510 foszforiláció a STAT1, STAT3 és STAT5 (A és B) transzkripciós faktorok toborzását mediálja, a STAT5 fehérjék leghatékonyabb aktivációjával [103, 104]. Szintén aktiválódik a foszfoinozitol-3-kináz (PI-3K)-Akt-p70-S6K jelátviteli út, ami a sejtnövekedést és túlélést segíti elő [11, 105]. A STAT5A és STAT5B molekulák az IL-2/15R $\beta$  láncon dokkolódnak, foszforilálódnak, dimerizálódnak és transzlokálódnak a sejtmagba, ahol azon célgénekhez kapcsolódnak, melyek a T sejtek növekedéséhez, differenciálódásához és effektor funkcióihoz esszenciálisak [6, 103, 104, 106]. Általánosságban elmondható, hogy az IL-2 több gént indukál, mint amennyit gátol, így aktivátornak tekinthető.



**4. ábra: IL-2 jelátviteli utak [3]:** Az IL-2 receptorához való kötődése aktiválhatja a foszfoinozitol-3-kináz (PI-3K)-Akt, a JAK (Janus arcú kináz)-STAT (jelátviteli és transzkripció aktivátor) és a Ras-MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) jelátviteli útvonalakat. Az IL-2 általi jelátvitel kontrolljának potenciális terápiás célpontjai és azok gátlószerei is fel vannak tüntetve az ábrán: az IL-2R $\alpha$  ellenes daclizumab, JAK1 és JAK3 inhibitorok a ruxolitinib és tofacitinib, az mTOR gátlószere a rapamycin. Az IL-2 által több STAT5 aktiválódik, mint STAT3, de több STAT3, mint STAT1.

## IL-15 transzprezentáció

Míg az IL-2 dominánsan szekretált citokin, ezzel szemben az IL-15 főként membránkötött formában fordul elő, így biztosítva jelet az immunológiai szinapszisban az antigénprezentáló sejt és a CD8<sup>+</sup> T sejt vagy NK sejt között. Az APC-k (aktivált monociták vagy a dendritikus sejtek) felszínén kifejeződő IL-15R $\alpha$  transzprezentálja az IL-15-öt a  $\beta$  és  $\gamma_c$  alegységet ko- expresszáló sejteknek [107, 108]. A transzprezentáció során az IL-15 által közvetített szignálok mellett kostimulációs jelek is továbbítódnak a kétféle sejt között az immunológiai szinapszisban. Az immunválasz korai szakaszában a dendritikus sejteken lévő CD25 transzprezentálhatja az IL-2-t az antigén-specifikus T sejtek felé [109]. Az IL-15 pedig ciszprezentációra képes azon sejteken, amelyek expresszálják az IL-15R $\alpha$ -t, az IL-2/15R $\beta$ -t és a  $\gamma_c$  láncot is [110, 111]. S míg az IL-2R $\alpha$  jelátvitelre nem képes, addig az IL-15R $\alpha$ -n keresztül lezajló jelátvitelt több kutatócsoport is leírta [112, 113].

## Az IL-2R $\alpha$ és a Daclizumab

1981-ben írták le először az IL-2R $\alpha$ -ellenes monoklonális antitestet, az anti-Tac-ot (T cell activation antigen: Tac), ami megakadályozza a citokin és a receptor interakcióját, azaz blokkolja az IL-2 kötődését az IL-2R $\alpha$ -hoz [114, 115]. Ennek a humanizált változatát daclizumab (Zenapax, Roche) néven 1997-ben engedélyezte az FDA (amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal) vese allograft kilökődés megakadályozására. Ez volt a harmadik monoklonális, az első humanizált illetve az első olyan antitest, amit citokin receptor kapcsán használtak a terápiában [116, 117]. Az IL-2 receptor ligand-specifikus alfa alegysége kivételesen értékes immunterápiás célpont, mivel nyugvó sejtek közül csak T<sub>reg</sub> sejteken és CD56<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> NK sejteken jelenik meg, viszont konstitutív expresszióját mutatták ki egy sor malignus és benignus betegséggel asszociáltan (szervkilökődés, neoplázia, különféle autoimmun- és fertőző betegségek) [41, 116] (1. táblázat).

Allograft kilökődés	Neoplázia	Autoimmun betegségek	Fertőző betegségek
Vese	Akut myeloid leukémia	Aplasztikus anaemia	HIV/AIDS
Máj	Anaplasztikus nagy-sejtes limfóma	Behcet kór	Tüdő tuberkulózis
Szív	Felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma	Crohn betegség	Rubeola
Csontvelő	Krónikus lymphoid leukémia	Óriás sejt artéritis	Fertőző mononukleózis
	Krónikus myeloid leukémia	Juvenilis rheumatoid arthritis	Szepszis
	Cutan T-sejtes limfóma	Kawasaki betegség	
	Mycosis fungoides	Sclerosis multiplex	
	Hajas sejt leukémia	Polymyalgia rheumatica	<u>Egyéb:</u>
	Hodgkin betegség	Rheumatoid arthritis	Vég-stádiumú
	Non-Hodgkin limfóma (B sejt)	Sarcoidosis	vesebetegség
	Perifériás T-sejtes limfómák	Scleroderma	
		Sjögren szindróma	
		Szisztémás lupus erythematosus	
		Vasculitis	
		Wegener granulomatózis	

### 1. táblázat: Az IL-2R $\alpha$ abnormális expressziójának előfordulása különböző betegcsoportokban [116]

Nemcsak az abnormális vagy az emelkedett IL-2R $\alpha$  expresszióhoz társulnak betegségek. IL-2R $\alpha$  deficiens egerekben jelentősen megnagyobbodott perifériás limfoid szervek fejlődnek ki, poliklonális T- és B sejt expanzióval, tükrözve a T<sub>reg</sub> sejtek fenntartásának és funkciójának károsodását és az AICD hiányát. Ezekben az egerekben és az IL-2R deficiens emberekben olyan autoimmun betegségek megjelenése tapasztalható, mint a hemolitikus anémia vagy a gyulladássos bélbetegség (IBS) [118-120].

Az IL-2R $\alpha$ -t megcélzó különböző terápiás felhasználások a módosítatlan antitestet (anti-Tac) illetve ezen antitest toxinokkal vagy  $\alpha$ - és  $\beta$ -emittáló radionuklidokkal kiegészített változatát

alkalmazzák [121-123]. Az anti-IL-2R $\alpha$  használatával kapcsolatos első tanulmányok a különböző limfocita funkciók gátlására fektették a hangsúlyt. Humán perifériás mononukleáris sejt kultúrában a szolubilis, allogén antigének által kiváltott proliferációt az anti-Tac gátolja [124]. A mitogén lektinek által indukált T sejt proliferációt is megakadályozza az anti-Tac. Az antigén- és mitogén-indukált T sejt proliferáció antitesttel való inhibíciója azonban megfiúsul tisztított IL-2 hozzáadásával. Az anti-Tac meggátolja a citotoxikus T limfociták képződését allogén sejt kultúrákban, de ha már egyszer T<sub>c</sub>-vé fejlődött a T sejt, akkor annak működését nem befolyásolja [115]. Lektinek vagy felszínhez kötött CD3 monoklonális antitest által aktivált T sejtek képződését is megakadályozza az anti-Tac. Ezenfelül, különböző mitogének, búzacsíra agglutinin vagy streptolysin O által aktivált B sejtek immunglobulin termelését is gátolja [125].

Az első klinikai felhasználása a (kezdetben még egér eredetű) anti-Tac-nak az ATL-ben (felnőttkori T-sejtes leukémiában) szenvedő betegek kezelésében 1977-ig nyúlik vissza [126]. A hatékonysága limitált, mivel a rágcsálóban termeltetett antitest olyan immunválaszt indukál, ami neutralizálja a terápiás hatást. Ezenkívül rövid, 50 órás a keringésbeli túlélése, ami eleve kizárja hosszú idejű használatának lehetőségét. Egy korai publikációban az intravénás anti-Tac kezelés 9 ATL-es betegből 3 vezetett részleges vagy teljes remisszióhoz, a többi páciens nem is reagált [122]. Az ADCC (antitest-függő celluláris citotoxicitás) folyamatában relatíve hatástalan, mint citocid ágens, mivel az antitest nem reagál a humán sejtekkel. Ezen limitáló tényezőket elkerülendő szükségessé vált olyan genetikailag tervezett antitest variánsok létrehozása, melyekben kombinálták a rágcsáló variábilis vagy hipervariábilis régiókat humán konstans régiókkal. A kiméra antitestekkel így javulást lehetett elérni, kevésbé immunogén voltak miatt és hatékonyabb ADCC mediálás által [116]. A xenogenetikai elemeket minimálisra csökkentendő további innovációs lépésként a komplementaritás meghatározó régiót (CDR) az egér antitestből kombinálták a humán FR régiókkal (konzervált, szerkezeti régiók) [127]. Sok esetben azonban a teljesen humanizált antitestek – beleértve az anti-Tac-ot is – szignifikánsan csökkent affinitást mutatnak az antigénhez, az eredeti egér antitestekhez képest. Ezért további tanulmányok születtek annak érdekében, hogy megőrizték az antitest eredeti affinitását és kapacitását [128]. Mindent összevetve a humanizált anti-Tac (daclizumab) csökkent immunogenitást, jobb farmakokinetikát és szív allograft túlélés meghosszabbítására megnövekedett képességet mutat az egér eredetű antitesthez képest. Ez alapján értékes kiegészítő standard immunszuppresszáns olyan terápiákban, melyet szervtranszplantált betegeknél, leukémiában (limfómában), vagy autoimmun betegségben, szklerózis multiplexben szenvedőknél alkalmaznak [116]. Az FDA által elfogadott IL-2R $\alpha$  antagonistá a

basiliximab (Simulect, Novartis) nevű kimérikus monoklonális antitest is, melyet a daclizumab-hoz hasonlóan vese allograft kilökődés megakadályozására használnak [129].

### 2.3. Felnőttkori T-sejtes Leukémia/Limfóma

A felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma (ATL) a legagresszívabb T-sejtes leukémia/limfóma, melyet a CD4<sup>+</sup> T sejtek HTLV-1 retrovírus általi fertőzése okoz, malignus T sejtek infiltrációjával jellemezhető. Gyakorta jár együtt nyirokcsomó-, máj- és lépmeagnagyobbodással vagy hiperkalcémiával, illetve jellemző az opportunisták fertőzések extrém magas előfordulása [126, 130, 131]. A perifériás vérben nagy mennyiségű CD25-öt kifejező CD4<sup>+</sup> T sejteket lehet kimutatni. Változatos klinikai tulajdonságai alapján akut, limfóma, krónikus és smoldering („parázsló”) ATL altípusokat különböztetnek meg. Bár a betegség krónikus és smoldering típusa a fehérvérsejtek normál vagy kissé emelkedett számával jellemezhető és jobb prognózissal, az akut ATL-es betegek kezelésében a hatékony terápia jelenleg limitált, szerv-működési zavarokkal és rossz prognózissal társul (4-10 hónapos átlagos túlélési idővel). A korai fázisban a leukémiás CD4<sup>+</sup> T sejtek autokrin növekedési periódusa figyelhető meg az IL-2 és funkcionális IL-2 receptorok expressziójával. Az ATL-nek ebben a fázisában a sejtek proliferációja csökkenthető anti-IL-2R $\alpha$  (anti-Tac) antitest alkalmazásával [132]. Idővel bár az IL-2 szekréció megszűnik, a CD25 sejtfelszíni expressziója még folyamatos. Ez a késői fázis IL-2-independens növekedéssel jellemezhető. Érdekes módon az ATL sejtek T<sub>reg</sub> sejt-szerű szuppresszor aktivitást mutatnak [133]. Sok betegnél a késői fázis konstitutívan aktivált JAK-STAT jelátviteli útvonallal asszociált [134]. Az IL-2/IL-2R $\alpha$  mellett az IL-15/IL-15R $\alpha$  autokrin növekedési hurok is jellemző a korai fázisú ATL sejtekre, továbbá egy parakrin citokin stimuláció is megfigyelhető, kifejezett IL-9 szekrécióval, IL-9R $\alpha$  expresszió nélkül [135-137]. Ezek az autokrin/parakrin hurkok összefüggésben vannak a smoldering/krónikus ATL-es betegek perifériás véréből szeparált mononukleáris sejtek spontán *ex vivo* proliferációjával, ami az akut ATL-es betegeknél nem figyelhető meg [135]. A betegség pathogenezeise még nem ismert, de a leukemogenezis iniciációjában központi szerepet tulajdonítanak a HTLV-1 transzaktivátor proteinjének, a Tax fehérjének. Az ATL sejtek genetikai instabilitást (halmozott géndeléciót) és sejtranszformációt mutatnak: a sejtciklus kontrolljában, a sejtproliferációban és az apoptózisban fontos gének expressziójának szabályozásában zavart okoz a Tax protein fizikai kölcsönhatások kialakítása révén (pl. transzkripciós faktorokkal: NF $\kappa$ B-vel, NFAT-vel) [138, 139].

## 2.4. Szekretált és plazmamembrán-fehérjék vezikuláris transzportja

A szekréción fehérjék – köztük az interleukin-2 és -15 is – a bioszintetikus-szekréción úton keresztül jutnak el a szintézis helyétől a plazmamembránig. Erre az útra azon fehérjék terelődnek, amelyek speciális szignálszekvenciával rendelkeznek, ami lehetővé teszi, hogy a szintézist végző riboszómáról az endoplazmatikus retikulum membránján keresztül a retikulum üregrendszerébe kerüljenek. Innen átáramlanak a Golgi-készülék ciszternáiba, ahol a következő válogatás után egy részük vezikulumokba csomagolódva elhagyja a Golgit és továbbítódik a plazmamembrán felé, s majd exocitózissal kiürül, míg más fehérjék az endoszóma-lizoszóma rendszerbe kerülnek. A szekréción folyamatban résztvevő sejtorganellek nincsenek egymással közvetlen kapcsolatban, az anyagok szállítása mindig membránba csomagolt formában megy végbe. A vezikulák képződése, lefűződése a donor kompartmentum membránjáról és beolvadása a fogadó kompartmentum membránrendszerébe számos fehérje ellenőrző-szabályozó hatása alatt áll. A vezikuláris transzport tehát nem véletlenszerű, hanem válogatáson alapuló, szigorúan irányított folyamat.

A membránfehérjék – így az interleukin receptorok – szintézise és áramlása a szekréción fehérjékhez hasonlóan valósul meg, azzal az eltéréssel, hogy teljes terjedelmükkel sosem kerülnek be az ER lumenébe. Speciális horgonyzó szekvenciáiknak köszönhetően rögzülnek az ER membránjában, ahonnan vezikuláris transzporttal, membránhoz kötöttségüket megőrizve jutnak el végső rendeltetési helyükre [140].

## 2.5. MHC fehérjék

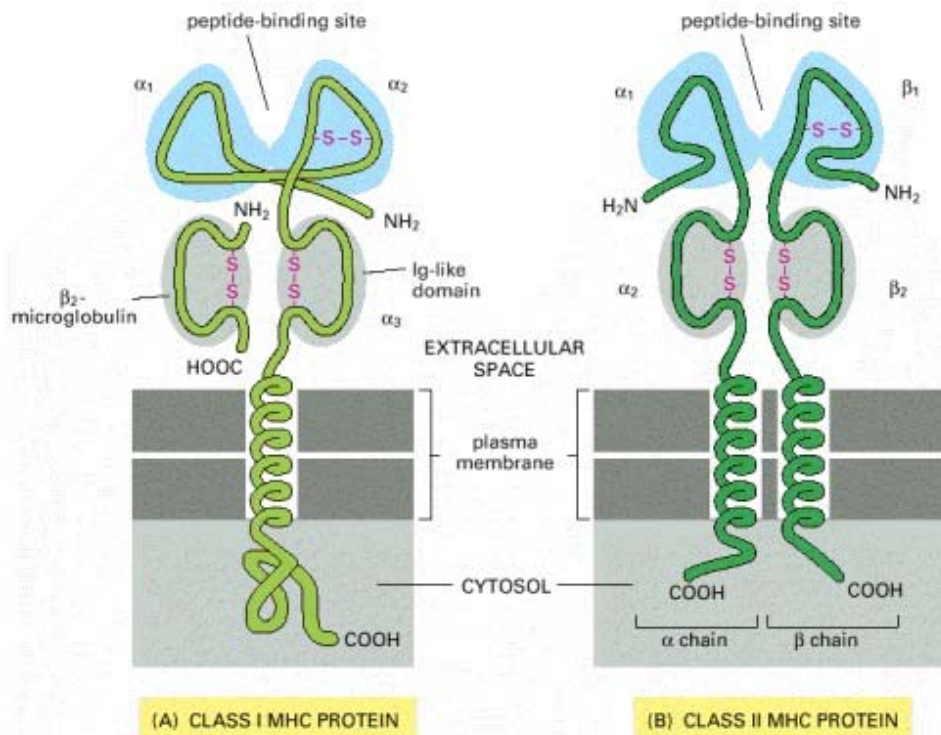
A 6. kromoszóma rövid karján található az emberi genom legnagyobb polimorfizmussal rendelkező komplexe, a fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC), amely négy különböző szerkezetű csoportba tartozó, egymástól eltérő funkcióval rendelkező fehérje kódolásáért felelős (MHC I, II, III és IV). A klasszikus vagy konvencionális MHC-gének két fő régiója által kódolt MHC I és MHC II fehérjék a plazmamembránban megjelenő HLA (human leukocyte locus A) antigének. Kiemelkedő jelentőséggel bírnak az immunrendszer működésében - a T-sejtes immunválasz kiváltásában és lezajlásában.

Az I. osztályba tartozó MHC glikoproteinek csaknem minden, sejtmaggal rendelkező humán sejt felszínén kifejeződnek (különböző szöveti megoszlásban), míg az MHC II molekulákat állandó jelleggel csak a hivatásos antigénprezentáló sejtek expresszálják [2], de megjelennek egyes tumoros sejtek felszínén is, illetve  $IFN\gamma$ -val indukálhatóak. Az MHC I fő funkciója az

endogén eredetű antigének (peptid fragmentumainak) bemutatása a CD8<sup>+</sup> T limfocitáknak [141], de T a sejtek jelátviteli folyamatainak szabályozásában is részt vesznek [142]. Ezzel szemben az MHC II molekulák az APC-k által endoszomális úton processzált exogén eredetű antigéneket ismerik fel, melyek peptid fragmentumai kötődnek hozzájuk így prezentálva azokat a CD4<sup>+</sup> T limfocitákon megjelenő T sejt receptornak. Nemcsak az antigénprezentációban betöltött szerepében eltérő a kétféle glikoprotein, szerkezetükben (5. ábra), így a peptidkötésükben is különböznek. Az MHC I heterodimer: polimorf ( $\alpha$ ) nehézláncához (44 kD) nem kovalensen kapcsolódik a könnyűlánc (12 kD), egy  $\beta_2$ -mikroglobulin molekula. A peptidkötésre alkalmas konformáció kialakításához és a molekulák sejt felszínre jutásához elengedhetetlen a  $\beta_2$ -mikroglobulin kapcsolódása [143]. A peptid-transzport hiánya többnyire a molekula endoplazmatikus retikulumban történő visszatartását és degradációját vagy instabil plazmamembránbeli expresszióját eredményezi, ezért a peptidkötő hely betöltése is alapvető fontosságú a fehérje stabil sejt felszíni megjelenésében [144, 145].

Az MHC I (nehézláncának polimorfizmusából adódóan) alléljainak száma a humán populációban ezres nagyságrendű. Az első betegségek között volt pl. a Hodgkin's limfóma [146] vagy az SLE (szisztémás lupus erythematosus) [147], melyet összefüggésbe hoztak egyes HLA allotípusok jelenlétével. Napjainkig különböző MHC I allélekkel asszociált betegségek egész sorát leírták már, ezek főként autoimmun betegségeket (Crohn-betegség, sclerosis multiplex) [148-150], néhány gyulladáshoz vezető betegséget (pl. Bechterew-kór, hajlamosító gén: HLA-B27) [151, 152] vagy fertőzéseket érintenek, számos esetben mindmáig tisztázatlan patogenezissel.

Az MHC II molekulát egymáshoz nem-kovalens módon kapcsolódó polimorf  $\alpha$ - és polimorf  $\beta$ -lánc építi fel. A két lánc mérete hasonló (30-32 kD) és egyaránt két extracelluláris domént, egy transzmembrán régiót és egy viszonylag rövid citoplazmatikus szakaszt tartalmaznak. A peptidkötő hely mindkét végén nyitott, térszerkezetét tekintve hasonló az MHC I molekulához. A nyitott kötőhely hosszabb peptidek kötését teszi lehetővé, amelyek C- és N-terminális végei „kilóghatnak”, szemben az MHC I zárt kötőhelyével, amely csak meghatározott aminosavszámú peptideket köt [2].



**5. ábra: Az I. és a II. osztályú MHC molekulák szerkezeti felépítése [153]**  
 (peptide-binding site: peptidkötőhely, extracellular space: extracelluláris tér, Ig-like domain: immunglobulin-szerű domén)

## 2.6. Fehérjeklaszterek a sejtmembránban

A transzmembrán jelátvitel a lipidek és fehérjék által kialakított mintázatok átrendeződését eredményezhetik a plazmamembránban. Különböző sejt felszíni fehérje mintázatok hoznak létre T sejteken például az általam is vizsgált MHC molekulák és interleukin receptorok egymással kialakított kölcsönhatásaik révén.

Az MHC I fehérjéknek jelentős mértékű homoasszociációját mutatták ki aktivált T és B sejtek, vírus-transzformált limfoblasztok és fibroblasztok felszínén [154, 155]. Ugyanezen molekulák magasabb fokú rendezettségét, klaszterekbe, szigetcsoportokba való összeállítását is felderítették a molekuláris méreteket meghaladó szubmikrométeres skálán [156]. Számos membránfehérjével, pl. sejt felszíni receptorokkal – IL-2R-ral, IL-15R-ral, EGFR-ral, transferrin receptorral – vagy az ICAM-1 adhéziós fehérjével ill az MHC II-vel való kölcsönhatását is leírták. Intézetünkben korábban azt is kimutatták (konfokális mikroszkópiás mérések alapján), hogy az IL-2/15R és az MHC glikoproteinek klaszterei egymással nagymértékben átfednek és a kolokalizáció magas koleszterin és (gliko)szfingolipid tartalmú, jelátviteli platformot képező lipid tutajokban valósul meg [157-159].

T sejtek plazmamembránjában az interleukin receptorok alegységeinek asszociációját vizsgálták már intézetünkben is illetve más munkacsoportokban is. A magas affinitású heterotrimer receptorok mellett, különböző ligandkötő affinitású dimereket is alkothatnak a receptorláncok [160]. Az alegységek sejtmembránbeli – ligand hiányában is - előre összeszerelődött heterokomplexeit, melyek a ligand kötődésével módosulhatnak, FRET mérésekkel mutatták ki először [73]. Az IL-2R $\alpha$  homoasszociációját is megfigyelték IL-2 independens Kit225 IG3 T lymphoma sejtvonalon, viszont nem tudtak kimutatni homoasszociációt IL-2-függő Kit225 K6 és Hut102 sejteken [161]. A  $\beta$ - $\beta$  homodimert, mint a funkcionális IL-2 receptor új formáját szintén leírták. Ezek a homodimerek a  $\gamma_c$  alegység hiányában spontán összeszerelődnek a sejt felszínén [162]. Az IL-2/15R $\beta$  ko-expressziója szignifikánsan csökkenti a homomer  $\gamma_c$  szintet BOSC23 (HEK293T-eredetű) sejteken. Az IL-2R $\alpha$  alegység jelenléte viszont nincs hatással az IL-2/15R $\beta$  és a  $\gamma_c$  láncok plazmamembránbeli oligomerizációjára [163]. Akceptor fotoelhalványításos (AcPbFRET) mérések alapján kimutatták, hogy az IL-2/15R $\beta$  és a  $\gamma_c$  extracelluláris doménjei kölcsönhatnak a citokin hiányában is a sejt felszínén, míg az intracelluláris és a transzmembrán domének nem járulnak hozzá szignifikánsan a heterodimerizációhoz. Az IL-2 kötődése közelebb hozza egymáshoz az IL-2/15R $\beta$  és a  $\gamma_c$  láncok transzmembrán doménjeit [164]. Korábban munkacsoportunk vizsgálta az IL-2/15 receptorok összeszerelődését és kimutatta, hogy a négy alegység (IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$  és  $\gamma_c$ ) heterotetramer komplexeket alkot és előre összeszerelt formában van jelen citokin hiányában is T lymphoma sejtek plazmamembránjában [158].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Értekezésem középpontjában olyan, az immunrendszer szabályozásában kulcsszereppel bíró membránfehérjék tanulmányozása áll, melyek segítségével klinikai szempontból is releváns, értékes információk tárulhatnak fel; így az intracelluláris IL-2 receptor összeszerelődés és az IL-2/MHC I fehérjeklaszter szétszerelődés vizsgálata.

Az IL-2-termelő sejtek esetén, pl felnőttkori T-sejtes leukémiában a sejtfelszíni receptorokat (és az exogén IL-2-t) célzó blokkoló antitestek hatástalanságára magyarázat lehet az, hogy az IL-2 receptorok már előre összeszerelődnek a szintézisüket követően és az endogén IL-2-t felhasználva elindítják a jelátvitelt, még mielőtt elérik a plazmamembránt. Ezért a következő célok vezéreltek munkám során:

- a receptor alegységek kolokalizációjának és molekuláris közelségének vizsgálata a szekréción úton, az endoplazmatikus retikulumtól a Golgi-n keresztül a plazmamembránig
- az IL-2 általi jelátvitel ellenőrzése az az ER-ben és a Golgi-ban

A transzmembrán jelátvitelben szereplő fehérjék és lipidek nem véletlenszerűen helyezkednek el a plazmamembránban, hanem mintázatot alkotnak. A mintázatok módosulhatnak a fehérje expressziók változásakor, ami funkcionális következménnyel járhat. Különböző sejtfelszíni fehérjemintázatot hoznak létre például az általam is vizsgált MHC molekulák és interleukin receptorok, jelátviteli hatékonyságot növelő lipid tutajokban feldúsulva a T sejtek plazmamembránjában. Az IL-2/MHC I klasztereket érintő változásokra fókuszálva így az alábbi kérdés fogalmazódott meg bennünk:

- megmaradnak-e a fehérje-fehérje kölcsönhatások a szuperklaszterben, ha az MHC I molekulák kifejeződése jelentősen csökken?

