

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Interleukin-15 transz-prezentáció vizsgálata

Kenesei Ádám

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Interleukin-15 transz-prezentáció vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
Az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kenesei Ádám okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudományi doktori iskolája
(Biofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Vámosi György

Az értekezés bírálói:

Dr. Bugyi Beáta, PhD
Dr. Koncz Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, PhD, DSc
tagok: Dr. Bugyi Beáta, PhD
Dr. Koncz Gábor, PhD
Dr. Dienes Beatrix, PhD
Dr. Grama László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Élettudományi Központ, F.008-009
előadó tanterme
2023. január 26. 15:00 óra

1. Bevezetés

1.1. Limfociták szerepe az immunrendszer működésében

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

1.2. IL-2 és IL-15 citokinek

A citokineknek számos csoportja és alcsoportja van, és általánosságban elmondható, hogy az immunválaszban résztvevő és jelátvitelt biztosító fehérjék tartoznak ide. A dolgozat szempontjából kiemelendő IL-2 és IL-15 a négy α -hélixből álló citokinek családjába tartozik. Az IL-2 citokint Robert Gallo munkacsoportja írta le először, ami az első emberben azonosított retrovírus (HTLV) azonosításához vezetett, az IL-15 citokint pedig szinte egyidejűleg fedezte fel Thomas A. Waldmann és Kenneth H. Grabstein kutatócsoportja. Az IL-2 és IL-15 receptorok (IL-2R, IL-15R) heterotrimer szerkezetűek, melyek tartalmaznak egy citokin specifikus α alegységet, amely különböző affinitással köti a saját specifikus ligandját. Az IL-15R α (CD215) nagyobb affinitással (Kd: 50 pM) köti az IL-15 citokint, mint az IL-2R α (CD25) az IL-2 citokint (Kd: 10 nM). Az IL-2/IL-15R β alegységet (CD122) valamint a γ_c (CD132) láncot (ami megtalálható az IL-4, IL-7, IL-9 és IL-21 receptorokban is) mindkét receptor használja. Mind az IL-15, mind az IL-2 serkenti a T-sejtek proliferációját, indukálja a citotoxikus limfociták (CTL) termelődését és serkenti a természetes ölő (NK) sejtek expanzióját. Azonban sok adaptív immunválaszban az IL-2 és IL-15 különböző szerepet játszhat. Az IL-2-vel ellentétben

az IL-15 gátolja az IL-2 által kiváltott sejthalált (AICD), nem aktiválja a T_{reg} sejteket, valamint nem okoz kapilláris szivárgás szindrómát, amit állatkísérletekben és klinikai vizsgálatokban is kimutattak. Az IL-15 elősegíti a $CD44^{hi}CD8^{+}$ effektor/memória T-sejtek fenntartását és a vírusspecifikus memória $CD8^{+}$ T-sejtek túlélését. Továbbá az IL-15 kritikus a szöveti memória fenotípus $CD103^{+}CD28^{+}CD8^{+}$ T-sejtek fejlődéséhez.

1.3. IL-15 transz-prezentáció

Dubois és munkatársai demonstrálták, hogy az IL-2 citokinnel ellentétben az IL-15 hosszabb ideig biztosítja a T-sejtek túlélését, miután mindkét citokintól mentes médiumban tenyésztették a sejteket. Azt is kimutatták, hogy a sejt felszínén található IL-15 függ az IL-15R α expressziójától. Továbbá az endoszomális újrahasonosítás az IL-15R α /IL-15 komplex jelenlétét igényli. Ez a fajta IL-15 újrahasonosítás a β alegység expressziótól nem, azonban az IL-15R α jelenlététől alapvető módon függ. Legjelentősebb megfigyelésük az volt, hogy az IL-15R α /IL-15 komplex stimulálta a szomszédos sejtek proliferációját, ezt a folyamatot IL-15 transz-prezentációnak (TP) nevezték. Az aktivált monociták felszínén található IL-15R α /IL-15 komplex a $\beta\gamma_c$ heterodimert expresszáló szomszédos sejtek transz-proliferációját idézte elő. Ezt az egyedi ligand szállítási módot az IL-15R α magas ligandkötő affinitása teszi lehetővé, amelynek köszönhetően egy stabil IL-15R α /IL-15 komplex már intracellulárisan összeszerelődik és így kerül a sejtfelszínre. A csak IL-2/15R β és γ_c alegységeket kifejező T-sejtek alacsonyabb affinitással (K_d : 1 nM) kötik az IL-15-öt, és mivel az IL-15 nincs jelen ilyen magas koncentrációban oldott formában in vivo, ezek a sejtek alternatív, irányított ligand célbajuttatási módszert igényelnek. Ezért az IL-15-öt elsősorban az IL-15R α prezentálja ezeknek a sejteknek. A prezentáció egyik mechanizmusa az, amikor az IL-15R α /IL-15 komplex extracelluláris része proteolitikusan lehasítódik, ami oldható IL-15R α /IL-15 (sIL-15R α /IL-15) komplexet eredményez, ezzel indukálva az IL-15 jelátvitelt a reagáló sejteken, mely internalizálja a komplexet. Egy másik leírt IL-15 transz-prezentációs módszer a transz-endocitózis, mely során immunszinapszis alakul

ki a prezentáló és a reagáló sejtek között, ahol a prezentáló sejt felszínén lévő IL-15R α prezentálja az IL-15 citokint a reagáló sejten lévő IL-2/15R $\beta\gamma_c$ heterodimernek. Ezután az egész IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$ /IL-15 TP komplex – a prezentáló sejt membránjának egy részével együtt – internalizálódik a reagáló sejtbe.

