

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az IL-9R sejtfelszíni elrendeződésének és molekuláris kölcsönhatásainak kvantitatív analízise humán T limfóma sejteken

Nizsalóczki Enikő

Témavezető: Dr. Dóczy-Bodnár Andrea



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	5
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1	A T sejtek rövid ismertetése	6
2.2	γ_c citokinek és receptoraik a T sejtek működésében	7
2.3	Az IL-9 és receptora	13
2.4	Az IL-2 szerepe a γ_c citokinek funkciójának szabályozásában	18
2.5	A sejtmembrán szerveződése	21
2.6	Membránfehérjék térbeli kapcsolatának vizsgálata konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával	23
2.6.1	Korrelációs vizsgálatok	25
2.6.2	Együttes előfordulás (co-occurrence) analízis	27
2.6.3	A kolokalizációs kísérletek interpretációja, kontrollok	28
2.7	Membránfehérjék molekuláris kölcsönhatásának vizsgálata: FRET hatásfok meghatározása	30
2.7.1	Intenzitás arányon alapuló („ratiometric”) FRET (rFRET) módszer	32
2.7.2	Akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET (accpbFRET)	33
2.8	Az IL-2 receptor részvételével kialakuló sejtfelszíni fehérje mintázatok	34
3.	CÉLKITŰZÉSEK	37
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
4.1	Sejttenyésztés és citokin kezelés	38
4.2	Sejtalkotók specifikus jelzése	38
4.3	Fehérje expresszió meghatározása	40
4.4	Membránalkotók páronkénti kolokalizációjának kvantitatív jellemzése	40
4.4.1	Pearson-féle korrelációs analízis	42
4.4.2	Membránalkotók átfedő hányadának meghatározása	43
4.5	FRET vizsgálatok	44
4.5.1	Az arányalapú FRET (ratiometric FRET, rFRET) mérések kivitelezése	45
4.5.2	Akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET (accpbFRET) vizsgálatok	46
4.6	Statisztikai számítások	48
5.	EREDMÉNYEK	49
5.1	Az IL-9R, az IL-2R α és az MHC glikoproteinek sejtfelszíni expressziója	49
5.2	Az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolata	51
5.2.1	Konfokális mikroszkópiás képek vizuális analízise	51
5.2.2	Konfokális mikroszkópiás képek korrelációs analízise	52
5.2.3	Pozitív és negatív kontroll minták	54
5.2.4	Az IL-2R α és az MHC glikoproteinek membrándomén szintű kapcsolata	54
5.2.5	Az IL-9R α és az IL-2R α /MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolata	55
5.3	Az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek molekuláris szintű kölcsönhatása	56
5.4	Az IL-9R és az IL-2R membrándomén szintű kapcsolata: Manders-féle együttes előfordulás (co-occurrence) analízis	59

5.5	A citokin miliő hatása az IL-9R és az IL-2R membrándomén szintű kapcsolatára.....	62
5.6	IL-9 hatása a γ_c , az IL-9R α és az IL-2R α molekuláris kölcsönhatására	66
6.	MEGBESZÉLÉS	69
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	78
8.	SUMMARY	79
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	80
9.1	Hivatkozott közlemények jegyzéke	80
9.2	Saját közlemények	87
10.	TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	89
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	90
12.	FÜGGELÉK.....	91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE (MAGYAR-ANGOL)

accpbFRET	akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET	acceptor photobleaching FRET
AICD	aktiváció indukálta sejthalál	activation induced cell death
CLSM	konfokális lézer pásztázó mikroszkópia	confocal laser scanning microscopy
CTX	kolera toxin B alegység	cholera toxin B subunit
DC	dendritikus sejt	dendritic cell
FOXP3	forkhead box P3 fehérje	forkhead box P3 protein
FRET	Förster-féle rezonancia energiatranszfer	Förster-type resonance energy transfer
γ_c	közös γ lánc	common γ chain
GM1	GM1 gangliozid	GM1 ganglioside
HC	nehézlánc	heavy chain
HTLV-1	humán T sejtes leukémia 1-es vírus	human T-cell leukaemia virus type 1
ILC	veleszületett limfoid sejt	innate lymphoid cell
IL	interleukin	interleukin
IL-R	interleukin receptor	interleukin receptor
Jak	Janus arcú kináz	Janus kinase
mAb	monoklonális antitest	monoclonal antibody
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz	mitogen-activated protein kinase
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex	major histocompatibility complex
M β CD	metil- β -ciklodextrin	methyl-beta-cyclodextrin
NK sejt	természetes ölősejt	natural killer cell
PBS	poszfát pufferolt sóoldat	phosphate buffered saline
PI-3K	foszfinozitol-3-kináz	phosphoinositide-3-kinase
PTP	fehérje tirozin foszfatáz	protein tyrosine phosphatase
PIAS	aktivált STAT fehérje inhibitora	protein inhibitor of activated STAT
SOCS	citokin jelátvitelt elnyomó fehérje	suppressor of cytokine signaling
STAT	jelátvitelt és transzkripciót aktiváló fehérje	signal transducer and activator of transcription
TCR	T sejt receptor	T cell receptor
Tc	citotoxikus T sejt	cytotoxic T cell
Tfh	follikuláris segítő T sejt	follicular helper T cell
TGF	transzformáló növekedési faktor	transforming growth factor
Th	segítő T sejt	helper T cell
TNF	tumor nekrosis faktor	tumor necrosis factor

Treg	szabályozó T sejt	regulatory T cell
TrfR	transzferrin receptor	transferrin receptor
β 2m	β 2-mikroglobulin	β 2-microglobulin

1. BEVEZETÉS

A membránfehérjék szerveződésének és kölcsönhatásainak ismerete alapvető funkciójuk megértéséhez. Többségük nem önállóan, hanem más fehérjékkel kialakított együttműködés révén fejt ki biológiai hatását, amelyet a különböző mérettartományokban kialakított, nagyon gyakran dinamikusan változó fehérjetársulások tesznek lehetővé. Erre a legalapvetőbb példát a több alegységből álló fehérjék szolgáltatják, de különböző fehérjék funkcionális együttműködésére is számtalan példa adódik. Sok esetben megfigyelhető funkcionálisan látszólag nem kapcsolódó fehérjék közös klaszterekben/membránrégiókban történő feldúsulása is; az így feltárt kapcsolat a későbbi vizsgálatok tükrében akár funkcionális relevanciát is nyerhet.

A T sejtekre pleiotróp hatással bíró interleukin (IL)-9 receptora (IL-9R) a specifikus α alegységből és a más receptorok felépítésében is részt vevő, γ_c láncból áll. Az IL-9 feltételezhető szerepet játszik a T sejt tumorok kialakulásában, melyhez a T limfóma sejtekre gyakorolt direkt hatása mellett, közvetve, a tumor mikrokörnyezetén keresztül is hozzájárulhat. Intézetünkben korábban jelentős hasonlóságot tártak fel a két heterotrimer felépítésű γ_c receptor, az IL-2R és IL-15R molekuláris környezetét illetően humán T sejteken. Felmerül a kérdés, hogy a heterodimer γ_c receptorok, így az IL-9R, szerveződése hasonló elveket követ-e.

A membránfehérjék elrendeződésének, illetve térbeli kapcsolatának intakt/kvázi intakt sejteken történő feltárására számos biofizikai módszer áll rendelkezésre. A ma már széles körben elérhető konfokális mikroszkópia a néhány 100 nm-es skálán szolgáltat információt. A Förster-féle rezonancia energia transzfer (FRET) módszerrel pedig a fehérjék közvetlen fizikai közelsége, molekuláris kölcsönhatásai (nanométeres szint) vizsgálhatók.

Munkám során az IL-9R összeszerelődését és sejtfelszíni szerveződését tanulmányoztam humán T limfóma sejteken, különös tekintettel az IL-9R és a γ_c citokinek között központi szereppel bíró IL-2R kapcsolatára, konfokális mikroszkópiás kolokalizáció és FRET mérések kombinálásával. Kolokalizációs adataink validálására adaptáltuk Costes korábban csak intracelluláris sejtalkotók vizsgálata során alkalmazott konfidencia intervallum módszerét, amely lehetőséget ad a véletlen által generált kolokalizációs kapcsolatok kiszűrésére. Eredményeink hozzájárulhatnak az IL-9/IL-9R rendszer működési mechanizmusának pontosabb megértéséhez, amelynek a későbbiekben az IL-9-nek a T sejtek onkogenezisében feltételezhető szerepe révén, terápiás jelentősége is lehet.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A T sejtek rövid ismertetése

A fehérvérsejtek közé tartozó T limfociták progenitor sejtjei a csontvelői hemopoetikus őssejtekből alakulnak ki. A progenitor sejtek a csecsemőmirigybe vándorolnak, amelyet különböző pozitív és negatív szelekciós lépéseket követően, érett, immunkompetens T sejtekként hagynak el. A perifériás szövetekbe kikerült T sejtek döntő többsége az adaptív immunválasz kialakításában, illetve szabályozásában tölt be kulcsszerepet. Ezen konvencionális T sejtek specifikus antigénreger hatására aktiválódnak. Az antigén felismeréséért a T sejt felszínén kifejeződő T sejt receptor komplex (TCR) felelős, amely egy központi $\alpha\beta$ heterodimerből, valamint az ahhoz kapcsolódó, adapter fehérjéből áll (amelyeket itt nem részletezek) (Erdei et al., 2006; Parham, 2009).

Az adaptív immunitásban betöltött szerepük alapján a konvencionális T sejtek az alábbi fő csoportokba sorolhatók: (A) A segítő vagy helper T sejtek (Th) az általuk termelt szolubilis faktorok, ún. citokinek, révén immunsejtek funkcióját és homeosztázisát szabályozzák. A Th sejtek differenciálódása révén további altípusok alakulnak ki (pl. Th1, Th2, Th9, Th17, stb.), amelyek eltérő citokin expressziós mintázatuk révén hangolják az immunválaszt. (B) A citotoxikus T sejtek (Tc) az immunrendszer által „targetként” kijelölt sejtek, így vírusfertőzött és tumorsejtek, elpusztítására szakosodtak. A Tc sejtek szintén termelnek citokineket, amelyek más sejtek effektor funkcióját szabályozzák. (C) A szabályozó T sejtek (Treg) az immunológiai tolerancia kialakításában játszanak szerepet, így az immunválasz leállítását, valamint az autoreaktív T sejtek elnyomását a fő funkciójuk. (D) A memória T sejtek hosszú élettartamú sejtek, amelyekből az adott antigénnel való ismételt találkozást követően gyors osztódással effektor Th vagy Tc sejtek alakulnak ki, ezáltal gyors és hatékony immunválaszt váltanak ki. Több altípusuk létezik, így centrális, effektor, szöveti és virtuális memóriasejtek (Gutcher et al., 2007).

A T sejteket az antigénfelismerés folyamata során koreceptorként funkcionáló CD4 és CD8 glikoproteinek sejt felszíni expressziója alapján 2 fő csoportba sorolhatjuk. A Th és Treg sejtek a CD4, a Tc sejtek pedig a CD8 fehérjét fejezik ki. A memória T sejtek között mind CD4⁺, mind pedig CD8⁺ alpopulációk megtalálhatók. Az értekezésemben vizsgált sejtek a CD4⁺ kategóriába tartoznak.

A T sejtek aktiválódásához szükséges specifikus antigénfelismerés sejt-sejt kontaktus kialakulását igényli: a TCR komplex az antigén peptid fragmentumát egy másik sejten kifejeződő fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) fehérjével alkotott komplex formájában ismeri fel. A Tc sejtek esetén az I. osztályú, míg a Th és Treg sejtek esetén a II. osztályú MHC fehérjék vesznek részt az antigén prezentáció folyamatában. Míg az MHC II molekula fiziológiás körülmények között az ún. professzionális antigénprezentáló sejteken (pl. B limfocita, dendritikus sejt, stb.) expresszálódik, addig az MHC I minden magvas sejt felszínén megtalálható.

Megjegyzendő, hogy a T sejtek funkciója nem korlátozódik az adaptív immunitásra. Egyéb T sejtípusok is ismertek, amelyekre gyors, az MHC jelenlététől független aktiválódás jellemző. Az általuk közvetített immunválasz mind a természetes, mind pedig az adaptív immunitásra jellemző jegeket hordoz, tulajdonképpen egyfajta hidat képez a kétfajta immunitás között. Itt a $\gamma\delta$ T sejteket szeretném kiemelni, amelyek nevüket arról kapták, hogy a T sejtípusok többségétől eltérően a TCR központi heterodimer elemét egy γ és egy δ lánc alkotja. Két fő alpopulációjukat különböztethetjük meg, az IFN γ termelő T $\gamma\delta$ 1 és az IL-17A termelő T $\gamma\delta$ 17 sejteket, de emellett számos egyéb citokint termelnek, így pl. IL-9-et is. A $\gamma\delta$ T sejtek legnagyobb mennyiségben a bél nyálkahártyájában találhatók, emberben az intraepitélialis limfociták kb. 10%-át teszik ki, emellett más, barrier funkciót ellátó szövetben is megtalálhatók. Ezeken a helyeken a $\gamma\delta$ T sejtek a szekretált citokinek révén gyors effektor választ tesznek lehetővé. A keringő limfociták esetén azok kb. 1%-át teszik ki, ugyanakkor számuk mikrobiális fertőzések, gyulladás, tumoros elváltozás, stb. esetén jelentősen megnövekszik (Angkasekwinai et al., 2021; Vantourout et al., 2013).

2.2 γ_c citokinek és receptoraik a T sejtek működésében

A citokinek a sejtek közötti kommunikációban alapvető szerepet játszó kisméretű fehérjék (5-20 kDa), amelyek a célsejt felszínén kifejeződő receptorhoz kötődve fejtik ki hatásukat parakrin, esetenként autokrin módon.

Az immunrendszer szabályozásában ható citokinek egyik fő csoportja a γ_c citokincsalád, amely az IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 és IL-21 citokineket foglalja magába, és a közösen használt γ_c receptor alegységről kapta nevét. A γ_c lánc kifejeződése a legtöbb limfoid eredetű sejten, így a T sejteken is megfigyelhető. Ennek következtében a családba

tartozó citokinek meghatározó jelentőségűek ezen sejttípusok fejlődésében, homeosztázisuk, aktivációs és differenciálódási folyamataik szabályozásában, ezáltal az adaptív immunrendszer összehangolt működésének kialakításában (Waickman et al., 2016). Megjegyzendő, hogy a citokincsalád bizonyos tagjai más immun- és nem immunsejt típusok életében és működésében is szerepet játszanak.

Miután az értekezést megalapozó vizsgálatainkat T sejteken végeztük, a továbbiakban a γ_c citokinek – elsősorban humán – T sejtekre gyakorolt hatásaira koncentrálok. A humán T sejtekre gyakorolt főbb hatásokat az I. táblázat foglalja össze (Spolski et al., 2017).

Mint látható, a γ_c citokinek a korai fejlődéstől kezdve az effektor sejtek funkciójának szabályozásáig számos szinten nélkülözhetetlenek a normál T sejt működés kialakításában és fenntartásában. Mindegyik γ_c citokin pleiotróp hatással bír. Emellett a család tagjai a közös lánc és a közös jelátviteli molekulák használatából eredően (lásd később) biológiai hatások tekintetében bizonyos fokú redundanciát mutatnak. Az átfedő funkciók mellett egyedi, gyakran ellentétes funkciókat képesek ellátni akár ugyanazon sejttípus esetén. Hibás működésük, amely alapulhat mind a citokinek, mind pedig az egyes receptorláncokat, illetve a kapcsolódó jelátviteli elemeket kódoló gének mutációján/polimorfizmusán, számos, az immunrendszert érintő működési zavar, immundeficiencia vagy rosszindulatú elváltozás alapját képezheti (Goh et al., 2017). Így pl. a γ_c láncot kódoló Xq13.1 kromoszóma lókuszt mutációja az X-kromoszómához kapcsolódó súlyos kombinált immundefektus (X-SCID) különböző formáinak kialakulásához vezethet (Noguchi et al., 1993). Az – egyebek mellett – drámaian alacsony T sejt számmal jellemezhető immundeficienciát a γ_c citokineknek (IL-7 és IL-15) a korai T sejt fejlődésben betöltött szerepe alapozza meg, amely a későbbiekben más immunsejt funkciókra is hatással van (Noguchi et al., 1993; Sugamura et al., 1996).

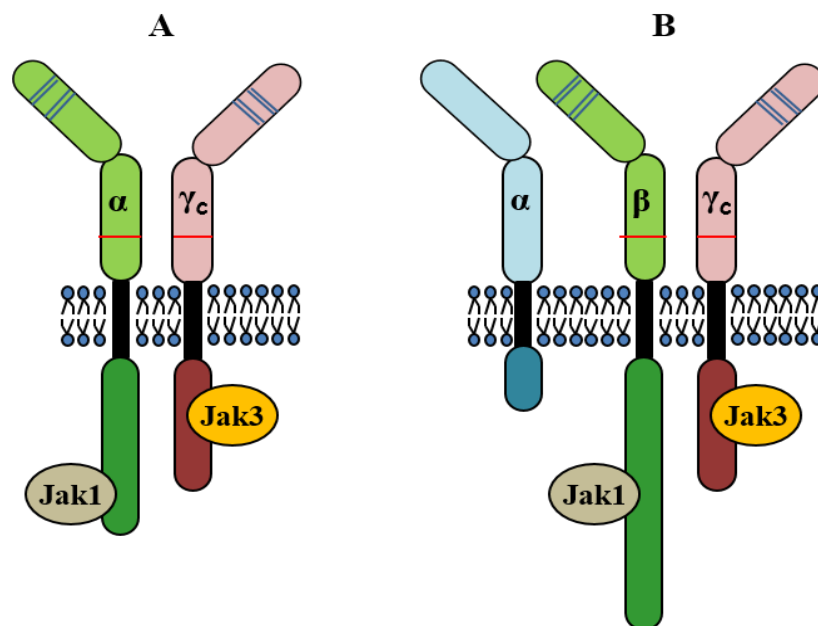
A γ_c citokinek hatásának erősítése, gátlása vagy más módon történő befolyásolása pedig terápiás potenciállal bír számos betegség kezelésében (Lu et al., 2012; Rivera Vargas et al., 2017; Rosenberg, 2014).