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Felhasznált oldatok listája

Fehérje lízis puffer:	50 mM Tris, 1 mM EDTA, MEA, 0,5% Triton X-100, PMSF 1:100
Denaturáló puffer:	0,125 M Tris-HCl, 4% SDS (sodium dodecyl sulfate), 20% glicerol, 10% MEA, 0,02% brómfenolkék (pH=6,8)
2×HBS:	280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O (pH=7,0)
HBSS:	136,9 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 5,36 mM KCl, 0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,75 mM MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O, 0,33 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 5,55 mM glükóz, 10 mM Hepes (pH=7,4)
LB agar:	20 g/l LB, 16 g/l agar
LB médium:	20 g/l LB
10×PBS:	1,5 mM NaCl, 32,18 mM KCl, 85,96 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 16,9 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=6,8)
SOC:	10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O, 20 mM MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O, 20 g/l LB, 20 mM glükóz
50×TAE:	242 g/l TRIS, 57,1 ml/l ecetsav, 14,61 g/l EDTA (pH=8,5)

### 4.2. Sejttenyésztés

Az IL-2/15 receptorok alegységeinek összeszerelődését humán méhnyak karcinóma (HeLa) sejtvonalon vizsgáltuk, melyet 10% (v/v) foetális borjú szérummal (FBS), L-glutaminnal és gentamycinnel kiegészített RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tápfolyadékban tenyésztettük. A plazmamembránbeli fehérjeklaszterek vizsgálatához a Kit 225 K6 vad típusú sejtekből létrehozott FT7.10 nevű CD4<sup>+</sup> humán T limfóma sejtvonalat használtuk [165], mely stabilan kifejezi az IL-15R $\alpha$  alegységet és a fehérje tartalmaz egy FLAG epitópot is (DYKDDDK peptid szakasz), ami monoklonális antitesttel specifikusan jelölhető. Ezeket a sejteket is a már említett médiumban tartottuk fent, azzal a különbséggel, hogy 48 óránként 500 pM humán rekombináns IL-2-t is kaptak, ezzel biztosítva növekedésüket. Az IL-15R $\alpha$  pozitív sejtek szelekcióját 0,8 mg/ml Geneticin (G418) hozzáadásával biztosítottuk. Az ED40515(+)-vad típusú (IL-2-függő) és az ED/IL-2 (IL-2-t kifejező) humán ATL sejtvonalakat szintén a fenti médiumban tenyésztettük. Előbbi sejtek 100 U/ml humán rekombináns IL-2-t

kaptak növekedésükhöz. A sejt kultúrákat steril körülmények között, 37°C-on, állandó parciális nyomású CO<sub>2</sub> atmoszféra és megfelelő páratartalom mellett tenyésztettük (CO<sub>2</sub> tartalom 5%), 2-3 naponta ismétlődő passzálassal, közel állandó sejtkoncentráció fenntartásával.

#### 4.3. Géncsendesítés RNS interferenciával

Az FT7.10 sejtek géncsendesítését az MHC I könnyűláncára, a  $\beta$ 2-mikroglobulinra specifikus siRNS szekvenciával végeztük, melyet AMAXA Nucleofector II elektroporátorral (AMAXA GmbH, Köln, Németország) juttattunk be a sejtekbe. Két anti- $\beta$ 2m siRNS szekvenciát tervezett számunkra intézetünk munkatársa, Prof. Dr. Nagy Péter, a Wistar Institute (Philadelphia, PA, USA) Selector programjával a következő antiszensz szálakkal: 5'CAAACCUCCAUGAUGCUGCTT és 5'CAAGUCUGAAUGCUCACUTT. Kontrollként elektroporálatlan és irreleváns (GFP-ellenes vagy negatív kontroll) siRNS-sel transzfektált mintákat alkalmaztunk. Mintánként 2 millió sejt 90  $\mu$ l Nucleofector Solution V-ben felvéve, 10  $\mu$ l siRNS elegyítésével került a 100  $\mu$ l-es transzfektáló küvettkébe. A készülék gyártója által T sejtekhez ajánlott programok közül az optimalizálási kísérletek során leghatékonyabbnak bizonyult C-16 beállításával történt minden transzfekeció. A program lefutását követően 1-1 mintát kétfelé osztva, 24-lyukú plate-ben, 500-500  $\mu$ l RPMI 1640 médiumban (10% FBS, gentamycin, 800  $\mu$ g/ml G418, 500 pM IL-2) tenyésztettük, nedves kamrában 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában. A két siRNS szekvencia közül az első bizonyult hatékonyabbnak, a további géncsendesítési kísérletekben ezt használtuk. A sejtek releváns membránfehérjéinek – köztük az MHC I-nek – az expresszióját immunfluoreszcens jelölést követően, áramlási citométer segítségével ellenőriztük. Az MHC I könnyű- és nehézláncának sejtfelszíni expressziója a transzfekeció után 24 órával csökkent, 48 órával érte el minimumát, majd a 72 óra múlva kezdett helyreállni. A géncsendesítés maximális hatékonysága 100  $\mu$ g/ml (végkoncentrációjú) siRNS használatakor volt tapasztalható, ahol az MHC I expressziós szintje az eredeti 5-10%-ára csökkent.

A sejtek életképességét fluoreszcein-diacetát/propídiám-jodid festéssel ellenőriztük elektroporáció után 48 órával.

Az MHC I, MHC II, IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  molekulák sejtenkénti abszolút mennyiségét Dako QIFIKIT (Dako North America, Carpinteria, CA, USA) fluoreszcens gyöngyök segítségével határoztuk meg, a gyártó által ajánlott protokollt követve.

#### 4.4. Plazmidok

A konfokális mikroszkópos kolokalizációs és FRET kísérletekhez felhasznált plazmid konstruktokat, illetve azok klónozással történő előállítását, annak részfolyamatait foglaltam össze ebben az alfejezetben. A kiindulási konstruktokat és vektorokat a 2. táblázat, a klónozással elkészített konstruktokat, a receptor alegység és a fluoreszcens protein (FP) közötti linker szekvenciákkal a 3. táblázat mutatja be.

Kiindulási konstruktok	Forrás	Vektorok
pEF-NEO-GFP-IL2R $\alpha$	Nagy Éva (korábbi mts.)	pEGFP-C3 (Clontech)
pEF-NEO-mCherry-IL2R $\alpha$	Nagy Éva (korábbi mts.)	pmCherry-C3 (saját munka)
pEF-NEO-GFP-IL15R $\alpha$	Nagy Éva (korábbi mts.)	pEGFP-N1 (DKFZ)
pEF-NEO-mCherry-IL15R $\alpha$	Nagy Éva (korábbi mts.)	pmCherry-N1 (saját munka)
SYFP2-IL2/15R $\beta$	DKFZ (Heidelberg)	pmKate2-C1 (Evrogen)
IL2/15R $\beta$ -YFP	Thierry Rose labor (Párizs)	
$\gamma_c$ -YFP	Thierry Rose labor (Párizs)	

2. táblázat: A klónozások során felhasznált plazmid konstruktok és vektorok

A humán IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  cDNS-ét EcoRI/BamHI hasítóhelyekkel pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) és pmCherry-N1 expressziós vektorokba klónoztuk a fluoreszcens proteint kódoló rész előtt elhelyezkedő MCS-be (multiple cloning site). A marha pre-prolaktin szignálpeptidjét BglII/EcoRI hasítóhelyekkel vittük be ugyanabba a vektorba a receptor génje elé.

Az IL-2/15R $\beta$  és  $\gamma_c$  génjét tartalmazó IL-2/15R $\beta$ -YFP és  $\gamma_c$ -YFP plazmidokat Dr. Thierry Rose-tól kaptuk (Institute Pasteur, Párizs, Franciaország). Ezekben a konstruktokban az YFP fluoreszcens proteint EGFP-re és mCherry-re cseréltük. A megfelelő FP-t tartalmazó vektorból standard PCR segítségével amplifikáltuk a szükséges DNS szakaszt, amit aztán AgeI/NotI hasítóhelyekkel az adott receptor génjét kódoló plazmidba ligáltunk, miután abból az YFP-t kivágtuk. A konfokális mikroszkópos FRET mérések során néhány kísérletben az IL-2/15R $\beta$  lánc rövidített variánsát használtuk ( $\beta$ -C7), amit 279 aminosav C-terminálisról való eltávolításával készítettünk. Az így csupán 7 aminosav hosszúságú intracelluláris doménnel rendelkező alegységet kódoló DNS-t a pEGFP-N1 vektorba ligáltuk EcoRI/BamHI hasítóhelyekkel.

A TagBFP-t is kifejező plazmidokat, ami az ER citoplazmatikus felszínét (ER marker) ill. a Golgit (Golgi marker) jelöli, Prof. Dr. Várnai Péter készítette el (Simmelweis Egyetem, ÁOK,

Élettani Intézet, Budapest) a GFP szekvenciájának TagBFP-re való cseréjével, amit a pTagBFP-C (Evrogen, Moszkva, Oroszország) expressziós vektorból amplifikált fel. Az ER jelölő klónozásakor a SacI foszfatáz C-terminálisának target szekvenciája (521-587 aminosavak) a fluoreszcens fehérje C-terminálisához lett ligálva, az SGLRSRAQASNSRV linker inzerciójával [166], míg a fluoreszcens fehérjék Golgihoz való toborzásához a Giantin C-terminális farok szekvenciája (3140-3269 aminosavak) SGLRSRAQASNS linkerrel [167].

A kísérletekben pozitív kontrollként EGFP-mCherry fúziós fehérjét kódoló pSV-EGFP-mCherry vektort használtunk. A két fluoreszcens protein között a következő linker szekvencia található: RDPPV.

Negatív kontrollként az N- vagy C-terminálison EGFP-t is kifejező IL-2R $\alpha$  és az mCherry-GPI (Dr. J. Lippincott-Schwartz laborjából, NIH, Bethesda, MD, USA) együttes transzfekciójával elért ko-expresszió szolgált. A glikozilfoszfatidinozitol (GPI) horgonyzott fehérjék a sejtmembránhoz vannak kikötve a fehérje rész C-terminálisához kapcsolódó acil-láncon keresztül. A GPI-horgonyzott fehérjék a lipid tutajokban, az extracelluláris „leaflet”-ben halmozódnak fel [168].

<b>Elkészített konstruktok</b>	<b>Linker szekvencia</b>	<b>Fluoreszcens protein pozíciója</b>
IL-2R $\alpha$ -EGFP	cgg gat cca ccg gtc gcc acc	C terminálison
IL-2R $\alpha$ -mCherry	cgg gat ccc gcc acc	C terminálison
IL-15R $\alpha$ -EGFP	cgg gat cca ccg gtc gcc acc	C terminálison
IL-15R $\alpha$ -mCherry	cgg gat ccc gcc acc	C terminálison
EGFP-IL2/15R $\beta$	tcc gga ctc aga tet cga gct caa gct teg	N terminálison
mKate2-IL2/15R $\beta$	tcc gga ctc aga tet cga gct caa gct teg	N terminálison
IL2/15R $\beta$ -EGFP	ggg gta ccg cgg gcc cgg gat cca ccg gtc gcc acc	C terminálison
IL2/15R $\beta$ -mCherry	ggg gta ccg cgg gcc cgg gat cca ccg gtc gcc acc	C terminálison
$\beta$ -C7-EGFP	cgg gat cca ccg gtc gcc acc	C terminálison
$\beta$ -C7-mCherry	cgg gat ccc gcc acc	C terminálison
$\beta$ -C46-EGFP	cgg gat cca ccg gtc gcc acc	C terminálison
$\beta$ -C46-mCherry	cgg gat ccc gcc acc	C terminálison
$\gamma_c$ -EGFP	ggg gta ccg cgg gcc cgg gat cca ccg gtc gcc	C terminálison
$\gamma_c$ -mCherry	ggg gta ccg cgg gcc cgg gat cca ccg gtc gcc	C terminálison

**3. táblázat: A klónozással elkészített plazmid konstruktok** (a felhasznált linkerek nukleotid szekvenciáival és a fluoreszcens fehérje pozíciójával)

## 4.5. Klónozás

### PCR (polimeráz láncreakció)

Az egyes receptor láncok génjeit EGFP vagy mCherry fluoreszcens fehérjét kifejező vektorokba klónoztuk, melyekhez a szükséges DNS szekvenciákat standard polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk fel.

A PCR-hez szükséges primereket manuálisan terveztük az alapvető tervezési szabályok figyelembe vételével. A megtervezett primerek olvadási hőmérsékletét, G-C tartalmát, hairpin- és dimer-képzési hajlamát az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) internetes honlapján található Oligo Analyzer szoftverrel (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) ellenőriztük, majd a szekvenciákat ugyanezen cégtől vásároltuk meg.

Több párhuzamos minta készítésével minden reakcióhoz, mintánként 19 µl végtérfogat a következőket tartalmazta (jégen inkubálva): 1,5 ng templát DNS, 0,5 mM dNTP, 1 µM primer-mix (forward és reverz primerek 1:1 arányú keveréke nukleázmentes vízben), 1×HF puffer és 0,1 µl Phusion DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A készüléket az alábbi beállítással indítottuk el:

- 98°C – 1 perc
- rendszerint 25-30 ciklusban: 98°C – 10 mp, T<sub>m</sub> – 20 mp, 72°C – 15-30 mp
- 72°C – 4 perc

### Agaróz gél elektroforézis

A PCR reakció lefutása után a különböző méretű DNS fragmenteket (templát DNS, forward és reverz primer, PCR termék - ampikon), ill. a restrikciós emésztés után, a hasított vektorok ragadós végű szekvenciáit tartalmazó mintákat 1 %-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk el egymástól. Ehhez 40 ml 1× TAE pufferben oldottunk 0,4 g agarózt melegítéssel, majd szilárdulás előtt 20 µg (foszfátpufferben oldott) interkalálódó DNS festéket, ethidium-bromidot adtunk hozzá, hogy a DNS látható legyen majd az elektroforézist követően, az UV transzilluminátor használatakor. A minták géltre való felvitelét megkönnyítendő, 6 µl Loading Dye-t (Thermo Fisher Scientific) szuszpendáltunk minden mintához. Referencia méret meghatározása 1 kb-os (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) vagy 100 bp-os (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) létra segítségével történt. Az elektroforézis 400 mA-rel, 80 V-on, 45 percig zajlott.

## **DNS extrakció agaróz gélből**

A megfelelő méretű PCR amplikonokat az agaróz gélből etanos precipitációval tisztítottuk ki. A DNS csíkokat steril szikével kivágva a gélből Eppendorf csőbe helyeztük, majd megmértük a tömegét. A cső aljára akkora nagyságú lyukat vágunk, hogy a centrifugálás közben át tudjon rajta folyni a DNS-t tartalmazó gél. A gélkockákat tartalmazó lyukas csövet új steril csőbe helyezve centrifugáltuk 7500 rpm-en, 5 percig, szobahőmérsékleten. A centrifugálás során áttört gélhez az előzőleg leírt DNS tömegével megegyező mennyiségben adtunk 4°C-os, equilibrált fenolt, majd szuszpendálás után 30 percig -72°C-on inkubáltuk. Felolvadást követően a fenolos gélt 13000 g-n centrifugáltuk 5 percig, szobahőmérsékleten. A DNS-t tartalmazó felső vizes fázissal tovább dolgozva, új Eppendorf csőben fenollal és kloroformmal 1:1 arányban szuszpendáltuk, rövid ideig vortexeltük majd centrifugáltuk az előzőleg leírt módon. A felső fázist 1/10-ed rész 3M Na-acetáttal equilibráltuk majd 2,5-szeres mennyiségű, jéghideg, 99%-os etanollal való rövid vortexelést követően 30 percig -20°C-on inkubáltuk. Ezután 13000 g-n centrifugáltuk 15 percig 4°C-on, majd a felülúszó eltávolítása után maradó pelletet 500 µl, jéghideg, 70%-os etanollal mostuk. Centrifugálás után a felülúszót alaposan eltávolítottuk a cső alján maradt pelletről, amit szárítást követően 10 µl nukleázmentes vízben oldottuk fel. A precipitált DNS-t ilyen formában a további felhasználásig (koncentrációmérés, restrikciós emésztés) -20°C-on tároltuk.

## **Restrikciós emésztés**

Minden restrikciós hasítást a Thermo Fisher Scientific konvencionális restrikciós endonukleázainak felhasználásával végeztünk, 20 µl végtérfogatban, a gyártó által ajánlott („double digest”) protokoll alapján 2 órán át, 37°C-on.

## **DNS tisztítás restrikciós emésztés után**

A restrikciós hasítással a tisztított PCR termék és az expresszós vektor kompatibilis ragadós végei szabaddá váltak; a reakcióelegyből a nemkívánatos pufferek és enzimek eltávolítása, a DNS tisztítása fenol/kloroform-os extrakcióval történt.

## Ligálás

A ragadós végű inzert (amplikon) és vektor ligálásához a DNS koncentrációkat és tisztaságukat NanoDrop™ 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) ellenőriztük. 20 µl reakció-térfogatba 50 ng plazmidhoz hozzámértük az inzertet a következő képlettel kiszámolt mennyiségben:

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

ahol  $3 \leq N \leq 6$ . A felhasznált inzert tömege rendszerint legalább háromszoros túlsúlyban volt a vektor tömegéhez képest. A ligálás két unit T4 DNS ligázzal (Thermo Fisher Scientific), az enzim saját pufferében 16-20 órán át 16°C-on történt.

A klónozással elkészített szekvenciákat restriktions hasítással és szekvenálással ellenőrizzük. A szekvenálást az UD-GenoMed (Medical Genomic Technologies) Kft (Debrecen) végezte el.

### 4.6. Kompetens sejtek preparálása

Az újonnan létrehozott plazmid DNS amplifikálását – illetve bármilyen/minden/az összes plazmid konstrukt amplifikálását – mesterségesen kompetenssé tett *Escherichia coli* baktérium törzs segítségével végeztük el. Ehhez először kompetens baktérium tenyészetet kellett preparálni. Éjszakai kultúrát készítettünk: 5 ml LB tápoldatban szuszpendáltunk 20 µl glycerol stock-ból kivett DH5α törzset és 37°C-on rázattuk (300 rpm) egy teljes éjszakán át. Másnap a teljes cső baktérium kultúrát 200 ml, 37°C-os LB-be oltottuk, majd rázatva inkubáltuk 37°C-on, közben időnként ellenőrizve az OD-ját. Az OD<sub>600</sub>=0,375 érték elérésekor a baktérium szuszpenziót centrifugáltuk 3000 rpm-en, 7 percig, 4°C-on majd a felülúszó eltávolítása után a csövet szárítottuk pár percig. Ezután a pelletet jéghideg, 60 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Pipes (pH=7) és 15% glicerol összetételű oldatban szuszpendáltuk fel, csövenként 10 ml-ben. A szuszpenziót 2500 rpm-en, 5 percig, 4°C-on centrifugáltuk és a felülúszó eltávolítása után ismét szárítottuk a csöveket pár percig, majd újabb 10-10 ml CaCl<sub>2</sub>-os oldatban felvéve a sejteket 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően centrifugáltuk 2500 rpm-en, 5 percig, 4°C-on, aztán a felülúszót eltávolítva már csak 2-2 ml oldatban felvéve a baktérium sejteket egy éjszakán át jégen inkubáltuk (16-20 óra, 4°C-on). Másnap 250 µl-enként, feliratozott fagyasztócsövekbe porcióztuk és a további felhasználásig -72°C-on tároltuk.

#### 4.7. *Escherichia coli* transzformálás

A  $-72^{\circ}\text{C}$ -on tárolt DH5 $\alpha$  ultrakompetens *E. coli* törzset jégre helyezve felolvasztottuk majd 20  $\mu\text{l}$  szuszpenzióhoz hozzáadtunk 1  $\mu\text{g}$  plazmidot. A ligálást követő transzformálások alkalmával egy teljes cső (200  $\mu\text{l}$ ) baktériumhoz adtuk a ligált elegy teljes térfogatát (20  $\mu\text{l}$ ). Rövid vortexelés után a szuszpenziót 30 percig jégen inkubáltuk, majd 1,5 perc hősokk következett  $42^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőn. Ezután ismét jégre helyeztük 5 percre, majd 1 ml szobahőmérsékletű SOC oldatot adtuk a bacikhoz és 1 órán át rázattuk (330 rpm)  $37^{\circ}\text{C}$ -on. Centrifugáltuk 1100 rpm-en 3 percig, majd a felúszó nagy részének eltávolításával 20-30  $\mu\text{l}$ -t hagytunk a cső alján. Szuszpendálás után szélesztettük 1,5 % agaros antibiotikus szobahőmérsékletű plate-re. Az agar plate-et 16-20 órára fejjel lefelé  $37^{\circ}\text{C}$ -os, száraz termosztátba helyeztük.

Az inkubálási idő elteltével a megfelelően felnőtt baktérium-tenyészetből 1-1 különálló telepet steril pipettaheggyel átoltottunk 5-5 ml folyékony LB tápoldatba, mely tartalmazta a plazmid rezisztenciájának megfelelő antibiotikumot (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycint vagy 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillint). 16-20 órás,  $37^{\circ}\text{C}$ -on való rázatás (300 rpm) után  $4^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további felhasználásig (DNS preparálás/tisztítás, glycerol stock készítése).

#### 4.8. Plazmid tisztítás

A baktérium által felszaporított DNS preparálását GenElute™ Plazmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) segítségével, a gyártó protokollja alapján végeztük el. A plazmid koncentrációjának és tisztaságának ellenőrzése NanoDrop™ 1000 spektrofotométer használatával történt.

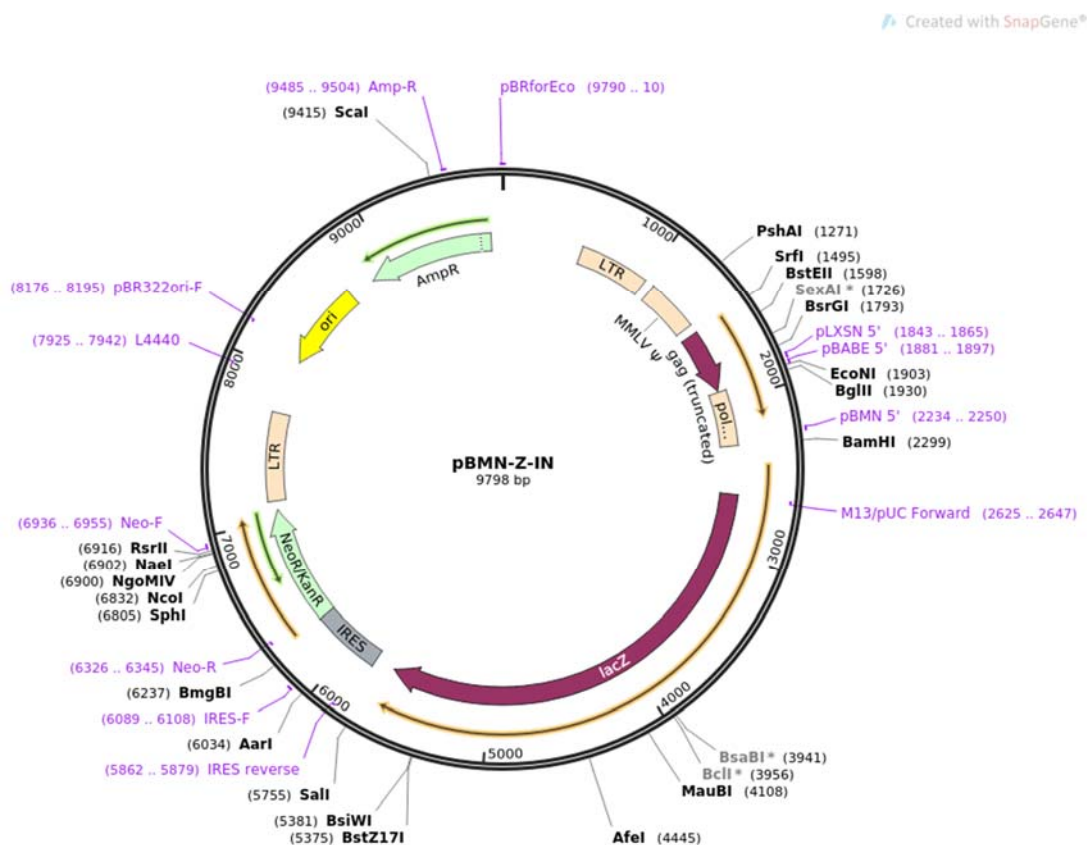
#### 4.9. Tranziens transzfekció

A HeLa sejtek tranziens transzfekcióját 8-lyukú kamrában, FuGene HD transzfekciós reagens (Promega, Madison, WI, USA) segítségével végeztük el. A GFP vagy mCherry fluoreszcens fehérjét is hordozó receptor alegységek ko-transzfekciójához a felhasznált plazmidok mennyiségét előzőleg optimalizáltuk, a közel azonos expressziós arány elérése érdekében. A transzfekciót megelőzően 24 órával  $10^4$  HeLa sejtet raktunk 8-lyukú, lyukanként 1  $\text{cm}^2$  alapterületű mikroszkópos kamrába (ibidi, München, Németország), 300  $\mu\text{l}$  tápfolyadékba. Lyukanként 0,4  $\mu\text{l}$  FuGene HD és 80-160 ng DNS elegyét szérum- és

indikátormentes Opti-MEM oldatban (Thermo Fisher Scientific) szuszpendáltuk össze. 20 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció elteltével, a transzfekciós mix 5-5  $\mu$ l-ét óvatosan a sejtekhez pipettáztuk. A transzfekció után 24 órával, közvetlenül a mérés előtt, lecseréltük a tápoldatot a sejtekről Leibovitz's L-15 (Thermo Fisher Scientific) „imaging” médiumra.

#### 4.10. Retrovirális transzdukció, stabil sejtvonalak létrehozása

A citokin receptorok alegység-összeszerelődésének intracelluláris vizsgálatához az egyes alegységeket stabilan expresszáló HeLa sejtvonalakat hoztunk létre virális transzdukcióval. Ehhez ún. pakoló sejtvonalként HEK293T humán embrionális vesesejteket használtunk (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ban tenyésztve), melyeket a transzdukciót megelőző napon 10 cm<sup>2</sup>-es sejttenyésztő petribe plételtünk (2 $\times$ 10<sup>6</sup> sejt/petri). A retrovirális pBMN-Z-IN (Addgene plazmid #1735) transzfer vektorba (6. ábra) a lacZ helyére előzőleg BamHI/SalI hasítóhelyekkel ligáltuk a megfelelő receptorlánc cDNS-ét (IL-2R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$  vagy  $\gamma$ c).



6. ábra: A pBMN-Z-IN retrovirális vektor plazmid térképe ([www.addgene.org](http://www.addgene.org))

Kalcium-foszfátos módszerrel transzfektáltuk a pakoló sejtekbe a receptor inzertet tartalmazó transzfer vektort, a VSVG és PAX2 csomagoló („helper”) plazmidokat együtt, sorban 17-12-4 µg (egy mintára számolt) mennyiségben, 125 µl 2M CaCl<sub>2</sub> és 1 ml 2×HBS felhasználásával. 15 perc inkubálás után az egész elegyet hozzácsepegtettük a sejtekhez. 5 perccel a mix hozzáadása előtt, a transzfekciót segítő, chloroquine-t mértünk a sejtekre (25 µM végkoncentrációban). A 37°C-os, elkülönített sejttenyésztő inkubátorba helyezett sejteken 4-6 óra elteltével a médiumot friss DMEM-re cseréltük. 48 órával később a már érett vírusokat tartalmazó felülúszót a sejtekről óvatosan fecskendővel leszívtuk és 0,45 µm-es fecskendőszűrőn átszűrtük. Az előzően 6-lyukú sejttenyésztő plate-be (0,5×10<sup>6</sup> sejt/2 ml médium/lyuk) kirakott HeLa sejteken a tápfolyadékot vírusos felülúszóra cseréltük. Az infekció hatékonyságának növelése érdekében 10 µg/ml polybrene-t (Sigma-Aldrich) mértünk a sejtekhez. Háromféle infekciós módszert teszteltünk párhuzamosan: 5 órával később egyiknél 1 ml friss médiummal hígítottuk a sejteken a vírusos felülúszót, másikonál friss vírusos felülúszóra cseréltük a sejteken lévő (friss polybrene hozzáadásával), a harmadikat érintetlenül hagytuk. A maradék vírusos felülúszót légmentesen lezárva, 24 órára 4°C-os hűtőbe tettük. Következő reggel mindhárom módszernél a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot majd friss, 37°C-ra előmelegített vírusos felülúszót és 10 µg/ml polybrene-t mértünk hozzájuk („boosting”). 4-6 óra elteltével a sejteket a saját tápoldatukban (RPMI 1640) 2× mostuk, majd új sejttenyésztő flaskában, friss médiumban szuszpendálva 37°C-os normál sejttenyésztő inkubátorba helyeztük 48 órára. A tápfolyadékhoz – az előzőleg meghatározott sejt-pusztulási görbe alapján – 0,75 mg/ml G418 antibiotikumot is adtunk, biztosítva a sikeresen transzdukált sejtek pozitív szelekcióját.