1.4. IL-2 és IL-15 jelátvitel

Mivel mind az IL-2R, mind az IL-15R ugyanazt a jelátvitelért felelős β és γ_c alegységet tartalmazza, ezért jelátvitelük ugyanazt a három fő útvonalat használja: JAK/STAT, Ras/Raf/MAPK és PI3K/AKT/mTOR. A JAK/STAT útvonal aktivációja vezethet proliferációhoz, differenciációhoz, migrációhoz vagy apoptózishoz. Jelátvitelére egy viszonylag egyszerű mechanizmust használ. Az alegységek konstitutívan kötik a JAK1/3 (β alegység) és JAK3 (γ_c alegység) tirozin kinázokat. Ligandkötés hatására kettő (vagy több) JAK egymás közelébe kerül, transz-foszforilálják egymást, valamint receptorukat, amihez így kötődhet a STAT1, STAT3 vagy STAT5, amiket a JAK1/3 szintén foszforilál. A foszforilált STAT dimerizálódik vagy tetramerizálódik és az importin α 5- és Ran-függő transzporttal a sejtmagba jut, ahol specifikus szabályozó régiókhoz kötődik, amivel aktiválhatja vagy gátolhatja célgénjeit. A Ras/Raf/MAPK útvonal a sejtbiológiában az egyik legjobban karakterizált jelátvitel, mivel számos fontos folyamatban vesz részt (pl. sejtciklus szabályozás, integrin jelátvitel, sejt migráció, angiogenezis). A PI-3K/Akt/mTOR útvonal a már leírt két jelátviteli folyamathoz hasonló funkciókkal rendelkezik (proliferáció, angiogenezis, apoptózis). A szintén JAK által aktivált PI3K végzi a PIP₂→PIP₃ átalakítást. PIP₃ mint másodlagos hírvívó a sejtmembránhoz köti a PDK1-et és ennek a jelátviteli útnak a legjelentősebb fehérjéjét az AKT-ot. Az AKT számos célfehérjével rendelkezik, amiken keresztül számos sejtfunkciót képes szabályozni.

1.5. Antigén prezentáció

Az antigén prezentáció (AP) egy jól tanulmányozott immunológiai folyamat, amely elengedhetetlen a T-sejt aktiválásához. Az antigén prezentáló sejtek (APC-k) mint a B-

sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek kötik össze a természetes és adaptív immunitást, melyek képesek internalizálni az exogén eredetű antigéneket, amelyeket feldolgoznak, majd fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákhoz kötve a sejt felszínére juttatnak, ahol bemutatják azokat a T-sejt receptor-CD3 (TCR/CD3) komplexnek. A TCR-MHC II kölcsönhatás során a CD4, a TCR ko-receptora is kötődik az MHC II receptorhoz, ezzel tovább erősítve az intercelluláris fehérje komplexet. CD4⁺ T-sejtek esetében a másodlagos jeleket további fehérje-fehérje interakciók biztosítják: a CD28 a T-sejten lévő receptor, amely a prezentáló sejten lévő CD80-hoz vagy CD86-hoz kötődik. További fehérjék, mint az ICOS, 4-1BB és OX40 expressziója a T-sejteken és ezek ligandjai az APC-n is nélkülözhetetlenek a T-sejt aktiváláshoz. Ezek a ko-stimulusok csak akkor állnak rendelkezésre, ha a bemutató sejt kórokozóval találkozik és azt megfelelően prezentálja. További fehérje-fehérje kölcsönhatások, mint a CD40 és CD40L, valamint az LFA-1/ICAM-1 tovább stabilizálják az immunológiai szinapszist (IS). Az IS szerkezete három részre osztható, koncentrikus gyűrűkre, amelyek különböző szegregált fehérjeklaszterekből állnak. A szupramolekuláris aktivációs klaszter (SMAC) három területe a központi SMAC (central SMAC, c-SMAC), perifériás SMAC (periferal SMAC, p-SMAC) és távoli SMAC (distal SMAC, d-SMAC). Korábbi tanulmányok betekintést engedtek ennek a három területnek a fehérje összetételére. A CD4/CD8-ról kimutatták, hogy a c-SMAC-ben dúsul fel. A leukocita funkcionális antigén-1 (LFA-1) és a talin citoszkeletális fehérje a p-SMAC-ben koncentrálódik, míg a CD43 és a CD45 a d-SMAC-ben lokalizálódik. Intézetünk és más kutatócsoportok azt is kimutatták, hogy különböző ioncsatornák, túlnyomórészt a feszültségfüggő Kv1.3 káliumcsatornák is feldúsulnak az IS-ben a PSD-95 adapter fehérje segítségével a T-sejt aktiváció korai szakaszában.