I. TÁBLÁZAT: A γ_c CITOKINEK HUMÁN T SEJTEKRE GYAKOROLT FŐBB HATÁSAI ÉS EGYÉB CÉLSEJTJEI

Citokin	Termelő sejt	T sejtekre gyakorolt legfontosabb hatásai	Egyéb célsejtek
IL-2	aktivált $CD4^+$ T limfociták, $CD8^+$ T sejtek, NKT sejtek, aktivált dendritikus sejtek, hízósejtek	• T sejt aktiváció és proliferáció serkentése • Th1, Th2 és Th9 irányú differenciáció serkentése • Th17 és Tfh differenciáció gátlása • Treg differenciáció és proliferáció serkentése • aktiváció indukálta sejthalál (AICD) serkentése	B sejtek, NK sejtek
IL-4	aktivált Th2 sejtek NKT sejtek bazofil sejtek hízósejtek ILC2 sejtek	• Th2 sejtek érésének és proliferációjának elősegítése • Th2 és Th9 differenciáció szabályozása	B sejtek, NK sejtek, bazofilek, hízósejtek, endotél sejtek
IL-7	strómasejtek epitél sejtek fibroblasztok	• T sejtek tímuszban történő fejlődésének szabályozása • naiv és memória T sejtek proliferációjának és túlélésének támogatása • T sejt homeosztázis és érés ($\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$) szabályozása	dendritikus sejtek
IL-9	Th9, Th2, Th17 hízósejtek, eozinofilek, Treg, $CD8^+$ T sejtek, NKT sejtek ILC2	• T sejt növekedési faktor • Th17 és Treg sejtek növekedésének/funkciójának szabályozása	B sejtek, hízósejtek, eozinofilek, myeloeritroid progenitorok, foetális timociták, myeloid őssejtek
IL-15	monociták, makrofágok, sztróma sejtek, dendritikus sejtek epitél sejtek	• T sejtek proliferációjának serkentése • $CD8^+$ memória T sejtek fejlődésének támogatása • Az IL-2 által kiváltott AICD gátlása • NKT sejtek homeosztázisának szabályozása	NK sejtek, aktivált B sejtek, monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, eozinofilek, neutrofilek, hízósejtek
IL-21	Tfh, Th2, Th17 NKT sejtek Th17 sejtek	• Tfh és Th17 sejtek differenciáció serkentése • Th9 sejtek differenciációjának gátlása • $CD8^+$ T sejtek citotoxicitásának erősítése	B sejtek, NK sejtek, dendritikus sejtek

(Liao et al., 2011a; Paul, 2013; Perera et al., 2012; Pilipow et al., 2015; Spolski et al., 2017; Ying He, 2020)

Az X-kromoszóma Xq13.1 lókuszában elhelyezkedő *IL-2GR* gén által kódolt γ_c lánc az I. típusú vagy hemopoietikus citokinreceptorok közé tartozik, amelyek extracelluláris doménje egy konzervált membránközeli WSXWS aminosav motívumot tartalmaz. Szerkezetüket tekintve a γ_c citokinek a négy α -hélixet tartalmazó citokinek (4 α -hélix bundle citokines) ún. rövidláncú, azaz egyenként kb. 15 aminosavat tartalmazó α -hélixekből felépülő alcsoportjába tartoznak (Paul, 2013). A γ_c lánc nem rendelkezik saját enzimatis aktivitással, ugyanakkor intracelluláris részén keresztül kölcsönhat a Janus arcú kinázok (Jak) családjába tartozó Jak3 citoszolikus tirozin kinázzal. A γ_c lánc citokinkötő affinitása önmagában elhanyagolható. A citokin megfelelő affinitással történő megkötésére és a hatékony jelátvitelre képes funkcionális receptorkomplexek kialakításához a γ_c lánc mellett további receptoralegységek közreműködésére van szükség. Az adott receptor komplex felépítésében részt vevő alegységek számától függően a γ_c citokinek receptorai két csoportra oszthatók (1. ábra):



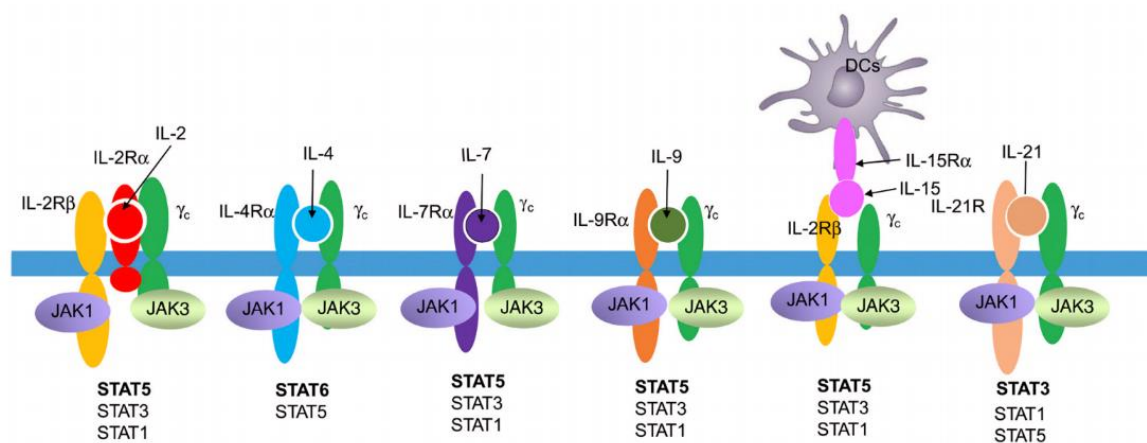
1. ÁBRA: A γ_c CITOKINRECEPTOROK ÁLTALÁNOS FELÉPÍTÉSE

A heterodimer komplexek felépítésében (A) a citokinspecifikus α és a γ_c alegység vesz részt. A heterotrimer receptorok (B) két közösen használt alegységből (γ_c és β), valamint a ligandum specifikus α láncból épülnek fel. Az ábrán piros és kék vonalak a hemopoetikus receptorcsaládra jellemző Trp-Ser-X-Trp-Ser aminosav motívumot, valamint a 4 konzervált extracelluláris ciszteint jelölik.

- A) *Két alegységből álló receptorkomplexek:* Az IL-4, IL-7, IL-9 és IL-21 biológiai hatásukat *heterodimer* receptorkomplexein keresztül fejtik ki, mely a γ_c alegység mellett a citokin specifikus kötődését biztosító α alegységből áll. A γ_c alegységhez hasonlóan a citokin specifikus α láncok szintén az I. típusú citokinreceptorok csoportjába tartoznak, ugyanakkor expressziójuk kevésbé általános: az adott citokintől függően csak bizonyos T sejt altípus(ok)on fejeződnek ki (I. táblázat). A γ_c lánchoz hasonlóan az α alegységek sem rendelkeznek saját enzimatis aktivitással: a jel továbbításában a hozzájuk kapcsolódó citoszolikus tirozin kinázok (pl. Jak1) aktiválódásán keresztül vesznek részt.
- B) *Három alegységből álló receptorkomplexek:* Az IL-2 és IL-15 esetében a receptorkomplex felépítésében a γ_c lánc mellett a mindkét receptorfajta által használt IL-2/15R β alegység, valamint a citokin-specifikus α lánc vesz részt. A β alegység a heterodimer receptorok α alegységével homológ szerkezetű és – azokhoz hasonlóan – intracelluláris tirozin kináz (Jak1) kapcsolódik hozzájuk. A citokin specifikus α lánc (IL-2R α és IL-15R α) – a másik két alegységtől eltérően – nem a hemopoietikus receptorok közé tartozik. Ezen alegységek rövidebb intracelluláris doménnel rendelkeznek (Waickman et al., 2016), mint az IL-2/15R β , illetve a heterodimer receptorok α -alegysége és nem kapcsolódik hozzájuk enzimaktivitással bíró citoszolikus fehérje (Bodnar et al., 2008; Waickman et al., 2016). Így – legalábbis T sejteken – nem vesznek részt a citokinek kötődése által kiváltott jel továbbításában. A három alegység mind az IL-2, mind pedig az IL-15 receptor esetén különböző összetételű és affinitású receptor komplexeket hozhat létre, ugyanakkor hatékony jelátvitel csak a magas affinitású heterotrimer (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ vagy IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$, $K_d \sim 10^{-11}M$), illetve a közepes affinitású heterodimer (IL-2/15R $\beta\gamma_c$, $K_d \sim 10^{-9}M$) receptorkomplexek esetén valósulhat meg. Az IL-2R α és az IL-15R α alegységek ligandumkötő affinitása között mintegy 1000-szeres különbség tapasztalható ($K_d \sim 10^{-11} M$, illetve $K_d \sim 10^{-8}M$), amely a heterotrimer receptorkomplex kialakulásának módját is meghatározza. Az IL-15R esetén a citokint magas affinitással kötő heterotrimer cisz és transz módon is kialakulhat: előbbi esetben mindhárom alegység ugyanazon a sejten fejeződik ki, míg a transz-jelátvitel esetén az IL-15-öt magas affinitással kötő IL-15R α egy másik (pl. dendritikus) sejten kifejeződve prezentálja a ligandumot a T sejten kifejeződő $\beta\gamma_c$ heterodimernek (Mortier et al., 2009). Számos adat utal arra, hogy az IL-15 esetén a transz-

prezentációs mechanizmus dominál (Dubois et al., 2002; Schluns et al., 2005). Ezzel szemben az IL-2-t három nagyságrenddel kisebb affinitással kötő IL-2R α az ugyanazon a T (vagy NK) sejten kifejeződő IL-2/15R β és γ_c alegységekkel alkot komplexet (cisz-prezentáció). Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy az IL-2 esetén is vannak a transz-prezentációs mechanizmus létezésére utaló adatok (Wuest et al., 2011).

A γ_c citokinek által kiváltott jelátviteli folyamatok feltétele heterodimer komplexek esetén a citokin specifikus α lánc és a γ_c alegység, míg a három alegységből álló receptorok esetén az IL-2/15R β alegység és a γ_c lánc heterodimerizációja, ezen belül is a receptorláncok intracelluláris doménjeinek megfelelő távolságba és konformációba történő kerülése. Ennek révén megtörténhet a receptor-asszociált Jak1 és Jak3 citoszolikus protein tirozin kinázok aktivációja (transz-foszforilációja), majd a receptorláncok tirozin foszforilációja (Waickman et al., 2016) (2. ábra).



2. ÁBRA: A γ_c CITOKINCSALÁD TAGJAI ÁLTAL AKTIVÁLT STAT FEHÉRJÉK

Az ábra az egyes γ_c citokinreceptorok felépítését, valamint a citokinek kötődése által aktivált STAT fehérjéket mutatja. Az IL-15 esetén a domináns transz-prezentációs mechanizmus került feltüntetésre (Spolski et al., 2017).

A receptorláncok tirozin foszforilációja további, SH2 doménnel rendelkező fehérjék számára biztosít kötőhelyet, így a STAT transzkripciós faktorok, az inzulin receptor szubsztrát-1 fehérje, illetve a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonal adapter fehérjei számára. Ezen fehérjéken keresztül a citokinek kötődése három fő jelátviteli kaszkád aktiválásához vezet: a Jak/STAT, a Ras/MAPK és a PI-3K/Akt útvonalak (Goh et al., 2017; Johnston et al., 1995; Lin et al., 1995). A Jak/STAT útvonal jelentősége mindegyik

citokin esetén kiemelendő, a további jelátviteli útvonalak eltérő fontosságúak a család különböző tagjai esetén. A STAT transzkripciós faktorok SH2 doménjükön keresztül kapcsolódnak a receptor alegységek foszfortirozin oldalláncaihoz, amelyet a STAT fehérjék tirozin foszforilációja (aktiválódása), dimerizációja és magi transzlokációja követ. Az aktivált STAT transzkripciós faktorok fajtája a citokin típusától függ (2. ábra).

A közös receptor alegység és az ennek következtében közösen használt jelátviteli apparátus magyarázattal szolgálhat az egyes citokinek egymással átfedő funkcióira (I. táblázat). Az egyedi hatásokat a receptorláncok T sejtek állapotától/típusától függő eltérő expressziós mintázata, a más membránfehérjékkel kialakított (molekuláris) kölcsönhatásai, valamint a jelátvitel során aktivált különböző STAT fehérjék biztosíthatják (Leonard et al., 2019; Lin et al., 2018).

2.3 Az IL-9 és receptora

Az IL-9 citokint elsőként Th sejt növekedési faktorként azonosították egerekben, potenciális onkogén aktivitással (Renauld et al., 1995b; Rivera Vargas et al., 2017). Ennek ellenére a kutatások fókuszában hosszú ideig az allergiás immunválaszban betöltött szerepe állt, amelyet a hízósejtekre kifejtett pleiotróp hatása alapozott meg. Az utóbbi években került újra előtérbe a T sejtes onkogenezis, s azon belül a limfómagenezis elősegítésében játszott szerepe (Lv et al., 2013), amelyet egér modellrendszeren, illetve humán biopsziákon egyaránt bizonyítottak.

A humán IL-9-et kódoló gén az 5-ös kromoszómán helyezkedik el, az ún. Th2 citokin klaszterben belül. Ennek megfelelően sokáig a Th2 sejteket tartották az IL-9 elsődleges forrásának és elsősorban ezen citokinek által szabályozott folyamatokban vizsgálták szerepét (lásd a hízósejtekre gyakorolt hatás). Később újabb IL-9 termelő T sejt típusokat azonosítottak: így a Th9, Th17, Treg, valamint egyes T limfóma sejteket (Veldhoen et al., 2008). A T sejteken kívül az NKT sejtek, hízósejtek, illetve veleszületett limfoid sejtek (ILC2) is képesek az IL-9 termelésére (Goswami et al., 2011; Rojas-Zuleta et al., 2017; Turner et al., 2013; Wilhelm et al., 2011). A hízósejteken és T sejteken kívül antigénprezentáló sejtek esetén is bizonyították az IL-9 szabályozó szerepét (II. táblázat) (Chakraborty et al., 2019; Lv et al., 2013; Neurath et al., 2016; Noelle et al., 2010).

Mint láthattuk, az IL-9R a heterodimer γ_c citokinreceptorok közé tartozik (1. és 2. ábra). A humán esetben 521 aminosavból álló IL-9R α lánc felelős az IL-9 magas affinitású

($K_d \sim 100$ pM), specifikus kötéseért (Renauld, 1995). Az IL-9R α a hemopoetikus receptorcsaládra jellemző módon az extracelluláris részen hordozza a jellegzetes WSXWS motívumot a transzmembrán régió közelében, valamint a 4 konzervált ciszteint. Az intracelluláris domén membránközeli részén található a prolinban gazdag BOX1 motívum, amely elengedhetetlen az IL-9 által kiváltott sejtproliferációhoz, valamint a Jak1 tirozin foszforilációjához (Goswami et al., 2011; Zhu et al., 1997). A γ_c lánctól eltérően, amely jellemzően a sejtmembránban helyezkedik el, az IL-9R α alegység a membrán-asszociált forma mellett szolubilis formában is előfordulhat (Renauld et al., 1992).

II. TÁBLÁZAT: AZ IL-9 LEGFONTOSABB CÉLSEJTJEI ÉS A CÉLSEJTEKRE KIFEJTETT HATÁSAI

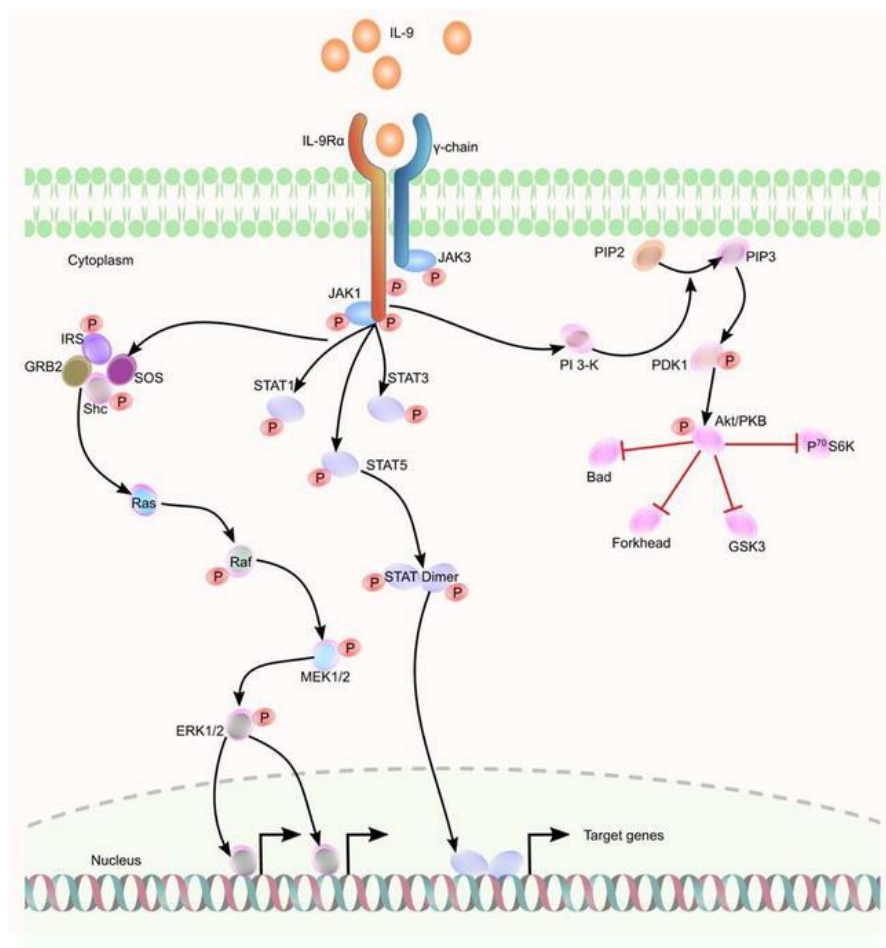
CÉLSEJT	Célsejtre gyakorolt hatás
Hízósejtek	• proliferáció serkentése • IL-1β-, IL-5-, IL-6-, IL-9-, IL-10-, IL-13-és TGFβ- termelés serkentése (Renauld et al., 1990; Wiener et al., 2004)
Treg sejtek	• túlélés és érés serkentése (Elyaman et al., 2009; Feng et al., 2011)
Th17 sejtek	• proliferáció elősegítése (in vitro), autokrin hatás (Elyaman et al., 2009; Purwar et al., 2012)
APC	• TGFβ termelés serkentése • T_H1 típusú immunválasz kontrollálása (Noelle et al., 2010)
Eozinofilek	• túlélés és differenciáció serkentése (Gounni et al., 2000)
Őssejtek	• fokozza a kolóniaképződést a köldökzsínórvéri és a csontvelői prekurzorok esetén (Donahue et al., 1990; D. E. Williams et al., 1990)
Progenitor sejtek	• a humán IL-9 a megakariocita progenitor sejtek aktivátoraként is működik (Fujiki et al., 2002)

Ahogy ezt korábban láthattuk, a heterodimer receptorkomplexek, így az IL-9R esetén is, a citokin kötődése által kiváltott jel átviteléhez az α alegység és a γ_c lánc intracelluláris részeinek megfelelő közelségbe kell kerülniük (Bauer et al., 1998; Demoulin et al., 1998a; Knoops et al., 2004). Ez egyrészt megvalósulhat úgy, hogy a két különálló lánc citokinkötés hatására közel kerül egymáshoz. Másik lehetséges mechanizmus az, hogy az eleve egymás közelségében lévő alegységek (preformált receptor komplex) konformációja változik meg

oly módon, ami a jelátviteli folyamatok első lépéseit lehetővé teszi. Korábbi immunofluoreszcenciás co-patching vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy az IL-9R α alegységek ~25%-a a γ_c -vel közös doménekben dúsul fel IL-9 hiányában is, de az IL-9 kötődése a heterodimer receptorkomplexek számát megnöveli (Malka et al., 2008).

Az IL-9R α naiv T sejteken nem fejeződik ki, expressziója elsősorban aktivált Th sejteken, különböző effektor T sejtípusokon (pl. Th2, Th17), valamint a Treg sejteken figyelhető meg (Goswami, et al., 2011). Fontos megemlíteni, hogy ezeken a sejteken a magas affinitású, heterotrimer IL-2R is kifejeződik, így az IL-2 fontos szabályozó szerepet tölt be (Liao et al., 2011a).

A γ_c citokinek által kiváltott legjellemzőbb jelátviteli útvonal a Jak/STAT kaszkád. Az IL-9 esetén ez a kaszkád a STAT1, STAT3 és STAT5 transzkripciós faktorok aktiválódását (tirozin foszforilációját) foglalja magában (3. ábra).



3. ÁBRA: AZ IL-9/IL-9R RENDSZER ÁLTAL AKTIVÁLT JELÁTVITELI ÚTVONALAK

Az IL-9 kötődését a Jak kinázok, majd következményesen a receptorláncok tirozin foszforilációja követi. Ez utóbbi kapcsolódási helyet biztosít az SH2 doménnel rendelkező STAT fehérjék számára. A Jak/STAT útvonal mellett az IL-9 kötődése a PI-3K és a MAPK jelátviteli útvonalakat is aktiválhatja (A. U. K. Bintha et al., 2021).

Az aktivált STAT transzkripciós faktorok dimerizálódása és magi transzlokációja az IL-9 hatásának fő közvetítője (Demoulin et al., 2003; Demoulin et al., 1998b; Demoulin et al., 2000; Demoulin et al., 1996; Demoulin et al., 1999). A STAT1, STAT3 és STAT5 homodimerek mellett STAT1/STAT3 heterodimerek kialakulása is megfigyelhető (Bauer et al., 1998). A STAT transzkripciós faktorok kapcsolódásáért az IL-9R α láncon, a 367-es pozícióban található foszfortirozin motívum a felelős, ugyanakkor aktiválódásuk további, a 367-es pozícióhoz közeli, de a transzkripciós faktor típusától függő aminosav(ak) közreműködését igényli (STAT1: glutamin-370, prolin-370; STAT3: glutamin-370, STAT5: leucin-368) (Chakraborty et al., 2019).