A receptor alegységek kifejeződését immunfluoreszcens jelölést követően konfokális mikroszkóppal ellenőriztük. Az adott receptor láncot stabilan expresszáló sejtvonalakra a továbbiakban a HeLa-IL-2R $\alpha$ , a HeLa- $\beta$  és a HeLa- $\gamma_c$  elnevezéseket alkalmaztuk.

#### **4.11. Antitestek jelölése fluoreszcens festékekkel**

A sejtek membránfehérjéinek immunfluoreszcens jelöléséhez a hibridóma felülúszóból preparált vagy jelöletlenül vásárolt antitestekhez szukcinimidil-észter csoporttal rendelkező Alexa Fluor festéket (Thermo Fisher Scientific) konjugáltunk. 500 µg antitestet 250 µl PBS-ben hígítottuk és hozzáadtunk 2-5 µl Alexa Fluor 488, 546 vagy 647 festéket, majd az így kapott elegy pH-ját 25 µl 1M NaHCO<sub>3</sub> oldattal állítottuk be (pH~8,3). 1 órán át, sötétben, szobahőmérsékleten, kevertetve inkubáltuk. Az inkubálási idő alatt megjelölődött antitesteket

ezt követően Sephadex G-50 gélt tartalmazó oszlopon választottuk el a nem kötődött festék frakciójától. A festék/protein jelölési arányt abszorpciós fotometriával határoztuk meg [169].

#### **4.12. HeLa-IL-2R $\alpha$ , HeLa- $\beta$ és HeLa- $\gamma_c$ sejtek immunfluoreszcens jelölése**

A virális transzdukcióval létrehozott HeLa-IL-2R $\alpha$ , HeLa- $\beta$  és HeLa- $\gamma_c$  sejtvonalak nem fejeznek ki semmilyen fluoreszcens fehérjét, ezért sejtmembránbeli expressziójukat immunfluoreszcens jelöléssel tettük láthatóvá. A jelölés előtt 24 órával 8-lyukú kamrába tettünk lyukanként  $1,5 \times 10^4$  sejtet, 300  $\mu$ l médiumban. Jéghideg HBSS oldattal való mosást követően a sejteket 50  $\mu$ g/ml végkoncentrációjú, fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel inkubáltuk 30 percig jégen, majd a nem kötődött antitestek eltávolítása végett kétszer mostuk jéghideg HBSS oldattal, végül fixáltuk 2% formaldehid/HBSS oldattal. A jelölés során a következő egér antitesteket használtuk (melyeket előzőleg Alexa Fluor 546 festékekkel konjugáltunk): az IL-2R $\alpha$  citokinkötő epitópját felismerő anti-Tac (Repligen Corporation, Waltham, MA, USA), az IL-2/15R $\beta$ -hoz kötődő Mik $\beta$ 3 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) és a  $\gamma_c$  alegységre specifikus TUGh4 (BD Pharmingen).

#### **4.13. FT7.10 sejtek immunfluoreszcens jelölése**

Az FT7.10 sejtek membránfehérjéinek jelöléséhez a következő monoklonális antitesteket használtuk fel: az IL-2R $\alpha$  citokinkötő epitópját felismerő anti-Tac (Repligen Corporation); az IL-15R $\alpha$ -hoz kötődő anti-FLAG-M2 (Sigma-Aldrich) vagy 7A4-24, melyet Dr. T.A. Waldmann-tól (NIH, Bethesda, MD, USA) kaptunk; a transferrin receptort felismerő MEM-75 (Exbio Praha, Prága, Csehország); és a GPI-horgonyzott CD48 fehérje elleni MEM-102 (Exbio Praha). Az MHC I nehézláncára specifikus W6/32 monoklonális antitestet termelő hibridómát, a  $\beta$ 2-mikroglobulinhoz kötődő L368-at termelő hibridómát és az MHC II (HLA-DR)-t felismerő L243-at termelő hibridómát F. Brodsky-tól kaptuk (University of California, San Francisco, CA, USA).

A jelölést megelőzően Alexa Fluor 488, 546, vagy 647 (Thermo Fisher Scientific) fluoreszcens festékek szukcinimidil-észteréhez konjugáltuk az antitesteket. A sejteket jéghideg  $1 \times$ PBS-ben való mosást követően inkubáltuk 50  $\mu$ g/ml végkoncentrációjú fluoreszcens antitest(ek)kel 30 percig jégen, majd kétszeri  $1 \times$ PBS-es mosás után fixáltuk 1% formaldehid/HBSS oldattal. Az áramlási citometriás mérésekhez használt minták a jelölő csövekben jégen maradtak a felhasználásig.

#### 4.14. Kolokalizáció meghatározása konfokális mikroszkópiával

A konfokális képalkotás alapelve Marvin Minsky-től származik (1961-ből) melynek lényege, hogy egy vagy több fókuszált lézernyalábbal megvilágítva a mintát, csak egy, az objektív és a tubuslencse rendszerének hátsó fókuszpontjában elhelyezett résen, „pinhole”-on keresztül érkező emittált fluoreszcencia intenzitást detektáljuk. Ez biztosítja, hogy a képalkotásban csak az objektív elülső fókusz síkjából származó fotonok vesznek részt, így a mintáról vékony „optikai szeleteket” vehetünk fel, melynek vastagsága a pinhole méretétől függ [170].

Két fehérje kolokalizációjának mértékét, azaz együttes előfordulását néhány száz nm-es felbontással jellemezhetjük a Pearson-féle keresztkorrelációs együtthatóval, amit a konfokális mikroszkópos képekből az alábbi képlettel számolhatunk ki:

$$C = \frac{\sum_i \sum_j (x_{i,j} - \bar{x})(y_{i,j} - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i \sum_j (x_{i,j} - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_i \sum_j (y_{i,j} - \bar{y})^2}} \quad 2)$$

ahol  $x_{i,j}$  és  $y_{i,j}$  fluoreszcens pixel értékek az  $x$  és  $y$  képek  $i, j$  koordinátáinál (az  $x$  és  $y$  képek a minta ugyanazon detektált részéből, de két különböző, a jelölt fehérjéknek megfelelő csatornájából származnak). Az elméleti maximum  $C = 1$ , ami azonos képekre, míg a 0-hoz közel eső érték a jelölt fehérjék egymástól eltérő lokalizációjára utal [159].

A receptor alegységek kolokalizációját a különböző organellumokban néhány száz nanométeres feloldással a konfokális képek Pearson-féle korrelációs analízisével értük el. A zaj mérsékléséhez a képeken  $5 \times 5$  pixeles Gauss-filtert használtunk. Az ER-hez vagy a Golgihoz tartozó pixeleket a fentebb leírt markerek segítségével azonosítottuk. Pearson-féle korrelációs koefficiens számításával határoztuk meg a kolokalizáció mértékét a zöld (EGFP) és vörös (mCherry) detektált csatornák pixelintenzitásai között [159] a munkatársam, dr. Mocsár Gábor által írt MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) algoritmus alkalmazásával. Csak azok a pixelek lettek figyelembe véve az analízisnél, amelyek intenzitása legalább az egyik csatornában meghaladta a beállított küszöbértéket (az átlagos autofluoreszcencia intenzitás kétszeresét). Pozitív kontrollként az EGFP-mCherry fúziós fehérjét használtuk. Negatív kontroll esetén minden minta képeinek pixeleiből többszörös randomizálással ( $1000 \times$ ) készített képekből lett meghatározva a korrelációs együttható [171].

#### 4.15. FRET hatásfok meghatározása konfokális mikroszkópiával

A fehérje-fehérje interakciók molekuláris szintű vizsgálatát a konfokális mikroszkóppal végzett kolokalizációs méréssel elérhető maximális, néhány száz nm-es feloldás nem teszi lehetővé. A szubcelluláris szintű, intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálatát elérhetjük az általam is alkalmazott módszer, a rezonancia energiáttranszfer segítségével.

Elméletét Theodor Förster 1946-ban írta le, róla elnevezve Förster (-féle, vagy -típusú) rezonancia energiáttranszfernek (röviden FRET-nek) hívjuk az olyan sugárzásmentes energiaátadást, mely dipól-dipól kölcsönhatás (rezonancia) révén jön létre két, megfelelő spektroszkópiai paraméterekkel rendelkező (ún. donor és akceptor) fluorofór molekula között. A spektroszkópiai feltételek a következők: a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának át kell fednie egymással, a molekuláknak megfelelő relatív orientációval kell rendelkezniük, 2-10 nm távolságon belül. Az energiáttranszfer következtében a gerjesztett donor molekula visszakerül alap állapotba, míg az akceptor molekula gerjesztődik és megfelelő körülmények között relaxációját kísérheti fluoreszcens fotonok kibocsátása.

Az energiáttranszfer hatásfoka a donor-akceptor távolság ( $R$ ) hatodik hatványa szerint csökken, ami lehetővé teszi molekuláris távolságok vizsgálatát, ha ismert az a donor-akceptor párra specifikus távolság ( $R_0$ , Förster rádiusz), ahol a transzfer hatásfoka 50%.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad 3)$$

Az energiáttranszfer érzékeny távolságfüggése lehetővé teszi számos biológiai alkalmazását [172]. A vizsgálni kívánt fehérjék molekuláris közelségére következtethetünk mintegy spektroszkópiai vonalzóként használva a módszert [173]. Többféle lehetőség adódik a mikroszkópos FRET meghatározásra (donor vagy akceptor fotohalványítás - photobleaching, intenzitásmérésen alapuló FRET), illetve áramlási citométerrel is mérhetünk energiáttranszfert, amely segítségével rövid idő alatt nagyszámú sejt vizsgálható.

A transzfektált HeLa sejteken a citokin receptorok láncai között a molekuláris együttállást 2-10 nm-es szinten mikroszkópos, pixelenkénti FRET technikával [174, 175] vizsgáltuk, LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Németország) vagy TCS SP5 II (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) konfokális mikroszkópok segítségével. Az EGFP gerjesztéséhez egy argonion lézer 488 nm-es vonalát, az mCherry gerjesztéséhez 543 nm-es (Zeiss) vagy 594 nm-es (Leica) HeNe lézert használtuk. A fluoreszcencia intenzitásokat 3 csatornában detektáltuk:  $I_1$  – donor

(ex: 488 nm, em: 500-550 nm),  $I_2$  – transzfer (ex: 488 nm, em: 604-687 nm) és  $I_3$  – akceptor (ex: 543 vagy 594 nm, em: 604-687 nm), melyeket a következő egyenletekkel lehet kifejezni:

$$\begin{aligned} I_1 &= I_D(1-E) + B_1 \\ I_2 &= I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha + B_2 \\ I_3 &= I_A + B_3 \end{aligned} \quad 4)$$

ahol az  $E$  a (látszólagos) FRET hatásfok egy pixelben,  $I_D$  a donor intenzitása az 1. csatornában, ami FRET hiányában lenne jelen és az  $I_A$  az akceptor intenzitása a 3. csatornában. A spektrális átvilágítási faktorokat, az  $S_1 = (I_2 - B_2)/(I_1 - B_1)$  és  $S_2 = (I_2 - B_2)/(I_3 - B_3)$  képletek alapján számoltuk ki azon mintákból, ahol a sejtek egyszeresen voltak transzfektálva EGFP-vel (mint FRET donor), vagy mCherry-vel (akceptor). A háttér korrekció minden csatornában az átlagos autofluoreszcencia intenzitások ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ) levonásával történt, amiket a nem-transzfektált sejtek alapján határoztunk meg. Az  $\alpha$  faktor, amit az azonos mennyiségben kifejeződő gerjesztett donor és akceptor fehérjék donor és transzfer csatornákból érkező fluoreszcencia intenzitásai határoznak meg, a pSV-EGFP-mCherry fúziós plazmiddal transzfektált sejtekből (a két fluoreszcens fehérjét 1:1 arányban kifejezve), a következő képlettel számolható ki [175]:

$$\alpha = \frac{(I_1 - B_1)S_1 + \left(1 + \frac{\varepsilon^{EGFP}}{\varepsilon^{mCherry}}\right)(I_3 - B_3)S_2 - (I_2 - B_2)}{(I_1 - B_1)} \quad 5)$$

ahol  $\varepsilon^D(488) \sim 53000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon^A(488) \sim 5040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  az EGFP és az mCherry extinkciós koefficiensei a donor gerjesztési hullámhosszán [176, 177]. Az energiatranszfer hatásfokát ( $E$ ) minden donor- és akceptor FP-vel jelölt fehérjét ko-expresszáló mintára az alábbi képlet szerint határoztunk meg:

$$E = 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha} \left( \frac{(I_2 - B_2) - S_2(I_3 - B_3)}{(I_1 - B_1)} - S_1 \right)} \quad 6)$$

Az átlagos FRET hatásfok egy pixelben vagy egy sejtben a donor és az akceptor festékek relatív számától függ. A pozitív kontroll mintákban a donor és az akceptor azonos mennyiségben fejeződik ki, lehetővé téve az akceptor/donor expressziós arány ( $N_A/N_D$ ) meghatározását a többi mintában is [175].

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{(I_3 - B_3)(1-E)}{(I_1 - B_1)Q} \quad 7)$$

$Q$ : a pozitív kontroll FRET-tel korrigált akceptor/donor fluoreszcencia intenzitás aránya. A mérési adatok analízise során az 1 - 3 közötti akceptor/donor arányú sejteket vettük figyelembe.

Az endoplazmatikus retikulum és a Golgi apparátus azonosításához TagBFP-t is kifejező (Sac1 és giantin) plazmidokat használtunk, a donor és akceptor fehérjék plazmidjainak ko-transzfekeciója mellett. Így organelum-specifikus módon tudtuk a FRET adatokat analizálni azokban a pixelekben, ahol a TagBFP fluoreszcencia intenzitása egy beállított küszöbérték felett volt. A 405 nm-en gerjesztett kék fluoreszcens fehérje (TagBFP) használatának előnye, hogy nem interferál a FRET mérésekkel, nem befolyásolja a zöld-vörös donor-akceptor pár kölcsönhatását. A mérési adatokat a FiJi ImageJ [178] programmal, RiFRET plugin [179] használatával értékeltük ki.

#### 4.16. FRET hatások meghatározása áramlási citometriával

Az FT7.10 sejtek membránfehérjéinek molekuláris asszociációit áramlási citometriás FRET mérések segítségével vizsgáltuk. A mérésekhez egyszeresen (csak donor vagy csak akceptor) és duplán (donor- (Alexa Fluor 546) illetve akceptor- (Alexa Fluor 647) festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel) jelölt sejteket használtunk. FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) áramlási citométerrel az összes sejtről három csatornában ( $I_1$ ,  $I_2$  és  $I_3$  - donor, FRET és akceptor) detektáltuk a fluoreszcencia intenzitásokat. A következő gerjesztési hullámhosszakot és detektálási tartományokat alkalmaztuk: 561/595±25, 561/>635 és 633/>635 nm. Az  $S_1$ ,  $S_2$  és  $S_3$  átvilágítási faktorok és a donor és az akceptor detektálási hatékonyságát jellemző  $\alpha$  faktor egyszeresen jelölt (csak donoros vagy csak akceptoros) mintákból lettek meghatározva [180].

A döglött sejteket kizártuk az analízisből az oldalszórás/előre szórás dot plot-ok alapján. A FRET adatokat az intézet korábbi munkatársa által írt REFLEX nevű programmal [181] értékeltük ki. A három csatornában detektált intenzitásokból az átlagos FRET hatások,  $E$ , a teljes gyengítetlen donor intenzitás és a teljes akceptor intenzitás minden sejtre meghatározható [180]. Akceptor/donor arányok meghatározása a következőképpen történt: az Alexa 647-W6/32-vel jelölt MHC I akceptor csatornában mért átlagos sejtenkénti intenzitásának ( $\overline{I_3^A}$ ) és az Alexa 546-W6/32-vel jelölt MHC I fehérjék donor csatornában mért átlagos sejtenkénti intenzitásának ( $\overline{I_1^D}$ ) aránya normalizálva a W6/32 antitest festék/protein (F/p) jelölési

arányaival. Ez megadja a donor és az akceptor festékek relatív detektálási hatékonyságát a két csatornában.

$$Q = \frac{\overline{I_3^A} / (F / p)_{A647-W6/32}}{I_1^D / (F / p)_{A546-W6/32}} \quad 8)$$

Az összes duplán jelölt minta esetén az  $N_A/N_D$  arány az alábbi képlettel kiszámítható (példaként donorként az anti-Tac-kal jelölt IL-2R $\alpha$ , akceptorként a W6/32-vel jelölt MHC I szerepel):

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{1}{Q} \frac{I_3^A / (F / p)_{A647-W6/32}}{I_1^D / (F / p)_{A546-anti-Tac}} \quad 9)$$

#### 4.17. Golgi izolálás ATL sejtekből

Az ED40515(+) vad típusú sejtekből (48 órás IL-2 megvonást követően) és az ED/IL-2 sejtekből Golgi apparátust tartalmazó frakciókat izoláltunk ultracentrifugálással, Golgi izoláló kit (Sigma-Aldrich) segítségével.  $4-8 \times 10^8$  ATL sejtet mostunk (proteáz inhibitor koktélt és PhosSTOP foszfatáz inhibitor - Sigma-Aldrich - tartalmazó) 0,25 M szukróz oldatban, majd a felülúszó eltávolítása után megmértük a sejt pelletet, melyet g-onként 1 ml 0,25 M szukróz oldatban szuszpendáltunk. A sejtszuszenziót (homogenizáló üvegcsőbe áttéve) a dugattyú 50-70-szeri fel-le mozgásával homogenizáltuk, majd a homogenizátumot  $3000 \times g$ -n 15 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót új csőbe átmérve, meghatároztuk annak szukrózkoncentrációját a következő képlet szerint:

$$[\text{szukróz}] = \frac{0,25 \times V_{\text{puffer}}}{m_{\text{sejt}} + V_{\text{puffer}}} \quad 10)$$

$V_{\text{puffer}}$ : 0,25 M szukróz oldat térfogata ml-ben,  $m_{\text{sejt}}$ : a megmért sejt tömeg grammban kifejezve (centrifugálás utáni pellet). Az 1,25 M végső szukrózkoncentráció beállításához az alábbi képlettel meghatározott térfogatú 2,3 M szukrózt adtunk a felülúszóhoz:

$$V_{\text{szukróz}} = \frac{V_{\text{felülúszó}} \times (1,25 - [\text{szukróz}])}{1,05} \quad 11)$$

A következő szukróz gradiens frakciókat rétegeztük egymásra egy ultracentrifuga csőbe: legalulra 1,84 M oldat, amire a minta réteget mértük (1,25 M-ra beállított szukrózkoncentrációval), majd 1,1 M és legfelül 0,25 M szukróz oldat. A rétegzett mintákat  $120000 \times g$ -n 3 órán át 4°C-on centrifugáltuk az Orvosi Vegytani Intézet (fix rotorú) Beckman

ultracentrifugájában. A Golgi-ban gazdag frakció a centrifugálás után az 1,1 és 0,25 M szukróz oldatok interfázisában helyezkedett el. Az izolálás minden lépését jégen vagy 4°C-on végeztük.

#### 4.18. Fehérjék kimutatása Golgi izolátumokban Western-blot technikával

Az ATL sejtek teljes sejtfrakcióit és Golgi izolátumait proteáz inhibitor és foszfatáz inhibitor (1:100) tartalmazó fehérje lízis pufferben oldottuk 4°C-on majd fehérje koncentrációjukat Bradford esszével határoztuk meg. A 2 mg/mL koncentrációjára beállított lizátumokat azonos térfogatú denaturáló pufferrel elegyítettük és elfőztük (99°C, 10 perc). Mintánként 20 µg fehérjét 8%-os SDS–poliakrilamid gélen választottunk szét, majd PVDF membránra blottoltunk. A membránt 5% BSA-s TTBS-ben való blokkolás után a 0,5% tejporos vagy BSA-s TTBS-ben hígított elsődleges antitestekkel egész éjszakán át inkubáltuk 4°C-on, billegtetve. Az ER és Golgi jelenlétén kívüli lehetséges szennyező organelumok azonosítását specifikus antitestekkel (4. táblázat) végeztük. Ezután 3×15 perces TTBS-ben történő mosás, majd a tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel (Advansta Inc.) egy órán át, szobahőmérsékleten való inkubálás következett. A fehérje sávokat peroxidáz előhívó oldattal (ECL Kit: WesternBright ECL HRP substrate, Advansta Inc., San Jose, CA) tettük láthatóvá.

Elsődleges antitest	Antigén/Fehérje	Host	Hígítás	Gyártó	Másodlagos antitest
p-JAK1 (Tyr 1022)	foszforilált JAK1	rabbit polyclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
p-JAK3 (Tyr 980)	foszforilált JAK3	goat polyclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Donkey anti-Goat IgG (H+L) HRP
pY20	foszfitirozin	mouse monoclonal	1:2000	Santa Cruz Biotechnology	Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP
Mikβ3	IL-2/15Rβ	mouse monoclonal	1:1000	BD Pharmingen	Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP
TUGh4	γc	rat monoclonal	1:2000	BD Pharmingen	Goat anti-Rat IgG (H+L) HRP
anti-GM130	GM130 (cis-Golgi)	rabbit monoclonal	1:5000	Abcam	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
anti-Calreticulin	Calreticulin (ER)	rabbit monoclonal	1:10000	Abcam	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
anti-LAMP1	LAMP1 (lizoszóma/késői endoszóma)	rabbit polyclonal	1:1000	Abcam	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
anti-Rab11	Rab11 (recirkuláló endoszóma)	rabbit monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
D3H1Q	MDR1/ABCB1	rabbit monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP

4. táblázat: A fehérjék kimutatásához használt antitestek

#### **4.19. Statisztikai elemzés**

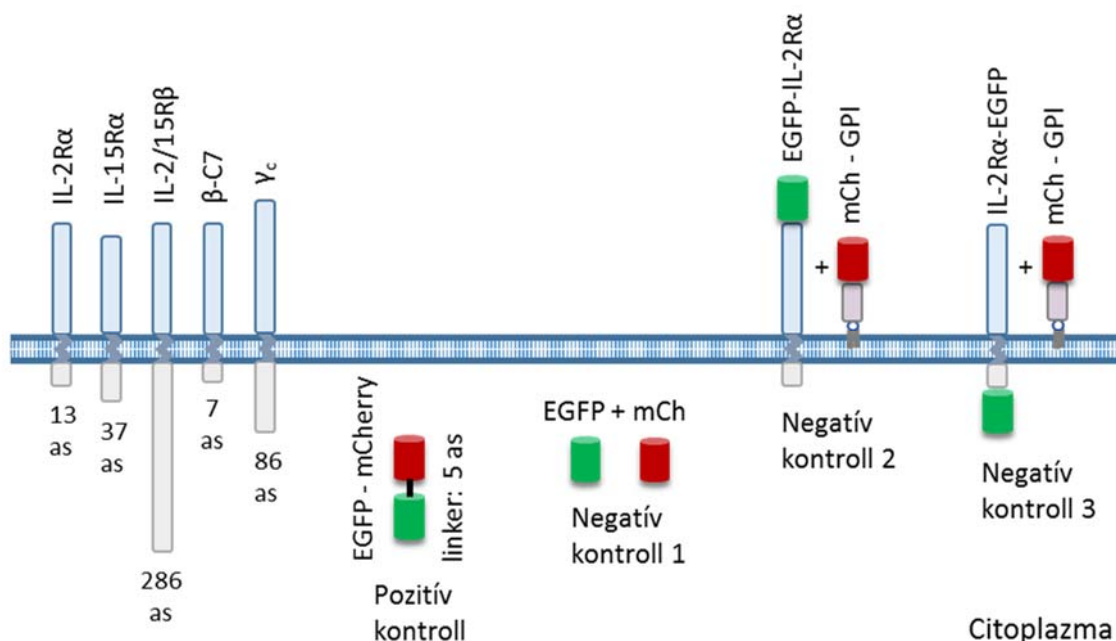
A statisztikai elemzésekhez Student'féle t-tesztet használtunk (helyenként Holm-Sidak korrekcióval) a GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA) program segítségével. Azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol  $p < 0,05$  volt.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 IL-2/15 receptorok intracelluláris összeszerelődése

#### 5.1.1. A ko-transzfektált IL-2/15 receptor alegységek részleges kolokalizációt mutatnak az ER és a Golgi területén

Az IL-2-termelő sejtek esetén a sejtfelszíni receptorokat (és az exogén IL-2-t) célzó blokkoló antitestek hatástalanságára elképzelhető magyarázat lehet az, hogy az IL-2 receptorok már előre összeszerelődnek a szintézisüket követően és az endogén IL-2-t felhasználva elindítják a jelátvitelt, még mielőtt eléri a plazmamembránt. Ezért célul tűztük ki a receptor alegységek kolokalizációjának és molekuláris közelségének vizsgálatát a szekréciós úton az ER-ben és a Golgi-ban. Az alábbi sematikus rajz (7. ábra) a kísérleteink során vizsgált receptor alegységeket és az alkalmazott kontrollokat ábrázolja. Az alegységek intracelluláris doménjeinek hosszát (aminosavak számával) is feltüntettem. Az általunk modellrendszerként használt HeLa sejt vonal a vizsgálandó receptorok egyik alegységét sem fejezi ki, így azokat ko-transzfektációval, N- vagy C-terminálisukon fluoreszcens fehérjével megjelölve juttattuk be a sejtekbe a mérések előtt 24 órával.



**7. ábra: IL-2/15 receptor alegységek és kontrollok sematikus ábrája**  
A FRET mérések során a receptorláncok N- vagy C-terminálisukon EGFP (donor) vagy mCherry (akceptor) fluoreszcens proteint hordoztak.

Az élő HeLa sejtek különböző intracelluláris kompartmentumaiban a receptorláncok (membrán domén szintű) együttállását először a közöttük lévő kolokalizáció mértékének meghatározásával ~200-300 nm felbontással, konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

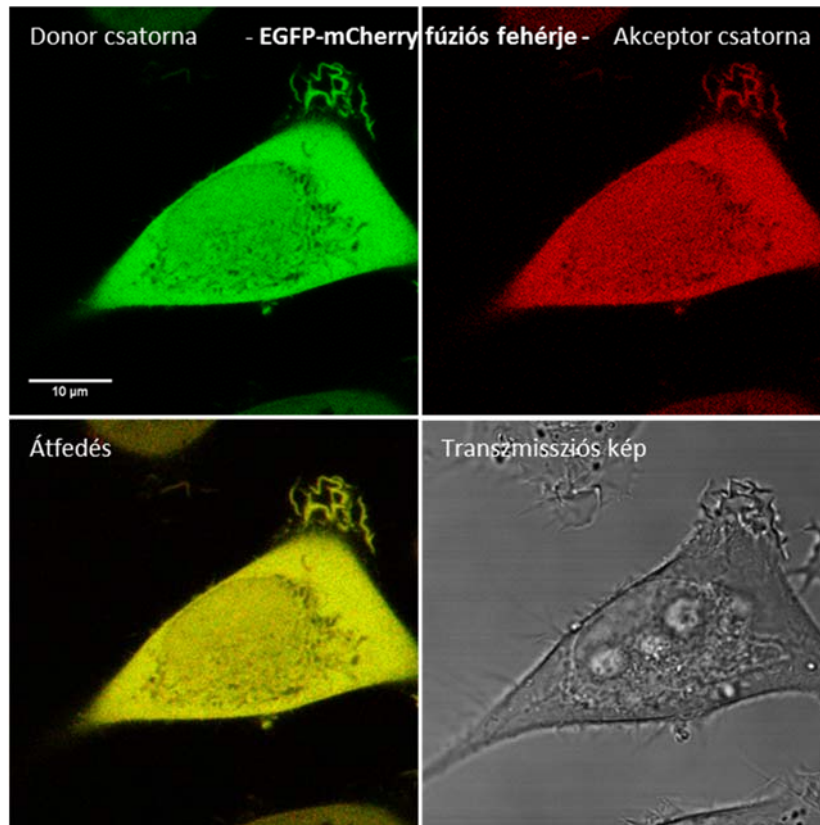
A kolokalizáció mértéke a két csatornában készült kép zöld és vörös pixel intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs koeficiens (C) meghatározásával fejezhető ki, amelyeket az 5. táblázatban foglaltam össze. Ennek a paraméternek a maximális értéke 1 a teljes mértékben átfedő eloszlások esetén, egymástól független eloszlásoknál 0, és negatív, ha egymást kölcsönösen kizárják.