2. Célkitűzés

Mivel mind az IL-15 TP, mind az AP hozzájárul a T-sejt aktiváláshoz, és hasonló sejt-sejt interakción alapul, felmerül a kérdés, hogy ez a két folyamat befolyásolja-e egymás működését vagy független egymástól. Vannak olyan összetevők immunológiai szinapszisokban, nevezetesen a KIR család inhibitor receptorai, amelyeket NK sejtek fejeznek ki, ezek negatívan szabályozzák az IL-15 TP hatását a B- és NK sejtek között. Az AP-nak az IL-15 TP-ra gyakorolt lehetséges hatásait azonban még nem vizsgálták. A dolgozatban ismertetett kísérletek az IL-15 TP és az AP kapcsolatát vizsgálják biofizikai módszerekkel. Az itt használt B-sejt - T-sejt modell rendszer az AP-hoz és IL-15 TP-hoz szükséges fehérjéket expresszálja, melyeknek mind „transz” (intercelluláris), mind „cisz” (ugyanazon a sejten előforduló) kölcsönhatásait vizsgáltuk. Célul tűztük ki, hogy elsőként közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltatassunk az IL-15R alegységek összeszerelődésére, amelyeket a két sejt az IL-15 TP során expresszál, valamint hogy megállapítsuk, az AP-ban és IL-15 TP-ban részt vevő receptorok közös komplexben vagy egymástól függetlenül transzlokálódnak-e az immunszinapszisba. Arra is kerestük a választ, hogy az IL-15 jelátviteli hatékonyságát befolyásolja-e az AP és viszont. A dolgozat második felében a γ_c alegységek homodimerizációját vizsgáltuk. 2008-ban Pillet és munkatársai leírták, hogy az IL-2/15R β alegység a ligand, illetve γ_c vagy IL-2R α és IL-15R α hiányában is homodimerként van jelen COS-7 sejtek membránjában. Munkacsoportunk FRET kísérletekkel kimutatta, hogy a γ_c alegység hasonlóan viselkedik, HeLa sejtekben már intracellulárisan megtörténik az összeszerelődés. További fehérjedinamikai kérdések megválaszolásához egység megvilágítású mikroszkópia alapú fluoreszcencia keresztkorrelációs (SPIM-FCCS) méréseket végeztünk a γ_c alegységen.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejttenyésztés

Az IL-15 transzprezentáció vizsgálatához használt Raji B-sejteket és Jurkat T-sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, amit kiegészítettünk 10% (v/v) FBS-sel és GlutaMAX-szal. A γ_c alegységek homodimerizációjának vizsgálata HeLa sejtvonalon történt, melyet szintén a korábban leírt médiumban tenyésztettünk. A retrovirális transzdukcióhoz használt HEK293T sejtek DMEM médiumban, a korábban említett kiegészítésekkel együtt voltak fenntartva. Minden sejtet 5% CO₂ párasított légkörben tenyésztettünk 37 °C-on. Azokat a Raji és Jurkat sejteket, amelyek stabilan expresszálták az IL-15 receptor alegységeit mint: EGFP-IL-15R α , mCherry-IL-15R α , IL-15R α és IL-2/15R β (a továbbiakban: Raji-EGFP-IL-15R α , Raji-mCherry-IL-15R α , Raji-IL-15R α és Jurkat-IL-2/15R β) Geneticin-nel szelektáltuk.

3.2. Plazmidok

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

3.3. Tranziens transzfekció

Az mCherry-IL-2R α -t és IL-2R α -mCherry-t kódoló plazmidokat tranziens transzfekcióval (elektroporáció) juttattuk a Raji sejtekbe. A transzfekciót Amaxa Nucleofector II eszközzel végeztük a gyártó által ajánlott protokoll segítségével.

HeLa sejtek esetében FuGene HD transzfekciós reagenssel történt a transzfekció.

3.4. Retrovirális transzdukción

A szükséges plazmidokat (retrovirális transzfer vektor, VSVG burok és psPAX2 csomagoló) a csomagoló sejtekként használt HEK293T sejtekbe juttattuk. A retrovírust tartalmazó leszűrt felülúszót Raji vagy Jurkat sejtekhez adtuk további 10 µg/ml polibrénnel és 48 órán át inkubáltuk, majd a sejteket immunfluoreszcensen jelöltük a transzdukción hatékonyságának ellenőrzése céljából.

3.5. Immunológiai szinapszis képzés

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

3.6. Immunfluoreszcens jelölés

A Raji és Jurkat sejteket Alexa Fluor 488-val vagy Alexa Fluor 546-tal konjugált egér monoklonális antitesttel jelöltük a receptorok és receptoralegységek kimutatásához. A jelöléshez a következő antitesteket használtuk: anti-Tac az IL-2R α esetében, Mik β 3 az IL-2/15R β esetében, OKT3 a CD3 esetében és L243 az MHC II (HLA DR) esetében. A sejteket a jelölés előtt egyszer PBS-ben mostuk, majd 30 percen át jégen inkubáltuk 50 µg/ml fluoreszcens mAb-val. A jelölés után a sejteket kétszer megmostuk és 2%-os formaldehiddel fixáltuk, majd 8-lyukú mikroszkópos mintatartó kamrába helyeztük.

3.7. Intenzitás alapú FRET mérés konfokális mikroszkópiával

A receptor alegységek asszociációját (közelségét a 2-10 nm-es tartományban) FRET mikroszkópiával pixelenként határoztuk meg LSM 880 konfokális mikroszkóppal. Az Alexa Fluor 488 gerjesztése Ar-ion lézerrel 488 nm-en történt, az mCherry esetében pedig 543-nm-en HeNe lézerrel. 3 csatornában rögzítettük a jeleket: I₁ – donor

(gerjesztés: 488 nm, emisszió: 500-560 nm), I_2 – transzfer (gerjesztés: 488 nm, emisszió: 590-700 nm) és I_3 – akceptor (gerjesztés: 543 nm, emisszió: 590-700 nm).