A citokincsalád többi tagjához hasonlóan a JAK/STAT útvonal mellett az IRS-1/PI-3K (főként hematopoietikus sejtekre jellemzően) (Demoulin et al., 2003; Demoulin et al., 1996; Renauld et al., 1995a) és bizonyos esetekben (pl. limfoid eredetű sejt vonalak) az Erk/MAPK jelátviteli útvonalak stimulációját is megfigyelték (Renauld et al., 1995a).

A citokinek, így az IL-9 jelátvitel is, többszintű, szigorú szabályozás alatt áll, melyben kiemelt szerepe van a különféle gátló mechanizmusoknak. Ennek egyik módja a negatív regulátor fehérjék, így a SOCS (citokin jelátvitelt elnyomó) fehérjék, a PIAS (aktivált STAT fehérje inhibitora) fehérje, illetve az SH2 domént tartalmazó fehérje tirozin foszfatázok (SH2-PTP2) közreműködése. (i) A SOCS fehérjék kifejeződése tranziens, a citokin hatására történik. Ezen fehérjék a foszforilált Jak-hoz kötődve gátolják a STAT aktivációt. Az IL-9 három különböző SOCS fehérje expresszióját indukálja, melyek közül a SOCS-3 gátolja a leghatékonyabban a jelátvitelt. (ii) A konstitutívan kifejeződő PIAS fehérjék a sejtmagba bejutott STAT dimerekhez kötődnek és ezáltal gátolják a STAT specifikus DNS szekvenciákhoz történő kapcsolódását, illetve egyéb molekuláris kölcsönhatásait. (iii) A tirozin foszfatázok a receptorláncok defoszforilációján keresztül fejtik ki negatív szabályozó hatásukat, ugyanakkor az IL-9 jelátvitelében szerepük nem kritikus, aktivitásuk gátlása nem befolyásolja az IL-9R α foszforilációjának mértékét (Chakraborty et al., 2019; Erdei et al., 2006).

A másik negatív szabályozási lehetőség a sejt felszíni receptorok downregulációja endocitózis révén, mely az IL-9 stimulációt követően csökkenti a sejt felszínen elérhető IL-9R-ok számát, így az IL-9 megkötésének esélyét. Ebben a folyamatban – legalábbis részben – az ubiquitin-proteasóma rendszer játszik szerepet (Yen et al., 2000).

Az utóbbi évek vizsgálatai számos bizonyítékot szolgáltatottak az IL-9 feltételezhető szerepére a hematológiai tumorok kialakulásában, különös tekintettel a különféle limfómák

kialakulására (Wan et al., 2020) (Lv et al., 2013). Az IL-9 hatása érvényesülhet közvetlenül a limfóma sejteken, ugyanakkor a limfómák kialakulását szabályozó tényezők, így pl. a Treg sejt funkció, illetve a tumor mikrokörnyezet befolyásolásán keresztül is, de a pontos mechanizmus még nem tisztázott.

Betegek szövettani eredményei feltárták az IL-9 expresszió és több, limfocita eredetű daganatos betegség, így a Hodgkin limfóma, NK/T limfóma, krónikus limfocitás leukémia (CLL), illetve az anaplasztikus nagysejtes limfóma (ALCL) kialakulása közötti kapcsolatot (Bittner et al., 2000; Chen et al., 2014; Merz et al., 1991).

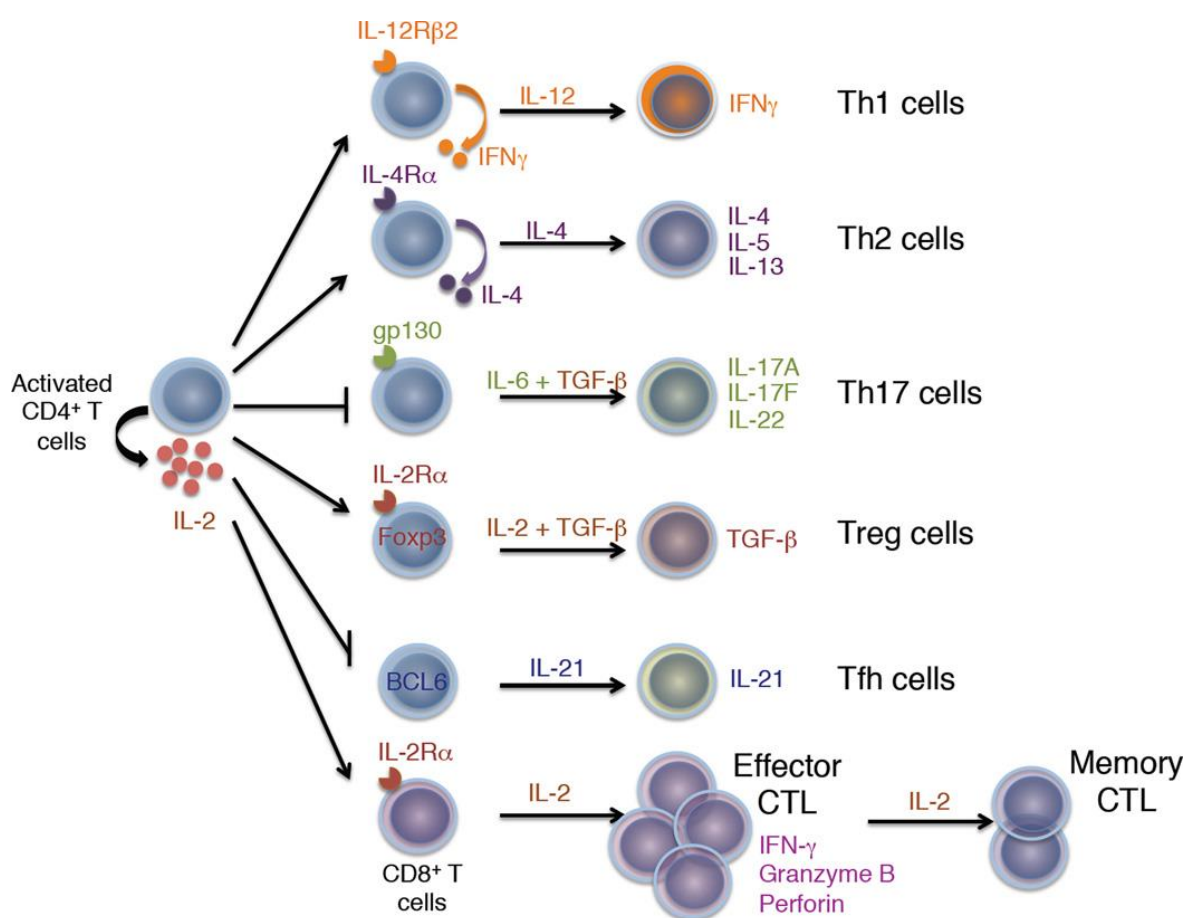
Ezt a kapcsolatot *in vitro* egér modellrendszeren is kimutatták (Renauld et al., 1994; Vink et al., 1993). *In vitro* kísérletek alapján az IL-9 részt vesz a limfóma sejtek proliferációjának és apoptózisának szabályozásában (Gruss et al., 1992; Li et al., 2015; Nagato et al., 2005; Qiu et al., 2006; Renauld et al., 1994; Renauld et al., 1995b; Vink et al., 1993).

Ezen hatások hátterében a JAK/STAT jelátviteli útvonal aktiválása mellett az apoptózis és a sejtciklus szabályozásában kritikus fehérjékre (pl. Bcl-2, ciklin D1, p21, stb.) gyakorolt hatása állhat (Lemoli et al., 1997; Lv et al., 2013; Shang et al., 2008).

A T sejtekre gyakorolt hatása mellett az IL-9 a krónikus gyulladásos folyamatok támogatásával a tumor mikrokörnyezet fenntartását is elősegíti. Közvetítő szerepet tölt be a tumor sejtek és a tumor mikrokörnyezetében levő, gyulladást előidéző tumor infiltráló sejtpopulációk között (hízósejtek, Treg sejtek, makrofágok és eozinofil sejtek) (Lu et al., 2012; Wan et al., 2020; Ying He, 2020). A tumorelles immunválasz kialakulását gátló szuppresszor egér Foxp3⁺ Treg sejteknek tumor növekedést serkentő és metasztázis-képző hatása van *in vitro*. Az IL-9 egyike a Treg sejtek által termelt, szupresszív hatású citokineknek, melyek akadályozzák a T sejtek proliferációját, emellett autokrin módon a Treg sejtek immunszupresszív hatását is fokozzák. Az IL-9 antiapoptotikus hatása az egér Treg sejtek túlélését segíti *in vitro*. Az IL-9 jelátvitel gátlása serkenteti az effektor T sejtek proliferációját, valamint megnöveli az általuk termelt, a tumorelles immunválaszban szerepet játszó citokinek (IL-2, IL-17, TNF- α) koncentrációját *in vitro*. Rekombináns IL-9 alkalmazását követően megfigyelhető a Treg sejtek szupresszív hatásának növekedése és az effektor citokinek termelődésének gátlása (Lu et al., 2012).

2.4 Az IL-2 szerepe a γ_c citokinek funkciójának szabályozásában

Az IL-2 a γ_c citokincsalád elsőként azonosított tagja. Biológiai hatását autokrin és parakrin mechanizmussal egyaránt kiválthatja, miután mind az IL-2-t termelő, mind pedig a környezetében található más T sejtekre is hatást gyakorol(hat). Célsejtjei közé tartoznak a naiv T sejtek, $CD4^+$ és $CD8^+$ T sejtek, NK sejtek, valamint a szabályozó T sejtek (Liao et al., 2011a) (lásd I. táblázat és 4. ábra). Amellett, hogy számos esetben T sejt növekedési faktorként viselkedik, az AICD folyamatában is kritikus a jelenléte: az aktivált T sejteket érzékenyíti a Fas-által közvetített sejtpusztulás iránt (I. táblázat) (Erdei et al., 2006).



4. ÁBRA: IL-2 HATÁSA EGYÉB CITOKINRECEPTOROK EXPRESSZIÓJÁRA ÉS A $CD4^+$ T SEJTEK DIFFERENCIÁCIÓJÁRA

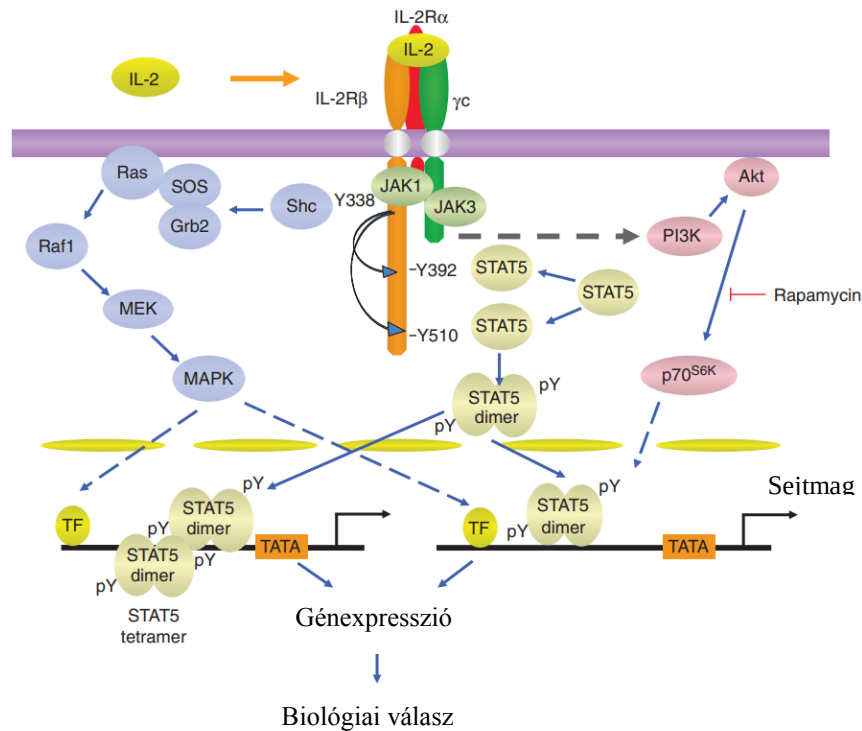
Activated $CD4^+$ T cells: aktivált $CD4^+$ T sejtek, $IFN\gamma$: interferon- γ , $TGF\beta$: tumor nekrozis faktor- β , Effector CTL: effektor citotoxikus T limfocita, Memory CTL: memória T sejt (Liao et al., 2011; Liao et al., 2013)

Emellett az effektor CD8⁺ T sejtek differenciálódásában és expansziójában, a CD8⁺ memória sejtek kialakulásában és proliferációjában, valamint a szabályozó T sejtek és más CD4⁺ T sejt alpopulációk differenciálódási folyamatainak szabályozásában is kritikus szerepet játszik (Kalia et al., 2010; Malek et al., 2010; M. A. Williams et al., 2006).

Az IL-2R a heterotrimer γ_c receptorok közé tartozik, felépítésében a γ_c lánc és a citokin specifikus α alegység mellett az IL-15R-ral közös β alegység vesz részt. Ahogy ezt korábban már ismertettem, az egyes alegységek különböző ligandumkötő affinitással rendelkező receptorkomplexeket hozhatnak létre, amelyek sejtfelszíni megjelenését a sejt típusa, állapota határozza meg (Fehniger et al., 2002). Az IL-2R α naiv és memória T sejteken nem figyelhető meg, expresszióját az antigén inger váltja ki. A β lánc konstitutívan expresszálódik az NK, NKT és memória CD8⁺ T sejteken, naiv T sejtek esetén a β lánc expressziójához szintén antigén inger szükséges. A magas affinitású, heterotrimer IL-2R komplex tehát aktivációt követően fejeződik ki a T sejteken. A T limfóma/leukémia eredetű sejtek egy része, így a kísérleteinkben alkalmazott sejtvonalak is, konstitutívan expresszálják a heterotrimer IL-2R komplexet, így az IL-2R expresszió vonatkozásában aktivált fenotípusú sejteknek tekinthetők. A heterotrimer IL-2R konstitutív expressziója a legtöbb Treg sejtre jellemző (Malek et al., 2010).

Az IL-2 általi jelátvitel beindításához az IL-2/15R β alegység és a γ_c lánc heterodimerizációja, ezen belül is a receptorláncok intracelluláris doménjeinek megfelelő távolságba és konformációba történő kerülése szükséges (5. ábra). Ennek révén megtörténhet a receptor-asszociált Jak1 és Jak3 citoszolikus protein tirozin kinázok aktivációja (transz-foszforilációja), illetve a receptorláncok tirozin foszforilációja (Waickman et al., 2016). Hasonlóan a család többi tagjához, a receptorláncok tirozin foszforilációja SH2 doménnel rendelkező fehérjék, így a STAT transzkripciós faktorok, az inzulin receptor szubsztrát-1 fehérje, illetve a MAPK útvonal adapter fehérjéi, kapcsolódását teszi lehetővé.

A fentieknek megfelelően az IL-2 kötődése három fő jelátviteli kaszkád aktiválásához vezet: a Jak/STAT, a Ras/MAPK és a PI-3K/Akt útvonalak (Goh et al., 2017; Johnston et al., 1995; Lin et al., 1995). Az IL-2 serkentheti mind az IL-2R α (Depper et al., 1985), mind pedig az IL-2/15R β (Siegel et al., 1987) alegységek kifejeződését, mely folyamat pozitív visszacsatolás révén erősíti az IL-2 funkcióját (Liao et al., 2011a). Ez az erősítő mechanizmus figyelhető meg pl. a Treg sejtek differenciálódása esetén.



5. ÁBRA: AZ IL-2/IL-2R JELÁTVITEL

Az IL-2 kötődése a Jak kinázok aktiválódását, majd ezt követően a β és γ_c láncok tirozin foszforilációját eredményezi. A foszfortirozin motívumokhoz kapcsolódnak az SH2 doménnel rendelkező STAT transzkripció faktorok, amelyek tirozin foszforilációt és dimerizációt követően transzlokálódnak a sejtmagba. A Jak/STAT útvonal mellett a PI-3K/Akt és a MAPK útvonal aktiválódása is megfigyelhető (Lin et al., 2018).

A végső sejtválaszt, a célsejtek sorsát az IL-2 más citokinreceptorok expressziójának módosításán keresztül is befolyásolhatja (4. ábra) (Liao et al., 2011a). Az IL-2 stimulálja az IL-4R α expresszióját (Liao et al., 2008), ugyanakkor az IL-7R α alegységek kifejeződését gátolja (Xue et al., 2002). Miután az IL-7 egy fontos túlélési faktor, az IL-7R expresszió gátlása a túléléshez szükséges jelek elnyomása révén potenciálisan elősegítheti a már említett AICD folyamatát, illetve a T sejtek expanszióját követő kontrakciós fázis kialakulását virális fertőzések esetén. Az IL-4R α indukciója révén az IL-2 elősegíti a Th2 sejtek differenciálódását.

Szükséges megemlíteni, hogy nemcsak a γ_c családba tartozó citokinek esetén figyelhető meg az IL-2 szabályozó szerepe: az IL-2 stimulálja az IL-12R β 2 expresszióját, ugyanakkor gátolja az IL-6R α és a gp130 kifejeződését (Liao et al., 2011b). A gp130 expresszió gátlása lehet az egyik magyarázata az IL-2 gátló hatására a sejtek differenciálódásában. Az itt felsorolt példákban a differenciálódási folyamatnak az IL-2 nem

közvetlen hajtóereje, hanem – az adott receptor alegység, s így a funkcionális receptorkomplexek számának módosításával – a sejteknek a differenciálódási folyamatban kulcsszerepet játszó citokinekre mutatott válaszkészségét, s ezáltal a kapcsolódó jelátviteli folyamatok hatékonyságát kontrollálja (erősíti vagy gyengíti). Attól függően, hogy az antigén stimulációt követően a T sejt környezetében milyen a citokin miliő, az IL-2 egyfajta központi, „mester” regulátorként segít(het) a sejsorsra vonatkozó döntés kialakításában.

2.5 A sejtmembrán szerveződése

A sejtek kommunikációjában, az anyag- és információáramlásban, valamint ezek szabályozásában a plazmamembrán alapvető szerepet játszik. A '70-es években kidolgozott Singer-Nicolson folyékony-mozaik membránmodell szerint a membránt alkotó folyékony lipid kettősréteg egyfajta oldószernek tekinthető, amelybe ágyazva véletlenszerűen és szabadon úszkálnak a membrán fehérje komponensei (Singer et al., 1972). Már ez a modell is hangsúlyozta a membránstruktúra dinamikus jellegét, illetve felvetette, hogy ez a dinamizmus – a fehérjekomponensek laterális diffúziója révén – lehetővé teszi azok találkozását és így funkcionális együttműködését, illetve a komponensek adott jelre történő átrendeződését. A későbbi adatok tükrében, amelyek egy része már a 80-as években rendelkezésre állt, a modell jelentős korrekcióra szorult. Egyrészt kiderült, hogy a lipidek eloszlása sem teljesen homogén, illetve funkciójuk nem merül ki a passzív oldószer szerepben, emellett a fehérjekomponensek mozgása számos esetben korlátozott, amely végeredményben különböző mérettartományokban megvalósuló szerveződésükhöz vezet (Damjanovich et al., 1997; Matko et al., 2002; Ramalingam et al., 1997; Vereb et al., 2003).

Mára már tudjuk, hogy a membrán komponenseinek szerveződése/kompartmentalizációja általános jelenség, amely alapvető számos fiziológiai sejtfunkció, így az intra- és intercelluláris jelátvitel, koordinálásában és végrehajtásában. A kompartmentalizáció révén létrejött membrándomének egyik típusát a polarizált sejteken megfigyelhető, ún. stabil domének jelentik, ahol a membrán egyes, egymástól jól elkülönülő, specializált funkciót ellátó régiói a funkció által meghatározott fehérje- és lipidkészlettel, valamint szerkezettel és mérettel jellemezhetők. A membrán kompartmentumok kialakulása nem-polarizált sejteken is megfigyelhető, azonban az így kialakuló struktúrák élettartama és méreteloszlása jóval szélesebb skálát fed le. Összetételüket és/vagy felépítésüket tekintve többségükre bizonyos fokú dinamizmus a jellemző.