Kölcsönható partnerek	Korrelációs koeficiens C, átlag ± s.d. (n)			
	ER	Golgi	Plazmamembrán	Teljes sejt
Pozitív k. (EGFP-mCherry)				0,93 ± 0,01 (13)
Negatív k. (randomizált képek)				0,00 ± 0,00 (13)
IL-2/15Rβ + γ <sub>c</sub> (C)	0,55 ± 0,22 (13)	0,50 ± 0,16 (15)		
IL-2Rα + β-C7 (C)	0,70 ± 0,14 (16)	0,69 ± 0,21 (18)	0,83 ± 0,06 (27)	
IL-15Rα + β-C7 (C)	0,62 ± 0,07 (10)	0,67 ± 0,19 (10)	0,83 ± 0,06 (18)	
IL-2Rα + IL-15Rα (N)	0,54 ± 0,21 (12)	0,48 ± 0,23 (10)	0,89 ± 0,05 (15)	
γ <sub>c</sub> + γ <sub>c</sub> (C)	0,50 ± 0,33 (10)	0,68 ± 0,32 (16)		

**5. táblázat: Pearson-féle korrelációs koeficiens:** donorral és akceptorral jelölt protein párok, az első receptor alegység EGFP-vel, a második mCherry-vel volt jelölve. A jelölés pozíciójának (N vagy C terminális, az 1. oszlopban) és zárójelben az analízisbe bevont sejtek számának feltüntetésével.

Az EGFP-vel vagy mCherry-vel jelölt különböző alegységek kolokalizációjáról készített konfokális mikroszkópos képeket a következő oldalakon mutatom be.

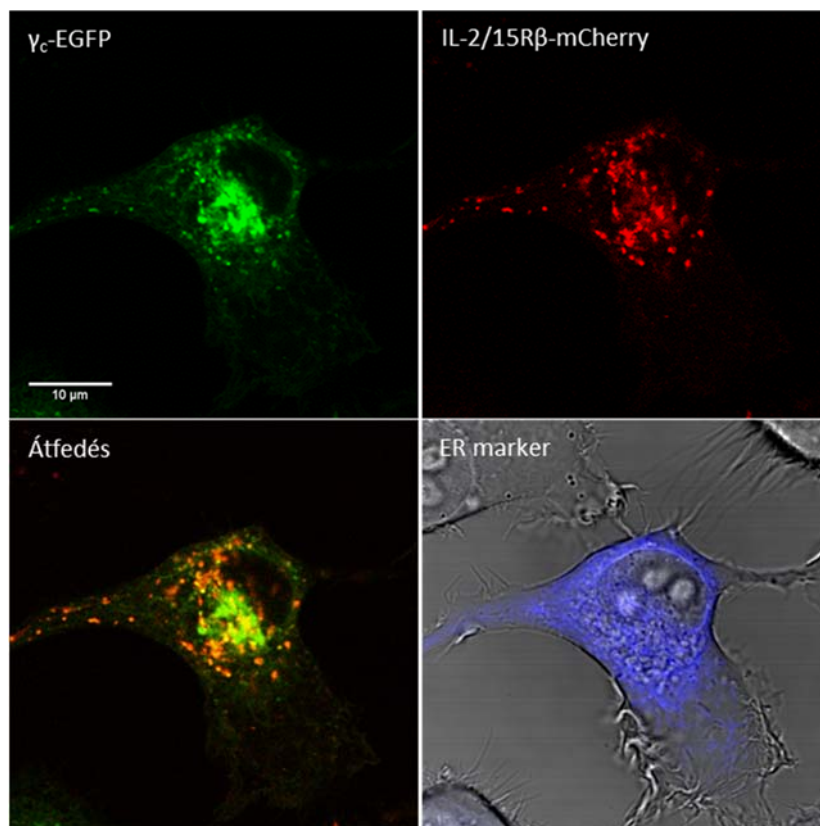
A pozitív kontrollként használt EGFP-mCherry fúziós fehérje, amelynél a zöld és a vörös csatornában lévő intenzitások homogén sárga színű átfedő képet eredményeznek, magas átlagos korrelációs koefficienssel rendelkeznek ( $C=0,93$ ) (5. táblázat, 8. ábra). A negatív kontrollnál, a többszörösen randomizált képek pixeleiből a kolokalizációs együttható értéke 0-nak adódott.



**8. ábra: Az EGFP-mCherry fúziós fehérjéről (pozitív kontroll) készült konfokális felvétel**

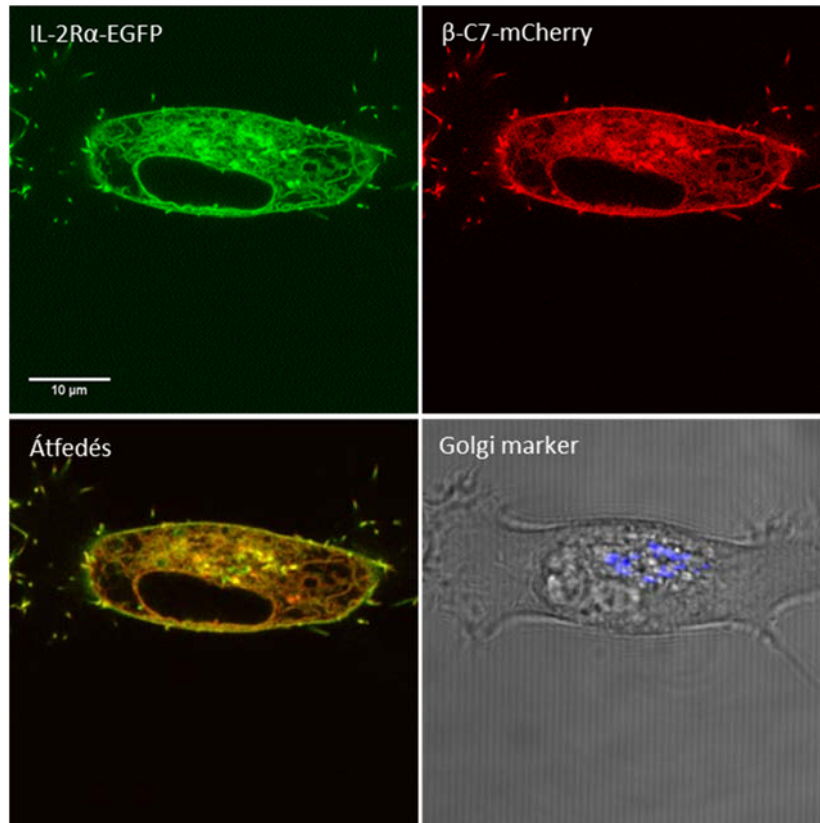
A sejt-organellumokat kék színű fluoreszcens fehérjével, TagBFP-vel jelölt ER/Golgi rezidens proteinek segítségével azonosítottuk, így a receptor alegységek kolokalizációját organellum-specifikus módon tudtuk tanulmányozni.

A  $\gamma_c$ -EGFP és az IL-2/15R $\beta$ -mCherry kolokalizációja az ER-ben és a Golgi-ban csak részleges volt; amellett hogy voltak olyan területek, ahol mindkét fehérje hasonló intenzitást mutatott, olyan régiók is előfordultak, ahol az egyik vagy a másik receptorlánc dominált (9. ábra). A részleges kolokalizációra utal a korrelációs együttható pozitív kontrollhoz viszonyított alacsonyabb értéke is (0,55 az ER-ben és 0,5 a Golgi-ban).



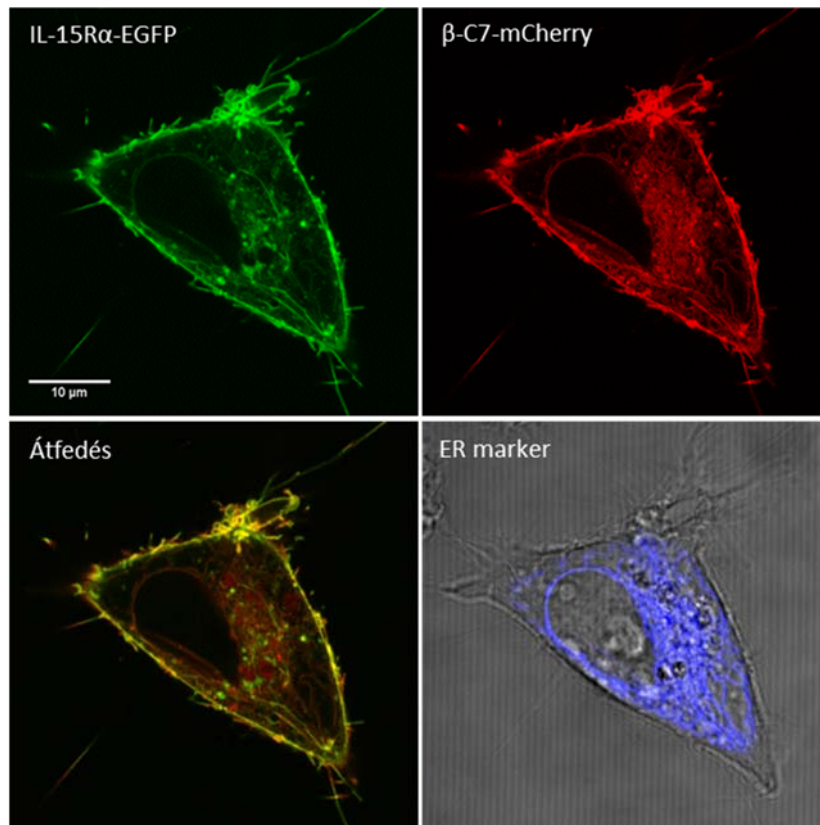
**9. ábra: A  $\gamma_c$ -EGFP és az IL-2/15R $\beta$ -mCherry ko-transzfekeciójáról készített konfokális mikroszkópos felvétel (ER-t azonosító organellum-jelölő jelenlétében)**

Az IL-2R $\alpha$ -EGFP és a  $\beta$ -C7-mCherry (az IL-2/15R $\beta$  alegység C-terminálison rövidített verziója) esetében, az ER-ben és a Golgi-ban is magasabb korreláció volt mérhető ( $C \approx 0,7$ ), és még magasabb a plazmamembránban ( $C=0,83$ ).



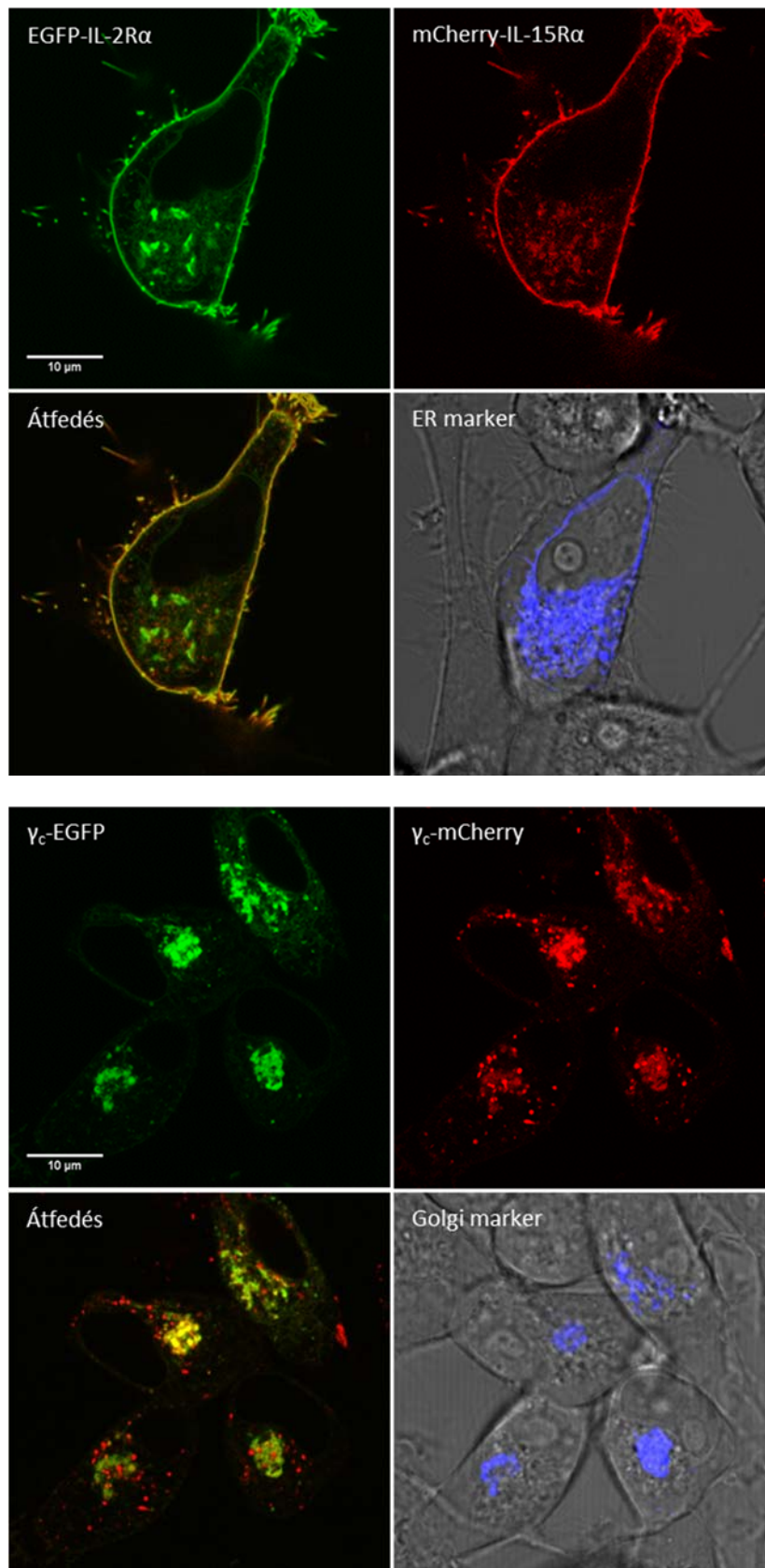
**10. ábra: IL-2R $\alpha$ -EGFP és  $\beta$ -C7-mCherry ko-expresszió (Golgi marker jelenlétében)**

Az IL-15R $\alpha$ -EGFP és a  $\beta$ -C7-mCherry esetén hasonló tendenciát kaptunk: részleges kolokalizáció az ER-ben és a Golgi-ban ( $C=0,62$  és  $0,67$ ) és nagyobb mértékű a plazma membránban ( $C=0,83$ ).



**11. ábra: IL-15R $\alpha$ -EGFP és  $\beta$ -C7-mCherry ko-transzfekeióról készült konfokális kép (ER-jelölővel)**

Az EGFP-IL-2R $\alpha$  és az mCherry-IL-15R $\alpha$  alegységek (12. ábra felső panelei) közepes  $C$  értéket adtak az ER/Golgi területén ( $0,54$  és  $0,48$ ) és igen magas értéket a plazmamembránban ( $0,89$ ). A ko-transzfekeiólt  $\gamma_c$ -EGFP és  $\gamma_c$ -mCherry kolokalizációja (12. ábra alsó panelei) az ER-ben és a Golgi-ban szintén részleges volt ( $C=0,5$  és  $0,68$ ). A  $\gamma_c$  lánc sejtfelszíni gyenge fluoreszcencia intenzitása nehezen elkülöníthető az autofluoreszcenciától, ezért ennél a fehérje-párnál csak az intracelluláris organelumok területén határoztuk meg a korrelációs együtthatókat, a plazmamembránban nem.



12. ábra: A felső paneleken az EGFP-IL-2R $\alpha$  és mCherry-IL-15R $\alpha$  (ER jelöléssel), alattuk a  $\gamma_c$ -EGFP és  $\gamma_c$ -mCherry (Golgi markerrel)

### 5.1.2. A konfokális mikroszkópiás FRET mérések során alkalmazott kontrollok

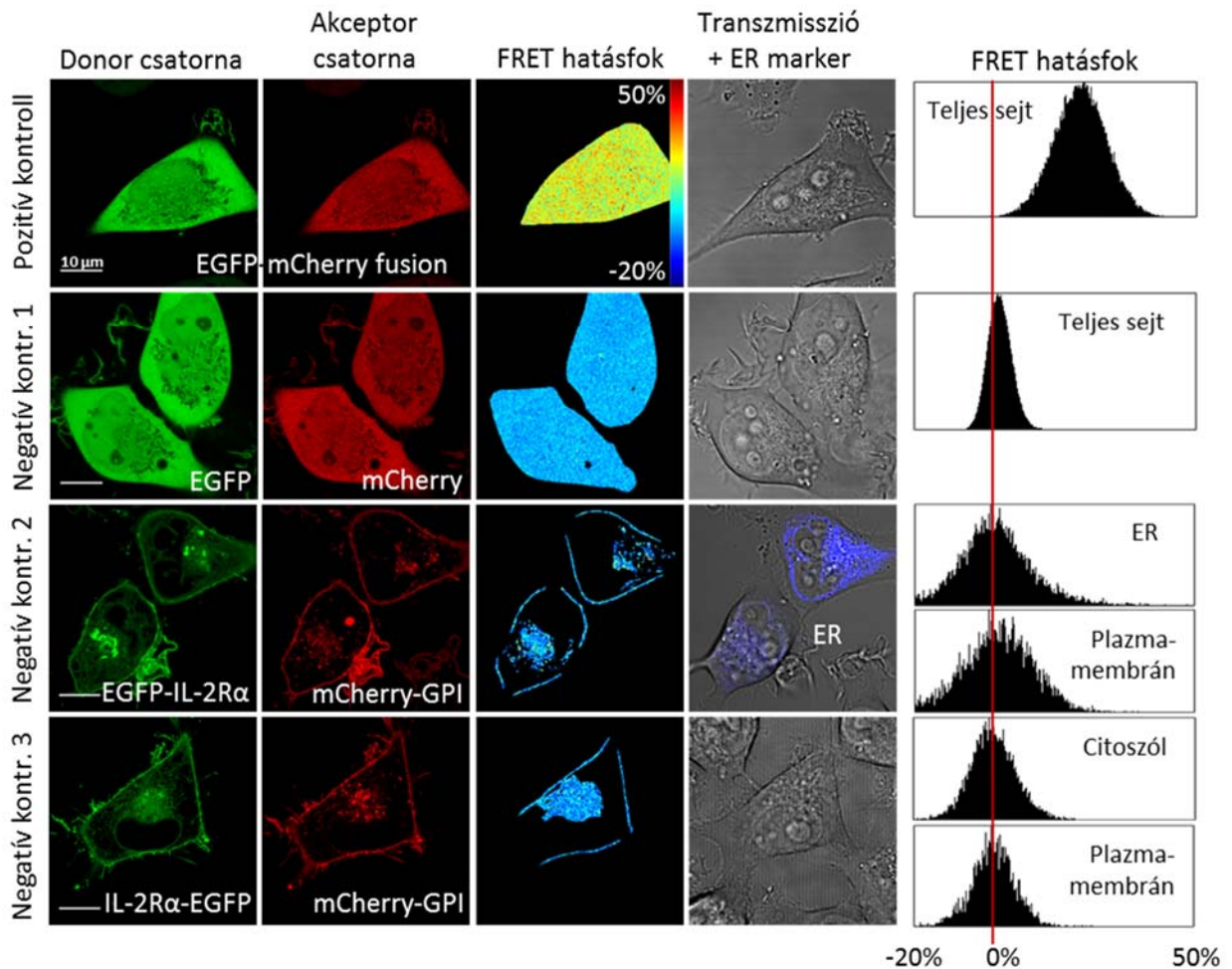
Az IL-2/15 receptor alegységek molekuláris szintű intracelluláris összeszerelődését konfokális mikroszkópiás, intenzitás-alapú FRET mérésekkel vizsgáltuk, organelum-specifikus módon. A mérések százalékos eredményeit az 6. táblázatban foglaltam össze (61. oldal).

A pozitív kontroll, a zöld és a vörös fluoreszcens fehérjét 1:1 arányban kifejező EGFP-mCherry fúziós fehérje, amely a teljes sejtben egyenlően expresszálódik,  $E=24,5\% \pm 2,3\%$ -os (átlag  $\pm$  s. d.) átlagos FRET hatásfokot eredményezett (13. ábra, 1. sor; 14. ábra).

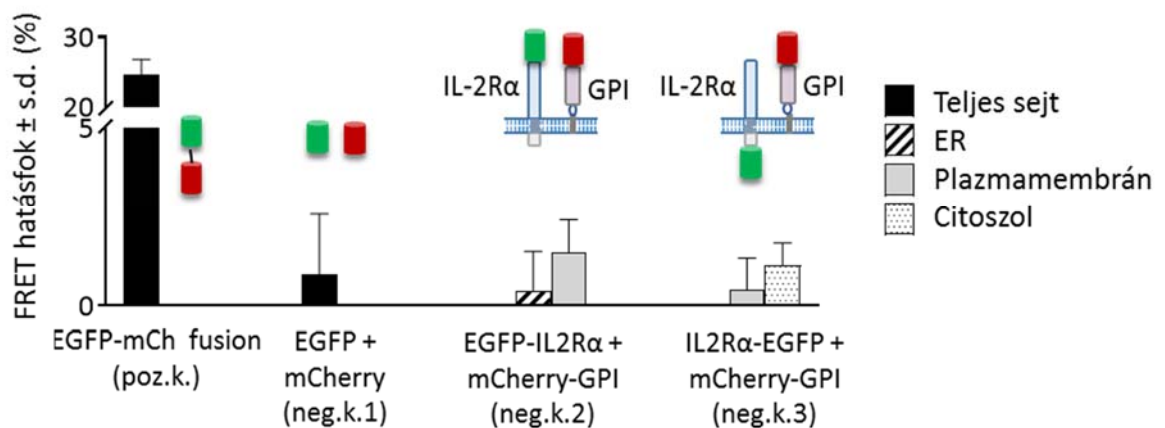
Negatív kontrollként három különböző mintát alkalmaztunk. Az egyik az üres EGFP és mCherry expressziós vektorok ko-transzfekeciója által valósult meg, amely (a magvacskák kivételével) a teljes sejtben egyenletes eloszlást mutatott,  $E=0,9\% \pm 1,7\%$  átlagos transzfer hatásfokot adott (13. ábra, 2. sor).

A második negatív kontroll az N-terminálisan jelölt EGFP-IL-2R $\alpha$  ko-expressziója az mCherry-GPI-vel, mely esetben a donor és az akceptor fluorofór is a plazmamembrán extracelluláris oldalán helyezkedett el (13. ábra, 3. sor),  $E=0,4\% \pm 1,1\%$  transzfer hatásfokot eredményezett az ER-ben, és  $1,5\% \pm 0,9\%$ -ot a plazmamembránban. Ez a kontroll alkalmas az esetlegesen kialakuló random FRET vizsgálatára is, mely véletlen együttállás révén következhet be két egymástól független membránkomponens között. A kontroll fehérjek is a lipid tutajokban fejeződnek ki hasonló koncentrációban, mint a receptorláncok egy-egy adott kísérlet során. Az alacsony  $E$  értékek arra utalnak, hogy a kísérleteink során a receptorokhoz használt expressziós szint mellett jelentős mértékű random FRET nem jött létre.

A harmadik negatív kontrollt a C-terminálison jelölt IL-2R $\alpha$ -EGFP és az mCherry-GPI (13. ábra, 4. sor) ko-transzfekektált sejtek jelentették, melyek esetén  $E=1,1\% \pm 0,6\%$  FRET hatásfok volt mérhető a citoszolban (itt ER/Golgi markert nem használtunk) és  $0,4\% \pm 0,9\%$  a plazmamembránban. Ebben az esetben az IL-2R $\alpha$  az intracelluláris részén, míg a GPI az extracelluláris oldalán fejezte ki a fluoreszcens fehérjét. Így a donor és az akceptor legalább a membrán lipid kettősréteg vastagságának megfelelő távolságra volt egymástól (5-10 nm). Ez a kontroll azt mutatja, hogy egy olyan mintánál, ahol a donor-akceptor távolság a FRET tartományon kívül esik, a FRET hatásfok praktikusán nulla, bizonyítva, hogy a spektrális átvilágítási faktorok pontos meghatározásával pontos FRET számítást végezhetünk. Hangsúlyozandó, hogy az átlagos FRET hatásfokok minden általunk alkalmazott negatív kontroll esetén  $1,6\%$  alatt voltak (14. ábra).



13. ábra: Kontroll minták konfokális mikroszkópos felvételei a donor és akceptor csatornában, FRET hatásfok eloszlásokkal és transzmissziós képekkel

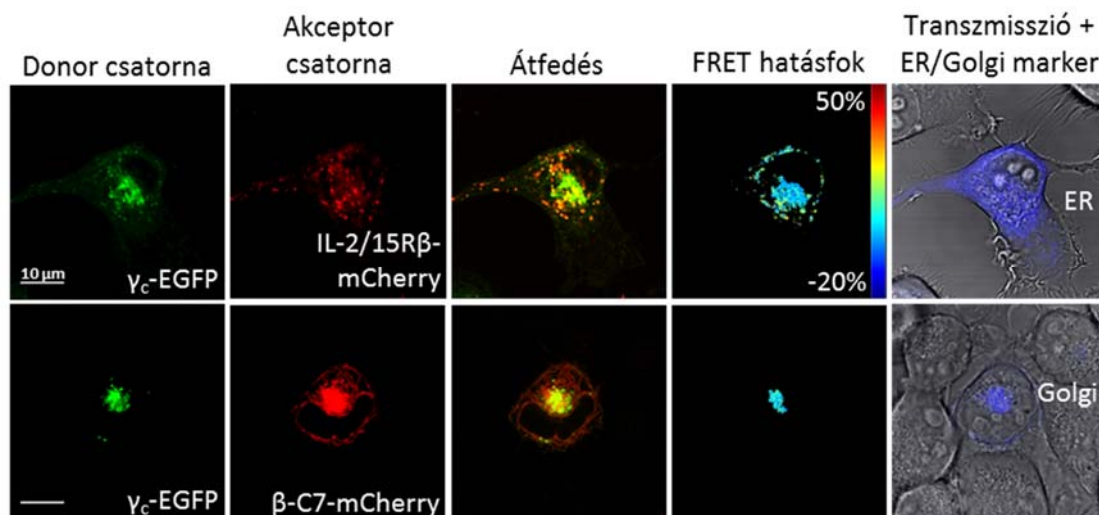


14. ábra: Átlagos FRET hatásfokok a különböző kontroll minták esetében (a mérésenkénti sejtszámok a 6. táblázatban találhatóak)

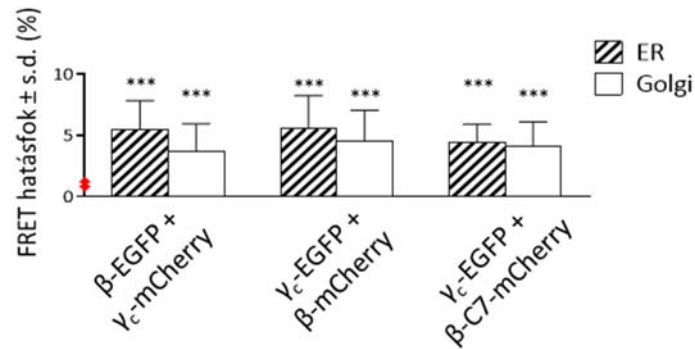
### 5.1.3. Az IL-2/15R $\beta$ lánc asszociál a $\gamma_c$ alegységgel az ER-ben és a Golgi-ban

A kontroll minták energia transzfer hatásfokainak meghatározása után a közepes ligandkötő affinitással rendelkező IL-2/15R $\beta$  -  $\gamma_c$  heterodimerek összeszerelődését vizsgáltuk. A FRET méréseket először  $\gamma_c$ -EGFP-vel és IL-2/15R $\beta$ -mCherry-vel ko-transzfektált sejteken végeztük el. A FRET hatásfokokat kizárólag azokból a pixelekből számoltuk, ahol az ER vagy a Golgi marker jelen volt, ezeken a területeken 5,5%-ot ( $\pm 2,7\%$ ) és 4,6%-ot ( $\pm 2,5\%$ ) kaptunk (15. ábra, 1. sor). A donor és akceptor jelölés felcserélése (IL-2/15R $\beta$ -EGFP és  $\gamma_c$ -mCherry) hasonló FRET hatásfokokat eredményezett: 5,5%  $\pm$  2,4% (ER) és 3,7%  $\pm$  2,2% (Golgi). Minden érték szignifikánsan nagyobb volt, mint a negatív kontroll (EGFP+mCherry) (16. ábra), ami arra utal, hogy az IL-2/15R $\beta$  és  $\gamma_c$  alegységek legalább részben összeszerelődnek ezekben az organelumokban. A  $\gamma_c$ -EGFP és az IL-2/15R $\beta$ -mCherry receptorláncok sejtfelszíni fluoreszcencia intenzitása nehezen volt elkülöníthető az autofluoreszcencia intenzitásuktól, ezért a plazmamembránban nem tudtunk FRET-et számolni.