A FRET hatékonyságát pixelenként számítottuk olyan régiókban, melynek pixeleiben az intenzitás értékek egy küszöbérték felett voltak az 1. és 3. csatornában is (a dinamikus küszöbértéket az egyes képek maximális pixel intenzitásának 10%-ára állítottuk be). A küszöbölést követően a ROI-kat tovább szűkítettük manuálisan a transzmissziós felvétel alapján, hogy azok csak a szinaptikus területeket tartalmazzák. A kiválasztott pixelekre kapott FRET hatékonyságokat átlagoltuk, így egy adott szinapszisa jellemző értéket nyertünk. Az akceptor/donor arány (N_A/N_D) befolyásolja a FRET hatásfokot, ezért ezt is meghatároztuk.

3.8. FLIM-FRET mérés konfokális mikroszkópiával

A FRET-et a donor molekulák fluoreszcencia élettartam csökkenésével is meghatároztuk, ehhez egy pikoszekundumos pulzáló lézeres gerjesztést használtunk, amelynek ismétlési sebessége 20-40 MHz volt. A FRET-hatékonyságot a következő egyenlettel határozhatjuk meg:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1)$$

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

3.9. A receptorok transzlokációjának számszerűsítése

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

$$\langle I_{IS,norm} \rangle = \frac{\sum I_{IS} / N_{IS}}{\sum I_{tot} / N_{tot}} \quad (2)$$

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

3.10. Foszforilált STAT5 és CD3 ζ áramlási citometriás mérése Jurkat sejtekben

Az immunológiai szinapszisok kialakulását megelőzően a Jurkat sejteket Alexa Fluor 546-W6/32 mAb-val jelöltük a Raji sejtektől való megkülönböztethetőség érdekében. Az IS kialakulása után a sejteket 37 °C-on 5 percig tripszines emésztéssel választottuk el egymástól. A sejteket ezután Alexa Fluor 647-anti pSTAT5 mAb-val vagy IgG1 κ izotípus kontrollal jelöltük. A Jurkat sejteket az Alexa Fluor 546 pozitív és EGFP negatív (a Raji-EGFP-IL-15R α -ból) jel alapján kapuztuk; a pSTAT5 szintet az Alexa Fluor 647 jel alapján határoztuk meg.

A TCR által kiváltott jelátvitel mértékének megállapításához a pSTAT5-höz hasonlóan áramlási citometriai kísérleteket végeztünk, p-CD3 ζ szint méréssel. A sejteket allofikocianin jelölővel ellátott anti-p-CD3 ζ mAb-val vagy IgG2b κ izotípus kontrollal jelöltük. A kiértékelés során a T sejteket és a T sejt - B sejt konjugátumokat az Alexa Fluor 546-W6/32 pozitív jel alapján, a p-CD3 ζ szintet az allofikocianin intenzitásából határoztuk meg.

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

A receptor alegységek ko-mobilitását SPIM-FCCS mérésekkel végeztük, amit képalkotó FCCS-nek is neveznek. Ez a módszer képes a fluoreszcens részecskék stabil ko-diffúziójának kimutatására a megfigyelési időablakon belül (a részecskék diffúziós ideje a detektálási térfogatban). A méréseket egy a heidelbergi DKFZ-ben épített SPIM készüléken hajtottuk végre. A γ_c alegységek homodimerizációjának

tanulmányozásához γ_c -EGFP + γ_c -mCherry ko-transzfekciót alkalmaztunk. Az egyesített nyalábokból egy hengeres lencse körülbelül 1,3 μm vastagságú fénysíkot képezett, amely megvilágította a sejteket. A mintából származó fluoreszcenciát egy nagy munkatávolságú vízimmerziós objektívvel gyűjtöttük össze, amelynek optikai tengelye merőleges volt a gerjesztő fénysíkra. Az összegyűjtött fluoescenciát zöld (500-550 nm) és vörös (>593 nm) komponensre osztottuk.

A fluoescencia képekből a QuickFit 3 szoftver segítségével kiszámoltuk az egyes csatornák autokorrelációs függvényeit, valamint a két csatorna keresztkorrelációs függvényét minden pixelre. A diffúziós együtthatókat és a zöld-vörös dimer frakciók arányát az illesztési paraméterekből kaptuk. A zöld-vörös komplexben lévő molekulák, azaz az egymással kölcsönhatásban lévő fehérjék hányadának modellfüggetlen meghatározásához kiszámítottuk a relatív keresztkorrelációs függvény (*RCCF*) amplitúdóját is a kiválasztott pixelekre:

$$RCCF(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n G_{CCF(x,y)}(\tau_i)}{\sum_{i=1}^n G_{ACF(x,y)}(\tau_i)} \quad (3)$$

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

3.12. Statisztikai elemzés

A Student-féle t-próbákat a GraphPad Prism 8 szoftverrel végeztük el. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