A több alegységből álló fehérjék, így az értekezésemben is vizsgált interleukin-9 és -2 receptorok esetén a legalapvetőbb szerveződési szintet az alegységek közvetlen molekuláris kölcsönhatása, s ezáltal a funkcionális receptorkomplexek kialakulása jelenti. Ugyancsak az egyes fehérjekomponensek fizikai közelsége (homo-, illetve hetero-asszociációja) játssza a főszerepet a membránfehérjék nanométeres távolságskálán megvalósuló szerveződésében, az ún. kisméretű molekulaklaszterek (nanodomének) kialakulásában. Az egyes membránfehérjék, illetve az általuk alkotott kisméretű fehérjeklaszterek nagyobb léptékű, a több száz nanométeres (vagy akár mikrométeres) mérettartományban megvalósuló kompartmentalizációját is számos esetben feltárták. Az 2.8 fejezetben, az IL-2R vonatkozásában mindegyik szerveződési szintre vonatkozóan láthatunk példát.

A membránfehérjék szerveződésének kialakításában, fenntartásában és szabályozásában különböző tényezők játszhatnak szerepet, így a fehérje-fehérje, fehérje-lipid és lipid-lipid kölcsönhatások, a citoszkeleton membrán-asszociált része, vezikuláris transzport folyamatok, extracelluláris faktorok (pl. ligandum kötődése, extracelluláris mátrix). A felsorolt faktorok közül szeretném kiemelni a lipid mikrodomének, ezen belül is az ún. lipid tutajok (raftok) szerepét. A lipid mikrodomének modellmembránokban és biológiai membránokban egyaránt megfigyelhetők, kialakulásuk a hasonló fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező lipidek „csoportosulásának” a következménye. A lipid tutajok (20-100 nm) általános definíció szerint magas koleszterin és glikoszíngolipid tartalommal rendelkező domének, amelyekben – feltehetően a lipidekkel kialakított preferenciális kölcsönhatások révén – megfigyelhető a glikozil-foszfatidilinozitol (GPI)-horgonyzott (pl. CD48), valamint a membrán citoplazmatikus oldalához (dupla) telített zsírsavlánccal kapcsolódó (acilált) fehérjék (pl. Src protein tirozin kinázok, G fehérjék), illetve a hozzájuk kapcsolódó citoszolikus jelátvivő molekulák feldúsulása. A speciális membránkapcsolattal rendelkező fehérjék mellett transzmembrán fehérjék jelenléte kimutatható a lipid tutajokban.

A lipid tutajok méretüket és összetételüket tekintve is igen sokszínű, dinamikusan változó struktúrák. Kritikus szerepet játszanak a jelátviteli folyamatokban kulcsfontosságú fehérjék - mint pl. receptorok, ioncsatornák, kapcsolódó intracelluláris elemek - sejtfelszíni elrendeződésének kialakításában, így ezen jelátviteli folyamatok szabályozásában. A lipid tutajok egyrészt megnövelhetik az egyes molekulák lokális koncentrációját, másrészt a különböző fehérjéket egymás közvetlen közelébe terelve, másokat pedig egymástól elkülönítve elősegíthetik a jelátvitel szempontjából fontos kölcsönhatások kialakulását. A

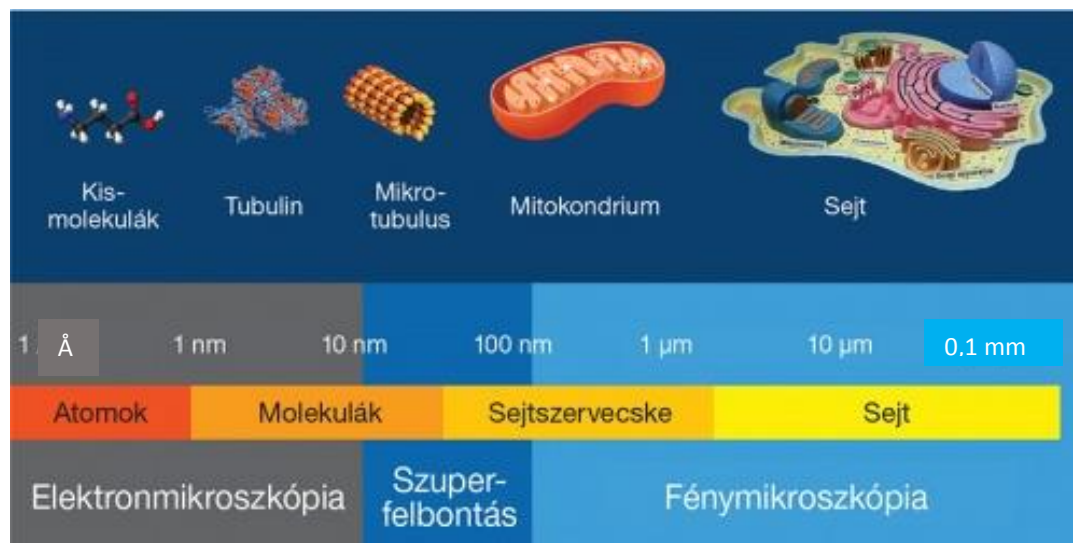
lipid tutajok a nagyobb méretű fehérjecsoportosulások mellett a kisebb méretű fehérjeklaszterek kialakításában és dinamikus átrendeződésében is szerepet játszanak. A transzmembrán jelátvitel tér- és időbeli szervezésében ily módon a lipid tutajokon belüli és azok közötti dinamikus folyamatok kitüntetett szerepet töltenek be (Vamosi et al., 2006). A lipid tutajok nélkülözhetetlenek továbbá a lipidek és fehérjék szortírozásában, különféle vezikuláris transzportfolyamatokban is.

2.6 Membránfehérjék térbeli kapcsolatának vizsgálata konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával

A membránfehérjék elrendeződésének és más fehérjékkel kialakított térbeli viszonyának vizsgálata, valamint az ezeket kialakító és szabályozó tényezők feltárása alapvető információkkal szolgálhat a membránban lezajló folyamatok részleteinek megértéséhez (Bodnar et al., 2005; Vereb et al., 2003). Ennek vizsgálatára számos biokémiai (pl. pull down assay) és biofizikai módszer ad lehetőséget. Utóbbiak előnye, hogy – ellentétben a biokémiai módszerekkel – nem igénylik a sejtek feltárását, a vizsgálatok intakt, de legalábbis kvázi-intakt sejteken is elvégezhetők. Emellett – a kiválasztott módszer függvényében – a fehérjék (és egyéb membránalkotók) szerveződése különböző hierarchikus szinteken tanulmányozható, kezdve a molekuláris szintű kapcsolatok feltérképezésétől a nagyobb mérettartományban megvalósuló szerveződésig. A membránban lezajló komplex folyamatok megértéséhez legtöbb esetben nem elegendő csak egy hierarchikus szinten vizsgálni, a leginkább célravezető, ha a fehérjék és egyéb membránalkotók által kialakított struktúrákat több szinten vizsgáljuk egyidejűleg (Jenei et al., 2009).

A membránalkotók szerveződésének vizsgálatára szolgáló biofizikai módszerek közül a legkézenfekvőbbek a különféle mikroszkópiás eljárások. Ezekben az eljárásokban a vizsgálni kívánt molekulákat specifikus jelöléssel látjuk el, majd (egy vagy több) mikroszkópos képet rögzítünk. A képek kvantitatív analízisével a jelzett molekula térbeli eloszlása, illetve – többféle jelzett molekula esetén – az egyes eloszlások egymáshoz való viszonya tanulmányozható. A mérettartományt az adott mikroszkópiás eljárás felbontása határozza meg (6. ábra). A CLSM alkalmazásával fluoreszcensen jelzett membránalkotók laterális (plazmamembránbeli) eloszlása a néhány száz nanométeres mérettartományban vizsgálható (Bodnar et al., 2005; Jenei et al., 2009). Ezt a módszert az teszi széles körben

alkalmazhatóvá, hogy a konfokális mikroszkóp napjainkban már könnyen elérhető, és a minta előkészítése is viszonylag egyszerűen megoldható.



6. ÁBRA: AZ ÉLETTUDOMÁNYOKBAN HASZNÁLT MIKROSKÓPOS ELJÁRÁSOK MÉRETTARTOMÁNYAI (https://www.innoteka.hu/cikk/latni_a_lathatatlant.1859.html)

A technika lehetővé teszi, hogy a sejtfelszíni struktúrákat, illetve a sejt belsejének akár háromdimenziós viszonyait is vizsgálni tudjuk. Élő sejteken alkalmazva a rendszer alkalmas a membránalkotók dinamikus sajátságainak tanulmányozására is (internalizáció/membránban történő transzlokáció).

Két membránalkotó (vagy általánosságban bármilyen 2 sejtalkotó) térbeli viszonyának vizsgálatakor az elsődleges kérdés az az, hogy ko-lokalizálnak-e egymással, azaz előfordulnak-e a membrán azonos régiójában? Ennek a kérdésnek a megválaszolására, illetve a kolokalizáció mértékének kvantitatív jellemzésére két alapvető lehetőség adódik: egyrészt az előfordulásuk közötti korreláció mértékének, másrészt pedig átfedő hányaduknak (co-occurrence vagy együttes előfordulás) meghatározása. Mindkét esetben a vizsgált molekulák eloszlását jellemző képpárok segítségével határozzák meg a kolokalizáció jellemzésére alkalmazott kvantitatív paramétert, ugyanakkor az így kapott értékek a molekulák térbeli viszonyát más-más szempontból jellemzik. A korrelációs vizsgálatok során a kérdés az, hogy az egyik molekula adott régióban történő előfordulása (vagy hiánya), mennyiben befolyásolja a másik adott régióban történő előfordulását, annak megjelenése mellett a számosságát is beleértve. Ezzel szemben az együttes előfordulás vizsgálatok során csak azt vizsgáljuk, hogy vannak-e olyan területek, ahol mindkét membránalkotó előfordul és az adott membránalkotó mekkora hányada található meg ezeken

a területeken (Aaron et al., 2018; Dunn et al., 2011; Manders et al., 1993; McDonald et al., 2013; Pike et al., 2017).

A fenti megfontolások elvileg bármilyen képpár esetén alkalmazhatók a vizsgált komponensek kapcsolatának leírására, ahol az alkalmazott módszertől függően a detektált jel eltérő lehet. Miután kísérleteim során konfokális mikroszkópiás méréseket végeztem, ahol a képek analízise során az egyes biomolekulák térbeli kapcsolatának feltérképezésére a pixelenkénti fluoreszcencia intenzitásokat alkalmaztuk, a további leírásban ezt a terminológiát használom.

2.6.1 Korrelációs vizsgálatok

A két membránalkotó elhelyezkedése közötti **korreláció meghatározásánál** azt vizsgáljuk, hogy egy adott területen megjelenő molekula mennyire feltételezi egy másik molekula jelenlétét. Másképpen fogalmazva: az egyik csatornában mérhető fluoreszcencia intenzitás mennyire határozza meg a másik csatornában mérhető jel intenzitását, vagyis, hogy a két fluoreszcencia jel közötti korreláció különbözik-e attól, amit véletlenszerű eloszlás esetén várhatunk.

Az egyik leggyakrabban alkalmazott korrelációs módszer a **Pearson-féle korrelációs koefficiens** meghatározása, amely megmutatja, hogy két kvantitatív változó kapcsolata (esetünkben a biomolekulák számával arányos fluoreszcencia intenzitások) mennyire lineáris, azaz milyen mértékben magyarázza az egyik változó megváltozása a másik változó megváltozását. Az adott képpárhoz tartozó kereszt-korrelációs együtthatókat az x és y csatornában a Pearson-féle keresztkorrelációs koefficiens segítségével számíthatjuk ki:

$$C = \frac{\sum_{i,j} (x_{ij} - \langle x \rangle)(y_{ij} - \langle y \rangle)}{\sqrt{\sum_{i,j} (x_{ij} - \langle x \rangle)^2 \sum_{i,j} (y_{ij} - \langle y \rangle)^2}} \quad (1)$$

ahol x_{ij} és y_{ij} x és y képek i,j koordinátájú pixeleiben/pixelblokkjain mért fluoreszcencia intenzitást, míg $\langle x \rangle$, $\langle y \rangle$ az átlag intenzitást jelenti.

Miután a Pearson-féle együttható tartalmazza a pixelintenzitások átlagtól való eltérését, ezért előjellel rendelkezik, elméletileg -1 és +1 között vehet fel értékeket. Ha az együttható értéke ± 1 , akkor a két csatornában mérhető intenzitások között egy elsőfokú (lineáris) függvénnyel jellemezhető a kapcsolat van. A +1 szélső érték a két molekula (pontosabban az őket tartalmazó pixelek) közötti teljes pozitív korrelációt, a -1-es szélső

érték a teljes negatív korrelációt (vagy anti-korreláció, a két molekula szegregációját) jelenti. Ha a koefficiens értéke 0, akkor az intenzitások között nincs lineáris korreláció, azaz függetlenek egymástól, azaz a vizsgált molekulák térbeli kapcsolata véletlenszerű. Itt kell megjegyezni, hogy a lineáris korreláció hiánya nem zár ki másfajta függvénykapcsolatot.

Önmagában a korrelációs együttható nem alkalmas ok-okozati viszony meghatározására. Viszont feltételezhető, hogy ha a vizsgált fehérjék eloszlása egymással korrelál (vagy éppen anti-korrelációt mutat), akkor annak biológiai jelentősége is van. Sejtfelszíni fehérjék eloszlásának vizsgálatakor a korrelációs együttható értéke elsősorban a kolokalizáció (vagy szegregáció) tényének kimutatására szolgál, annak valós mértékét legtöbbször nem lehet megmondani a C értéke alapján.

A Spearman korrelációs koefficiens szintén a két változó közötti összefüggésről nyújt információt, azaz megmutatja, hogy az egyes változók hogyan befolyásolják egymás értékét. Az összefüggés irányára és erősségére szintén következtethetünk a koefficiens alapján. Ugyanakkor az ok-okozati kapcsolatok feltárására ez a módszer sem alkalmas. A Spearman analízist abban az esetben használják, amikor a két fluoreszcens csatorna közötti korreláció nem lineáris, azaz a képpontokon mérhető intenzitások kapcsolata megjósolható, de a fluoreszcencia intenzitásokat leíró szórásgörbe (scatter plot) nem jellemezhető lineáris függvénnyel. A Spearman korreláció az ún. rang korrelációk közé tartozik (Rank Correlation). A minta elemszámának növelésével a pontossága is növekszik. A módszer a kapcsolat szorosságának mérésére a fluoreszcencia intenzitások helyett az intenzitásokból számolt rangszámokat számolja ki úgy, hogy a pixelekhez intenzitástól függően pozitív egész számokat rendel (a legalacsonyabb intenzitású, háttértől magasabb lesz az 1, stb.), majd ezeket hasonlítja össze a két képen. Ez a transzformáció linearizálja a szórásgörbét.

2.6.2 Együttes előfordulás (co-occurrence) analízis

Az **együttes előfordulás** (co-occurrence) analízise során azt vizsgáljuk, hogy az egyes membránalkotókat jelző fluoreszcens jel mekkora hányada jelenik meg közös membránterületeken (pixeleken).

Ezt a fajta együttállást legegyszerűbben úgy jellemezhetjük, ha meghatározzuk a közösen elfoglalt membránterületek arányát az egyik, illetve a másik membránalkotó által elfoglalt összterülethez képest. Azaz, a mindkét fluoreszcenciás jelet tartalmazó pixelek számát osztjuk az összes olyan pixel számával, ami csak az egyik vagy csak a másik jelet tartalmazza) (Aaron et al., 2018).

Az egyes membránalkotók átfedő hányadát az ún. **Manders kolokalizációs koefficienssel** is jellemezhetjük, mely az átfedő pixelek száma (területe) mellett az adott pixelre jellemző intenzitásviszonyokat (azaz az ott kifejeződő membránalkotók számát) is figyelembe veszi. Így a magasabb intenzitású pixelek nagyobb súllyal vesznek részt a számításban, mint a háttérhez közeli, ezáltal az adott membránalkotó tényleges átfedő hányada határozható meg.

A Manders által bevezetett számítás két együttthatót ad meg (Manders et al., 1993), amellyel a kétfajta molekula átfedő hányada külön-külön meghatározható:

$$M_x^I = \frac{\sum_{i,j} I_{i,j}^x \text{ kolok}}{\sum_{i,j} I_{i,j}^x}, \text{ ahol } I_{i,j}^x \text{ kolok} = \begin{cases} I_{i,j}^x, \text{ ha } I_{i,j}^y > 0 \\ 0, \text{ ha } I_{i,j}^y = 0 \end{cases} \quad (2)$$

$$M_y^I = \frac{\sum_{i,j} I_{i,j}^y \text{ kolok}}{\sum_{i,j} I_{i,j}^y}, \text{ ahol } I_{i,j}^y \text{ kolok} = \begin{cases} I_{i,j}^y, \text{ ha } I_{i,j}^x > 0 \\ 0, \text{ ha } I_{i,j}^x = 0 \end{cases} \quad (3)$$

ahol $I_{i,j}^x$ és $I_{i,j}^y$ a küszöbérték feletti intenzitással jellemezhető, i,j koordinátájú pixeleiben/pixelblokkjain detektált intenzitásokat jelenti az x és y csatornában, míg $I_{i,j}^x \text{ kolok}$ és $I_{i,j}^y \text{ kolok}$ ugyanezen csatornában detektált intenzitásokat jelenti azon pixeleken, ahol mindkét csatornában küszöbintenzitás feletti jel detektálható. Ennek megfelelően M_x^I az egyik csatornában, míg M_y^I a másik csatornában detektált membránalkotók átfedő hányadát jellemzi.

2.6.3 A kolokalizációs kísérletek interpretációja, kontrollok

Adott molekulapár esetén a koeficiensek értékét befolyásolhatják a kísérleti rendszer biológiai és/vagy technikai paraméterei: míg a Pearson-féle együtttható esetén a vizsgált molekulák abszolút és relatív (egymáshoz viszonyított) számossága, az eltérő kolokalizációs sajátságokkal jellemezhető membránterületek együttes létezése (pl. átfedő és kizáró területek párhuzamos létezése ugyanazon a sejten) eredményezhet nehezen értelmezhető adatokat, addig a Manders együttthatók esetében az ún. küszöbérték (azaz a háttér) meghatározása a kritikus (Dunn et al., 2011).

A kolokalizációs adatok megfelelő értelmezéséhez kritikus a megfelelő kontrollok alkalmazása. Ezek egyrészt lehetőséget adnak arra, hogy a kolokalizáció jellemzésére használt kvantitatív paraméter esetén meghatározzuk az adott kísérleti rendszerhez tartozó, ún. dinamikus tartományt, amelyen belül a tényleges értékek elhelyezkedhetnek, másrészt elősegítik a kapott értékek megfelelő interpretációját. Az adott paraméter dinamikus tartományának meghatározása pozitív, illetve negatív kontrollok segítségével történhet. Pozitív kontrollként olyan molekulapárok alkalmazhatók, amelyek sejtfelszíni kifejeződése bizonyítottan a másik jelenlétét feltételezi, azaz „kapcsoltan” fordulnak elő (pl. az MHC I két alegysége). Negatív kontrollként bizonyítottan elkülönülő membrán régiókban előforduló molekulák (pl. lipid tutaj és burkolt vezikula rezidens membránalkotók) alkalmazhatók (Harder et al., 1999; Langlet et al., 2000).

Az előzőekben ismertetett megfontolások, így a koeficiensek által felvehető értékek tartománya is, pontszerű objektumok esetén érvényesek. Ezzel szemben a fehérjék (és más membránalkotók) valós mérettel rendelkező objektumok, az egy fehérje által elfoglalt „térfogat” nem fedhet át egy másik fehérje által elfoglalt térfogattal, még a fehérjék közvetlen fizikai kapcsolata esetén sem. Így még teljes mértékű kolokalizáció esetén is előfordulhat, hogy a kép felvétele során a partnerek egy részét külön pixelben/pixelblokkban detektáljuk, így a koeficiens értéke alacsonyabb lesz az elméletileg elérhető maximális értéknél, azaz 1-nél. Ugyanígy, egymástól elkülönülő membránalkotók esetén is előfordulhat, hogy azonos pixelben/pixelblokkban detektáljuk őket, így az elméletileg várható minimum értéktől magasabb értéket kapunk. Pearson koeficiens esetén -1 helyett kevésbé negatív értéket, míg a Manders együtttható esetén 0 helyett annál valamivel magasabb pozitív értéket tapasztalunk.