Az interleukin-2 és -15 receptorok alegységei közül az IL-2/15R $\beta$  rendelkezik a leghosszabb intracelluláris doménnel, ami 200 aminosavval hosszabb, mint a  $\gamma_c$  lánc intracelluláris doménje. Ahhoz, hogy a két receptorláncot közelebb hozzassuk egymáshoz, elkészítettük a  $\beta$  alegység C-terminálison rövidített verzióját, a  $\beta$ -C7 konstruktot (mindössze 7 aminosav hosszú citoplazmatikus résszel). Várakozásainkkal ellentétben ez a módosítás nem volt szignifikáns hatással a transzfer hatásfokra,  $E=4,4\% \pm 1,5\%$  volt az ER-ben és  $4,1\% \pm 2,0\%$  a Golgi-ban (15. ábra, 2. sor).



15. ábra:  $\gamma_c$ -EGFP és IL-2/15R $\beta$ -mCherry illetve  $\gamma_c$ -EGFP és  $\beta$ -C7-mCherry ko-expressziója: reprezentatív képek a donor és akceptor csatornákból, azok átfedő képei, FRET hatásfok térképpel és organelum-markerrel



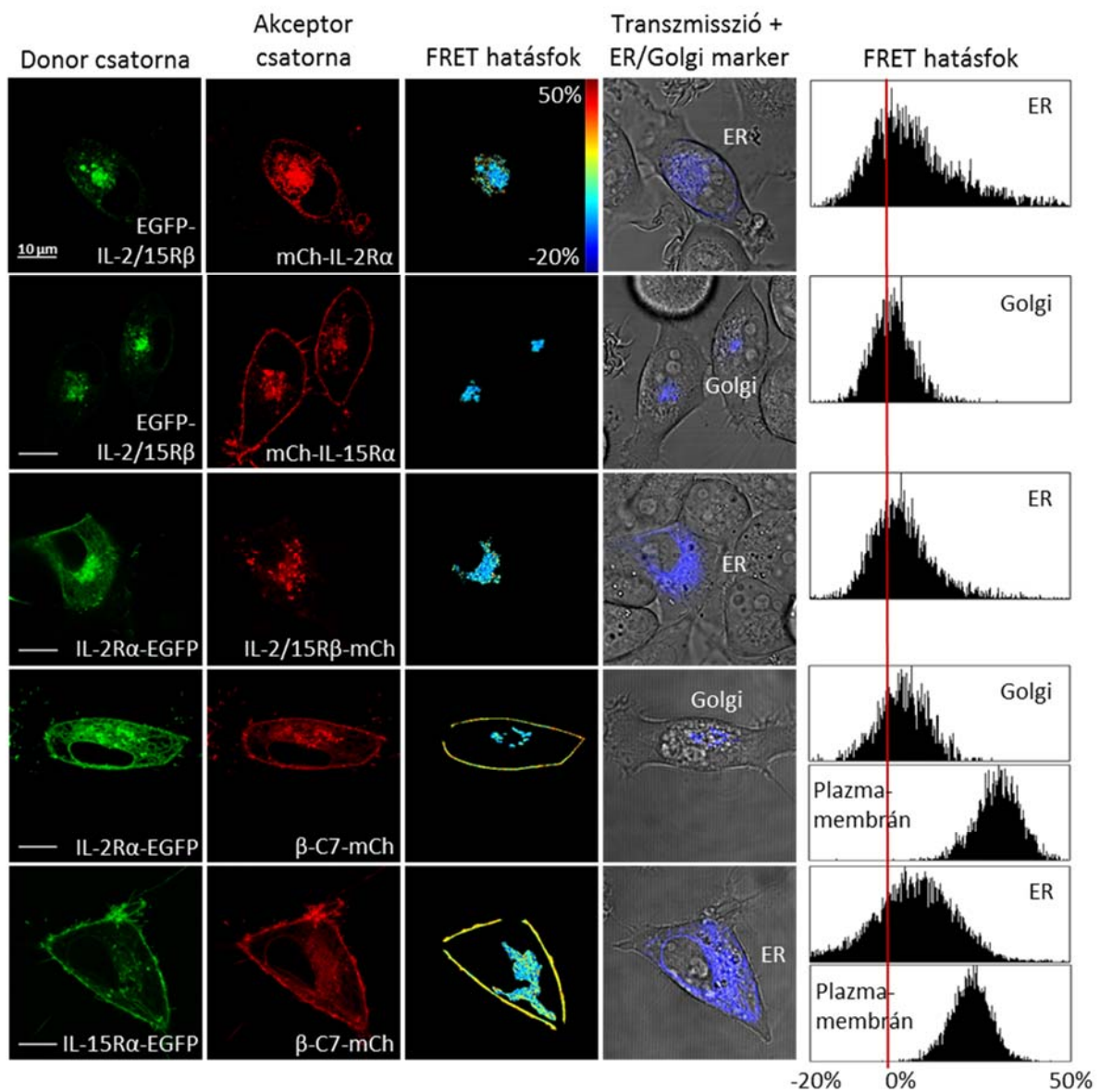
**16. ábra:  $\gamma_c$  és IL-2/15R $\beta$  ill.  $\gamma_c$  és  $\beta$ -C7 asszociációk átlagos FRET értéke**  
Az y tengelyen feltüntetett piros nyíl a negatív kontroll átlagát jelzi (szignifikáns eltérések a negatív kontrolltól:  $p < 0,001$ ). A mérésenkénti sejtszámokat a 6. táblázat tartalmazza.

#### 5.1.4. Az IL-2/15R $\beta$ alegység részlegesen asszociál az IL-2R $\alpha$ -val és az IL-15R $\alpha$ -val a szekréciós útvonalon, mielőtt teljesen összeszerelődnek a sejtfelszínen

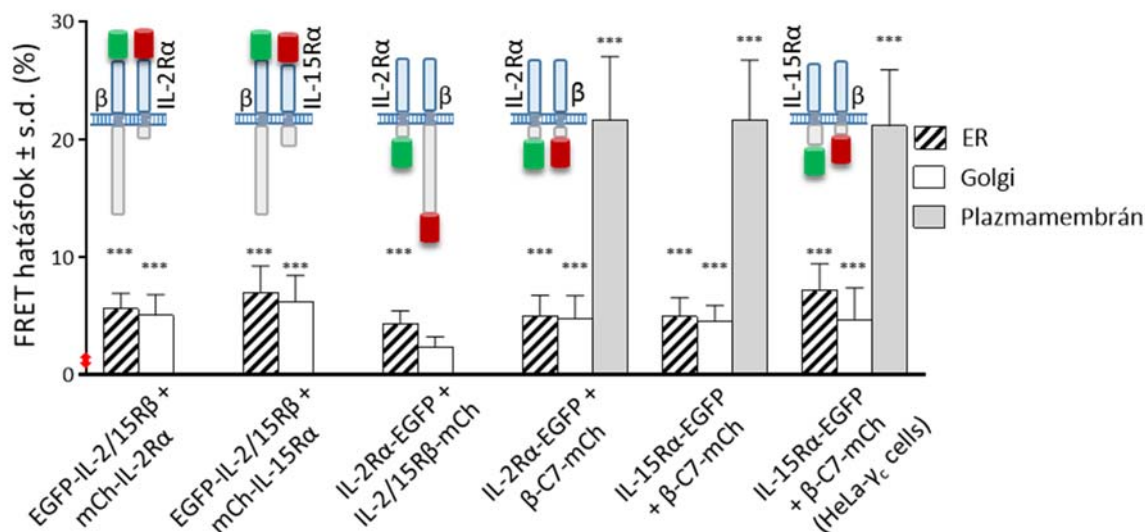
A későbbiekben az IL-2/15R $\beta$  láncnak a citokin-specifikus IL-2R $\alpha$ -val és IL-15R $\alpha$ -val való kölcsönhatását vizsgáltuk. Összehasonlítottuk az N- és C-terminálison jelölt alegység-párokat, és megvizsgáltuk a  $\beta$  lánc rövidítésének és a harmadik alegység jelenlétének hatását. Az N-terminálison jelölt alegységek közötti FRET hatásfokok, EGFP-IL-2/15R $\beta$  és mCherry-IL-2R $\alpha$  (5,5%  $\pm$  1,3% az ER-ben, 5,0%  $\pm$  1,7% a Golgi-ban) vagy mCherry-IL-15R $\alpha$  (6,9%  $\pm$  2,4% az ER-ben, 6,2%  $\pm$  2,3% a Golgi-ban) között (17. ábra, 1-2. sor) szignifikánsan magasabbak voltak a negatív kontrollnál. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy mindkét  $\alpha$  lánc legalább részlegesen asszociál a  $\beta$  láncsal, mielőtt kikerülne a sejtfelszínre. Alacsonyabb FRET értékeket kaptunk a C-terminálison jelölt IL-2R $\alpha$ -EGFP és IL-2/15R $\beta$ -mCherry esetén (4,3%  $\pm$  1,1% - ER, 2,3%  $\pm$  0,9% - Golgi, 17. ábra, 3. sor), mint ugyanezen alegységek N-terminálison jelölt változatai között, ami valószínűleg a C-terminálisok közötti nagyobb távolságból fakad. Ezért megismételtük a FRET méréseket (17. ábra, 4-5. sor) a rövid intracelluláris doménnel rendelkező  $\beta$ -C7-mCherry és IL-2R $\alpha$ -EGFP (5,0%  $\pm$  1,7% - ER, 4,7%  $\pm$  2,0% - Golgi) vagy IL-15R $\alpha$ -EGFP (4,9%  $\pm$  1,6% - ER, 4,5%  $\pm$  1,3% - Golgi) ko-transzfecciókkal is. Ez magasabb FRET hatásfokokat eredményezett, mint amit a teljes hosszúságú  $\beta$  láncsal kaptunk (18. ábra). A  $\beta$ -C7-mCherry használatakor mind az IL-2R $\alpha$ -EGFP, mind az IL-15R $\alpha$ -EGFP esetén az alegységek erős sejtfelszíni expresszióját tapasztaltuk és sokkal magasabb FRET hatásfokot sikerült mérni a plazmamembránban (21,6%  $\pm$  5,4% az IL-2R $\alpha$  és 21,6%  $\pm$  5,1% az IL-15R $\alpha$  esetén), mint az ER-ben vagy a Golgi-ban. A plazmamembránban mért magas energia transzfer arra utal, hogy ezen receptor alegységek

teljes összeszerelődése csak a rendeltetési helyükön következik be, vagyis a szekréción utján történő összeszerelődés részleges.

Annak kiderítésére, hogy vajon a  $\gamma_c$  alegység - mint a magas affinitású  $\alpha\beta\gamma_c$  receptor heterotrimerek harmadik tagja - hatással van-e az  $\alpha$  és  $\beta$  láncok kölcsönhatására, jelöletlen, fluoreszcens protein nélküli  $\gamma_c$  láncot stabilan kifejező HeLa- $\gamma_c$  sejtvonalat használtunk. A mérések eredménye szerint a  $\gamma_c$  alegység jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az IL-15R $\alpha$  és a  $\beta$ -C7 heterodimerek közötti kölcsönhatást (18. ábra, utolsó oszlop csoport, 6. táblázat).



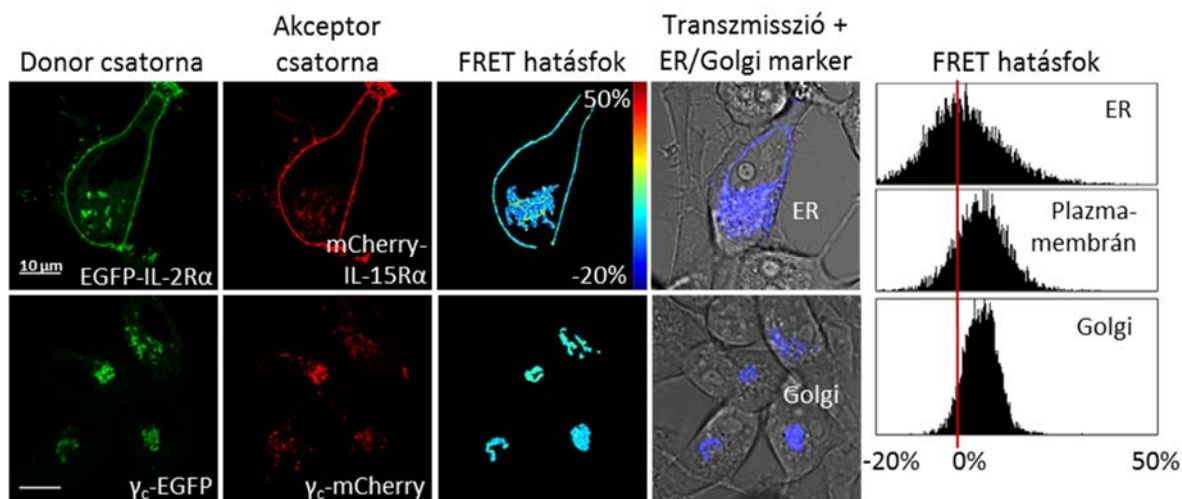
**17. ábra: Teljes hosszúságú és rövidített IL-2/15R $\beta$  kölcsönhatása az IL-2R $\alpha$ -val és IL-15R $\alpha$ -val:** mikroszkópos képek a donor és akceptor csatornákból, FRET hatásfok térképpel és eloszlásokkal, az ER illetve a Golgi jelölésével



**18. ábra:** Átlagos energiáttranszfer hatásfokok a teljes hosszúságú és a C-végén rövidített IL-2/15Rβ alegység citokin-specifikus α láncokkal kialakított hetero-asszociációi esetén. A mérésenkénti sejtszámok a 6. táblázatban találhatóak. Szignifikáns eltérések a negatív kontrolltól:  $p < 0,001$ .

### 5.1.5. Az IL-2Rα és IL-15Rα közös klaszterei

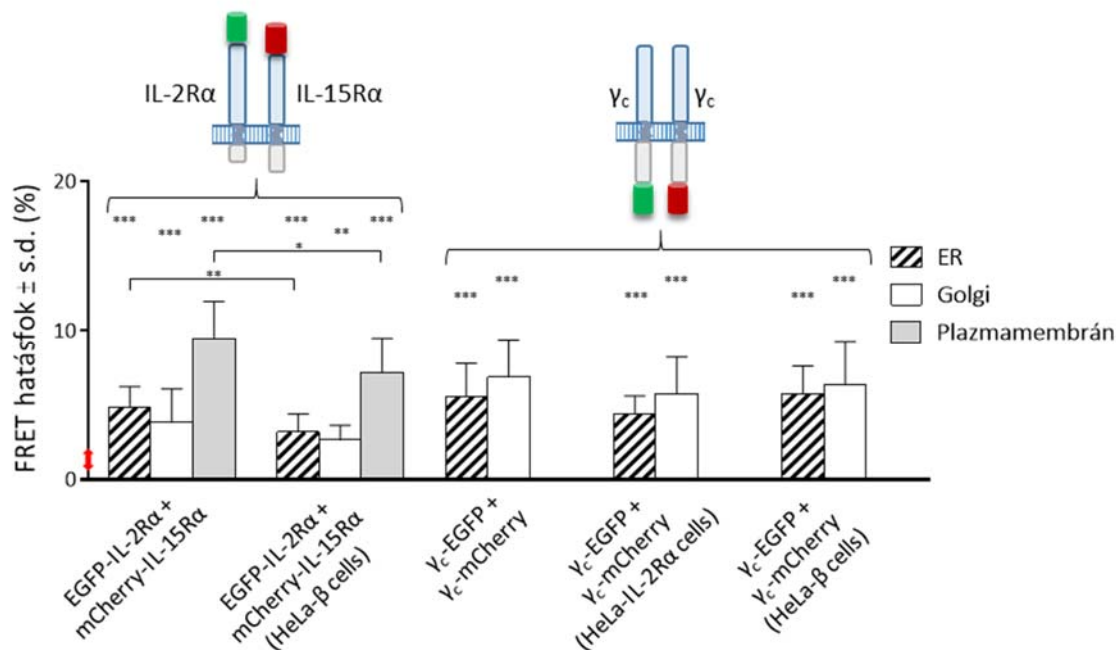
Intézetünkben korábban kimutatták, hogy az IL-2Rα és az IL-15Rα közös komplexben fejeződik ki a T sejteken [158], ami feltehetően a jelátvivő β és γ<sub>c</sub> alegységek hatékony megosztásában játszik szerepet. Kíváncsiak voltunk, vajon a két α lánc már a szintézisüket követően, a szekréciós úton is asszociál-e egymással. Az N-terminálison EGFP-vel vagy mCherry-vel jelölt α láncok vizsgálata pozitív FRET hatásfokot eredményezett, ami intracelluláris heterodimerek kialakulására utal (ER:  $E = 4,8\% \pm 1,4\%$ ; Golgi:  $3,8\% \pm 2,2\%$ , 19. ábra, felső sor). A plazmamembránban magasabb energia transzfer ( $E = 9,5\% \pm 2,5\%$ ) volt mérhető, tehát a sejten belüli összeszerelődés feltehetően itt is részleges. Megvizsgáltuk az IL-2/15Rβ alegység jelenlétének befolyását a két eltérő α lánc kölcsönhatására, fluoreszcens fehérje nélküli IL-2/15Rβ-t stabilan kifejező HeLa-β sejtvonalon megismételve a méréseket (20. ábra, 6. táblázat). Enyhe FRET hatásfok csökkenés volt tapasztalható az ER és a sejtmembrán területén, ami kompetícióra enged következtetni a két α lánc kölcsönhatása és az IL-2/15Rβ alegységgel való hetero-asszociációjuk között.



19. ábra: IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  láncok hetero-asszociációja és a  $\gamma_c$  alegységek homoasszociációja: mikroszkópos képek a donor és akceptor csatornákból, FRET hatásfok térképpel és eloszlásokkal, ER vagy Golgi-markerrel

#### 5.1.6. A $\gamma_c$ alegység homoasszociációja az ER-ben és a Golgi-ban

*In vitro* gél filtrációval bizonyították, hogy a tisztított  $\gamma_c$  alegységek stabil homotrimeret alkotnak, melyek IL-2R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$  és IL-2-vel való inkubáció következtében disszociálnak [182]. Kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a homoasszociáció vajon élő sejtekben is előfordul-e. C-terminálison EGFP-vel vagy mCherry-vel jelölt  $\gamma_c$  láncokat tranziensen kifejező sejteken végeztünk energia transzfer méréseket a komplexek lehetséges kialakulásának vizsgálatához. Ahogy fentebb már bemutattam (a kolokalizáció vizsgálatánál) a  $\gamma_c$  alegységek nagyrészt az ER-ben és a Golgi-ban lokalizálódnak, sejtfelszíni fluoreszcencia intenzitásuk nem volt elkülöníthető az autofluoreszcenciától (19. ábra, alsó sor), így FRET-et csak az intracelluláris organellemben tudtunk mérni. A  $\gamma_c$  láncok között mért FRET hatásfokok (ER:  $5,6\% \pm 2,2\%$ , Golgi:  $6,8\% \pm 2,5\%$ ) szignifikánsan magasabbak voltak a negatív kontrollonál (20. ábra). Elvégeztem a kísérleteket HeLa-IL-2R $\alpha$  és HeLa- $\beta$  sejtvonalakon is. Sem az IL-2R $\alpha$  sem pedig az IL-2/15R $\beta$  lánc jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan a  $\gamma_c$  alegységek homoasszociációját (20. ábra, 6. táblázat).



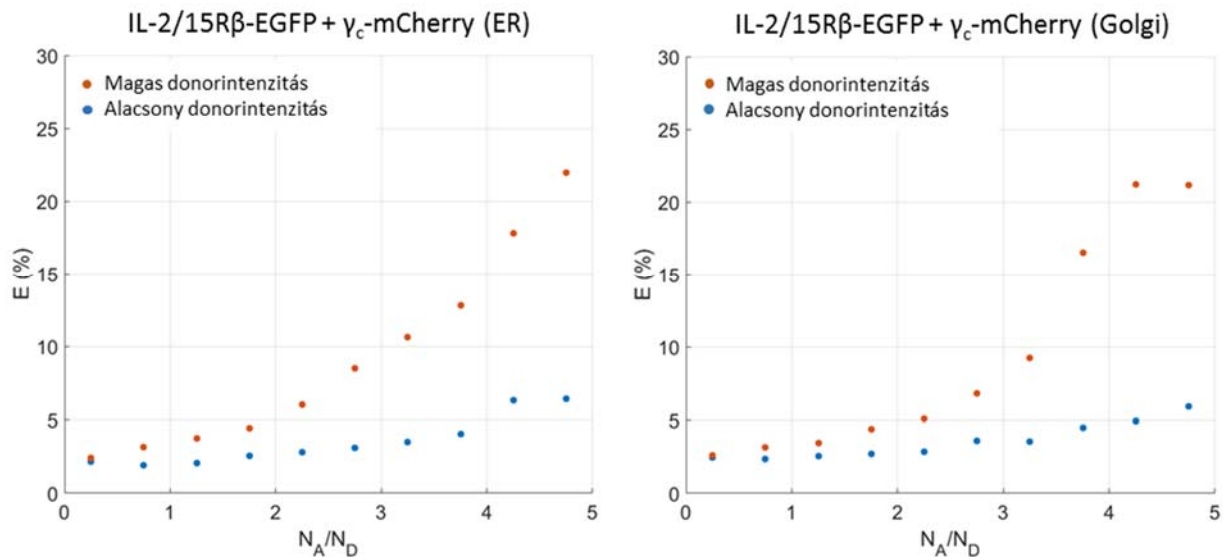
**20. ábra: Átlagos FRET hatásfokok IL-2R $\alpha$  + IL-15R $\alpha$  és  $\gamma_c$  +  $\gamma_c$  alegységek között**  
A mérésenkénti sejtszámokat a lenti (6.) táblázat tartalmazza. Szignifikáns eltérések:  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Kölcsönható partnerek	FRET hatásfok $E(\%)$ , átlag $\pm$ s.d. (n)			
	ER	Golgi	Plazmamembrán	Teljes sejt
Poz. kont. (EGFP-mCh)				24,5 $\pm$ 2,3 (277)
Neg. kont.1 (EGFP+mCh)				0,9 $\pm$ 1,7 (180)
Neg. kont.2 (EGFP-IL2R $\alpha$ + mCh-GPI)	0,4 $\pm$ 1,1 (13)		1,5 $\pm$ 0,9 (11)	
Neg. kont.3 (IL2R $\alpha$ -EGFP + mCh-GPI)	1,1* $\pm$ 0,6 (12)		0,4 $\pm$ 0,9 (22)	
IL-2/15R $\beta$ + $\gamma_c$ (C)	5,5 $\pm$ 2,4 (11)	3,7 $\pm$ 2,2 (21)		
$\gamma_c$ + IL-2/15R $\beta$ (C)	5,5 $\pm$ 2,7 (46)	4,6 $\pm$ 2,5 (27)		
$\gamma_c$ + $\beta$ -C7 (C)	4,4 $\pm$ 1,5 (11)	4,1 $\pm$ 2,0 (22)		
IL-2/15R $\beta$ + IL-2R $\alpha$ (N)	5,5 $\pm$ 1,3 (11)	5,0 $\pm$ 1,7 (10)		
IL-2/15R $\beta$ + IL-15R $\alpha$ (N)	6,9 $\pm$ 2,4 (16)	6,2 $\pm$ 2,3 (25)		
IL-2R $\alpha$ + $\beta$ (C)	4,3 $\pm$ 1,1 (12)	2,3 <sup>n.s.</sup> $\pm$ 0,9 (13)		
IL-2R $\alpha$ + $\beta$ -C7 (C)	5,0 $\pm$ 1,7 (16)	4,7 $\pm$ 2,0 (17)	21,6 $\pm$ 5,4 (23)	
IL-15R $\alpha$ + $\beta$ -C7 (C)	4,9 $\pm$ 1,6 (10)	4,5 $\pm$ 1,3 (11)	21,6 $\pm$ 5,1 (21)	
IL-15R $\alpha$ + $\beta$ -C7 (HeLa- $\gamma_c$ ) (C)	7,1 $\pm$ 2,4 (10)	4,6 $\pm$ 2,7 (17)	21,1 $\pm$ 4,8 (26)	
IL-2R $\alpha$ + IL-15R $\alpha$ (N)	4,8 $\pm$ 1,4 (16)	3,8 $\pm$ 2,2 (18)	9,5 $\pm$ 2,5 (27)	
IL-2R $\alpha$ + IL-15R $\alpha$ (HeLa- $\beta$ ) (N)	3,2 $\pm$ 1,2 (12)	2,6 $\pm$ 1,0 (10)	7,2 $\pm$ 2,3 (15)	
$\gamma_c$ + $\gamma_c$ (C)	5,6 $\pm$ 2,2 (53)	6,8 $\pm$ 2,5 (62)		
$\gamma_c$ + $\gamma_c$ (HeLa-IL-2R $\alpha$ ) (C)	4,4 $\pm$ 1,2 (10)	5,7 $\pm$ 2,5 (17)		
$\gamma_c$ + $\gamma_c$ (HeLa- $\beta$ ) (C)	5,7 $\pm$ 1,9 (32)	6,3 $\pm$ 3,0 (39)		

**6. táblázat: Átlagos FRET hatásfokok:** mindenhol szignifikáns eltéréssel a negatív kontrolltól ( $p < 0,01$ ) kivéve az IL-2R $\alpha$ -EGFP+IL-2/15R $\beta$ -mCherry a Golgi-ban (n.s.). Kölcsönható alegységek sorrendje: EGFP-vel jelölt donor + mCherry-vel jelölt akceptor. Zárójelben a mért sejtek száma. \*citoszolban mért FRET

### 5.1.7. A FRET hatásfokának függése az akceptor/donor aránytól

A FRET hatásfokát befolyásolhatja az akceptor és a donor expressziójának aránya ( $N_A/N_D$ ), amit a két festéket fúziós fehérjében 1:1 arányban kifejező pozitív kontroll felhasználásával határoztunk meg. A FRET mérések analízise során kizárólag az 1 és 3 közé eső  $N_A/N_D$  arányú sejteket vettük figyelembe. A transzferhatásfok  $N_A/N_D$  aránytól való függését jól szemlélteti a 21. ábrán lévő diagrampár. Az IL-2/15R $\beta$ -EGFP-vel és  $\gamma_c$ -mCherry-vel ko-transzfektált minták adataiból - donorintenzitás alapján két csoportot megkülönböztetve - ábrázoltuk az  $E$  transzferhatásfokot az  $N_A/N_D$  molekula arány függvényében, mely a vártnak megfelelően növekvő tendenciát mutatott a növekvő  $N_A/N_D$ -vel és magas donorintenzitások esetén magas értéket is elért mind az ER mind a Golgi területén.