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

Az IL-15 TP vizsgálata során prezentáló sejt-ként jelölt (mCherry vagy EGFP az N-terminálison) vagy jelöletlen IL-15R α alegységet expresszáló Raji B-sejteket, célsejt-ként jelöletlen IL-2/15R β alegységet expresszáló (a γ_c alegységet endogén módon kifejező) Jurkat T-sejteket használtunk. Ellenőriztük a különböző sejteken az IL-15 TP-ban vagy AP-ban résztvevő receptorok, illetve receptor alegységek expresszióját. Méréseink alapján a Raji B-sejteken az MHC II rendelkezik a legmagasabb expressziós szinttel, amit az IL-15R α követ, ami összevethető a Jurkat T-sejteken mért a CD3 expressziójával. Ez utóbbiak hozzávetőlegesen 3× magasabbak, mint az IL-2/15R β alegysége. A γ_c alegység expressziója két nagyságrenddel alacsonyabb, mint az IL-2/15R β -é. Az IL-15R α /IL-15 - IL-2/15R β komplex molekuláris szintű összeszerelődésének közvetlen megfigyelésére, valamint az AP-nak az IL-15 TP-ra gyakorolt hatásának tanulmányozása érdekében racionális FRET kísérleteket végeztünk. A FRET-hatékonyságot pixelenként értékeltük ki. Az IL-15 kezelés növekedett FRET hatékonyságot eredményezett az A488-Mik β 3 mAb-val ellátott IL-2/15R β és az mCherry-IL-15R α között, jelezve az IL-15 receptor alegységek és a ligand alkotta komplex összeszerelődését az IS-ban. Az IL-15-tel és a SEE szuperantigénnel való kettős kezelés tovább növelte az E-t. A csak SEE-vel végzett kezelés esetén az alacsony FRET érték azt mutatta, hogy IL-15 hiányában a vizsgált alegységek között nem volt szignifikáns asszociáció; legfeljebb véletlenszerű FRET fordulhat elő a magas N_A/N_D akceptor-donor molekuláris arányok miatt.

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

Annak ellenőrzésére, hogy létrejön-e az AP a modellrendszerünkben, az IS-ban a CD3 és az MHC II közötti asszociációt mértük FLIM-FRET-tel, ehhez a CD3-at Alexa488-

OKT3, az MHC II-t pedig Alexa546-L243 mAb-val jelöltük. Ha csak IL-15-tel kezeltük a Raji sejteket, nem volt jelentős transzfer hatások a két fehérje között annak ellenére sem, hogy magas volt az N_A/N_D arány. SEE kezeléssel azonban a FRET hatékonysága jelentősen megnőtt, bár ekkor az N_A/N_D az IL-15 kezeléssel mért érték felére esett vissza. A kettős kezelésnek nem volt további hatása a csak SEE-vel végzett kezeléshez képest, amiből arra a következtethetünk, hogy az antigén önmagában szükséges és elegendő a hatékony AP-hoz.

4.3. Nincs jelentős cisz-interakció az IL-2/15R β és a CD3 között

Felmerülhet a kérdés, hogy az IS-be transzlokálódó fehérjék a T sejten együtt vagy egymástól függetlenül mozognak a szinapszisba. Az IL-2/15R β alegység és a CD3 közötti kölcsönhatásra se AP, se IL-15 TP során nem találtunk bizonyítékot. Az IS-ban történő méréskor sem az IL-15-tel kezelt, sem a kettős kezelésen átesett minták nem eredményeztek szignifikáns FRET növekedést. Az SEE kezelés során a kissé megemelkedett E-t valószínűleg a megnövekedett N_A/N_D arány okozza, amely magasabb a többi mintánál tapasztaltnál. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy nincs jelentős asszociáció az IL-2/15R β és a CD3 között sem a magányos, sem IS-ban lévő sejteken.

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

Az a megállapításunk, hogy az AP fokozta az IL-15R α és az IL-2/15R β alegységek asszociációját, felveti a kérdést, hogy az IL-15R α és az MHC II kölcsönhatásba lépnek-e egymással B-sejteken is. FLIM-FRET kísérletekkel vizsgáltuk az IL15R α és az MHC II közötti cisz kölcsönhatást az IS-ban. Először magányos B-sejteken mértünk FRET-et és növekedett transzferhatást tapasztaltunk, ami arra utal, hogy ezek a molekulák ligand hiányában is komplexet képeznek. Ezután megmértük a FRET-et az IS-ban is. Az IL-15- és a kettős kezelésű minták hasonló eredményeket mutattak; azonban a csak SEE-vel

kezelt minta lényegesen magasabb értéket eredményezett. Kiszámítottuk a FRET hatékonyságát a sejtmembrán szinaptikus régióján kívül is. Az eredmények hasonló tendenciát mutattak, mint amit az IS-ban megfigyeltünk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IL-15R α és az MHC II közös komplexben van jelen mind magányos, mind IS-t képző sejteken.

4.5. Receptor transzlokáció az IS-ba

Az AP-ban és IL-15 TP-ban résztvevő fehérjék IS-ban való feldúsulását az ($I_{IS,norm}$) paraméter segítségével számszerűsítettük, amely megadja a vizsgált molekula IS-ban mért átlagos pixelenkénti intenzitását a sejtmembrán egészében mért átlagintenzitáshoz képest. Az IL-15R α változatlan, kismértékű feldúsulást mutat az IS-ban, mindhárom kezelés esetében. Az IL-2/15R β alegység az IL-15R α -val ellentétben csak akkor dúsult fel az IS-ban, amikor az IL-15R α prezentálta az IL-15-öt: IL-15 TP esetén az IL-2/15R β alegységek száma az IS-ban jelentősen emelkedett. Az MHC II az IL-15R α alegységhez hasonlóan viselkedett, az összes kezeléskor alacsony, de közel állandó mértékű feldúsulást mutatott. A CD3 az IL2/15R β -hez hasonlóan csak akkor transzlokálódott a szinaptikus régióba, amikor az MHC II prezentálta az antigént. Ebben az esetben a feldúsulás jelentős volt, de alacsonyabb, mint az IL-2/15R β alegységé.