A kolokalizációs, különösen a korrelációs vizsgálatok sarkalatos pontja a valós kolokalizáció (vagy éppen szegregáció) elkülönítése a véletlen által létrehozott, „látszólagos” korrelációtól (anti-korrelációtól). Amennyiben két objektum térbeli eloszlása egymástól független, a Pearson-féle korrelációs koefficiens elméleti várható értéke nulla. Ugyanakkor – a fentebb említett megfontolások miatt – a véletlen akár teljesen független eloszlás esetén is generálhat nullától különböző korrelációs koefficiens értéket, különösen akkor, ha legalább az egyik molekula kifejezetten magas expresszióval jellemezhető. Emellett, amennyiben a vizsgált molekulák számossága jelentősen eltér, valós korreláció is eredményezhet alacsony pozitív korrelációs koefficiens értéket. Így különösen a korrelációs koefficiens alacsony értéke esetén okozhat gondot annak eldöntése, hogy az érték tényleges, nem a véletlennek köszönhető korrelációt jelez-e.

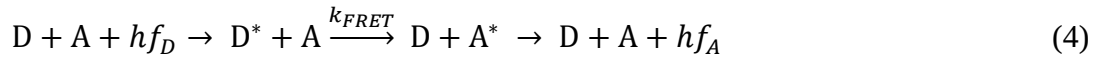
Ellentétben a pozitív, illetve negatív kontrollal, a véletlenszerűség ellenőrzésére – pont a koefficiens expresszió függése miatt – nehezen kivitelezhető (gyakorlatilag lehetetlen) megfelelő biológiai kontrollt találni. Ezen probléma áthidalására ad lehetőséget Costes és munkatársainak ún. konfidencia intervallum módszere, amelyet eredetileg intracelluláris sejtalkotók kapcsolatának vizsgálatára dolgoztak ki (Costes et al., 2004): adott sejt esetén a két molekula eloszlásáról detektált mikroszkópos képek pixeleinek keverésével modellezzik azok véletlenszerű kapcsolatát és számítanak korrelációs koefficiens értéket. A folyamatot megfelelően sok (több száz) alkalommal megismételve meghatározható a vizsgált molekulák véletlenszerű (nem korrelált) térbeli kapcsolatára vonatkoztatható (általában 95%-os) konfidencia intervallum, amely az adott sejtre jellemző expressziós viszonyokat tükrözi. Az eredeti képpár alapján számított, a két molekula tényleges térbeli kapcsolatát tükröző korrelációs koefficiens értékét ehhez az intervallumhoz hasonlítják. Amennyiben a koefficiens értéke az intervallumon kívül esik, a két molekula valódi pozitív (vagy negatív) korrelációja valószínűsíthető. Az intervallumba eső értékek esetén nem tudunk biztosat mondani, csak annyit, hogy nincs statisztikai bizonyíték a két molekula korrelációjára (anti-korrelációjára), azaz nem zárható ki a véletlen hatása.

2.7 Membránfehérjék molekuláris kölcsönhatásának vizsgálata: FRET hatásfok meghatározása

Míg a konfokális mikroszkóppal végzett kolokalizációs és együttes előfordulás mérések néhány 100 nm-es mérettartományban adnak információt a vizsgált fehérjék laterális eloszlásáról, addig a FRET módszer lehetővé teszi a fehérjék molekuláris asszociációjának, közvetlen fizikai közelségének a vizsgálatát (nanométeres lépték).

A FRET során egy gerjesztett állapotban levő donor fluorofór dipól-dipól kölcsönhatás révén, fotonemisszió nélkül adja át energiáját egy másik, ún. akceptor molekulának. Az energiaátadás feltétele a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedése, illetve a donor emissziós és az akceptor abszorpciós dipólmomentumának megfelelő orientációja. Emellett a donor-akceptor távolságnak a 2-10 nm tartományba kell esnie (Clegg, 1995; Szollosi et al., 2006).

FRET következtében a donor alap-, míg az akceptor gerjesztett állapotba kerül. Megfelelő körülmények között az utóbbi relaxációját szintén kísérheti fluoreszcencia kibocsátása. A folyamat az alábbi egyenlettel írható le



- D és A az donor és akceptor festékek alapállapotát jelöli;
- D* és A* a donor és akceptor gerjesztett állapota;
- k_{FRET} az energiatranszfer folyamat sebességi állandója;
- f_D és f_A a donort gerjesztő, illetve az akceptor által emittált fotonok frekvenciája.

A FRET sebességi állandójára igaz, hogy $k_{FRET} \propto J\kappa^2 R^{-6}$, ahol J a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedési integrálja, κ^2 a donor és akceptor relatív orientációját leíró orientációs faktor (szabadon elforduló donor és akceptor esetén ennek átlagos értéke 2/3), R pedig a két molekula távolsága. A fentiek alapján adott donor-akceptor pár esetén a k_{FRET} csak a két molekula átlagos távolságának függvénye.

A FRET hatásfoka (E) kiszámítható a FRET átmenet és az összes lehetséges relaxációra vezető átmenet sebességi állandóinak segítségével (a sebességi állandók viszonya meghatározza az egyes legerjesztődési folyamatok valószínűségét):

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_f + k_{nf}} \quad (5)$$

ahol k_{FRET} a FRET átmenet sebességi állandója, k_f a fluoreszcenciával járó relaxáció, k_{nf} pedig az egyéb, nem fluoreszcens átmenetek sebességi állandója.

A Förster típusú energiaátadás sajátossága, hogy a FRET a donor-akceptor távolság hatodik hatványával fordítottan arányos:

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

ahol R a donor és akceptor távolsága, R_0 pedig az 50%-os FRET hatásfokhoz tartozó Förster távolság egy adott donor-akceptor pár esetén.

Mivel a FRET hatásfoka fordítottan arányos a donor-akceptor távolság hatodik hatványával, így kiválóan alkalmas intermolekuláris kapcsolatok feltérképezésére (pl. fehérjék asszociációinak kimutatására) (Stryer, 1978). A sejt felszíni fehérjék asszociációinak vizsgálatakor a FRET hatásfok több lehetséges donor-akceptor távolság statisztikus átlaga, így a kapott érték alapján tényleges távolság nem határozható meg, csak az asszociáció tényére lehet következtetni belőle.

A FRET hatásfokot több módon is meg lehet határozni, attól függően, hogy milyen mérhető folyamatokban való megjelenését vizsgáljuk. A FRET méréseknek alapvetően kétféle változatát szokás tárgyalni (Péter Nagy, 2012)

(1) Hetero-FRET, mely esetén a donor és akceptor spektroszkópiailag különbözik egymástól. FRET hatására a donor, illetve akceptor egyes fluoreszcenciás paraméterei megváltoznak, amely lehetőséget ad a FRET hatásfok meghatározására:

- csökken a donor fluoreszcencia intenzitása;
- csökken a donor fluoreszcencia élettartama akceptor jelenlétében;
- nő a donor fluoreszcencia anizotrópiája;
- lassul a donor fotoelhalványítási kinetikája;
- akceptor fluoreszcencia intenzitása megnő.

(2) Homo-FRET, mely esetben a festékek spektroszkópiailag azonosak. Ebben az esetben a donor fluoreszcencia anizotrópiájának csökkenése ad lehetőséget a FRET hatásfok meghatározására.

Viszonylagos egyszerűsége miatt a sejt felszíni fehérjék kölcsönhatásinak vizsgálatára az intenzitásváltozás mértékéből történő FRET hatásfok meghatározás a legelterjedtebb módszer. Az intenzitásalapú vizsgálatok áramlási citometriára, illetve mikroszkópiára egyaránt adaptálhatók, kihasználva ezzel a kétféle műszer adta

lehetőségeket. A következőkben röviden említtem azon módszerek elméleti alapját, amelyet saját vizsgálatainkban alkalmaztunk.

2.7.1 Intenzitás arányon alapuló („ratiometric”) FRET (rFRET) módszer

Az intenzitás alapú FRET módszer előnye, hogy élő mintákon is alkalmazható, a FRET hatásfokot sejtenként is meghatározhatjuk, így a fluoreszcensen jelölt molekulák kölcsönhatását pixelenként és sejtenként vizsgálhatjuk (P. Nagy et al., 2016). A FRET hatásfok a direkt gerjesztett donor és akceptor fluoreszcencia intenzitása, valamint az akceptor szenzitizált (azaz a FRET által kiváltott) emissziója alapján az alábbi egyenletrendszer segítségével határozható meg (A I_D és I_A indexek a donort, illetve az akceptort jelölik):

$$I_1(\lambda_{ex,D}, \lambda_{em,D}) = I_D(1 - E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2} \quad (7)$$

$$I_2(\lambda_{ex,D}, \lambda_{em,A}) = I_D(1 - E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \quad (8)$$

$$I_3(\lambda_{ex,A}, \lambda_{em,A}) = I_D(1 - E) S_3 + I_A + I_D E \frac{\varepsilon_{R2}}{S_2} \quad (9)$$

$$\varepsilon_{R2} = \frac{\varepsilon_D^A \varepsilon_A^D}{\varepsilon_D^D \varepsilon_A^A} \quad (10)$$

Minden egyes duplán (azaz donorral és akceptorral is) jelzett minta esetén három különböző csatornában detektáljuk a fluoreszcencia intenzitásokat:

- (i) donor csatorna (I_1), ahol a gerjesztési és emissziós hullámhosszak a donornak felelnek meg;
- (ii) FRET csatorna (I_2), ahol a gerjesztés a donor abszorpciós spektrumában történt, a detektálás pedig az akceptor emissziós spektrumának megfelelően (szenzitizált emisszió);
- (iii) valamint akceptor csatorna (I_3), ahol a gerjesztés és emissziós hullámhosszak az akceptornak megfelelő hullámhossz-tartományokban történt.

Az alkalmazott festékpár és a műszerben rendelkezésre álló gerjesztési/detektálási paraméterek függvényében szükséges lehet az egyes csatornák közötti, ún. átvilágítás miatti (S_{1-4} faktorok), illetve a donor és akceptor eltérő gerjeszthetősége és kvantumhatásfoka (α faktor, extinkciós együtthatók) miatti korrekció. Mint láthatjuk, a detektált intenzitások kifejezhetők az akceptor jelenléte nélkül mért donor intenzitás (I_D) és közvetlenül gerjesztett

akceptor (I_A) intenzitás, a FRET hatásfok (E) és a fentebb említett korrekciós faktorok α , valamint az extinkciós állandók (ϵ) segítségével.

Az I_1 - I_3 intenzitások a háttérlevonás utáni intenzitásokat jelölik. Az S_1 és S_3 átvilágítási faktorok a donor FRET, illetve akceptor csatornába történő átvilágítását jellemzik, míg az S_2 és S_4 faktorok az akceptor FRET, illetve donor csatornába történő átvilágítását. Ezen faktorok az α faktoral együtt az egyszeresen (csak donorral vagy akceptorral) jelzett minták fluoreszcencia intenzitásából határozhatók meg, itt nem részletezett módon (a mi rendszerünkre vonatkozóan lásd 4.5.1 fejezet).

A fenti egyenletrendszer segítségével a FRET hatásfok sejtenként meghatározható akár áramlási citométer, akár konfokális mikroszkóp alkalmazásával.

2.7.2 Akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET (accpbFRET)

Az accpbFRET módszer alapja, hogy a donor fluoreszcencia intenzitása akceptor jelenlétében csökken a FRET következtében (kioltás, donor quenching) (Roszik et al., 2008; Wouters et al., 1998). Amennyiben az akceptort nagy intenzitással, megfelelő hullámhosszúságú fénnel gerjesztjük, akkor olyan irreverzibilis fotokémiai átalakulásokon megy keresztül, amelyek következtében molekuláris szerkezete megváltozik, ennek következményeként többé nem képes a donortól energiát átvenni, azaz a donor fluoreszcencia intenzitása a FRET hatásfokától függő mértékben megnő. Fluoreszcencia akceptor alkalmazva annak fluoreszcencia intenzitása lecsökken, „kiég” („photobleaching”, fotoelhalványulás), innen a módszer elnevezése. Az előző módszerrel szemben, amely áramlási citométerre és konfokális mikroszkópra egyaránt adaptálható, ez az eljárás kizárólag mikroszkóp alkalmazásával valósítható meg.

A FRET hatásfoka az alábbiak szerint, pixelenként határozható meg

$$E_{ij} = \left(1 - \frac{F_{ij}^{D1} - B}{F_{ij}^{D2} - B}\right) \times 100\% \quad (11)$$

ahol az F_{ij}^{D1} és a F_{ij}^{D2} az akceptor kiegészése előtt és után detektált donor fluoreszcencia intenzitások egy adott pixelben, B pedig a sejtek átlagos autofluoreszcenciája a donor csatornában, amelyet jelöletlen sejteken végzett mérések során határoztunk meg. Hasonlóan az intenzitásalapú mérésekhez, itt is szükséges a megfelelő kontrollok alkalmazása, amelyek segítségével az akceptor nem tökéletes fotoelhalványulása (vagy esetlegesen fluoreszcencia

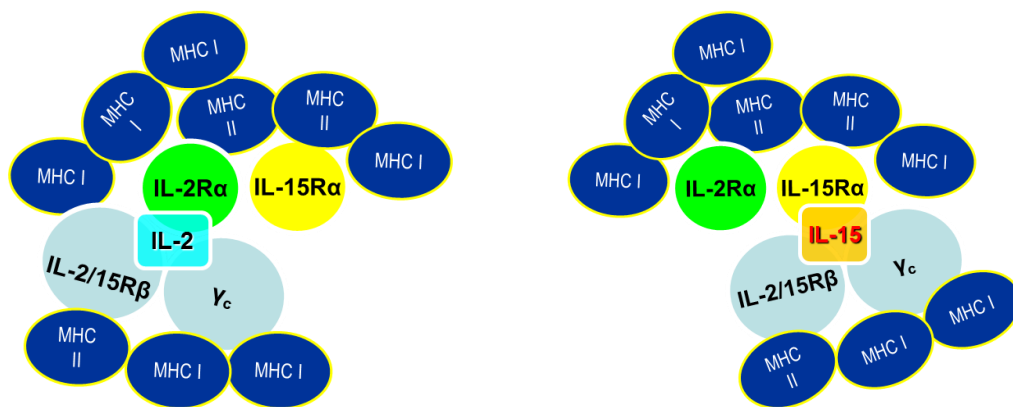
reakciótermékek képződése), a donor intenzitáscsökkenése, illetve a detektálási csatornák közötti esetleges átvilágítást lehet korrigálni, amelyek a FRET hatások alul- vagy felülbecslését okozhatják (Berney et al., 2003; Roszik et al., 2008).

2.8 Az IL-2 receptor részvételével kialakuló sejtfelszíni fehérje mintázatok

Az IL-2 receptor összeszerelődésével, illetve sejtfelszíni szerveződésével kapcsolatban már viszonylag sok adat áll rendelkezésre. Damjanovich és munkatársai 1997-ben áramlási citometriás FRET módszerrel kimutatták, hogy a magas affinitású heterotrimer IL-2R komplex alegységei citokinkötés nélkül is egymás molekuláris közelségében helyezkednek el humán T limfóma sejteken (Damjanovich et al., 1997). Az IL-2, valamint a heterotrimer IL-2R-ral egy, illetve két közös receptoralegységet „használó” IL-7 és IL-15 citokinek kötődése a komplexen belüli kölcsönhatásokat szelektíven módosította. Ez az eredmény összhangban állt más, a preformált (IL-2 kötése nélkül is létező) IL-2R $\alpha\beta$ heterodimerek létezésére utaló vizsgálatokkal és jelentősen árnyalta az IL-2R komplex kialakulására vonatkozóan elfogadott, ún. affinitás konverziós modellt, mely szerint a receptorkomplex kialakulása több lépésben, az IL-2R α /IL-2 kötés létrejöttét követően történik. IL-2 hiányában az egyes receptoralegységek egymástól függetlenül helyezkednek el (Kondo, 1986). Később munkacsoportunk feltárta, hogy a heterotrimer IL-2R kialakulásához és funkciójához elengedhetetlen a lipid tutajok integritása (Matko et al., 2002). Újabb eredmények szerint az IL-2R receptor alegységek részleges asszociációja már az endoplazmatikus retikulumban bekövetkezhet, majd a sejtmembránban válik teljessé (Volko et al., 2019). IL-2-t is termelő sejtekben ez a részleges asszociáció már az ER-ből (vagy Golgi-ből) kiinduló hatékony IL-2 jelátvitelt tehet lehetővé.

Az azonos családba tartozó receptorok, így a γ_c család esetén is, kritikus kérdés a közös receptor láncok megosztása a receptorcsalád egyes tagjai között. Konfokális mikroszkópiás kolokalizáció, valamint FRET és fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) mérések segítségével intézetünkben kimutatták, hogy az IL-2/15R rendszer mind a négy alegységét kifejező T limfóma sejteken a kétféle receptor közös klasztereket alkot az adott sejtek lipid tutajaiban, amelyben az egyes receptoralegységek kölcsönhatása a citokin típusától függően módosul (Vamosi et al., 2004). Adataik alapján az IL-2/IL-15 receptor rendszer a következőképpen modellezhető: az egyes alegységek (minimum) heterotetramer struktúrába tömörülve egymás molekuláris közelségében

helyezkednek el. IL-2 vagy IL-15 kötődését követően az alegységek távolsága (és/vagy konformációja) megváltozik: kialakul a megfelelő magas affinitású heterotrimer ($\alpha\beta\gamma_c$) receptorkomplex, míg másik citokin specifikus α lánc eltávolodik a citokin-receptor kölcsönhatás helyétől (7. ábra). Mindezek az eredmények felvetették a lehetőségét egy gazdaságos alegységmegosztási mechanizmus létezésének a γ_c citokinreceptorok (legalábbis a heterotrimer receptorok közé tartozók) között, amelyhez a lipid tutajok szolgáltathatnak platformot.



7. ÁBRA: AZ IL-2/15R ÉS AZ MHC GLIKOPROTEINEK SZUPERKLASZTEREINEK LEHETSÉGES (MINIMÁLIS) MODELLJE

Az IL-2/15R rendszer mind a négy alegységét kifejező T limfóma sejteken a két receptor az MHC I és II fehérjékkel közös klasztereket alkot. Az egyes alegységek heterotetramer struktúrába tömörülve egymás molekuláris közelségében helyezkednek el. A releváns citokinek kötődését követően az alegységek távolsága (és/vagy konformációja) megváltozik.

Közele mező optikai mikroszkópiás (near field scanning optical microscopy, NSOM) vizsgálatokkal kimutatták az IL-2R α szubmikrométeres méretű klaszterekbe tömörülését is humán T limfóma eredetű sejteken (de Bakker et al., 2008). Ugyanakkor az NSOM vizsgálatok azt is feltárták, hogy az IL-2R α alegységek egy kis hányada monomerként, a nagyobb méretű klaszterekből kizárva helyezkedik el a sejtek plazmamembránjában. Az eredmények arra is felhívták a figyelmet, hogy az IL-2R α klaszterek denzitása (egységnyi területen kifejeződő receptor alegységek száma) gyakorlatilag konstans, azaz nem függ a klaszter méretétől. Hasonló eredményeket kaptak az IL-15R α esetén is, bár ott az alegységek klaszterekből kizárt hányada jóval nagyobb mértékűnek adódott.