21. ábra: FRET hatásfokok alakulása az  $N_A/N_D$  függvényében: IL-2/15R $\beta$  és  $\gamma_c$  alegységek hetero-asszociációja esetén az ER-ben és a Golgi-ban

### 5.1.8. Sejtorganellek átfedését vizsgáló kontroll mérések

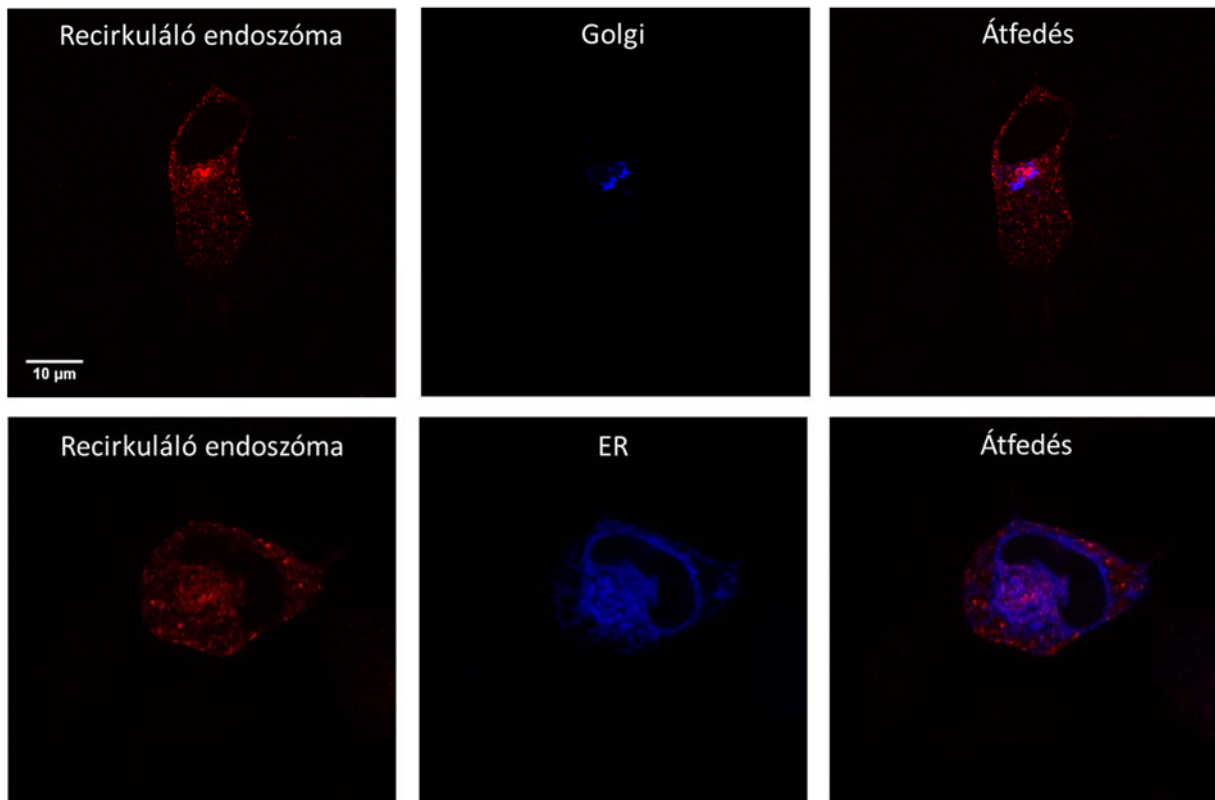
A receptor alegységek vizsgálatakor méréseink az endoplazmatikus retikulum és a Golgi területére korlátozódtak, a receptorláncok elsődlegesen ezen intracelluláris organellekben lokalizálódnak. Nem zárható ki ugyanakkor jelenlétük az endoszóma/lizoszóma rendszer vezikuláiban. Az ER és a Golgi esetleges átfedését a mikroszkópos képeken a FRET számításba nem bevonandó sejtorganellel - endoszómával (22. ábra) vagy lizozómával (23. ábra) – HeLa sejtek konfokális mikroszkópos felvételeinek kolokalizációs analízisével ellenőriztük. Az ER/Golgi jelölésére a FRET mérések során is alkalmazott, kék fluoreszcens fehérjét is kifejező rezidens fehérjék (Sac1/Giantin) szolgáltak, a

recirkuláló (vagy késői) endoszómát mCherry-vel jelölt Rab11 fehérje expressziója alapján, míg a lizoszómát LysoTracker Red festék feldúsulásának segítségével azonosítottuk. Az alábbi táblázatban foglaltam össze az eredményeket:

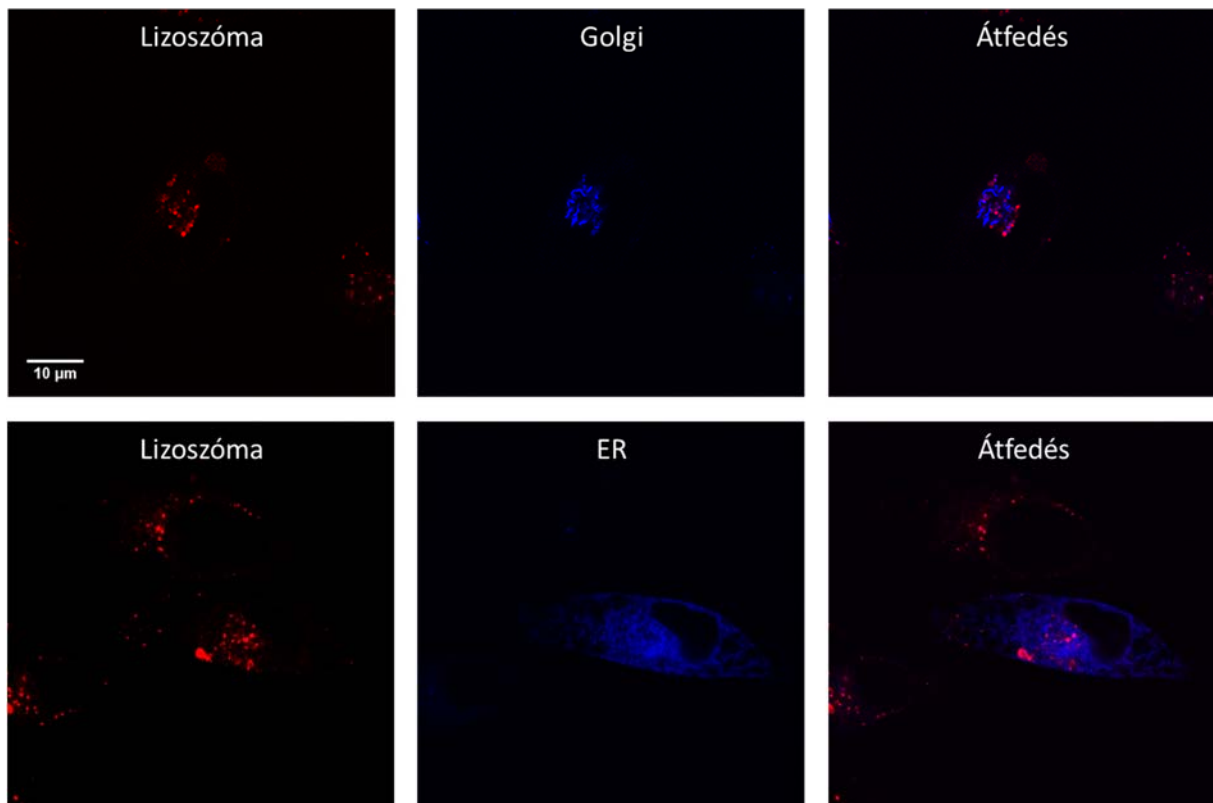
Organellum 1	Organelum 2	Korrelációs koefficiens $C$ , átlag $\pm$ s.d.
ER	Recirkuláló endoszóma	$0,16 \pm 0,25$
Golgi	Recirkuláló endoszóma	$0,23 \pm 0,15$
ER	Lizoszóma	$0,30 \pm 0,08$
Golgi	Lizoszóma	$-0,06 \pm 0,11$

**7. táblázat: Intracelluláris organellumok kolokalizációjára jellemző Pearson-féle korrelációs koefficiensek élő HeLa sejtekben (n=5-10)**

A kapott alacsony korrelációs értékek arra utalnak, hogy bár előfordul valamelyest átfedés a mikroszkópos képeken az organellumok eloszlása között, az alkalmazott ER és Golgi jelölő markerek segítségével megfelelően el lehet különíteni azokat a recirkuláló endoszómáktól és a lizoszómáktól, a mért energiatranszfer értékek döntően az ER-ben, illetve a Golgiban található alegységpárok kölcsönhatásaiból adódtak.



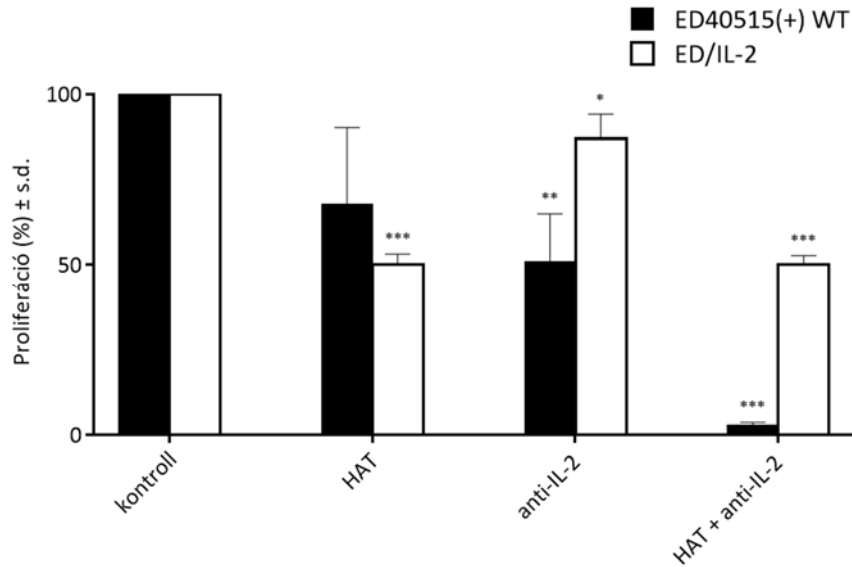
**22. ábra: Felső sorban a Rab11-mCherry (vörös) és TagBFP-Giantin (kék) ko-transzfekciójának eredménye, alatta a Rab11-mCherry és TagBFP-Sac1 ko-transzfekció képei**



**23. ábra:** Felső sorban TagBFP-Giantin (kék) transzfekciót követő LysoTracker Red (vörös) jelölés eredménye, alatta a TagBFP-Sac1 transzfekció és LysoTracker Red jelölés képei

### **5.1.9. ATL sejtek proliferációjának gátlása anti-IL-2R $\alpha$ és anti-IL-2 antitestek alkalmazásával**

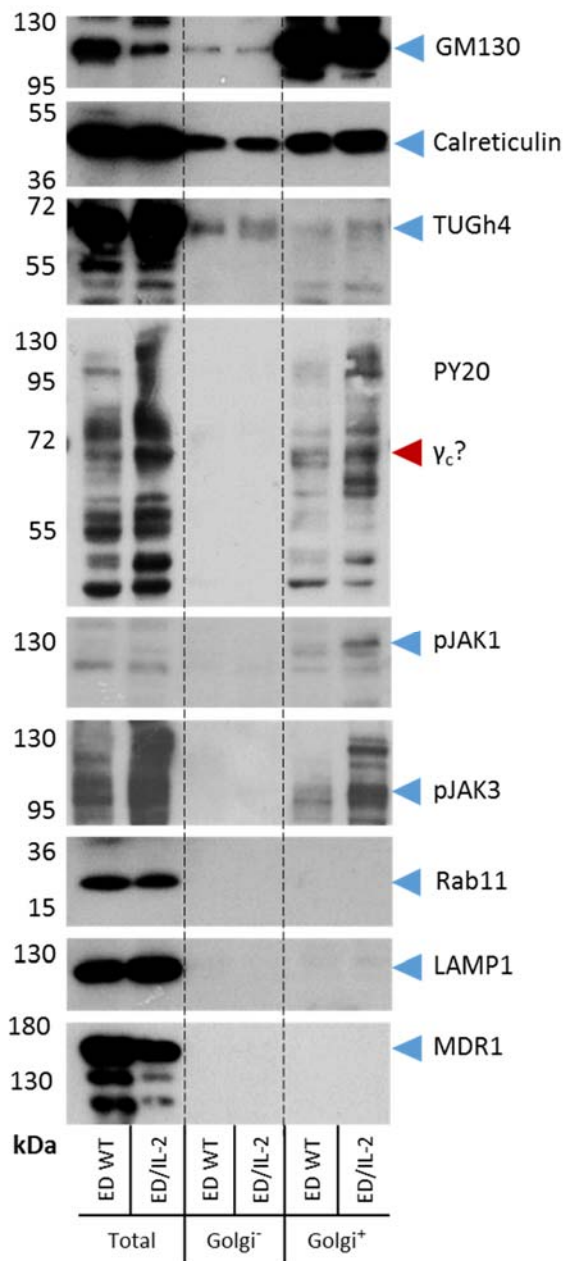
Amerikai kollaborációs partnerünk (Dr. T.A. Waldmann, NIH) laboratóriumában IL-2-t nem termelő, növekedésükhöz IL-2-t igénylő vad típusú és IL-2-vel transzfektált, IL-2-t termelő ATL sejtek proliferációját vizsgálták timidin felvételük nyomon követésével, különböző gátló antitestek alkalmazása után (24. ábra). Az IL-2R $\alpha$ -ellenes antitest (anti-Tac) humanizált változatával (az ábrán ld. a „HAT” jelölést) végzett 3 napos kezelés ~30-50%-kal csökkentette az ED40515(+) vad típusú (WT) és az IL-2-vel transzfektált ED/IL-2 sejtek proliferációs rátáját. Az anti-IL-2 kezelés 50%-os csökkenést eredményezett a vad típusú sejteknél, az IL-2-t termelő sejtekre viszont alig volt hatással. A HAT és az anti-IL-2 együttes alkalmazása azonban a vad típusú sejtek növekedését drasztikusan, mintegy 97%-kal lecsökkentette. Ez a kezelés az IL-2-t termelő sejteknél csak ~50%-os proliferáció csökkenést okozott. Az IL-2-t expresszáló sejtekben a gátlás hatástalansága azt sugallja, hogy még ha az IL-2 receptorához való kötődése a sejtfelszínen akadályozott is, a receptorok az endogén IL-2-t intracellulárisan megköthetik és lejátszódhat a jelátvitel.



**24. ábra: Vad típusú és IL-2-t termelő ATL sejtek IL-2 által indukált proliferációjának blokkolása citokin- és/vagy receptor-ellenes antitestekkel**  
Az ábrán 3 független mérés átlaga látható. Szignifikáns eltérések a kontrolltól: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.1.10. IL-2 jelátvitel az ATL sejtek Golgi apparátusában

Amennyiben a receptorok összeszerelődnek már a szintézisüket követően, elindíthatják a jelátvitelt felhasználva az endogén IL-2-t, mielőtt kijutnak a sejtfelszínre. Felmerül a kérdés, hogy az ER-ben és a Golgi-ban részlegesen már összeszerelődött receptorok valóban képesek-e hatékony jelátvitelre. Ennek kiderítésére Golgi-t izoláltunk az ATL sejtvonalainkból és Western-blottal vizsgáltuk az IL-2 jelátvitelében szereplő fehérjék foszforilációját (25. ábra). A JAK1 a  $\beta$  lánchoz kötődik és foszforilálja azt, míg a JAK3 konstitutívan a  $\gamma_c$  alegységgel asszociál és azt foszforilálja. Sikerült kimutatni pJAK1-et és pJAK3-at, továbbá (általános tirozinfoszforilációt mutató PY20-szal jelzett) foszfortirozin sávot a  $\gamma_c$  lánc (TUGh4) molekula tömege körül (65-70 kDa) az IL-2-t expresszáló ED/IL-2 sejtek Golgi frakciójában (a Golgi-ban gazdag frakció Golgi<sup>+</sup> jelöléssel a 25. ábrán). Mindhárom foszforilált fehérje jele sokkal gyengébb volt az IL-2-t nem termelő, éheztetett (IL-2 megvonásnak alávetett) ED40515(+) vad típusú sejtek esetén. Az izolált Golgi frakciók GM130 (Golgi marker) pozitívak voltak, de calreticulint (ER-re jellemző fehérjét) is tartalmaztak. Az izolátumokban sem lizoszóma/késői endoszóma marker (LAMP1), sem recirkuláló endoszóma marker (Rab11), sem pedig plazmamembrán marker (a membránban különösen hosszú, >100 óra féléletidejű MDR1) nem volt detektálható.



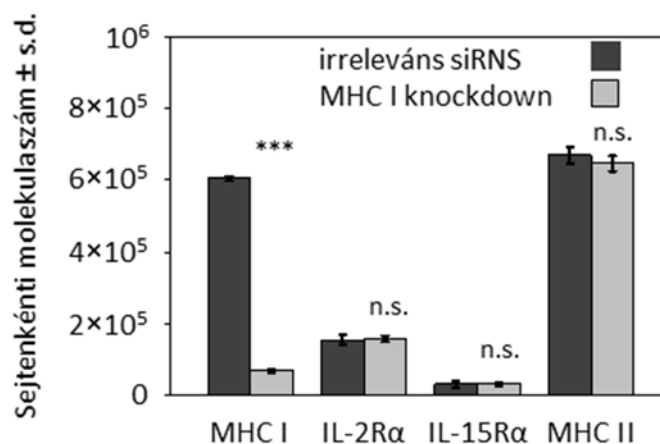
**25. ábra: Fehérjék kimutatása ATL sejtek teljes sejtlizátumából és Golgi izolátumából Western-blottal (ED WT: IL-2 függő, IL-2 megvonásnak alávetett vad típusú ED40515(+) sejt vonal; ED/IL-2: IL-2-t kifejező sejt vonal; Golgi<sup>+</sup>: Golgi-ban gazdag frakció; Golgi<sup>-</sup>: részben Golgi-t is tartalmazó frakció)**

## 5.2. Sejtfelszíni MHC I - IL-2R fehérjeklaszterek részleges szétszerelődése

Dolgozatom második részében a sejtfelszíni MHC I-IL-2R fehérjeklaszterek vizsgálatát, annak részleges szétszerelődését mutatom be.

### 5.2.1. Az IL-2/15 receptorok és az MHC glikoproteinek plazmamembránbeli expressziója az MHC I géncsendesítése előtt és után

Az IL-2R, IL-15R, MHC I és MHC II molekulák szuperklasztereket alkotnak a Kit 225 FT7.10 T limfóma sejtek lipid tutajajaiban [158]. Az MHC I – mint az ezen klaszterek szerveződésében legerősebben kifejeződő tag – szerepének a kiderítésére elvégeztem az MHC I expressziójának géncsendesítését a könnyűláncra specifikus anti- $\beta_2m$  siRNS-sel. A 26. ábrán a sejtenkénti antitest-kötőhelyek száma látható a géncsendesítés előtt és után. Az MHC I jelentős sejtfelszíni megjelenése miatt fontos volt a csendesítés hatékonyságának maximalizálása. Az MHC I membránbeli expressziója a növekvő siRNS koncentrációval párhuzamosan csökkent, a maximális hatást 100  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációnál érte el, ahol az expressziós szint az eredeti 5-10%-ára esett vissza. A géncsendesítés specifikuságát bizonyítja, hogy a többi vizsgált fehérje (az IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$  és MHC II) kifejeződésére nem volt hatással. A kontrollként használt irreleváns siRNS-ek (anti-GFP vagy anti-erbB1) nem eredményeztek változást sem az MHC molekulák, sem pedig az interleukin receptorok expressziójában.



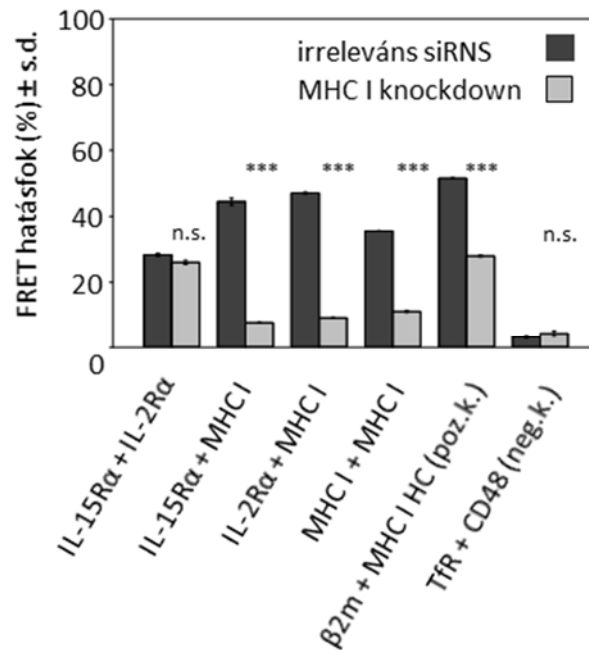
**26. ábra: Sejtenkénti antitest-kötőhelyek száma kontroll és MHC I géncsendesített sejteken:** Dako Qifikit kalibrációs gyöngy és áramlási citométer segítségével meghatározva. 3 független mérés átlaga (mintánként  $\sim 10^4$ sejt), szignifikáns eltérés az irreleváns kontrolltól:  $p < 0,001$ .

### **5.2.2. Az MHC I/IL-2R $\alpha$ /IL-15R $\alpha$ klaszterek részleges szétszerelődése, az MHC I homo- és hetero-asszociációk mértékének csökkenése**

A molekuláris együttállásokat, azaz az MHC I és II glikoproteinek homo- és hetero-asszociációit, illetve az IL-2R $\alpha$  és az IL-15R $\alpha$  hetero-asszociációit sejtenként, áramlási citometriás Förster rezonancia energia transzfer (FRET) mérések segítségével vizsgáltuk (27. ábra). Negatív kontrollként a burkolt csapdában elhelyezkedő transzferrin receptorok és a lipid tutajokban lokalizálódó GPI-horgonyzott CD48 fehérjék között mértünk energiatranszferet, ami  $3\pm 1\%$  FRET hatásfokot eredményezett. Pozitív kontrollnak az MHC I könnyű- és nehézlánc közötti kölcsönhatásból adódó, átlagosan  $52\pm 1\%$ -nak mért FRET-et tekintettük, amely az MHC I géncsendesítés hatására  $28\pm 1\%$ -ra csökkent. Ebben az esetben az energiatranszfer csak részben intramolekuláris: az aggregátumokat alkotó MHC I molekulák asszociálhatnak egymással, egyik molekula könnyűlánc kölcsönhatva egy másik molekula nehézláncával. Az MHC I nehézláncok homoklasztereit jellemző energiatranszfer értéke szignifikáns csökkenést mutatott az MHC I géncsendesítésének következtében: a nehézláncok között mérhető  $35\pm 1\%$ -os FRET hatásfok  $11\pm 1\%$ -ra esett vissza (27. ábra). Ennél a FRET párnál az intakt MHC I nehézláncára specifikus, donor és akceptor festékkel jelölt antitesteket használtunk.

A donorral jelölt IL-2R $\alpha$  és az akceptorral jelölt MHC I hetero-asszociációja szintén szignifikáns csökkenést mutatott az MHC I géncsendesítésének hatására ( $47\pm 1\%$ -ról  $9\pm 1\%$ -ra). Hasonlóképpen, az IL-15R $\alpha$  és az MHC I közötti energiatranszfer is csökkent ( $44\pm 1\%$ -ról  $7\pm 1\%$ -ra). Ez nem meglepő, hiszen az akceptor/donor arány csökkenésével annak valószínűsége is lecsökken, hogy egy adott donor-jelölt fehérjének a FRET hatótávolságán (2-10 nm) belül lesz egy akceptorral jelölt partnere.

Az IL-15R $\alpha$  + IL-2R $\alpha$  hetero-asszociáció jelentéktelen változása az MHC I géncsendesítés következtében arra utal, hogy az interleukin receptorok kapcsolatára az MHC I molekulákkal való kölcsönhatásuk nincs befolyással.

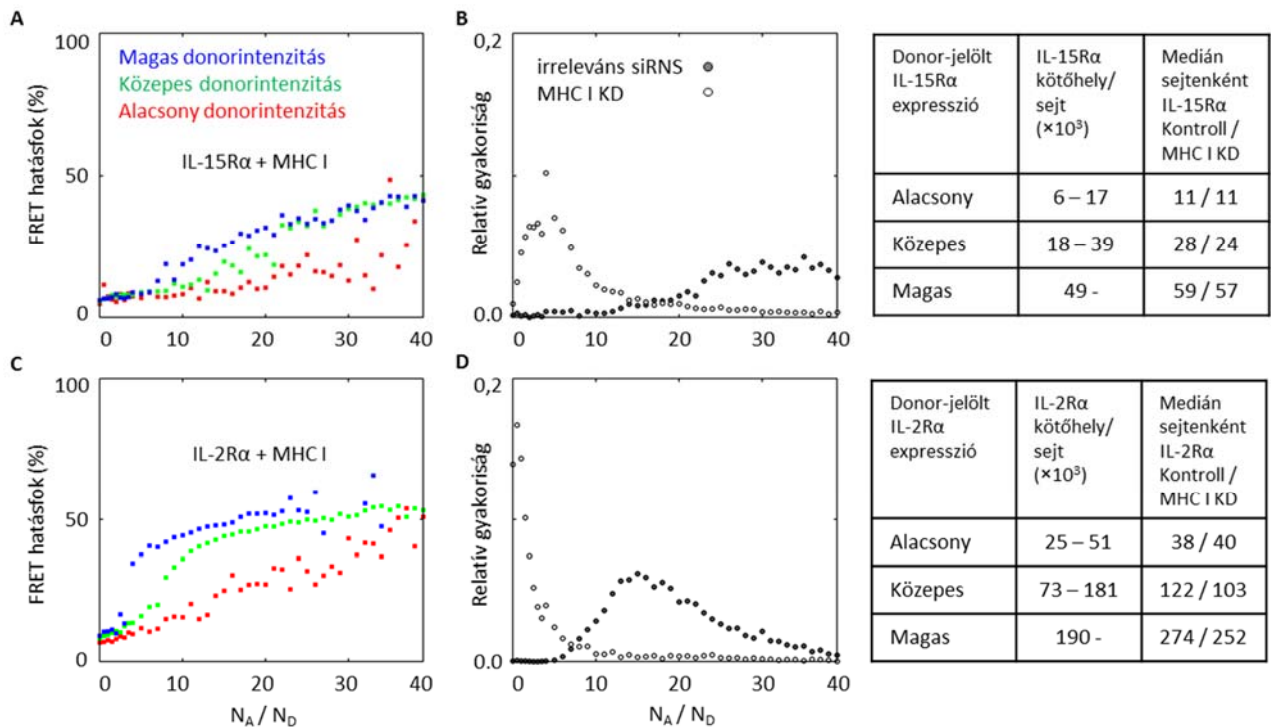


**27. ábra: Kontroll és MHC I géncsendesített sejteken mért átlagos energiatranszfer hatásokok:** Alexa Fluor 546 (donor)- és Alexa Fluor 647 (akceptor)-konjugált antitestekkel jelölt protein-párok között. Szignifikáns eltérés az irreleváns kontrolltól:  $p < 0,001$  (mintánkénti sejtszám  $> 10^4$ ).