4.6. A jelátvitelt sikeresen kiváltja az IL-15 TP, amit az AP nem befolyásol

Annak tanulmányozására, hogy az IL-15 TP valóban kiválthat-e jelátvitelt a célsejtben, és hogy megállapítsuk, hogy az AP-nak volt-e erre hatása, a foszforilált STAT5 mennyiségét mértük magányos és a különbözően kezelt Raji sejteknek kitett Jurkat sejtekben. Azt találtuk, hogy a magányos Jurkat sejtek rendelkeznek egy alap pSTAT5 szinttel, ami az SEE kezelés során kis mértékben emelkedett. Az IL-15-tel kezelt Raji sejtekkel való kölcsönhatás nagymértékben növelte a pSTAT5 mennyiségét, de az ezzel együtt végzett SEE kezelés hatására már nem volt jelentős növekedés. Az utóbbi két kezelésnél egy reagáló és egy nem reagáló populációt észleltünk, és egy

kétkomponensű lognormális függvényt illesztettünk a hisztogramokra. A pSTAT5 szintek összehasonlításához a reagáló populációk értékeit használtuk, amelyekből levontuk a magányos Jurkat sejtek alap pSTAT5 szintjének értékét. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IL-15 TP önmagában is kiválthatja a jelátvitelt, és az AP-nak nincs jelentős hatása erre a folyamatra.

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

Az IL-15 TP-nak az AP-indukálta T-sejt jelátvitelre gyakorolt lehetséges hatását áramlási citometriával és Western-blot-tal vizsgáltuk a TCR/CD3 komplex CD3 ζ lánc foszforilációjának mérésével. Először áramlási citometriával megmértük a foszforilált CD3 ζ szinteket Jurkat sejtekben, amelyek különbözőképpen kezelt Raji sejteknek voltak kitéve (SEE, IL-15, SEE+IL-15). Az izotípus kontroll jeléhez viszonyítva egy nem nulla pCD3 ζ szint már kimutatható volt magányos Jurkat sejtekben és olyan mintákban is, ahol csak IL-15 TP fordult elő. Az AP önmagában (SEE kezelés) jelentősen megemelte a pCD3 ζ szintjét. A kettős (SEE + IL-15) kezeléskor mért jel viszont valamivel alacsonyabb volt, mint önmagában az SEE kezelésnél, bár a különbség statisztikailag nem szignifikáns.

A CD3 ζ foszforilációt a sejtpopuláció szintjén is vizsgáltuk Western blot-tal. Ezek a kísérletek hasonló tendenciát mutattak, a legerősebb pCD3 ζ sávokat az SEE-vel kezelt Raji+Jurkat minta adta. A Western-blot megerősítette, hogy a szimultán IL-15 TP - bár nem statisztikailag szignifikánsan -, de csökkenti az AP által kiváltott TCR-jelátvitel hatékonyságát. Ugyanakkor az ötször megismételt kísérletben mindig ugyanezt a tendenciát tapasztaltuk.

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

Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával demonstrálhatjuk az asszociált molekulák ko-diffúzióját, amennyiben azok stabil komplexet képeznek. A

fluoreszcencia intenzitásának időbeli auto- és keresztkorrelációs függvényeinek (ACF, CCF) elemzése feltárja a molekulák mobilitását, valamint a komplexet alkotó molekulák hányadát. A γ_c láncok homoasszociációjának vizsgálatához SPIM-FCCS-t használtunk.

Negatív kontrollként külön EGFP-t és külön mCherry-t kódoló plazmidokkal ko-transzfektált sejteket használtunk. A γ_c láncok homo-oligomerizációjának kimutatására γ_c -EGFP-vel és γ_c -mCherry-vel ko-transzfektált sejteken mértünk. A méréseket a citoplazmában elhelyezkedő belső membránokon végeztük, ami egyértelműen megkülönböztethető volt a plazmamembrántól. A dimerizáció mértékének becsléséhez az $RCCF_g$ arány modellfüggetlen értékét számítottuk ki a CCF keresztkorrelációs függvény és a zöld csatorna ACF_g korrelációs függvény első öt mérési pontjának átlagából. A negatív kontroll szolubilis fehérjei egyenletesen oszlottak el az egész citoplazmában, míg a γ_c láncok kisebb területekre korlátozódtak. A γ_c -EGFP + γ_c -mCherry minta $RCCF_g$ értéke lényegesen magasabb volt, mint a negatív kontrollé, így ezek az eredmények azt mutatják, hogy az intracelluláris γ_c alegységek legalább egy része dimer (vagy oligomer) formában létezik. A korrelációs görbék illesztéséből kinyerhető az egyes molekulapopulációk koncentrációja. A zöld-piros dimer frakció $c_{gr}/(c_g+c_r+c_{gr})$ az illesztett ACF és CCF görbékből kalkulálható. A γ_c -EGFP + γ_c -mCherry minta a negatív kontrollal összehasonlítva szignifikánsan magasabb dimer frakciót eredményezett.