Áramlási citometriás FRET és a membránfehérjék laterális diffúziójának mérésére alkalmas FRAP módszerrel már 1987-ben kimutatták az IL-2R α és az ún. T27 peptid asszociációját (Edidin et al., 1988; Szöllösi et al., 1987). Ez utóbbi fehérjéről a későbbiekben

kiderült, hogy az ICAM-1 adhéziós molekulával azonos (Burton et al., 1990). A későbbiekben feltárták, hogy az IL-2R α az MHC glikoproteinekkal közös szuperklaszterekben fejeződik ki humán T limfóma eredetű sejtvonalakon és aktivált T limfocitákon. A klaszterek kialakulásában és fenntartásában a membrán lipid domén szerkezete alapvető szerepet játszik (Matko et al., 2002; Vereb et al., 2000). Az IL-15R-t is kifejező sejteken az IL-15R szintén része ezen szuperklasztereknek (Vamosi et al., 2004). Így az IL-2/15R szerkezetére vonatkozó modell kiegészíthető az MHC fehérjékkel (7. ábra). FCCS és STED mikroszkópiás vizsgálatok tanúsága szerint az IL-2R, IL-15R és MHC I fehérjék szoros aggregátumok formájában diffundálnak a sejtek membránjában, kb. 400-600 nm-es szuperklasztereket alkotva. Az MHC I sejtfelszíni expresszióját siRNS (RNS silencing) technika segítségével csökkentve a klaszterek mérete is csökkent, ezzel egyidejűleg a komponensek mobilitása jelentősen megnövekedett. Mindez az MHC I fontos szervező szerepére utalhat az IL-2/15 receptorok sejtfelszíni szerveződésében (Mocsar et al., 2016).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az IL-2R és IL-15R azonos membrán mikrodoménekben, hasonló molekuláris környezetben/közös szuperklaszterben fejtik ki hatásukat humán T limfóma eredetű sejteken. Feltételezhető, hogy más, a γ_c láncot használó citokinreceptorok, így az IL-9R is, hasonló környezetben, esetleg azonos szuperklaszterben funkcionálnak. Ezt alátámasztja az a tény is, hogy az IL-9R α lánc elsősorban olyan sejteken expresszálódik, melyek a heterotrimer IL-2R-t is kifejezik és ahol az IL-2 fontos szabályozó szerepet tölt be (pl. Th2, Th17, Treg) (Liao et al., 2011a). Emellett az IL-9R α jelentős homológiát mutat az IL-2/15R β láncsal, amely hasonló fehérje-fehérje, illetve fehérje-lipid kölcsönhatások kialakításának lehetőségére utal.

Ezen előzmények ismeretében munkám célja az IL-9R elhelyezése a térképen, azaz az IL-2R/MHC szuperklaszterekkel való térbeli kapcsolatának feltárása humán T limfóma sejteken. A vizsgált fehérjék (és más membránalkotók) térbeli kapcsolatának kvantitatív jellemzésére a FRET módszert (nanométeres skálán történő szerveződés), valamint a konfokális mikroszkópiás képek Pearson-féle korrelációs, illetve Manders-féle co-occurrence analízis módszerét (membrándomén szintű kapcsolat) alkalmaztuk. Célkitűzéseim az alábbi fő pontokban foglalhatók össze:

- (1) IL-9R kapcsolata az IL-2R/MHC szuperklaszterekkel, beleértve a lipid tutajok szerepét az IL-9R sejtfelszíni lokalizációjának kialakításában;
- (2) A heterodimer IL-9R összeszerelődése, az IL-9R és az IL-2R kapcsolata;
- (3) Costes konfidencia intervallum módszerének adaptálása membránfehérjék térbeli kapcsolatának korrelációs analízisében;
- (4) A konfidencia intervallum módszer adaptálása membránfehérjék együttes előfordulásának (co-occurrence) analízisében.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Sejttenyésztés és citokin kezelés

Vizsgálatainkat az alábbi két, humán T limfóma eredetű sejtvonalon végeztük:

Kit225/IL9R: az IL-2R α , β és γ_c alegységeit konstitutívan kifejező, IL-2-függő, nem HTLV-asszociált, segítő/inducer fenotípusú (Th/i) humán T-limfóma sejtvonal, amelyet a Kit225 sejtvonal (Hori et al., 1987) stabil IL-9R α transzfekciójával állítottak elő kollaborációs partnerünk (Thomas A. Waldmann) laboratóriumában.

MT-2: az IL-2 és IL-9 receptorok alegységeit konstitutívan kifejező, HTLV-1 vírussal fertőzött, humán felnőtt T sejt leukémia (ATL) sejtvonal (Miyoshi et al., 1981). Az MT-2 sejtek IL-9-et termelő sejtek (Lee et al., 1989).

Egyik, általunk használt sejtvonal sem termel IL-2-t.

Mindkét sejtvonalat RPMI 1640 médiumban (SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA) tenyésztettük, ami 10%-os FBS-t (magzati borjú szérumot), penicillint és sztreptomcint tartalmazott. A Kit225/IL9R sejtek médiuma 30 U/ml humán rekombináns IL-2-t (NCI BRB Preclinical Repository, Frederick, MD, USA), valamint a vad típusú sejtek növekedését gátló G418-at (800 μ g/ml, Calbiochem-Nova-biochem Ltd, Nottingham, UK) is tartalmazott. A sejtkultúrákat 37 °C-on, állandó parciális nyomású CO₂ atmoszféra (CO₂ tartalom 5%), illetve megfelelő páratartalom mellett tenyésztettük, és 48-72 óránként passzáltuk. Az IL-9 hatásának vizsgálatára irányuló kísérleteink előtt a Kit225/IL-9R sejteket passzálását követően 48 órán keresztül IL-2 mentes médiumban tenyésztettük („éheztetett sejtek”), kizárva ezzel az IL-2 esetleges zavaró hatását az IL-9 kötődésére. Ezen vizsgálatokban a sejteket mosást követően friss RPMI médiumban szuszpendáltuk, majd 0,25 μ g/ml IL-9 jelenlétében 20 percig 37 °C-on inkubáltuk.

4.2 Sejtalkotók specifikus jelzése

Kísérleteink során a membránfehérjéket fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitesttel, a GM1 gangliozidot pedig fluoreszcensen jelzett kolera toxin B (CTX-B) alegységgel jelöltük (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A III. táblázat tartalmazza az egyes fehérjék vizsgálata során alkalmazott antitesteket. Az IL-9R α alegységhez kötődő kétféle antitest abban különbözik, hogy milyen mértékben gátolják az

IL-9 citokin kötődését/hatását. A TS1H9RA3 proliferációs esszé szerint az AH9R4 kismértékű, míg az AH9R7 erős inhibitornak mutatkozott (De Smedt et al., 2000). Emiatt azon vizsgálatainkban, ahol az IL-9 kezelés hatását tanulmányoztuk, kizárólag az AH9R4 antitestet alkalmaztuk.

III. TÁBLÁZAT: MONOKLONÁLIS ANTITESTEK

Epitóp	Antitest neve	Izotípus	Beszerzési hely
$\beta 2m$	L368	IgG1 κ	Hibridóma sejtek által termelt
MHC I nehézlánc (MHC I HC)	W6/32	IgG2a κ	Hibridóma sejtek által termelt
MHC II (HLA-DR)	L243	IgG2a	Hibridóma sejtek által termelt
IL-2R α	anti-Tac	IgG2a	RepliGen Corp., Waltham, MA, USA
IL-9R α	AH9R4	IgG2a	J.C. Renauld, Ludwig Institute for Cancer Research and Experimental Medicine Unit, Brussels, Belgium laboratóriuma
	AH9R7	IgG2b κ	BioLegend, San Diego, CA, USA
γ_c lánc	TugH4	IgG2b	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
transzferrin receptor	MEM75	IgG1	Exbio Praha, Prága, Csehország

Az antitestek fluorofórral történő konjugálása a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben történt. Az antitestek jelölési arányát (egy antitesthez kötődő fluorofórok átlagos száma) spektrofotometriásan határoztuk meg. A sejtfelszíni fehérjék, illetve a GM1 gangliozid specifikus jelzésére különféle hullámhosszon emittáló Alexa Fluor 488, -546, -647 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Cy3 és Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK) fluorofórokkal konjugált reagenseket (monoklonális antitestek, illetve CTX B) használtunk.

A sejteket a tenyésztő flaskából kivéve hideg 1x PBS (150 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 8,6 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄, pH=7,4) pufferben 2x mostuk, majd az előre bemért, telítési koncentrációban alkalmazott antitestekhez adtuk a mintánként ~10⁶ sejtet tartalmazó sejtszuszpenziót 40 μ l végtérfogattal. Ezt követően a mintákat 45 percig jégen inkubáltuk, majd a szabad, nem kötődött antitestek eltávolítása miatt hideg pufferrel 2x mostuk, végül 1% formaldehidet tartalmazó hideg PBS oldattal fixáltuk a sejteket.

Az IL-9 hatásának vizsgálata során a sejtek immunfluoreszcens jelzése a citokin kezelést (lásd 4.1) követően történt. A citokin kezelt, illetve kontroll sejteket először 2%-os

nátrium-azid tartalmú PBS-sel, ezt követően pedig normál PBS-sel mostuk, majd az előzőekben leírtaknak megfelelően jelöltük a fluoreszcensen jelzett antitestekkel vagy CTX-B alegységgel.

4.3 Fehérje expresszió meghatározása

A vizsgált membránfehérjék expressziós szintjét Alexa Fluor 488, illetve Alexa Fluor 546 festékekkel konjugált monoklonális antitestek kötődésének áramlási citometriás vizsgálatával határoztuk meg. A vizsgálatokat FACSAria áramlási citométerrel (Beckton-Dickinson, New Jersey, USA) végeztük. A kötőhelyek relatív számát a sejtek fluoreszcencia intenzitás hisztogramjának autofluoreszcenciával korrigált és az alkalmazott antitest jelölési arányával (az antitesthez kötődő festékmolekulák átlagos száma) normalizált középértékéből (Mean Fluorescence Intensity, MFI) határoztuk meg. Az elérhető kötőhelyek abszolút számának meghatározásához az MFI értékeket ismert számú festéket tartalmazó mikrogyöngyök segítségével kalibráltuk (Quantum™ Alexa Fluor 488 MESF kit, Becton Laboratories, Fisher, USA). A mérési adatokat a Szentesi Gergely által írt REFLEX programmal értékeltük ki (Szentesi et al., 2004).

4.4 Membránalkotók páronkénti kolokalizációjának kvantitatív jellemzése

A membrándomén szintű (néhány száz nanométeres távolságskálán megvalósuló) kolokalizációs vizsgálatokat Olympus FluoView 1000 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japán) konfokális mikroszkóppal végeztük. A vizsgálatok során két vagy három sejtfelszíni alkotót (membránfehérje, illetve GM1 gangliozid) jelöltünk meg olyan specifikus markerekkel (lásd 4.2 fejezet), amelyeket egymástól elkülöníthető spektrumú fluorofórral jelöltünk meg. A sejteket 1%-os formaldehid oldattal fixáltuk, 1mg/ml poli-L-lizinnel előkezelt tárgylemezre cseppentettük, majd a kicseppentett mintához 10 µl 50% glicerin/50% 1x PBS-ben oldott Mowiol-t (Calbiochem®, San Diego, USA) adtunk. A Mowiol csökkenti a festékek gerjesztett állapotban bekövetkező irreverzibilis fotokémiai átalakulásának (photobleaching) valószínűségét, a poli-L-lizin pedig jobb tapadást biztosít a sejtek számára a tárgylemezen. Az általunk használt festékek gerjesztésére és detektálására vonatkozó információkat a IV. táblázatban foglaltam össze.

A mérések során a sejtek fedőlemezhez közeli (alsó) vagy tárgylemezhez közeli (felső) rétegéből vettük fel a többcsatornás optikai szeleteket. Ily módon egy, az optikai tengelyre merőleges (vagy közel merőleges), kétdimenziósnak tekinthető membránsíkban vizsgálható a membránalkotók eloszlása és térbeli kapcsolata, minimalizálva ezzel a más területekről érkező jelek zavaró hatását. Az optikai szeleteken Gauss szűrést alkalmaztunk, a fluoreszcencia csatornák közötti átvilágítás mértékének minimalizálására a képeket ún. „soronkénti szekvenciális üzemmódban” vettük fel. Ez azt jelenti, hogy adott sorban egymást követően rögzítettük az egyes csatornákhöz tartozó jeleket (gerjesztés/detektálás), majd ezt követően ugrottunk a következő sorra. A képeket 60× UPLSAPO olajimmerziós objektívvel (NA 1,35) rögzítettük. A képek optikai szeletvastagsága kb. 1µm-es volt. A rögzített képek 512×512 pixelből álltak, az egyes pixelek XY irányú kiterjedése ~51 nm volt.

IV. TÁBLÁZAT: A KOLOKALIZÁCIÓS VIZSGÁLATOKNÁL HASZNÁLT GERJESZTÉSI ÉS DETEKTÁLÁSI PARAMÉTEREK (OLYMPUS FLUOVIEW 1000 KONFOKÁLIS MIKROSKÓP)

Festék neve	Gerjesztés (lézer típusa, hullámhossz)		Detektálási hullámhossz
Alexa Fluor 488	Argon ion	488 nm	500-530 nm
Alexa Fluor 546	He-Ne	543 nm	555-625 nm
Alexa Fluor 647	He-Ne	633 nm	655-755 nm
Cy3	He-Ne	543 nm	555-625 nm
Cy5	He-Ne	633 nm	655-755 nm

A lézerintenzitások térbeli homogenitását Chroma autofluoreszcens tárgylemezekkel ellenőriztük (Chroma Technology, Vermont, USA). A kolokalizációs vizsgálatok során a használttal megegyező pixelmérettű képeket vettünk fel a tárgylemezről, majd – háttérkorrekciót követően – a pixelintenzitásokat normalizáltuk az adott kép átlagos intenzitására. A megvilágítási profil minden lézer esetén homogénnek bizonyult, ezért nem volt szükség a megvilágítás inhomogenitását kompenzáló korrekcióra a kolokalizációs képek analízise során. Ugyanezt a Chroma tárgylemezt használtuk a lézerintenzitások időbeli stabilitásának ellenőrzésére is: a tárgylemez adott pontját 10 másodpercig gerjesztve képsorozatot vettünk fel az emittált intenzitásokról (1×10^6 adatpont). Az intenzitásokat a felvett sorozat középértékére normalizáltuk, majd az idő függvényében ábrázoltuk. Az így

kapott görbék alapján elmondhatjuk, hogy a lézerek időben stabil gerjesztést biztosítottak a méréshez.

A kolokalizációs vizsgálatok esetén kritikus szempont, hogy az adott objektumról (sejtről) a különböző csatornában felvett képek helyzete ne térjen el szignifikánsan. A potenciális térbeli eltolódás ellenőrzésére a DipImage program „correctshift” parancsát használtuk, ami átlagosan kisebb, mint 1 pixelnyi eltolódást mutatott. Tekintve, hogy egy pixel mérete (~51 nm) kisebb, mint a mikroszkóp laterális feloldása, a képek kiértékelése során az eltolódás korrekciójára nem volt szükség.

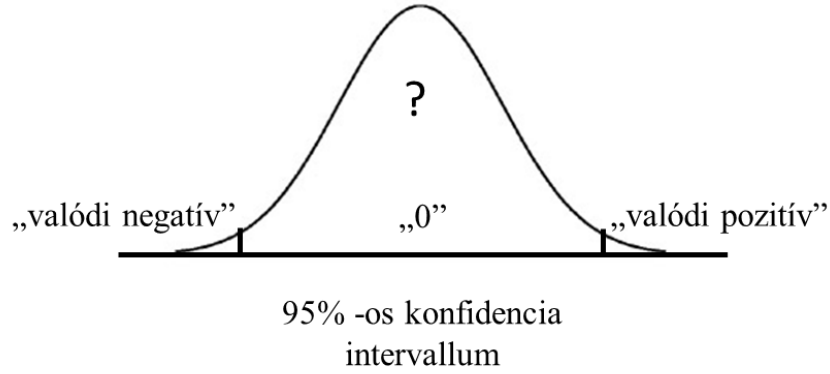
A membránalkotók térbeli kapcsolatának kvantitatív analízise során a sejteket először manuálisan körbe rajzoltuk, majd a maximum entrópia algoritmus alkalmazásával (Nagy Péter, MatLab plugin) szegmentáltuk a membrán és nem-membrán „tartalmú” pixeleket, valamint meghatároztuk a küszöb fluoreszcencia intenzitást. Ezt követően a program a szomszédos pixelekből a mikroszkóp laterális feloldásával összemérhető pixelblokkokat képzett. A kolokalizációt jellemző kvantitatív paramétereket a pixelblokkokban mérhető intenzitások alapján határoztuk meg.

4.4.1 Pearson-féle korrelációs analízis

Adott sejtre vonatkozó, az aktuálisan vizsgált két membránalkotó eloszlását rögzítő képpár esetén a Pearson-féle korrelációs együtthatót az (1) képlet segítségével határoztuk meg (lásd 2.6.1 fejezet). Ezt követően a képpár egyik tagjának pixelblokkjait véletlenszerűen újra rendezte („megkeverte”) a program, majd meghatározta az így kapott kép, illetve a képpár másik, változatlanul hagyott tagja közötti korrelációs koefficiens értékét. Ezt a folyamatot 500 alkalommal megismételve megkaphatjuk a korrelációs koefficiens eloszlását abban az esetben, amikor az egyes csatornában mért jelek (azaz a vizsgált membránalkotók) térbeli elhelyezkedése egymástól ténylegesen független ($C=0$). Az eloszlás segítségével minden egyes képpár (azaz minden egyes vizsgált sejt) esetén meghatározható az a 95%-os konfidencia intervallum, amelynek segítségével eldönthetjük, hogy az eredeti képpár (azaz a tényleges vizsgált sejt) esetén kapott korrelációs koefficiens tényleges korrelációt (antikorrelációt) valószínűsít-e. Az adott sejthez tartozó konfidencia intervallum segítségével három kategóriát definiálhatunk (8. ábra): „valódi pozitív”, „valódi negatív”, illetve „nulla” kategória. Amennyiben adott sejt esetén kapott Pearson korrelációs együttható az első két kategóriába esik, akkor a két membránalkotó térbeli lokalizációja

között tényleges korrelációt („valódi pozitív”) vagy anti-korrelációt (azaz a két membránalkotó szegregációját, „valódi negatív” kategória) valószínűsíthetünk.

Megjegyzendő, hogy amennyiben a C értéke a középső, „nulla” kategóriába esik, az nem feltétlenül jelenti két membránalkotó térbeli eloszlásának tényleges függetlenségét. Csak annyit jelent, hogy adott sejt esetén nincs statisztikai bizonyíték a nem véletlenszerű kapcsolatra.



8. ÁBRA: KORRELÁCIÓS EGYÜTTHATÓK KATEGORIZÁLÁSA A 95%-OS KONFIDENCIA INTERVALLUM ALAPJÁN

4.4.2 Membránalkotók átfedő hányadának meghatározása

A membránalkotók átfedő hányadának kvantitatív jellemzésére (együttes előfordulás vagy „co-occurrence” analízis) mind az intenzitás-, mind pedig a területalapú megközelítést alkalmaztuk (lásd 2.6.2 fejezet). Az intenzitásalapú együtthatókat (M_x^I és M_y^I) a Manders által kidolgozott (2) és (3) egyenletek segítségével határoztuk meg. 2 fluoreszcensen jelölt epitóp esetén az M_x^I jelentése az „x” epitóp átfedő hányada az „y” epitóppal, M_y^I pedig az „y” epitóp átfedő hányada az „x” epitóppal.

A területalapú (M_x^A és M_y^A) együtthatók számítása során az alábbi egyenleteket alkalmaztuk:

$$M_x^A = \frac{\sum_{i,j} A_{i,j}^{x \text{ kolok}}}{\sum_{i,j} A_{i,j}^x} \quad (12)$$

$$M_y^A = \frac{\sum_{i,j} A_{i,j}^{y \text{ kolok}}}{\sum_{i,j} A_{i,j}^y} \quad (13)$$

ahol $A_{i,j}^{x \text{ kolok}}$ x-szel jelölt epitóp csatornájában levő i,j blokkordinátájú, bináris változó: értéke 1, ha mindkét csatornában küszöb feletti fluoreszcens intenzitás detektálható

(„átfedő” pixelblokk), a többi pixel esetén értéke 0. Következésképpen $\sum_{i,j} A_{i,j}^x$ az átfedő pixelblokkok összterülete. $A_{i,j}^x$ az x -szel jelölt építőp csatornájában levő i,j blokkindexű bináris változó: küszöb feletti fluoreszcencia intenzitás esetén értéke 1, minden más pixelblokk esetén értéke 0. Következésképpen $\sum_{i,j} A_{i,j}^x$ azon pixelblokkok összterülete, melyek az x csatornában küszöbérték feletti intenzitással rendelkeznek. $A_{i,j}^y$ és $A_{i,j}^y$ analog módon definiálható a másik molekula (csatorna) esetén. Az M_x^A és M_y^A együtthatók a Manders-féle kolokalizációs együttható módosított változatának tekinthetők. Mind az intenzitásalapú, mind pedig a területalapú együtthatók számításánál ugyanazt a küszöbintenzitás meghatározási algoritmust alkalmaztuk.