### 5.2.3. A FRET hatások függése a donor- és akceptor-jelölt fehérjék expressziós szintjétől

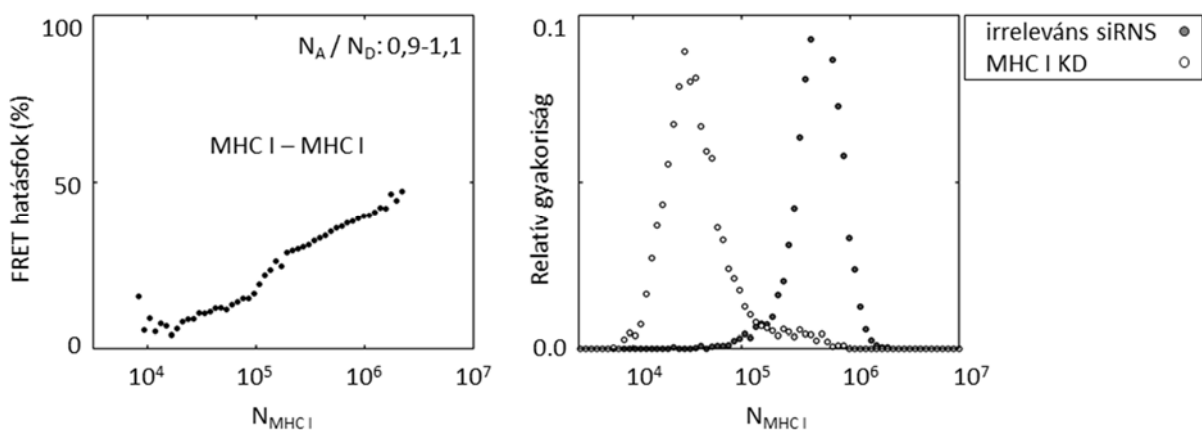
Megvizsgáltuk, hogyan függ az energiatranszfer hatásoka a kölcsönható fehérjék expressziós szintjétől (28-29. ábra). A donorról jelölt fehérjék expressziója alapján a sejteket három (alacsony, közepes, magas donorintenzitású) csoportba soroltuk. A donorról jelölt IL-15Rα és az IL-2Rα hetero-asszociációt az akceptorral jelölt MHC I-gyel jól megfigyelhető tendencia jellemzi, a FRET hatások növekszik az egyre emelkedő  $N_A/N_D$  molekularány függvényében, és gyorsabb telítődést mutat magasabb donor expresszió esetén (28. ábra).

A donor-jelölt interleukin receptorok expressziós szintjét mutatja be a 28. ábra két táblázata a különböző donorintenzitású kategóriák esetén (kalibrációs gyöngyök segítségével meghatározva).



**28. ábra:** Az IL-15R $\alpha$  + MHC I és az IL-2R $\alpha$  + MHC I kölcsönhatásokat jellemző FRET hatásfokok az akceptor/donor molekularány függvényében ábrázolva (A, C);  $N_A/N_D$  eloszlások (B, D) és az IL receptorok  $\alpha$  láncainak expressziója (táblázatok)

Az MHC I homoasszociációját tekintve (29. ábra), a FRET hatásfok a növekvő MHC I expressziós szinttel nő, a vártan megfelelően. Közel azonos számú donor- és akceptor-jelölt MHC I molekulát vontunk be az analízisbe, mivel csak azon sejteket vettük figyelembe, ahol az  $N_A/N_D$  a 0,9 - 1,1 közötti tartományba esett.



**29. ábra:** Az MHC I homoasszociációját jellemző FRET hatásfok az MHC I expressziójának függvényében ábrázolva (baloldali diagram); az MHC I expressziójának eloszlása kontroll és MHC I géncsendesített sejteken (jobboldali diagram)

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Az IL-2/15 receptorok intracelluláris összeszerelődése

Az IL-2 és az IL-15 receptorok alegységei változatos homo- és heterokomplexeket alkotnak különböző sejtek plazmamembránjában, melyek eltérő ligandkötő affinitással rendelkeznek. Ezek közül a  $\beta\gamma_c$  közepes affinitású heterodimerek ( $K_d \sim 10^{-9}$  M) és a nagy affinitású  $\alpha\beta\gamma_c$  heterotrimerek ( $K_d \sim 10^{-11}$  M) képesek hatékony jelátvitelre [71, 72]. Intézetünkben korábban kimutatták, hogy az IL-2 és IL-15 receptorok előre összeszerelt állapotban vannak jelen a plazmamembránban ligand hiányában is, és konformációjuk a ligand kötődése következtében megváltozik [73, 158]. Azt is leírták, hogy a receptorok heterotetramer komplexeket alkotnak: melyek a közös jelátvivő  $\beta$  és  $\gamma_c$  láncokból, valamint a citokin-specifikus IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  alegységekből tevődnek össze [158]. Érdekes kérdésként merül fel, vajon az újonnan szintetizált receptorláncok csak a rendeltetési helyükön, a plazmamembránban találhatnak egymásra vagy előre összeszerelt állapotban érik el a membránt. Ha a receptor alegységek intracellulárisan is asszociálnak egymással már a szekréción uton, esélyt adnak a jelátvitel lejátszódására még mielőtt eléri a plazmamembránt. Ez a megfigyelés az autokrin jelátvitel egy új lehetőségét veti fel azon sejtekben, melyek kifejezik a receptorokat és azok ligandját is.

Megfigyelték autokrin működést a - szintén a citokin receptorok szupercsaládjába tartozó - növekedési hormon receptor esetén is. A növekedési hormon *in vivo* változó mértékű szimultán hatást fejt ki különböző szöveteken endokrin, parakrin és autokrin módon. Egy modell szerint a hormon az ER-ben közvetlenül a szintézis után hozzákötődik a receptorához, megkönnyítve ezzel magának a receptornak az érését [183]. A sejtfelszínre kijutott hormon-receptor komplexhez így exogén növekedési hormon nem tud kötődni. Ebben az esetben már az ER-ben dimerizálódnak a receptorok [184] de a jelátvitel itt még nem indul el, csak amikor a Golgi-ba jutnak vagy amikor már elhagyták azt.

Az autokrin jelátvitel a kóros elváltozásokban is jelentős szerepet kap, hozzájárul a különböző tumorsejtek önállóságához, azok növekedési és túlélési funkcióit, valamint az inváziós képességüket támogatva. Ilyen például a főként fibroblasztok, gyulladásosejtek és tumorsejtek által – hipoxia esetén nagyobb mennyiségben – termelt legjelentősebb angiogén citokin, a vaszkuláris endotél növekedési faktor, melynek autokrin jelátvitele invazív emlő karcinóma és vastagbél karcinóma sejteken a tumorsejtek túlélését hivatott fenntartani, de elősegíti azok

migrációját is a CXCR4 kemokin receptor expressziójának indukciója által (hozzájárulva így a tumor progresszióhoz). A folyamat szabályozásában az  $\alpha 6 \beta 4$  integrin is szerepet játszik [185].

Kollaborációs partnerünk, dr. Meili Zhang (NIH), ATL sejtvonalak IL-2-indukált proliferációját vizsgálta. Az anti-IL-2 alkalmazása magában nem volt elégséges az IL-2-függő ED40515(+) vad típusú sejtek proliferációjának gátlására, azonban az IL-2R $\alpha$ -ellenes (HAT) antitesttel együtt adagolva hatékony gátlás volt elérhető. Az IL-2-vel transzfektált ED/IL-2 sejtvonal esetén a sejtek még az anti-IL-2 és a HAT antitestek együttes alkalmazásakor is proliferáltak, ami arra enged következtetni, hogy az endogén citokint a sejtek intracellulárisan fel tudják használni, kivédve így az antitestek blokkoló hatását a sejtfelszínen.

ED/IL-2 sejtek izolált Golgi frakciójából Western-blottal sikerült kimutatni a pJAK1 és pJAK3 jelenlétét és egy foszfortirozin sávot a  $\gamma_c$  alegység molekula tömegének megfelelő magasságban. Az IL-2-t termelő sejtekben ezek szerint lejátszódik a jelátvitel, míg a ligandfüggő vad típusú sejtekről ugyanez nem mondható el. Utóbbi sejtek Golgi izolátumában ugyanis 48 órás IL-2 éhezést követően nem volt detektálható egyik vizsgált foszfoprotein sem. Ezen eredmények háttérében az állhat, hogy a hatékony ligand-receptor jelátvivő komplexek kialakulása már intracellulárisan megtörténik, mielőtt a receptorok elérik a plazmamembránt.

A HTLV-1 asszociált ATL és a HTLV-1 asszociált myelopatia / tropikus szpasztikus paraparézis (HAM/TSP) neurológiai megbetegedés olyan betegségeket képviselnek, melyek IL-2/IL-2R autokrin hurokkal jellemezhetők. Az ATL korai fázisában és a HAM/TSP-ben a HTLV-1 expressziója, pontosabban a virális Tax gén stimulálja a T sejt proliferációt számos citokin/citokin receptor autokrin stimulációs hurok indukciója által, beleértve az IL-2/IL-2R $\alpha$ -indukált proliferációt [137]. 16 krónikus és parázsló ATL-es beteg daclizumab kezelését követően csak 6-nál figyeltek meg részleges választ [186]. Hasonlóképpen, HAM/TSP-ben szenvedő betegek daclizumab terápiájával az aktivált CD4<sup>+</sup> limfocitáknak csak részleges downregulációját érték el [187]. A daclizumab-ot használják szklerózis multiplex-es betegek kezelésére is, mellyel a T-sejtes válasz gyengíthető, a relapszus rátája 45%-kal és az új léziók száma 54%-kal csökken [188]. Ciklosporinnal és kortikoszteroidokkal együtt alkalmazzák vesetranszplantátumok akut kilökődésének megakadályozására a mellékhatások fellépésig [189]. Az IL-2 termelődése és receptorához való intracelluláris kötődése, csökkentheti az ezen immunreakciókban résztvevő T sejtekre irányuló antitest terápia hatékonyságát, amelyek csak a plazmamembránban kifejeződő receptorokat érik el, de nem jutnak be az intracelluláris organellekbe.

Azon hipotézisünk tesztelése érdekében, hogy vajon a receptorok összeszerelődnek-e, mielőtt eléri a plazmamembránt, ezáltal megteremtve az intracelluláris jelátvitel lehetőségét, megvizsgáltam az IL-2 és -15 receptor alegységek közötti kölcsönhatásokat az ER-ben és a Golgi-ban. A mikroszkópos FRET egy jól kidolgozott módszer, mely molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára kitűnően alkalmazható [179]. A korábbiakban intézetünkben ezzel a technikával tanulmányozták pl. az IL-2/-9/-15 receptorok alegységei közötti asszociációkat [157, 158, 190, 191], illetve a c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok közötti kölcsönhatásokat is [174, 175, 192]. Az általam használt fluoreszcens ER és Golgi markerek segítségével organellum-specifikus módon tudtam fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgálni élő sejtekben.

FRET mérésekkel tanulmányoztuk a fluoreszcens fehérjével jelölt IL-2/15 receptor alegységeket expresszáló HeLa sejtek páronkénti asszociációit a  $\beta + \gamma_c$ , a  $\beta + IL-2R\alpha$  valamint a  $\beta + IL-15R\alpha$  láncok között az ER-ben és a Golgi-ban. Sikerült kimutatni az IL-2R és IL-15R saját  $\alpha$  láncainak kölcsönhatásait is ezekben az organelumokban korábbi méréseinkkel összehangban, melyek azonban a T sejtek plazmamembránjára korlátozódtak. Ezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy szintézisüket követően a vizsgált receptor alegységek elkezdenek összeszerelődni, asszociálni egymással már a szekréción uton, ami akár általános jelenség is lehet különböző receptorok esetén. A negatív kontrollként használt, EGFP-IL-2R $\alpha$  és az mCherry-GPI között detektált nagyon alacsony FRET hatásfokok bizonyítják, hogy az egymástól független fehérjék közötti véletlen kolokalizáció a jelölt IL receptorokhoz hasonló expressziós szinten nem eredményez szignifikáns random FRET-et [193] sem a plazmamembránban, sem az ER-ben.

A receptor láncok citoplazmatikus részének kristálystruktúrája nem ismert, így a pontos konformációjuk sem. A FRET hatásfok a donor-akceptor távolság negatív hatodik hatványának függvénye, ami lehetővé teszi használatát molekuláris vonalzóként. Annak ellenére, hogy a FRET adataink nem nyújtanak kellő részletességű betekintést a receptor alegységek struktúrájába, felhasználhatjuk azokat a lehetséges konformációk egy részének kiszűrésére. A Förster távolság, mely esetén  $E=0,5$ , az EGFP-mCherry párra  $R_0 \sim 5,4$  nm [194]. A különböző receptor lánc pároknál mért  $E$  értékek 0,03 – 0,22 között változtak. Ha az orientációs faktor értékét  $\kappa^2=2/3$ -nak vesszük (feltételezve a festékek tranzíciós dipóljainak random orientációját [195]) és feltételezzük, hogy minden donor közelében van egy akceptor, ezeket az  $E$  értékeket 9,6 – 6,7 nm közötti donor-akceptor távolságtartománynak feleltethetjük meg.

A  $\beta$  és az  $\alpha$  láncok közötti, illetve az IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  alegységek közötti kölcsönhatásokat jellemző FRET hatásfokok is alacsonyabbak voltak az ER-ben és a Golgi-ban, mint a

plazmamembránban. Ilyen eltérés adódhat a következő szituációkból. Egyrészt a receptor láncok konformációja a különböző sejtorganelumokban eltérő lehet, eltérő donor-akceptor távolságokat és így eltérő FRET hatásfokokat eredményezve. Másrészt, az ER-ben és a Golgi-ban egyidejűleg lehetnek jelen összeszerelődött receptor komplexek és monomerek, míg ez az arány a plazmamembránban az összeszerelődött receptor komplexek felé tolódhat. A ko-expresszált receptor alegységek fluoreszcencia intenzitás eloszlásainak átfedő képei alapján a relatív koncentráció arányok eltérőek voltak az ER és a Golgi különböző régióiban. Az ER különböző részeiben elhelyezkedő riboszómákon való szintézisük után a receptor láncok elkezdnek összekeveredni az endomembrán rendszerben diffúzió révén, de láthatóan nem keverednek össze teljesen. Amellett, hogy vannak olyan területek, ahol mindkét fehérje hasonló koncentrációban van jelen, olyan régiók is előfordulnak, ahol az egyik vagy a másik alegység dominál. Ezzel szemben a plazmamembránban a receptor láncok összekeveredése (a néhány száz nanométeres skálán) tökéletesebb. A Pearson-féle korrelációs együttható értéke – mely a kolokalizációt méri ezzel a felbontással - magasabb volt a plazmamembránban, mint az ER-ben/Golgi-ban az összes vizsgált receptor alegység-pár esetén.

Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a lipid környezet az ER-ben és a Golgi-ban eltérhet a plazmamembránétól, ami szintén hatással lehet a receptor láncok közötti kölcsönhatásokra. Intézetünkben korábban kimutatták, hogy a plazmamembrán koleszterol tartalma - feltehetően mivel hozzájárul a lipid tutajok integritásához - fontos szerepet játszik az IL-2 receptorok eloszlásában és funkciójában Kit225 T limfóma sejteken. A koleszterol kivonása szignifikánsan csökkentette az IL-2 jelátvitelének hatékonyságát és a receptorok eredetileg klaszterekben tömörülő, egyenetlen eloszlása a plazmamembránban diffúzabb lett [157, 159]. A lipid tutajokban kifejeződő IL-2R alegységek és MHC I/II glikoproteinek közötti asszociációkat szintén gyengítette.

A foldingot követően a membránfehérjéknek át kell haladniuk az ER minőségellenőrző rendszerén [196], ahol a dajkafehérjék kötődése a receptor láncokhoz ugyancsak befolyásolhatja az alegységek összeszerelődését.

A heteromer komplexeken túlmenően leírták már az IL-2/15 receptor alegységek különböző homomer komplexeit is: IL-2R $\alpha$  oligomereket [161] és IL-2/15R $\beta$  dimereket [162] a plazmamembránban, melyek funkciójára még nem derült fény; illetve kimutatták a  $\gamma_c$  láncok trimerként való előfordulását is *in vitro* [182]. FRET méréseim arra utalnak, hogy  $\gamma_c$  dimerek/oligomerek előfordulnak már az ER-ben és a Golgi-ban is. Ez szintén hozzájárulhat a

különböző alegységek közötti FRET citoplazmában mért alacsonyabb voltához a plazmamembránbeli magasabb értékekhez képest.

FRET eredményeink, az IL-2-indukált proliferáció antitest-mediált blokk hatástalansága a saját IL-2-t szintetizáló sejtekben, illetve az ugyanezen sejtekben kimutatott működő jelátvitel, rávilágít egy új autokrin jelátviteli mechanizmusra, melyet az intracelluláris IL-2 vált ki a szekréción úton összeszerelődött receptorokhoz való kötődés révén. Ez a mechanizmus klinikai jelentőséggel bír azon antitest terápiákban, melyek a plazmamembránban expresszálandó receptorokat veszik célba.

## 6.2. A sejtfelszíni MHC I - IL-2R fehérjeklaszterek részleges szétszerelődése

A membránfehérjék dinamikus klasztereket alkotnak különböző hierarchikus szinteken [197, 198], melyek szerveződését számos tényező befolyásolhatja. Ezek lehetnek transzmembrán hélixek vagy extra/intracelluláris domének közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások, a membrán lipidösszetétele, a citoskeleton, vagy glikoproteinek galektin rácsok általi keresztköttése [199, 200]. T sejtekben a lipid tutajok koleszterin kivonást követő szétszedése az IL-2R klaszterek diffúzzá válását [159] és az IL-2 jelátvitel gyengülését [157] okozta.

Értekezésemben betekintést adtam az IL-2/15R-MHC I/II receptorklaszter laterális szerveződésében leginkább kifejeződő tag géncsendesítése következtében történő változásokba, melyek a FRET-tel kimutatható fehérje-fehérje kölcsönhatásokban jönnek létre a nanométeres skálán. A FRET hatásfok csökkenése alapján az MHC I-gyel kialakított asszociációk csökkentek a géncsendesítés hatására. Nemcsak az MHC I homoasszociáció mértéke lett kisebb, de az IL-2R $\alpha$  vagy IL-15R $\alpha$  és az MHC I közötti kölcsönhatások is gyengültek. Ugyanakkor az IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  alegységek közötti asszociáció nem változott szignifikánsan, ami arra utal, hogy a receptorláncokat összetartó kölcsönhatások nem függenek kritikusan az MHC I jelenlététől. Korábban munkacsoportunk kimutatta (ahogy már szó volt róla fentebb), hogy az IL-2/15 receptorok ligand hiányában is asszociálnak a lipid tutajokkal [158], míg más eredmények szerint az IL-2 receptorok migrációját a lipid tutajokba a ligand kötődése indukálja [164]. Azt is leírták korábban, hogy a közös  $\gamma_c$  lánc szupercsalád receptorainak más tagjai szintén feldúsulnak a lipid tutajokban [190, 201, 202].

A lipid tutajokban az IL-2R $\alpha$ /IL-15R $\alpha$  és az MHC glikoproteinek szuperklaszterekbe tömörülnek [157-159, 198], melyekben, kisebb, szorosan kölcsönható fehérjeaggregátumok alakulnak ki. Az MHC I géncsendesítés ezen aggregátumokat érintette, összességében szignifikánsan megváltoztatta a sejtfelszíni szupramolekuláris mintázatokat. Az MHC I expressziós szintjének csökkenése általi klaszterizációs sajátságok átalakulása hatással lehet az MHC I molekulákkal asszociált receptor komplexek jelátvivő tulajdonságaira is. Az adatok azt demonstrálják, hogy ha a fehérje klaszter egyetlen tagjának az expressziója megváltozik, az a résztvevő fehérjék közötti kölcsönhatások átrendeződését eredményezheti.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám során az immunrendszer szabályozásában központi szerepet betöltő, különböző leukémiákban és autoimmun betegségekben is meghatározó jelentőségű interleukin-2 és -15 citokinek membránreceptorait tanulmányoztam (melyek három alegységesek: saját  $\alpha$  illetve közösen használt  $\beta$  és  $\gamma_c$  láncokból állnak). Két különböző aspektusban vizsgáltam a receptorokat: (1) az alegységeik összeszerelődését intracellulárisan, illetve (2) azok MHC molekulákkal kialakított klasztereinek szétszerelődését a sejt felszínén. Az elért eredmények összefoglalásaként a következő megállapításokat tehetjük:

Élő HeLa sejteken részleges hetero-asszociációkat mutattunk ki az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-ban a  $\beta$  és  $\gamma_c$  alegységek között, a  $\beta$  és IL-2R $\alpha$  ill. IL-15R $\alpha$  alegységek között, a két ligand-specifikus  $\alpha$  lánc között, továbbá homoasszociációt a  $\gamma_c$  alegységek között. Utóbbi kölcsönhatást sem az IL-2R $\alpha$ , sem pedig a  $\beta$  alegység jelenléte nem befolyásolja. Kompetíció valószínűsíthető azonban a két  $\alpha$  lánc kölcsönhatása és a  $\beta$  alegységgel való hetero-asszociációjuk között. Megállapítottuk, hogy a különböző receptor láncok kolokalizációja és összeszerelődése a plazmamembránban nagyobb mértékű, mint az intracelluláris organellumokban. A mérések alapján a  $\beta$  alegység intracelluláris doménje erősen feltekeredett konformációjú. IL-2 termelő humán felnőttkori T-sejtes leukémiás sejtek Golgi frakciójában működő jelátvitelre utaló pJAK1 és pJAK3 kinázokat azonosítottunk.

Eredményeink szerint hatékony ligand-receptor jelátvivő komplexek alakulhatnak ki már intracellulárisan, mielőtt a receptorok elérnék a plazmamembránt. Ez felveti egy új, intracelluláris autokrin jelátviteli mechanizmus lehetőségét és megmagyarázhatja a sejt felszíni IL-2R $\alpha$ -ra irányuló antiproliferatív daclizumab terápiák hatástalanságát vagy korlátozott hatékonyságát.

Az MHC I számos membránreceptorral, többek közt az IL-2/15 receptorokkal szuperklaszttereket alkot. Az MHC I expresszió csökkentésének hatására nemcsak az MHC I fehérje homoasszociációja gyengült, hanem az IL-2/15 receptorokkal való hetero-asszociációi is. Bár az adatok alapján az IL-2 és IL-15 receptorláncokat összetartó kölcsönhatások nem függenek az MHC I jelenlététől, a klaszterizációs sajátságok megváltozása hatással lehet az MHC I molekulákkal asszociált receptor komplexek jelátvivő tulajdonságaira is.

## 8. SUMMARY

The membrane receptors (consisting of three subunits) of the interleukin-2 and -15 cytokines play essential roles in the regulation of the immune system and are important in several lymphomas and autoimmune disorders. I studied two aspects of these receptors: (1) assembly of their subunits intracellularly, and (2) disassembly of their superclusters formed with MHC molecules at the cell surface. Our results can be summarized as follows:

In the ER and the Golgi of live HeLa cells we demonstrated partial heteroassociation between  $\beta$  and  $\gamma_c$  subunits,  $\beta$  and IL-2R $\alpha$  or IL-15R $\alpha$  subunits, between the two ligand-specific  $\alpha$ -chains, moreover homoassociation between  $\gamma_c$ -chains. The presence of neither IL-2R $\alpha$  nor  $\beta$  influenced this homoassociation significantly. There is a competition between the interaction of the two  $\alpha$  chains and their heteroassociation with the  $\beta$  subunit. We showed that colocalization and assembly of the ILR subunits are more complete in the plasma membrane than in these intracellular organelles. Our measurements suggest that the intracellular domain of the  $\beta$  chain has a strongly folded conformation. We identified pJAK1 and pJAK3 kinases in the Golgi fraction of IL-2-producing human ATL cells indicating efficient signaling induced by intracellularly produced cytokine.

Our results imply the formation of efficient ligand-receptor signaling complexes intracellularly; IL-2/15 receptors start to assemble in the ER/Golgi, before they reach the plasma membrane and signal, utilizing the IL-2 in IL-2-producing adult T-cell leukemia/lymphoma cells. This finding raises the possibility of a new intracellular autocrine signaling mechanism, which explains resistance to antiproliferative daclizumab (anti-IL-2R $\alpha$ ) therapies targeting receptors at the cell surface.

MHC I forms superclusters with several membrane receptors including IL-2/15R at the cell surface. Silencing of MHC I (minimalized upon gene silencing) influences not only its homoassociations, but also its heteroassociations with the IL-2/15 receptors. Although interactions holding IL-2/15 receptor chains together, are independent from presence of MHC I, alteration of clustering properties might affect the signaling efficiency of receptor complexes associated with MHC I molecules.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

### 9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Parham, P., *The Immune System*. Third ed. 2009, USA: Garland Science.
2. Erdei, A., Gergely, J., Rajnavolgyi, E., Laszlo, G., Sarmay, G., *Immunbiológia*. 2nd ed. 2000, Budapest: Medicina.
3. Liao, W., J.X. Lin, and W.J. Leonard, *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy*. *Immunity*, 2013. **38**(1): p. 13-25.
4. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 713-58.
5. Peters, A., Y. Lee, and V.K. Kuchroo, *The many faces of Th17 cells*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(6): p. 702-6.
6. Liao, W., et al., *Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 551-9.
7. Ndhlovu, L.C., et al., *IL-2 immunotherapy to recently HIV-1 infected adults maintains the numbers of IL-17 expressing CD4+ T (T(H)17) cells in the periphery*. *J Clin Immunol*, 2010. **30**(5): p. 681-92.
8. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 621-63.
9. Ballesteros-Tato, A., et al., *Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation*. *Immunity*, 2012. **36**(5): p. 847-56.
10. Johnston, R.J., et al., *STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation*. *J Exp Med*, 2012. **209**(2): p. 243-50.
11. Malek, T.R. and I. Castro, *Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity*. *Immunity*, 2010. **33**(2): p. 153-65.
12. Caramalho, I., et al., *Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus*. *J Autoimmun*, 2015. **56**: p. 98-110.
13. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
14. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
15. Pipkin, M.E., et al., *Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 79-90.
16. Bazan, J.F., *Unraveling the structure of IL-2*. *Science*, 1992. **257**(5068): p. 410-3.
17. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. *Science*, 1976. **193**(4257): p. 1007-8.
18. Taniguchi, T., et al., *Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2*. *Nature*, 1983. **302**(5906): p. 305-10.
19. Leonard, W.J., et al., *Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor*. *Nature*, 1984. **311**(5987): p. 626-31.
20. Nikaido, T., et al., *Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor*. *Nature*, 1984. **311**(5987): p. 631-5.
21. Fehniger, T.A. and M.A. Caligiuri, *Interleukin 15: biology and relevance to human disease*. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 14-32.
22. Grabstein, K.H., et al., *Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor*. *Science*, 1994. **264**(5161): p. 965-8.