Végül meghatároztuk az ACF és CCF függvényekből a részecskék mobilitását. Az összes minta ACF-jét és a kontrollok CCF-jeit két komponensű diffúziós modellel illesztettük. Az ACF-ekből származó gyors és lassú diffúziós együtthatók átlagértékei hasonlóak mind a kontrollok, mind a γ_c -EGFP + γ_c -mCherry minta esetében. Azonban a γ_c - γ_c dimer lassú komponensének frakciója sokkal nagyobb, mint a szolubilis kontrolloké, ami a γ_c alegységek lassabb diffúzióját mutatja a citoplazma membránrendszereiben. SPIM-

FCCS méréseink megerősítették a citoplazmában a γ_c dimerek vagy oligomerek létezését, és bizonyították lassú ko-diffúziójukat.

5. Megbeszélés

Az IL-15 egy pleiotróp citokin, amely számos sejttípust és funkciót stimulál, azonban patogén szerepet is játszik több szervspecifikus immunbetegségben. Felmerül a kérdés, hogy a γ_c citokinek közül miért csak az IL-15 α /IL-15 alkalmazza a TP mechanizmusát. Az IL-15 TP olyan esetekben alakul ki, ahol az IL-15-re sejt-sejt kapcsolat kontextusában van szükség. Az IL-15 TP interakció elsősorban CD44^{hi} CD8⁺ memória T sejtek kialakulásában játszik fontos szerepet, amik az immunológiai memória fő funkcionális elemei.

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

A Jabri és Abadie által felvetett harmadik funkcióként az IL-15 veszélyjelzőként működik, hogy ezzel szabályozza a szöveti rezidens T-sejteket és a szövetkárosodást. Az IL-15 a többi γ_c citokinnel összehasonlítva rendkívül széles előfordulással rendelkezik, hematopoietikus és egyéb sejttípusok is kifejezhetik. Az IL-15 α /IL-15 indukálható ezekben a változatos szövetekben sejtfertőzéssel és steril gyulladással csakúgy, mint autoimmun betegségekben. Az IL-15 által indukált effektor citotoxikus sejtek csak akkor működnek lokálisan, ha folyamatban van egy olyan aktív szöveti „vészjel”, amit vagy fertőző, vagy nem fertőző stresszjel szabályoz. Bár egyes sejszintű fertőzésekben ez a gazdaszervezet számára értékes, ez áll olyan autoimmun betegségek hátterében is, mint a gluténérzékenység, az 1-es típusú cukorbetegség, a foltos hajhullás, a gyulladós bélbetegség és a szarkoidózis.

Az IL-15 TP fent leírt szerepének fényében érdekes kérdés volt, hogy az IL-15 TP egy APC és egy T-sejt között autonóm módon, vagy csak az AP kísérőjeként fordulhat-e elő. Mind az IL-15 TP, mind az AP kritikusan függ a ligandok által vezérelt intercelluláris

fehérje-fehérje kölcsönhatásoktól, és egy T-sejtes modellrendszerben korábban kimutattuk a két prezentáló fehérje, az IL-15R α és az MHC II közötti kölcsönhatást. Itt közvetlen bizonyítékot találtunk az IL-15 TP létrejöttére az IL-2/15R β és IL-15R α alegységek asszociációjának vizsgálata révén, mind AP hiányában, mind annak jelenlétében.

Eredményeink szerint az IL-15R heterotrimer receptor csak akkor szerelődik össze, ha az IL-15R α a kötött IL-15-öt bemutatja az IL-2/15R β γ_c komplexnek. Az IL-15 TP során mindegyik IL-15R alegység részben transzlokálódott az IS-ba, azonban – valószínűleg az expressziós arányok különbsége miatt – az alacsonyabban expresszált IL-2/15R β feldúsulása jelentősebbnek bizonyult, mint az IL-15R α -é, és csak akkor következett be, amikor az IL-15 jelen volt. Az IL-15 jelátvitel hatékonyságának ellenőrzéséhez meghatároztuk a STAT5 foszforiláció szintjét a T-sejtekben. Az eredmények azt mutatták, hogy az IL-15 TP önmagában indukálja a JAK/STAT útvonalat, és ez a folyamat független az AP-tól. A Jurkat sejtek kifejezik az IL-2-t, ami autokrin vagy intrakrin módon indíthatja el a JAK/STAT jelet, ez magyarázhatja az emelkedett alap STAT5 foszforilációt kezeletlen, magányos T-sejtekben. Érdekes jelenség, hogy amikor az AP az IL-15 TP-val párhuzamosan történt, az IL-2/15R β és az IL-15R α alegységek közötti asszociáció növekedett; ez magyarázható az AP miatti erősebb IS és/vagy a korábban bemutatott MHC II és IL-15R α együttállása révén, amit ezen a modellrendszeren is demonstráltunk. Kísérleteink igazolták az MHC II és IL-15R α asszociációját az általunk használt Raji B-sejteken; ezek a molekulák együtt transzlokálódtak a szinaptikus területre, amikor IL-15 vagy antigén volt jelen. Ezenkívül azt találtuk, hogy amennyiben az MHC II kötötte az SEE szuperantigént, az IL-15R α és az MHC II közötti FRET hatékonyság nemcsak a szinaptikus régióban, hanem az IS-on kívül, valamint a magányos B-sejteken is nőtt.