Az átfedő hányad analízise során szintén alkalmaztuk a korrelációs együtthatók esetén bevezetett konfidencia intervallum módszert: az 4.4.1 fejezetben leírt módon meghatároztuk az átfedő hányad értékére vonatkozó konfidencia intervallumot arra az esetre, amikor a két molekula eloszlása véletlenszerű egymáshoz képest, majd a tényleges értéket ehhez az intervallumhoz viszonyítottuk. Abban az esetben tekintettük bizonyítottnak a két molekula átfedését az adott sejten, amennyiben az együttható értéke magasabbnak adódott, mint a konfidencia intervallum felső határa.

4.5 FRET vizsgálatok

A FRET mérések során a két membránalkotót (membránfehérje, illetve GM1 gangliozid) olyan specifikus markerekkel jelöltük meg, amelyeket egymással donor-akceptor párt képző fluorofórokkal konjugáltunk előzőleg. A sejteket formaldehiddel fixáltuk, majd poli-L-lizinnel bevont tárgylemezre helyeztük ki. Az egyes FRET módszerek esetén alkalmazott donor-akceptor festékpárokat az V. táblázat tartalmazza.

V. TÁBLÁZAT: AZ rFRET MÉRÉSEKNÉL HASZNÁLT DONOR ÉS AKCEPTOR FESTÉKPÁROK GERJESZTÉSI ÉS DETEKTÁLÁSI PARAMÉTEREI (ZEISS LSM 880 KONFOKÁLIS MIKROSKÓP)

Festék neve	Gerjesztés		Detektálási hullámhossz
	(lézer típusa,	hullámhossz)	
Alexa Fluor 546 (donor)	He-Ne	543 nm	548 - 628 nm
Alexa Fluor 647 (akceptor)	He-Ne	633 nm	638 - 759 nm

A FRET méréseket konfokális mikroszkóppal végeztük, a mikroszkóp típusát a megfelelő fejezetben ismertetem. A képeket a sejtek középső, ún. gyűrűszerű fluoreszcenciát mutató részéről készítettük. A képek felvétele során itt is a „szekvenciális üzemmódot” használtuk, így minimalizálva a csatornák közötti átvilágítás mértékét.

4.5.1 Az arányalapú FRET (ratiometric FRET, rFRET) mérések kivitelezése

Az rFRET méréseket egy Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkópon végeztük. A felvett képek 512×512 pixelből álltak, a pixelek XY irányú kiterjedése ~207 nm volt, a szeletvastagság pedig ~1 µm. A képeket 40× C-APOCHROMAT vízimmerziós objektívvel (NA = 1,2) készítettük. A felhasznált festékeket, gerjesztési és detektálási hullámhosszokat, lézereket az V. táblázatban foglaltam össze.

VI. TÁBLÁZAT: AZ rFRET MÉRÉSEKHEZ SZÜKSÉGES KORREKCIÓS FAKTOROK MEGHATÁROZÁSA

Korrektíós faktor	A faktor meghatározásához felhasznált intenzitások (gerjesztés/detektálás hullámhossza)
<i>Csak donorral jelzett mintából számítható</i>	
S_1 : donor fluorofór átvilágítása a FRET csatornába ($S_1 = I_2/I_1$)	I_2 : FRET csatorna (donor/FRET)
	I_1 : donor csatorna (donor/donor)
S_3 : donor fluorofór átvilágítása az akceptor csatornába ($S_3 = I_3/I_1$)	I_3 : akceptor csatorna (akceptor/akceptor)
	I_1 : donor csatorna (donor/donor)
<i>Csak akceptorral jelzett mintából számítható</i>	
S_2 : akceptor fluorofór átvilágítása a FRET csatornába ($S_2 = I_2/I_3$)	I_3 : akceptor csatorna (akceptor/akceptor)
	I_2 : FRET csatorna (donor/FRET)
S_4 : akceptor fluorofór átvilágítása a donor csatornába ($S_4 = I_1/I_3$)	I_1 : donor csatorna (donor/donor)
	I_3 : akceptor csatorna (akceptor/akceptor)

Minden látómezőben három fluoreszcencia intenzitást detektáltunk (I_1 , I_2 és I_3) az elméleti bevezetőben leírtaknak megfelelően (lásd 2.7.1 fejezet), melyek a donor, a FRET és az akceptor csatornában detektálható intenzitásoknak felelnek meg. A képek kiértékelése a Matlab alatt futó DipImage alkalmazással történt: a membrán és nem-membrán “tartalmú” pixeleket a „manually seeded watershed” algoritmussal

szegmentáltuk, majd az rFRET pluginnal meghatároztuk a FRET kiszámításához szükséges átvilágítási korrekciós faktorokat (S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , VI. táblázat) és a relatív fluoreszcencia hatásfokot (α faktor) (P. Nagy et al., 2016). Itt szükséges megjegyezni, hogy az általunk használt festékpárok esetén az S_3 és az S_4 korrekciós faktorok értéke megközelítőleg 0. Az α faktort olyan egyszeresen jelölt minták segítségével határoztuk meg, ahol ugyanazt az epitópot jelöltük meg a donor, illetve az akceptor festéket hordozó antitesttel („ M_a/M_d módszer”). Ez esetben feltételezhető, hogy a felkötődött antitestek átlagos száma egyenlő mindkét mintában. A moláris abszorpciós koefficiensek (ε) és jelölési arányok (L) ismeretében az α faktor a következőképp számítható:

$$\alpha = \frac{M_A \varepsilon_D^D L_D}{M_D \varepsilon_A^D L_A} \quad (14)$$

ahol M_D a donor átlagos fluoreszcens intenzitása a donor csatornában, M_A pedig az akceptor átlagos fluoreszcencia intenzitása a FRET csatornában.

Végezetül a FRET hatásfok kiszámítása a duplán (donor és akceptor festékekkel együttesen) jelölt sejteken történt a (7-9) egyenletrendszer megoldásával, watershed szegmentációt követően, a „maximum likelihood” közelítést használva. Az rFRET módszerrel a FRET hatásfok meghatározása sejtenként történt.

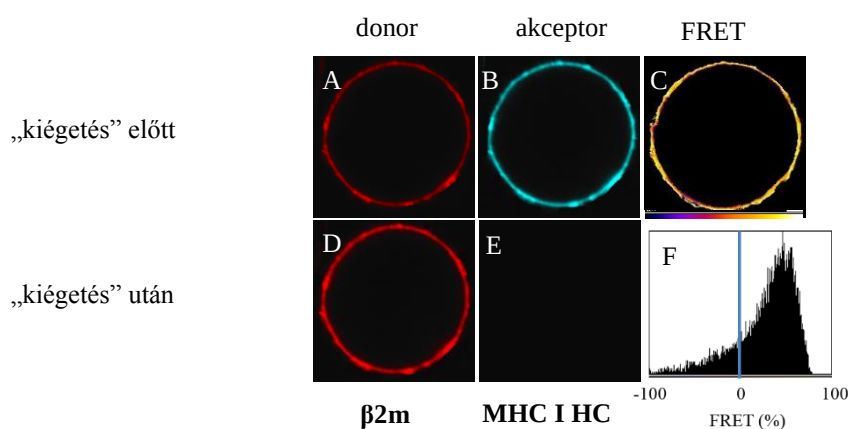
4.5.2 Akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET (accpbFRET) vizsgálatok

Az accpbFRET vizsgálatokat Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal végeztük. A képeket 60× UPLSAPO olajimmerziós objektívvel ($NA = 1,35$) vettük fel. A képek mérete 512×512 pixel, optikai szeletvastagsága $\sim 1\mu m$ volt. A pixelek XY irányú kiterjedése ~ 51 nm volt. A festékeket és a mérési paramétereket a VII. táblázat mutatja.

VII. TÁBLÁZAT: AZ ACCPBFRET MÉRÉSEKNÉL HASZNÁLT GERJESZTÉSI ÉS DETEKTÁLÁSI PARAMÉTEREK (OLYMPUS FLUOVIEW 1000 KONFOKÁLIS MIKROSKÓP)

Festék neve	Gerjesztés (lézer típusa, hullámhossz)		Detektálási hullámhossz
Alexa Fluor 546 (donor)	He-Ne	543 nm	555 - 625 nm
Alexa Fluor 555 (donor)			
Alexa Fluor 647 (akceptor)	He-Ne	633 nm	655 - 755 nm
Cy5 (akceptor)			

A mérések során a duplán jelzett (donor- és akceptor flurofórt egyaránt hordozó) sejtek donor és akceptor intenzitás-eloszlásáról egyszereletes, kétcsatornás konfokális képet rögzítettünk alacsony gerjesztő lézerintenzitás mellett (9/A és B ábra). Ezt követően a donor-gerjesztést kikapcsoltuk, majd az akceptor gerjesztésére használt lézerrel maximális teljesítményen több pásztázást végeztünk. Az ismétlődő (3×) pásztázások alkalmazásával az akceptor intenzitása gyakorlatilag nullára csökkent (fotoelhalványítás). Ezután egy újabb kétcsatornás képet vettünk fel alacsony lézerintenzitás mellett és vizsgáltuk a donor intenzitásának változását (9/D és E ábra). A képek kiértékelése során lowpass szűrést végeztünk a háttérzaj csökkentése érdekében.



9. ÁBRA: AZ AKCEPTOR FOTOELHALVÁNYÍTÁSON ALAPULÓ FRET VIZSGÁLATOK MENETE

Az ábra a vizsgálatainkban alkalmazott pozitív kontroll, azaz az MHC I glikoprotein két lánc (β2m és HC) közötti FRET példáján keresztül mutatja be az accpbFRET vizsgálatok menetét MT-2 sejteken.

A FRET hatásfok pixelenkénti meghatározásához az ImageJ AccPbFRET modulját használtuk (Roszik et al., 2008). Ez a program lehetővé tette olyan korrekciók használatát, mint a donor nem kívánt, illetve az akceptor nem tökéletes kiégetése (ez a FRET hatásfok alulbecslését eredményezheti), az akceptor, illetve az akceptor kiégetés fototermékének lehetséges átvilágítása a donor csatornába (fals pozitív eredményt adhat), illetve az egymás után felvett képek esetleges elcsúszását. A kiértékelés eredménye egy színekódolt FRET-térkép (9/C ábra), illetve az adott sejtre vonatkozó, pixelenkénti FRET hatásfok eloszlás hisztogram (9/F ábra). Egy adott fehérje párra jellemző átlagos FRET hatásfokot a sejtenkénti FRET hisztogramok medián értékeinek átlagolásával határoztuk meg.

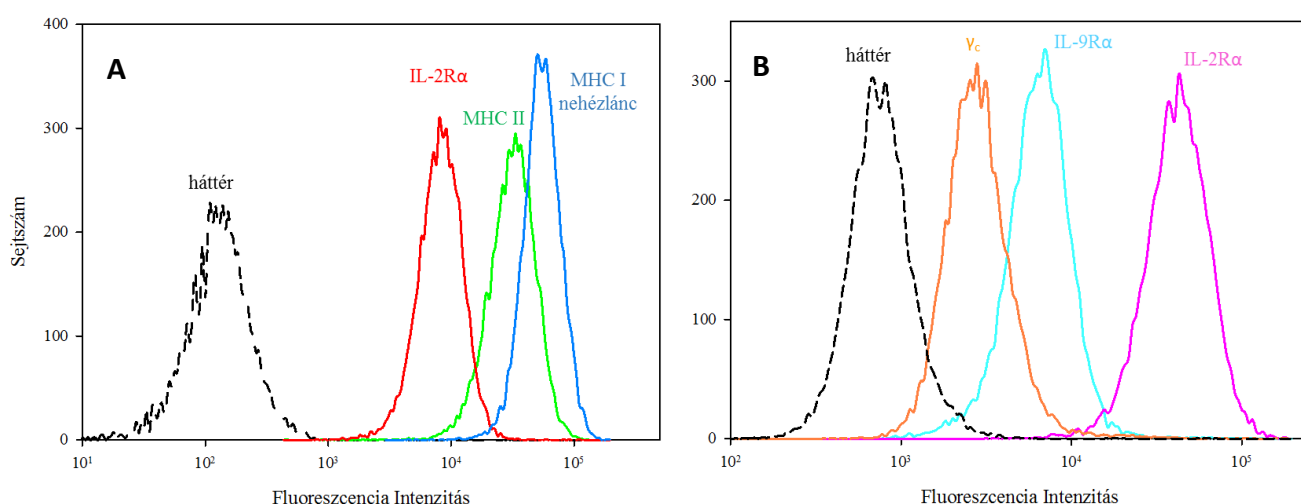
4.6 Statisztikai számítások

A kolokalizáció kvantitatív jellemzésére használt együtthatók összehasonlítására kétmintás t-próbát, illetve ANOVA tesztet használtunk, míg a rFRET értékek eloszlásának vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov tesztel végeztük. A számításoknál a $p < 0,05$ eseteket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Az IL-9R, az IL-2R α és az MHC glikoproteinek sejtfelszíni expressziója

A membránfehérjék térbeli kapcsolatának kvantitatív analíziséhez elengedhetetlen a vizsgált fehérjék expressziójának ismerete. A sejtfelszíni expressziót fluoreszcensen jelzett monoklonális antitestek kötődésének áramlási citometriás analízisével határoztuk meg. Itt kell megjegyezni, hogy bár expresszióról beszélünk, ezzel a módszerrel valójában az antitest kötőhelyek számát vizsgáljuk, ami a kötődést befolyásoló különféle hatások miatt (pl. sztérikus gátlás, jelölési arány), valamelyest eltérhet a fehérjék tényleges sejtfelszíni számától. Ugyanakkor nagyságrendbeli eltérést nem okoz, így a vizsgálatok tervezését és értelmezését nem befolyásolja.



10. ÁBRA: AZ MHC GLIKOPROTEINEK, AZ IL-2R α , AZ IL-9R α ÉS A γ_c SEJTFELSZÍNI EXPRESSZÓJA KIT225/IL-9R SEJTEKEN.

A fehérje expressziót az adott fehérjére specifikus, Alexa Fluor 546-tal konjugált monoklonális antitestekkel jelzett sejteken áramlási citometriával vizsgáltuk (lásd III.táblázat, IL-9R α esetén az AH9R4 antitestre vonatkozó hisztogramot mutatjuk be). Az ábra „A” része a magasabb (MHC I és II), míg a „B” rész az alacsonyabb expressziójú fehérjékre (γ_c , IL-9R α) vonatkozó adatokat mutatja. A kötőhelyek számának meghatározása során az egyes hisztogramok átlagát a háttérrel és az adott monoklonális antitest jelölési arányával korrigáltuk. A kötőhelyek abszolút számát ismert számú festékmolekulát hordozó mikrogöngyök segítségével kalibráltuk (lásd Anyagok és módszerek).

A 10. ábrán bemutatott reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok az MHC I és II glikoproteinek, az IL-2R α , az IL-9R α , valamint a γ_c alegység kifejeződését mutatják IL-2 jelenlétében növesztett Kit225/IL-9R sejteken. A vizsgált fehérjék szignifikánsan eltérő sejtfelszíni számossága miatt az áramlási citométeres vizsgálatok során eltérő beállítások

használatára volt szükség. A 10. ábra „A” része a magasabb (MHC I és II), míg a „B” rész az alacsonyabb expressziójú fehérjékre (γ_c , IL-9R α) vonatkozó adatokat mutatja. A köztes számosságú IL-2R α esetén a méréseket mindkét beállítással elvégeztük, lehetővé téve ezzel a fehérje expressziók összehasonlítását. A magas affinitású IL-2R expressziója és az MHC II konstitutív kifejeződése alapján mindkét sejtvonal az aktivált T sejtekre jellemző fenotípussal rendelkezik.

A VIII. táblázat a fehérjék relatív expressziós szintjét mutatja Kit225/IL-9R és MT-2 humán T limfóma sejteken. Az adatokat az MHC I glikoprotein nehézláncának (HC) expressziójára normalizálva adtuk meg. Fluoreszcens mikroyöngyökkel végzett kalibráció alapján az MHC I glikoproteinek száma a két sejten $\sim 1,5 (\pm 0,13) \times 10^6$ (Kit225/K6), illetve $\sim 3,3 (\pm 0,11) \times 10^6$. Ezen adatok ismeretében a többi fehérje abszolút számossága, valamint – a sejtek méretének ismeretében – átlagos sejtfelszíni denzitásuk is meghatározható. Ez utóbbi adatra a FRET eredmények értelmezéséhez lesz szükség (lásd később). A sejtek átmérőjét konfokális mikroszkópiás képek segítségével határoztuk meg. A Kit225/IL-9R sejtek átlagos átmérője $11,3 \pm 1,2 \mu\text{m}$ -nek, míg az MT sejtek átlagos átmérője $17,5 \pm 2 \mu\text{m}$ -nek adódott.

VIII. TÁBLÁZAT: RELATÍV FEHÉRJE EXPRESSZIÓS SZINTEK KIT22/IL-9R ÉS MT-2 SEJTEKEN.

A kötőhelyek relatív számát az MHC I glikoprotein HC expressziójához viszonyítva adtuk meg. (A meghatározás módját lásd 10. ábra és 4.3 fejezet.)

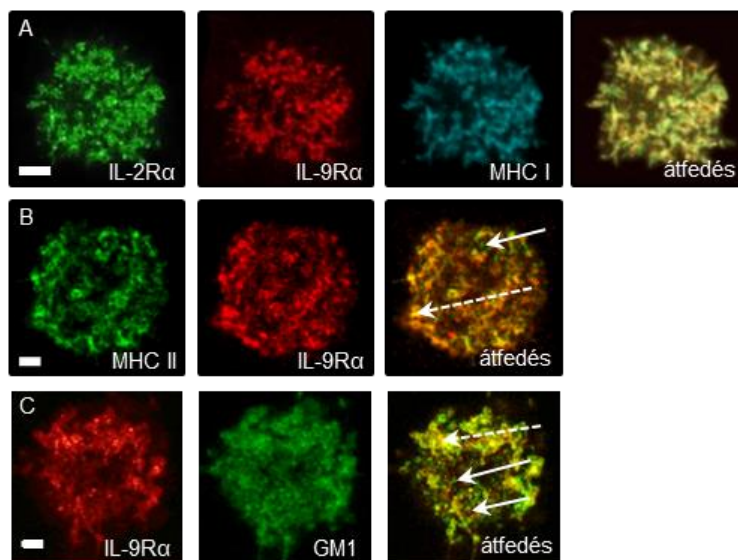
Jelölt epitóp	Relatív expresszió (%)	
	átlag $\pm$ SD	
	Kit225/IL-9R	MT-2
IL-9Rα	$1,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$
IL-2Rα	$16 \pm 1,2$	$13,2 \pm 0,8$
γ_c	$0,6 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,1$
MHC II	51 ± 10	$50 \pm 3,3$
MHC I HC	$100 \pm 8,9$	$100 \pm 3,2$

5.2 Az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolata

5.2.1 Konfokális mikroszkópiás képek vizuális analízise

Az IL-9R α és a korábbi vizsgálataink által feltárt IL-2R/MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolatát konfokális mikroszkópiás képek analízisével vizsgáltuk. Kísérleteink során a sejteket két vagy három, egymástól spektrálisan elkülöníthető fluorofórt hordozó specifikus jelölővel (lásd 4.2 fejezet) jelöltük meg.