23. Bamford, R.N., et al., *The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4940-4.
24. Burton, J.D., et al., *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, 1994. **91**(11): p. 4935-9.
25. Leonard, W.J., *Cytokines and immunodeficiency diseases.* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 200-8.
26. Paliard, X., et al., *Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones.* J Immunol, 1988. **141**(3): p. 849-55.
27. Yui, M.A., et al., *Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation.* J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4691-9.
28. Granucci, F., et al., *Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis.* Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 882-8.
29. Hershko, A.Y., et al., *Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis.* Immunity, 2011. **35**(4): p. 562-71.
30. Granucci, F., et al., *IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells.* Trends Immunol, 2002. **23**(4): p. 169-71.
31. Kim, H.P., J. Imbert, and W.J. Leonard, *Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system.* Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(5): p. 349-66.
32. Boyman, O., et al., *Homeostatic maintenance of T cells and natural killer cells.* Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(10): p. 1597-608.
33. Boyman, O., et al., *Cytokines and T-cell homeostasis.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 320-6.
34. Carson, W.E., et al., *A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 937-43.
35. Marks-Konczalik, J., et al., *IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11445-50.
36. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 595-601.
37. Bamford, R.N., et al., *Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2897-902.
38. Bamford, R.N., et al., *The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control.* J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4418-26.
39. Giron-Michel, J., et al., *Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15Ralpha complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors.* Blood, 2005. **106**(7): p. 2302-10.
40. Gaggero, A., et al., *Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms.* Eur J Immunol, 1999. **29**(4): p. 1265-74.
41. Waldmann, T.A., *The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy.* Cancer Immunol Res, 2015. **3**(3): p. 219-27.

42. Gaffen, S.L. and K.D. Liu, *Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications*. Cytokine, 2004. **28**(3): p. 109-23.
43. Isakov, N. and A. Altman, *Protein kinase C(theta) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
44. Muller, M.R. and A. Rao, *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 645-56.
45. Crabtree, G.R. and E.N. Olson, *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S67-79.
46. Flanagan, W.M., et al., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 803-7.
47. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
48. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka, *Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5138-43.
49. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
50. Shapiro, V.S., et al., *CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 4051-8.
51. Powell, J.D., et al., *The -180 site of the IL-2 promoter is the target of CREB/CREM binding in T cell anergy*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6631-9.
52. De Cesare, D., G.M. Fimia, and P. Sassone-Corsi, *Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(7): p. 281-5.
53. Tenbrock, K., et al., *The cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator suppresses IL-2 production in stimulated T cells by a chromatin-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2971-6.
54. Kallies, A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 466-74.
55. Martins, G.A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 457-65.
56. Martins, G.A., et al., *Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1959-65.
57. Quintana, F.J., et al., *Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 770-7.
58. Curtale, G., et al., *An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes*. Blood, 2010. **115**(2): p. 265-73.
59. Thiele, S., et al., *miR-9 enhances IL-2 production in activated human CD4(+) T cells by repressing Blimp-1*. Eur J Immunol, 2012. **42**(8): p. 2100-8.
60. Weitzel, R.P., et al., *microRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4+ T cells*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6648-57.
61. Villarino, A.V., et al., *Helper T cell IL-2 production is limited by negative feedback and STAT-dependent cytokine signals*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 65-71.
62. Hollander, G.A., et al., *Monoallelic expression of the interleukin-2 locus*. Science, 1998. **279**(5359): p. 2118-21.
63. Bix, M. and R.M. Locksley, *Independent and epigenetic regulation of the interleukin-4 alleles in CD4+ T cells*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1352-4.

64. Chiodetti, L., D.L. Barber, and R.H. Schwartz, *Biallelic expression of the IL-2 locus under optimal stimulation conditions*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2157-63.
65. Naramura, M., R.J. Hu, and H. Gu, *Mice with a fluorescent marker for interleukin 2 gene activation*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 209-16.
66. Stoecklin, G., et al., *Cellular mutants define a common mRNA degradation pathway targeting cytokine AU-rich elements*. RNA, 2001. **7**(11): p. 1578-88.
67. Lindstein, T., et al., *Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway*. Science, 1989. **244**(4902): p. 339-43.
68. Chen, C.Y., et al., *Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation*. Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1236-48.
69. Giri, J.G., et al., *Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15*. EMBO J, 1994. **13**(12): p. 2822-30.
70. Wang, X., et al., *Structural biology of shared cytokine receptors*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 29-60.
71. Nakamura, Y., et al., *Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 330-3.
72. Nelson, B.H., J.D. Lord, and P.D. Greenberg, *Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 333-6.
73. Damjanovich, S., et al., *Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13134-9.
74. Asao, H., et al., *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 1-5.
75. Kimura, Y., et al., *Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex*. Int Immunol, 1995. **7**(1): p. 115-20.
76. Kondo, M., et al., *Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1874-7.
77. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1877-80.
78. Russell, S.M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1880-3.
79. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 169-83.
80. Matikainen, S., et al., *Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells*. Blood, 1999. **93**(6): p. 1980-91.
81. Parada, N.A., et al., *Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2115-20.
82. Lin, J.X. and W.J. Leonard, *Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(4): p. 313-32.
83. Waldmann, T.A., *The multi-subunit interleukin-2 receptor*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 875-911.
84. Demaison, C., et al., *IL-2 receptor alpha-chain expression is independently regulated in primary and secondary lymphoid organs*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1977-82.
85. Siegel, J.P., et al., *The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities*. Science, 1987. **238**(4823): p. 75-8.
86. Sharon, M., J.R. Gnarr, and W.J. Leonard, *A 100-kilodalton protein is associated with the murine interleukin 2 receptor: biochemical evidence that p100 is distinct from the alpha and beta chains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4869-73.

87. Tanaka, T., et al., *In utero treatment with monoclonal antibody to IL-2 receptor beta-chain completely abrogates development of Thy-1+ dendritic epidermal cells*. *Int Immunol*, 1992. **4**(4): p. 487-91.
88. Djeu, J.Y., et al., *Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against Candida albicans by IL-2*. *J Immunol*, 1993. **150**(3): p. 960-70.
89. Hatakeyama, M., et al., *Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's*. *Science*, 1989. **244**(4904): p. 551-6.
90. Cerdan, C., et al., *CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation*. *J Immunol*, 1995. **154**(3): p. 1007-13.
91. Lin, J.X., et al., *Characterization of the human interleukin-2 receptor beta-chain gene promoter: regulation of promoter activity by ets gene products*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6201-10.
92. Lin, J.X. and W.J. Leonard, *The immediate-early gene product Egr-1 regulates the human interleukin-2 receptor beta-chain promoter through noncanonical Egr and Sp1 binding sites*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(7): p. 3714-22.
93. Casey, L.S., A.H. Lichtman, and M. Boothby, *IL-4 induces IL-2 receptor p75 beta-chain gene expression and IL-2-dependent proliferation in mouse T lymphocytes*. *J Immunol*, 1992. **148**(11): p. 3418-26.
94. Cao, X., et al., *Characterization of cDNAs encoding the murine interleukin 2 receptor (IL-2R) gamma chain: chromosomal mapping and tissue specificity of IL-2R gamma chain expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(18): p. 8464-8.
95. Ishii, N., et al., *Expression of the IL-2 receptor gamma chain on various populations in human peripheral blood*. *Int Immunol*, 1994. **6**(8): p. 1273-7.
96. Kondo, M., et al., *Expression of the mouse interleukin-2 receptor gamma chain in various cell populations of the thymus and spleen*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(9): p. 2026-30.
97. Ohbo, K., et al., *Functional analysis of the human interleukin 2 receptor gamma chain gene promoter*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7479-86.
98. Bosco, M.C., et al., *The gamma subunit of the interleukin-2 receptor is expressed in human monocytes and modulated by interleukin-2, interferon gamma, and transforming growth factor beta 1*. *Blood*, 1994. **83**(12): p. 3462-7.
99. Hemar, A., et al., *Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains*. *J Cell Biol*, 1995. **129**(1): p. 55-64.
100. Miyazaki, T., et al., *Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits*. *Science*, 1994. **266**(5187): p. 1045-7.
101. Russell, S.M., et al., *Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID*. *Science*, 1994. **266**(5187): p. 1042-5.
102. Zhu, M.H., et al., *Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-independent functional recruitment of Jak3 to Il-2Rbeta*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(17): p. 10719-25.
103. Friedmann, M.C., et al., *Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 2077-82.
104. Lin, J.X., et al., *Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function*. *Immunity*, 2012. **36**(4): p. 586-99.

105. Franke, T.F., D.R. Kaplan, and L.C. Cantley, *PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis*. Cell, 1997. **88**(4): p. 435-7.
106. Liao, W., et al., *Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1288-96.
107. Dubois, S., et al., *IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 537-47.
108. Stonier, S.W. and K.S. Schluns, *Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses*. Immunol Lett, 2010. **127**(2): p. 85-92.
109. Wuest, S.C., et al., *A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 604-9.
110. Rowley, J., et al., *Expression of IL-15RA or an IL-15/IL-15RA fusion on CD8+ T cells modifies adoptively transferred T-cell function in cis*. Eur J Immunol, 2009. **39**(2): p. 491-506.
111. Zanoni, I., et al., *IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions*. Cell Rep, 2013. **4**(6): p. 1235-49.
112. Chenoweth, M.J., et al., *IL-15 can signal via IL-15Ralpha, JNK, and NF-kappaB to drive RANTES production by myeloid cells*. J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4149-57.
113. Pereno, R., et al., *IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha*. Oncogene, 2000. **19**(45): p. 5153-62.
114. Uchiyama, T., S. Broder, and T.A. Waldmann, *A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells*. J Immunol, 1981. **126**(4): p. 1393-7.
115. Uchiyama, T., et al., *A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells*. J Immunol, 1981. **126**(4): p. 1398-403.
116. Waldmann, T.A., *Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey*. J Clin Immunol, 2007. **27**(1): p. 1-18.
117. Wiseman, L.R. and D. Faulds, *Daclizumab: a review of its use in the prevention of acute rejection in renal transplant recipients*. Drugs, 1999. **58**(6): p. 1029-42.
118. Roifman, C.M., *Human IL-2 receptor alpha chain deficiency*. Pediatr Res, 2000. **48**(1): p. 6-11.
119. Sadlack, B., et al., *Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4*. Eur J Immunol, 1994. **24**(1): p. 281-4.
120. Schorle, H., et al., *Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 621-4.
121. Morris, J.C. and T.A. Waldmann, *Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment*. Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i109-14.
122. Waldmann, T.A., et al., *Therapy of patients with human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia with anti-Tac, a monoclonal antibody to the receptor for interleukin-2*. Blood, 1988. **72**(5): p. 1805-16.
123. Waldmann, T.A., et al., *Radioimmunotherapy of interleukin-2R alpha-expressing adult T-cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-Tac*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4063-75.
124. Depper, J.M., et al., *Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: inhibition of human lymphocyte activation*. J Immunol, 1983. **131**(2): p. 690-6.

125. Waldmann, T.A., et al., *Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells*. J Exp Med, 1984. **160**(5): p. 1450-66.
126. Uchiyama, T., et al., *Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases*. Blood, 1977. **50**(3): p. 481-92.
127. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**(6069): p. 522-5.
128. Queen, C., et al., *A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 10029-33.
129. Kovarik, J., et al., *Disposition of basiliximab, an interleukin-2 receptor monoclonal antibody, in recipients of mismatched cadaver renal allografts*. Transplantation, 1997. **64**(12): p. 1701-5.
130. Bunn, P.A., Jr., et al., *Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States*. N Engl J Med, 1983. **309**(5): p. 257-64.
131. White, J.D., et al., *Infectious complications and immunodeficiency in patients with human T-cell lymphotropic virus I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma*. Cancer, 1995. **75**(7): p. 1598-607.
132. Waldmann, T.A., S. Dubois, and Y. Tagaya, *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 105-10.
133. Waldmann, T.A., et al., *Functional and phenotypic comparison of human T cell leukemia/lymphoma virus positive adult T cell leukemia with human T cell leukemia/lymphoma virus negative Sezary leukemia, and their distinction using anti-Tac. Monoclonal antibody identifying the human receptor for T cell growth factor*. J Clin Invest, 1984. **73**(6): p. 1711-8.
134. Migone, T.S., et al., *Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I*. Science, 1995. **269**(5220): p. 79-81.
135. Chen, J., et al., *Autocrine/paracrine cytokine stimulation of leukemic cell proliferation in smoldering and chronic adult T-cell leukemia*. Blood, 2010. **116**(26): p. 5948-56.
136. Chen, J., et al., *Induction of the IL-9 gene by HTLV-I Tax stimulates the spontaneous proliferation of primary adult T-cell leukemia cells by a paracrine mechanism*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5163-72.
137. Tendler, C.L., et al., *Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: pathogenic implications and a rationale for immunotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5218-22.
138. Grassmann, R., M. Aboud, and K.T. Jeang, *Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-I Tax*. Oncogene, 2005. **24**(39): p. 5976-85.
139. Jeang, K.T., et al., *Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 31991-4.
140. Szabó, G., et al, *Sejtbiológia*. 2nd ed. 2009, Budapest, HUN: Medicina.
141. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. Cell, 1994. **76**(2): p. 287-99.
142. Tscherning, T. and M.H. Claesson, *Signal transduction via MHC class-I molecules in T cells*. Scand J Immunol, 1994. **39**(2): p. 117-21.
143. Williams, D.B., et al., *Role of beta 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules*. J Immunol, 1989. **142**(8): p. 2796-806.
144. Townsend, A., et al., *Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro*. Cell, 1990. **62**(2): p. 285-95.

145. Townsend, A., et al., *Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides*. Nature, 1989. **340**(6233): p. 443-8.
146. Zervas, J.D., I.W. Delamore, and M.C. Israels, *Leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease*. Lancet, 1970. **2**(7674): p. 634-5.
147. Grumet, F.C., et al., *Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease*. N Engl J Med, 1971. **285**(4): p. 193-6.
148. Fernando, M.M., et al., *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet, 2008. **4**(4): p. e1000024.
149. Jersild, C. and T. Fog, *Histocompatibility (HL-A) antigens associated with multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand Suppl, 1972. **51**: p. 377.
150. Mahdi, B.M., *Role of HLA typing on Crohn's disease pathogenesis*. Ann Med Surg (Lond), 2015. **4**(3): p. 248-53.
151. Colbert, R.A., T.M. Tran, and G. Layh-Schmitt, *HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis*. Mol Immunol, 2014. **57**(1): p. 44-51.
152. Costantino, F., M. Breban, and H.J. Garchon, *Genetics and Functional Genomics of Spondyloarthritis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2933.
153. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv, 1548 p.
154. Bene, L., et al., *Lateral organization of the ICAM-1 molecule at the surface of human lymphoblasts: a possible model for its co-distribution with the IL-2 receptor, class I and class II HLA molecules*. Eur J Immunol, 1994. **24**(9): p. 2115-23.
155. Matko, J., et al., *Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3353-60.
156. Damjanovich, S., et al., *Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1122-6.
157. Matkó, J., et al., *GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines*. Eur J Biochem, 2002. **269**(4): p. 1199-208.
158. Vamosi, G., et al., *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, 2004. **101**(30): p. 11082-7.
159. Vereb, G., et al., *Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 6013-8.
160. Bodnár, A., et al., *A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions*. Immunol Lett, 2008. **116**(2): p. 117-25.
161. Eicher, D.M., S. Damjanovich, and T.A. Waldmann, *Oligomerization of IL-2Ralpha*. Cytokine, 2002. **17**(2): p. 82-90.
162. Pillet, A.H., et al., *Human IL-Rbeta chains form IL-2 binding homodimers*. Eur Cytokine Netw, 2008. **19**(1): p. 49-59.
163. Malka, Y., et al., *Ligand-independent homomeric and heteromeric complexes between interleukin-2 or -9 receptor subunits and the gamma chain*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33569-77.
164. Pillet, A.H., et al., *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, 2010. **403**(5): p. 671-92.

165. Hori, T., et al., *Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus*. *Blood*, 1987. **70**(4): p. 1069-72.
166. Varnai, P., et al., *Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(40): p. 29678-90.
167. Hammond, G.R., M.P. Machner, and T. Balla, *A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi*. *J Cell Biol*, 2014. **205**(1): p. 113-26.
168. Harder, T. and K. Simons, *Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(4): p. 534-42.
169. Haugland, R.P., *Antibody conjugates for cell biology*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. **Chapter 16**: p. Unit 16 5.
170. Pawley, J.B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Third Edition ed. 2006.
171. Costes, S.V., et al., *Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells*. *Biophys J*, 2004. **86**(6): p. 3993-4003.
172. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995. **6**(1): p. 103-10.
173. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967. **58**(2): p. 719-26.
174. Szaloki, N., et al., *High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry*. *Cytometry A*, 2013. **83**(9): p. 818-29.
175. Vamosi, G., et al., *Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study*. *Biophys J*, 2008. **94**(7): p. 2859-68.
176. Patterson, G.H., et al., *Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy*. *Biophys J*, 1997. **73**(5): p. 2782-90.
177. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
178. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
179. Roszick, J., et al., *Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry--approaches and a software solution*. *Cytometry A*, 2009. **75**(9): p. 761-7.
180. Sebestyen, Z., et al., *Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer*. *Cytometry*, 2002. **48**(3): p. 124-35.
181. Szentesi, G., et al., *Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis*. *Comput Methods Programs Biomed*, 2004. **75**(3): p. 201-11.
182. Stauber, D.J., et al., *Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2788-93.
183. van den Eijnden, M.J. and G.J. Strous, *Autocrine growth hormone: effects on growth hormone receptor trafficking and signaling*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(11): p. 2832-46.
184. Gent, J., et al., *Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(15): p. 9858-63.
185. Mercurio, A.M., et al., *Autocrine signaling in carcinoma: VEGF and the alpha6beta4 integrin*. *Semin Cancer Biol*, 2004. **14**(2): p. 115-22.

186. Berkowitz, J.L., et al., *Safety, efficacy, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of daclizumab (anti-CD25) in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma*. Clin Immunol, 2014. **155**(2): p. 176-87.
187. Lehky, T.J., et al., *Reduction in HTLV-I proviral load and spontaneous lymphoproliferation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients treated with humanized anti-Tac*. Ann Neurol, 1998. **44**(6): p. 942-7.
188. Lycke, J., *Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes*. Ther Adv Neurol Disord, 2015. **8**(6): p. 274-93.
189. Nashan, B., et al., *Reduction of acute renal allograft rejection by daclizumab. Daclizumab Double Therapy Study Group*. Transplantation, 1999. **67**(1): p. 110-5.
190. Nizsalóczki, E., et al., *Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells*. Chemphyschem, 2014. **15**(18): p. 3969-78.
191. Nizsalóczki, E., et al., *Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: A quantitative CLSM and FRET analysis*. Cytometry A, 2018. **93**(11): p. 1106-1117.
192. Szaloki, N., et al., *Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(21): p. 3785-98.
193. Kenworthy, A.K. and M. Edidin, *Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 69-84.
194. Lam, A.J., et al., *Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins*. Nat Methods, 2012. **9**(10): p. 1005-12.
195. Dale, R.E., J. Eisinger, and W.E. Blumberg, *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer*. Biophys J, 1979. **26**(2): p. 161-93.
196. Araki, K. and K. Nagata, *Protein folding and quality control in the ER*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(11): p. a007526.
197. Garcia-Parajo, M.F., et al., *Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 23): p. 4995-5005.
198. Vereb, G., et al., *Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8053-8.
199. Kusumi, A., et al., *Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2005. **34**: p. 351-78.
200. Lajoie, P., et al., *Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane*. J Cell Biol, 2009. **185**(3): p. 381-5.
201. Rose, T., et al., *Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response*. J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 14898-908.
202. Tamarit, B., et al., *Membrane microdomains and cytoskeleton organization shape and regulate the IL-7 receptor signalosome in human CD4 T-cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8691-701.

## 9.2. Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**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: DEENK/338/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Volkó Julianna  
Neptun kód: IC8W08  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10038818

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: 9.58 (2018)
2. Mocsár, G.\*, **Volkó, J.\***, Rönnlund, D., Widengren, J., Nagy, P., Szöllösi, J., Tóth, K., Goldman, C. K., Damjanovich, S., Waldmann, T. A., Dóczy-Bodnár, A., Vámosi, G.: MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells.  
*Biophys. J.* 111 (1), 100-112, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.044>  
\* Megosztott első szerzős közlemény.  
IF: 3.656





**További közlemények**

3. Nagy, É., Mocsár, G., Sebestyén, V., **Volkó, J.**, Papp, F., Tóth, K., Damjanovich, S., Panyi, G., Waldmann, T. A., Dóczy-Bodnár, A., Vámosi, G.: Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells.  
*Biophys. J.* 114 (10), 2473-2482, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.038>  
IF: 3.665
4. Damjanovich, L., **Volkó, J.**, Forgács, A., Hohenberger, W., Bene, L.: Crohn's Disease Alters MHC-Rafts in CD4+ T-Cells.  
*Cytometry A.* 81A (2), 149-164, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.21173>  
IF: 3.711

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,612**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
13,236**

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

Debrecen, 2019.11.05.



### 9.3. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

- Elsőszerzős magyar és idegen nyelvű előadások:

1. *Influence of MHC I gene silencing on interactions of membrane proteins and IL-2R signaling in human lymphocytes*  
15th efis-EJI Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, 2-6 September 2009, Balatonöszöd, Hungary
2. *Intracellular preassembly of interleukin receptor subunits*  
18th ELMi Meeting, 05-08 June 2018, Dublin, Ireland
3. *Intracelluláris IL-2 receptor összeszerelődés és anti-proliferatív anti-IL-2Rα terápia rezisztencia*  
Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája, 2019. május 23-25, Siófok
4. *Új intracelluláris jelátviteli mechanizmus? Interleukin receptor összeszerelődés az ER-ben és a Golgi-ban*  
Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa, 2019. augusztus 26-29, Debrecen

- Elsőszerzős idegen nyelvű poszterek:

1. *Influence of MHC I downregulation on the molecular patterns and signaling of IL-2/15 receptors and MHC glycoproteins in human T cells*  
**J. Volkó**, G. Mocsár, P. Nagy, A. Bodnár, B. Zsebik, R. Szabó, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, Gy. Vámosi  
14th efis-EJI Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, 15-19 September 2007, Balatonöszöd, Hungary
2. *Influence of MHC I gene silencing on interactions of membrane proteins and IL-2R signaling in human lymphocytes*  
**J. Volkó**, G. Mocsár, P. Nagy, A. Bodnár, K. Tóth, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, Gy. Vámosi  
15th efis-EJI Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, 2-6 September 2009, Balatonöszöd, Hungary
3. *Influence of MHC I gene silencing on interactions of membrane proteins and IL-2/IL-15R signaling in human lymphocytes*  
**J. Volkó**, G. Mocsár, P. Nagy, K. Tóth, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, A. Bodnár, Gy. Vámosi  
EMBO/EMBL Symposium: Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life, 17-20 March 2011, Heidelberg, Germany
4. *MHC I organizes protein clusters and inhibits IL-2/IL-15 signaling in human T cells*  
**J. Volkó**, G. Mocsár, E. Menczel, P. Nagy, K. Tóth, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, A. Bodnár, Gy. Vámosi  
8th European Biophysics Congress, 23-27 August 2011, Budapest, Hungary

5. *Nonclassical function of MHC I in human T cells?*  
**J. Volkó**, G. Mocsár, E. Menczel, P. Nagy, K. Tóth, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, A. Bodnár, Gy. Vámosi  
XXVII Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, 23-28 June 2012, Leipzig, Germany
6. *Nonclassical function of MHC I: Maintenance of interleukin receptor clusters in human T cells*  
**J. Volkó**, G. Mocsár, P. Nagy, K. Tóth, D. Rönnlund, J. Widengren, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, A. Bodnár, Gy. Vámosi  
IMmun-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (Efis-EJI Symposium), 31. August – 03. September 2013, Mátraháza, Hungary
7. *Assembly of interleukin receptor subunits during trafficking*  
**J. Volkó**, Á. Kenesei, P. Várnai, F. Bestvater, T.A. Waldmann, K. Tóth, Gy. Vámosi  
11th European Biophysics Congress, 16-20 July 2017, Edinburgh, Scotland, UK
8. *Intracellular preassembly of interleukin receptor subunits*  
**J. Volkó**, Á. Kenesei, P. Várnai, F. Bestvater, J. Langowski, T.A. Waldmann, K. Tóth, Gy. Vámosi  
18th European Light Microscopy Initiative Meeting, 05-08 June 2018, Dublin, Ireland

## 10. TÁRGYSZAVAK

IL-2/IL-15 receptorok

MHC I

fehérje szuperklaszter

géncsendesítés

RNS interferencia

Förster rezonancia energiatranszfer

autokrin jelátvitel

antiproliferatív antitest terápia

felőttkori T-sejtes leukémia/limfóma

## 11. KEYWORDS

IL-2/IL-15 receptors

MHC I

protein supercluster

gene silencing

RNA interference

Förster resonance energy transfer

autocrine signaling

antiproliferative antibody therapy

adult T-cell leukemia/lymphoma

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Vámosi Györgynek és Prof. Dr. Damjanovich Lászlónak, hogy lehetőséget kaptam tőlük doktorandusz hallgatóként a kutatómunka elkezdéséhez, Dr. Vámosi Györgynek a kezdetektől (tudományos diákkörös korom óta) tartó szakmai iránymutatását, hasznos tanácsait, ötleteit, támogatását.

Köszönetet mondok a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatóinak, Prof. Dr. Panyi Györgynek, Prof. Dr. Szöllösi Jánosnak és Prof. Dr. Damjanovich Sándornak, hogy intézetükben a kísérletes alap kutatás módszertanát megismerhettem, modern biofizikai és molekuláris biológiai módszerek egész sorát elsajátíthattam.

Köszönöm Dr. Mocsár Gábornak a hosszú évek közös munkáját, fizikus humorát, a mérésekben és az adatfeldolgozások kapcsán nyújtott segítségét.

Munkacsoportunk első asszisztensének Utasi-Szabó Rita Katalinnak, aki által a labormunka alapjait elsajátítottam, jelenlegi asszisztensének Nagy Edinának, akire a mai napig számíthatok mindenben - mindkettejük áldozatos munkája mellett szeretném megköszönni kedvességüket, önzetlenségüket.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk jelenlegi és korábbi tagjainak, közülük kiemelve Kenesei Ádámot, Dr. Rehó Bálintot, Dr. Forgács Attilát, Csomós Istvánt és Nagy Évát.

Köszönetet mondok a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi munkatársának, különösen Prof. Dr. Nagy Péternek és Dr. Dóczy-Bodnár Andreának a hasznos szakmai tanácsaikért; a teljesség igénye nélkül Dr. Szántó G. Tibornak, Dr. Arnódi-Mészáros Beátának, Szendi-Szatmári Tímeának, Csóti Ágotának és Dr. Erfaneh Firouzi Niakinak (szakmai segítségük mellett) a jó hangulatú és egyben támogató baráti légkörért.

Köszönet jár két fáradhatatlan kutató segítő jobbjaért a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetből, Dr. Balajthy Zoltánnak és Olafnak (azaz Jambrovics Károlynak), akik segítségével a munka örömeinek újabb és újabb frakcióit sikerült izolálni a színes hétköznapokban és dolgos hétvégéken egyaránt.

Köszönettel tartozom a külföldi kollaborációs partnereinknek, különösen Prof. Dr. Jörg Langowskinak és Dr. Tóth Katalinnak szakmai támogatásukért és a heidelbergi családi légkörért, a német rákkutató központban elvégzett mérések kivitelezésében nyújtott segítségükért, Gabriele Müllernek és Dr. Felix Bestvaternek.

Köszönöm Prof. Dr. Thomas A. Waldmann sok évre visszatekintő kollaborációban nyújtott szakmai támogatását, hasznos tanácsait.

Köszönöm a Barátaimnak, hogy szó nélkül vagy épp szép szóval támogattak/támogatnak, mellettem állnak.

És akiknek a legtöbbet köszönhetek, akik céljaim elérésében mindvégig velem vannak, drága Szüleimnek: köszönöm!

„Sejtjeid mélye  
rejti titkod. Szeretnéd  
tudni? – Kutasd még...” VJ.

## 13. FÜGGELÉK