Az IL-15 TP-hoz hasonlóan közvetlen bizonyítékot szolgáltatunk az antigén-prezentációs komplex összeszerelésére is, CD3 és MHC II közötti intercelluláris FRET

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

Modellrendszerünkben – hasonlóan az IL-15 TP résztvevőihez – az AP-ban résztvevő fehérjék is különböző expressziós szintekkel rendelkeztek. Ezért nem meglepő módon az alacsonyabb expresszióval rendelkező CD3 nagyobb mértékű transzlokációt mutatott az IS-ba, mint az MHC II. Az IL-2/15R β alegységhez hasonlóan a CD3 csak akkor dúsult fel a szinaptikus régióban, ha az MHC II antigént prezentált. A Kv1.3 káliumcsatorna döntő fontosságú a T-sejt aktivációjában, melynek a CD3-mal való lokalizációját szintén kimutatták, csakúgy, mint feldúsulását az IS-ban.

Eredményeink azt sugallják, hogy az IL-15 TP az APC-k és a T-sejtek között nem csak az AP kíséretében történhet meg, hanem önállóan is kialakulhat. Így az IL-15 transzprezentációra autonóm, önálló folyamatként tekinthetünk, ami hozzájárul a memória T sejtek túléléséhez, ha ezek a sejtek interakcióba lépnek IL-15-prezentáló sejtekkel az életciklusuk alatt.

Az IL-15 TP és AP tehát autonóm folyamatok, melyek önmagukban vagy egyidejűleg is előfordulhatnak. Ha az egyik ligand (IL-15 vagy antigén) jelen van, a B és T sejtek megfelelő receptorai transzlokálódnak a szinapszisba, és sejt-sejt kölcsönhatást

hoznak létre egy sejtközi fehérje komplex kialakításával. A B-sejten lévő IL-15R α és MHC II egymással konstans kapcsolatban állnak; így amikor a ligandot kötő fehérje transzlokálódik az IS-ba, a másik fehérje követi azt és szintén feldúsul ott. Ezzel szemben a T-sejten lévő IL-2/15R β és a CD3 nem lép kölcsönhatásba egymással; ezért csak az a fehérje kerül a szinapszisba, amelynek ligandját a B-sejt prezentálja, a másik fehérje pedig csak abban az esetben dúsul fel, ha a saját ligandja is jelen van az IS-ban. Az IL-15 TP önmagában is képes a T-sejtben jelátvitelt indukálni, és bár az IL-2/15R β és IL-15R α asszociációját az AP fokozza, az IL-15 TP által kiváltott JAK/STAT jelátvitel hatékonyságát nem befolyásolja.

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

6. Összefoglalás

Az interleukin-15 kulcsszerepet játszik a T-sejtek és az immunológiai memória hosszú távú fenttartásában. Az IL-15 elsősorban transz-prezentáción (TP) keresztül működik, melynek során az IL-15-öt kötő IL-15R α alegységet expresszáló antigén prezentáló sejt (APC) egy szomszédos T/NK-sejtnak mutatja be a ligandumot a γ_c receptor-heterodimernek. Az antigén prezentáció (AP), a T-sejt aktiválásának kezdeti lépése szintén az APC-T-sejt kölcsönhatáson alapul. Felvetődik a kérdés, hogy az AP-nek van-e hatása az IL-15 TP-re, vagy független folyamatok. Raji B-sejt – Jurkat T-sejt modellrendszerünkben az IL-15 TP és AP receptor komplexek kialakulásakor tanulmányoztuk az inter/intracelluláris fehérje kölcsönhatásokat Förster rezonancia energiatranszfer mérésekkel., Ha a Raji-sejteket IL-15-tel előkezeltük, az IL-15R α és IL-2/15R β feldúsulását tapasztaltuk a szinapszisznál és közöttük pozitív FRET-hatékonyságot mértünk, ami közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltat az IL-15 TP-ra. Az IL-15R α és az MHC II komplexként jelenik meg, és együtt transzlokálódik az immunológiai szinapszisba bármelyik ligandum jelenlétében. Az IL-15 TP a Jurkat sejtekben STAT5 foszforilációt váltott ki, amit az AP nem befolyásolt. Eredményeink bizonyítják, hogy modellrendszerünkben az IL-15 TP és az AP önállóan is előfordulhat, és az AP-nak nincs jelentős hatása az IL-15 jelátvitelre a TP során. Így az IL-15 TP autonóm, antigénfüggetlen folyamatnak tekinthető.

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

7. Köszönetnyilvánítás

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00026, NN129371, és ANN135107 pályázatok támogatták a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési És Innovációs Hivatal által.



Nyilvántartási szám: DEENK/231/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kenesei Ádám

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kenesei, Á.**, Volkó, J., Szalóki, N., Mocsár, G., Jambrovics, K., Balajthy, Z., Dóczy-Bodnár, A., Tóth, K. Á., Waldmann, T. A., Vámosi, G.: IL-15 Trans-Presentation Is an Autonomous, Antigen-Independent Process.
J. Immunol. 207 (10), 2489-2500, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2100277>
IF: 5.422 (2020)
2. Volkó, J., **Kenesei, Á.**, Zhang, M., Várnai, P., Mocsár, G., Petrus, M. N., Jambrovics, K., Balajthy, Z., Müller, G., Dóczy-Bodnár, A., Tóth, K., Waldmann, T. A., Vámosi, G.: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2R[alfa] therapies.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116 (42), 21120-21130, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1901382116>
IF: 9.412





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 20,757

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,834**

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

Debrecen, 2022.04.29.