A 11. ábrán egy reprezentatív képsorozat látható, amely az IL-9R α és az IL-2R α (11/A sor), az IL-9R α és az MHC glikoproteinek (11/A és B sorok), valamint az IL-9R α és a GM1 tartalmú lipid tutajok kapcsolatát mutatja (11/C sor). Bár eltérő mértékben, de minden esetben jelentős átfedést tapasztaltunk az IL-9R α és felsorolt fehérjék, valamint a GM1-tartalmú lipid tutajok által elfoglalt régiók között (kevert színű membránterületek az



11. ÁBRA: AZ IL-9R α KOLOKALIZÁCIÓJA AZ MHC I ÉS II GLIKOPROTEINEKKEL, AZ IL-2R α ALEGYSÉGGEL ÉS A GM1 TARTALMÚ LIPID TUTAJOKKAL

(A) Az IL-9R α , az IL-2R α és MHC I KOLOKALIZÁCIÓJA KIT225/IL-9R SEJTEKEN.

(IL-2R α : Alexa Fluor 488-anti-Tac, IL-9R α : Alexa Fluor 546-AH9R7, MHC I HC: Alexa Fluor 647-W6/32)

(B) Az IL-9R α és MHC II KOLOKALIZÁCIÓJA MT-2 SEJTEKEN

(IL-9R α : Alexa Fluor 546-AH9R7, MHC II: Alexa Fluor 488-L243).

(C) Az IL-9R α és a GM1 –TARTALMÚ LIPID TUTAJOK KOLOKALIZÁCIÓJA MT-2 SEJTEKEN

(IL-9R α : Alexa Fluor 546-AH9R7, GM1: Alexa Fluor 647-CTX).

Az “átfedés” képeken láthatók az egyes sejtalkotók által közösen (szaggatott nyíllal jelölt, sárga területek) és egyedül használt membránterületek (tömött nyíl, piros/zöld terület).

skála: 2 μ m

átfedést mutató képeken). A CLSM képek alapján az IL-9R α , az IL-2R α és az MHC I fehérjék páronkénti kolokalizációja elsősorban azon membránerületeken koncentrálódik, ahol mindhárom fehérje jelen van (11/A sor).

A közös membránrégiókban való együttes előfordulás mellett az IL-9R α és az előzőekben felsorolt membránalkotók különálló membránrégiókban történő megjelenését is megfigyelhettük (11. ábra, folytonos nyilak). A szegregált domének jelenléte nem korlátozódott a magasabb számosságú membránalkotóra. Az egyes párok esetén az átfedő és nem átfedő membránerületek aránya sejtenként változó mértéket mutatott.

5.2.2 Konfokális mikroszkópiás képek korrelációs analízise

Bár a CLSM képek vizuális analízise feltárhatja az egyes membránalkotókat tartalmazó membránerületek átfedését (vagy az átfedés hiányát), ugyanakkor csakis kvalitatív információval szolgál, így önmagában nem elegendő a fehérjék térbeli viszonyának jellemzésére. A szubjektív tényezők, így pl. az egyes membránalkotók expressziós szintje, s így azok „láthatósága”, jelentősen befolyásolhatja az analízis eredményét. Emellett nem ad módot a nem valós, azaz csupán a véletlennek köszönhető kolokalizáció kizárására sem.

A fentiek miatt elvégeztük a képek kvantitatív analízisét a membránalkotók páronként számolt Pearson-féle keresztkorrelációs együtthatóinak segítségével. A megfelelő pozitív és negatív biológiai kontrollok használatán túl a Costes módszer alkalmazásával megalkotott konfidencia intervallum alapján (lásd 4.4.1 fejezet) minden sejtet besoroltunk a következő kategóriák valamelyikébe: „valódi pozitív”, „valódi negatív” és „nulla”, attól függően, hogy a kapott korrelációs koefficiens értéke a 95%-os konfidencia intervallum fölé, alá vagy éppen az intervallumba esett. Az együtthatók átlagát ezután a különböző kategóriákon belül számítottuk. Összesített eredményeink a IX. táblázatban láthatók. A 12. ábra az egyes korrelációs kategóriákba eső sejtek arányát mutatja. Az egyes membránalkotók jelzésére használt antitestek jelölésére spektrálisan elkülönülő festékeket használtunk (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647).

IX. TÁBLÁZAT: PEARSON KORRELÁCIÓS ANALÍZIS EREDMÉNYE KIT225/IL-9R ÉS MT-2 SEJTEKEN
A táblázat a valódi pozitív („+”) és valódi negatív („-”) korrelációs kategóriákba eső sejtek átlagos Pearson együtthatóját ($\pm$ SD) mutatja. A membránalkotókat a III. táblázatban feltüntetett markerekkel jelöltük meg, az IL-9R α esetén az AH9R7 antitesttel kapott értékeket mutatjuk be. [a] Kit225/IL-9R sejtek: $n \geq 30$; [b] MT-2 sejtek: $n \geq 20$; [c] $n \geq 12$; [d] egyetlen sejt esett ebbe a kategóriába, nincs SD.

Jelzett membránalkotók	Korrelációs kategória	Pearson együttható (átlag $\pm$ SD)	
		Kit225/IL-9R ^a	MT-2 ^b
IL-9R α + IL-2R α	-	- 0,33 $\pm$ 0,12	- 0,36 $\pm$ 0,17
	+	0,38 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,18
IL-9R α + MHC I HC	-	- 0,39 $\pm$ 0,16	- 0,39 $\pm$ 0,15
	+	0,35 $\pm$ 0,22	0,46 $\pm$ 0,18
IL-9R α + MHC II	-	- 0,39 $\pm$ 0,17	- 0,30 $\pm$ 0,12
	+	0,41 $\pm$ 0,21	0,43 $\pm$ 0,18
IL-9R α + GM1	-	- 0,30 $\pm$ 0,22	- 0,36 $\pm$ 0,16
	+	0,42 $\pm$ 0,23	0,39 $\pm$ 0,19
IL-2R α + MHC I HC	-	- 0,32 $\pm$ 0,16	- 0,28 $\pm$ 0,19
	+	0,43 $\pm$ 0,20	0,47 $\pm$ 0,21 ^c
IL-2R α + MHC II	-	- 0,14 ^d	nincs adat ^e
	+	0,57 $\pm$ 0,17	0,48 $\pm$ 0,17
TrfR + GM1	-	- 0,39 $\pm$ 0,16	- 0,43 $\pm$ 0,17
	+	0,28 $\pm$ 0,14	0,37 ^d
MHC I HC + β 2m	-	nincs adat	nincs adat
	+	0,74 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,09 ^c

5.2.3 Pozitív és negatív kontroll minták

A pozitív biológiai kontrollként használt MHC I két lánc ($\beta 2m$ és HC) közötti Pearson-együttható értékek mindegyike a valódi pozitív kategóriába esett, átlagértéke a várakozásoknak megfelelően mindkét sejt esetében magas pozitív ($\langle C \rangle \sim 0,7 - 0,8$) értéknek adódott. A negatív biológiai kontrollként használt transferrin receptor (TrfR) és a lipid tutajokban feldúsuló GM_1 gangliozid esetében a sejtek nagy része (80%) a valódi negatív kategóriába esett ($\langle C \rangle \sim -0,4$ átlaggal), ami – ismerve a két molekula egymástól jól elkülönülő membrándoménekben történő feldúsulását – szintén várható volt (IX. táblázat, 12/I,J és K,L ábrák). Ugyanakkor a burkolt csapdák és a lipid raftok mérete miatt (lásd 2.6.3 fejezet) az elméletileg várthoz képest kevésbé negatív korrelációs koefficiens értéket kaptunk. Megjegyzendő, hogy a negatív kontroll esetén a sejtek egy kis hányada a valódi pozitív kategóriába esett, ami leginkább a TrfR és GM_1 molekulák alacsony sejtfelszíni kifejeződésének és/vagy a jelölési hatékonyságnak köszönhető, amely csökkenti a jel/zaj arányt, ezzel egyidejűleg pedig a számítás pontosságát is.

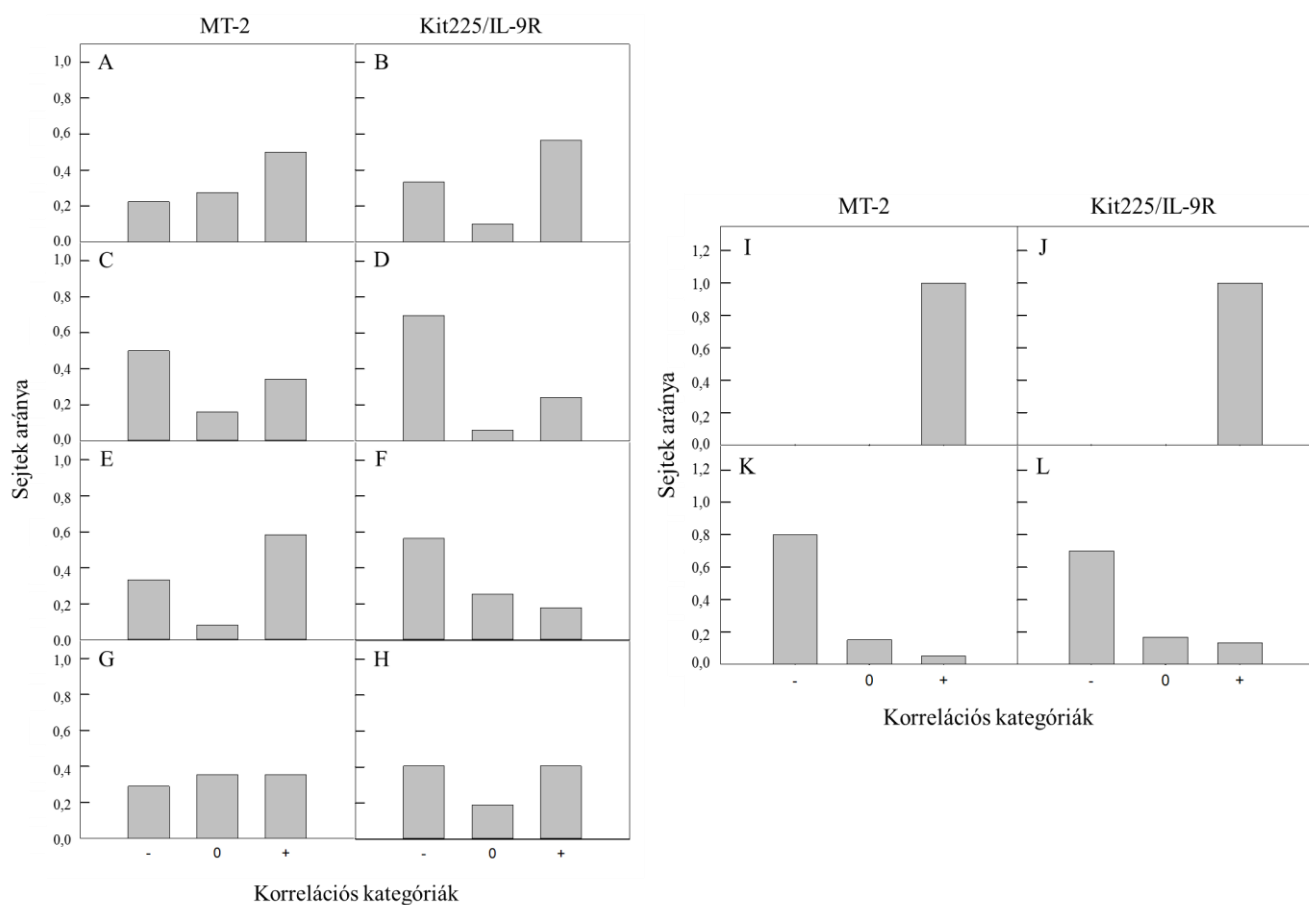
5.2.4 Az IL-2R α és az MHC glikoproteinek membrándomén szintű kapcsolata

A Kit225/IL-9R sejtvonal a Kit225 sejtvonalnak az az IL-9R α alegységgel stabilan transzfektált változata. Korábban kimutatták, hogy az IL-2R és az MHC fehérjék jelentős részt közös membránrégiókban dúsulnak fel a Kit225 sejteken (lásd 2.8 fejezet): így először azt ellenőriztük, hogy a transzfekció módosította-e az IL-2R és az MHC glikoproteinek kolokalizációját. Eredményeink megerősítették mind az MHC I, mind pedig az MHC II fehérjék nagymértékű, nem véletlenszerű átfedését az IL-2R α alegységgel a Kit225/IL-9R sejteken. Az IL-2R α /MHC II pár esetén gyakorlatilag az összes sejt a valódi pozitív kategóriába esett, $\sim 0,6$ -os C értékkel, míg az IL-2R α /MHC I HC pár esetén a sejtek többsége (60%-a) esett ebbe a kategóriába $\sim 0,5$ körüli C értékkel (IX. táblázat). Hasonló eredményeket kaptunk az eddig még nem vizsgált, az IL-9R-t konstitutívan kifejező MT-2 sejtek esetén is.

Fontos megjegyezni, hogy az IL-2R α /MHC I pár esetén a sejtek egy kisebb hányada (Kit225/IL-9R esetén a sejtek 30%-a, MT-2 esetén a sejtek 10%-a) a valódi negatív kategóriába esett, ami arra utal, hogy ezek a fehérjék egymástól elkülönülő membránrégiókban is megtalálhatók.

5.2.5 Az IL-9R α és az IL-2R α /MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolata

Már a CLSM képek kvalitatív analízise alapján feltételezhető volt az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek többi tagjának jelentős mértékű átfedése mindkét vizsgált sejttípus esetén (11. ábra). A képek kvantitatív analízise megerősítette ezt a feltételezést: a sejtek jelentős százaléka a „valódi pozitív” korrelációs kategóriába esett mind az IL-9R α és az IL-2R α , mind pedig az IL-9R α és az egyes MHC glikoproteinek térbeli kapcsolatát tekintve (12. ábra).



12. ÁBRA: A COSTES-MÓDSZERREL MEGHATÁROZOTT KORRELÁCIÓS KATEGÓRIÁKBA ESŐ SEJTEK ARÁNYA MT-2 ÉS KIT225/IL-9R SEJTEKEN

(A-B) IL-9R α (AH9R7) és IL-2R α (aTac)
 (C-D) IL-9R α (AH9R7) és MHC I HC (W6/32)
 (E-F) IL-9R α (AH9R7) és MHC II (HLA-DR) (L243)
 (G-H) IL-9R α (AH9R7) és GM1 (CTX-B)
 (I-J) MHC I HC (W6/32) és β 2m (L368)
 (K-L) TfR (MEM75) és GM1 (CTX-B alegység)

A Pearson korrelációs koefficiens értéke közepesen magasnak ($\langle C \rangle \sim 0,4$) adódott. Hasonló eredményt kaptunk az IL-9R α és a GM1 tartalmú lipid tutajok viszonylatában is.

A korrelációs analízise alapján a sejtek egy része a „valódi negatív” korrelációs kategóriába esett, megerősítve azt, a CLSM képek vizuális analízise során felvetődött lehetőséget, miszerint az IL-9R α és a többi vizsgált membránalkotó kolokalizációja nem teljes mértékű: az átfedő domének mellett az IL-9R α és a vizsgált molekulák egymástól különálló (szegregált) membránrégiókban is előfordulhatnak (11. ábra). A „valódi negatív” kategóriába eső sejtek aránya az IL-9R α /MHC I esetén volt a legmagasabb (MT-2: ~50%, Kit225/K6: ~70%) (12. ábra).

A korrelációs analízise alapján a sejtek egy része a „valódi negatív” korrelációs kategóriába esett, megerősítve azt, a CLSM képek vizuális analízise során felvetődött lehetőséget, miszerint az IL-9R α és a többi vizsgált membránalkotó kolokalizációja nem teljes mértékű: az átfedő domének mellett az IL-9R α és a vizsgált molekulák egymástól különálló (szegregált) membránrégiókban is előfordulhatnak (11. ábra). A „valódi negatív” kategóriába eső sejtek aránya az IL-9R α /MHC I esetén volt a legmagasabb (MT-2: ~50%, Kit225/K6: ~70%) (12. ábra).

5.3 Az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek molekuláris szintű kölcsönhatása

Kimutattuk tehát, hogy az IL-9R – legalábbis részben – az IL-2R/MHC fehérjékkel azonos membrándoménekben (lipid tutajokban) található. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a doménszintű kapcsolat mellett vajon „közelebbi”, molekuláris szintű kölcsönhatás is fennáll-e az IL-9R és az IL-2R/MHC klaszterek között. Kísérleteinkben az akceptor fotoelhalványításra alapuló FRET módszert alkalmaztuk, amelynek során a donor-, illetve akceptor fluorofórt hordozó monoklonális antitestekkel jelöltük meg a vizsgálni kívánt fehérjéket, majd konfokális mikroszkópos képeket vettünk fel a donor intenzitás sejtenkénti eloszlásáról az akceptor fluorofór jelenlétében, illetve annak fotoelhalványítását követően (lásd 4.5.2 fejezet). A módszer lényegét bemutató 9. ábra egyben a vizsgálataink során alkalmazott pozitív kontrollra, azaz az MHC I glikoprotein két lánc közötti FRET-re vonatkozó eredményünket is demonstrálja MT-2 sejteken. Negatív kontrollként a transzferrin receptor és a GM1 gangliosid párt alkalmaztuk.

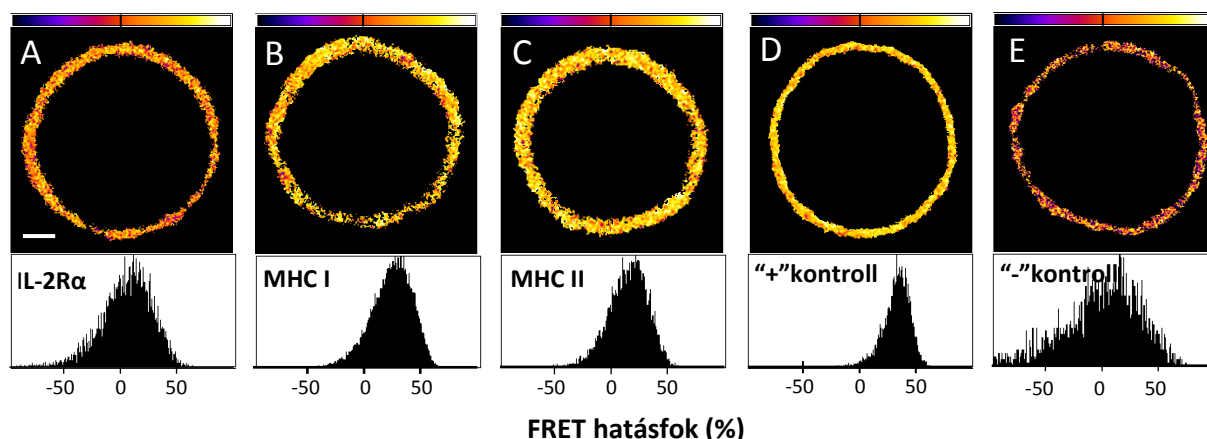
FRET kísérleteink során mindig az alacsonyabb számosságú epitópot jelöltük meg a donor, míg a magasabb számosságút az akceptor fluorofórt hordozó antitesttel (illetve a GM1 gangliozid esetében a CTX-B alegységgel). Az egyes epitópok relatív expressziós szintjeit a 5.1 fejezetben ismertettem, a FRET kísérletek tervezése és kivitelezése az ott közölt expressziós adatoknak megfelelően történt.

Az accpbFRET vizsgálatok eredményeit a X. táblázatban foglaltam össze. A 13. ábrán pedig reprezentatív FRET hatásfok képeket, illetve a hozzájuk tartozó hisztogramokat mutatok be Kit225/IL-9R sejteken.

X. TÁBLÁZAT: FRET HATÁSFOKOK KIT225/IL-9R ÉS MT-2 SEJTEKEN

A táblázatban szereplő FRET-hatásfokok a pixelenként mért hatásfokok gyakorisági hisztogramjának medián értékeit átlagoltuk és kiszámítottuk a szórást ($n \geq 10$). A statisztikai számításokat úgy végeztük, hogy ezeket az átlagokat összehasonlítottuk a negatív kontrollnál kapott értékekkel ($p < 0,001$). Donor fluorofórként Alexa Fluor 546 vagy Alexa Fluor 555 (CTX B esetén), míg akceptorként Alexa Fluor 647 festéket alkalmaztunk.

JELÖLT EPITÓPOK	DONOR	AKCEPTOR	E $\pm$ SD (%)	
			Kit226/IL-9	MT-2
IL-9Rα + IL-2Rα	AH9R4	anti-Tac	6,4 $\pm$ 2,3	5,2 $\pm$ 2,1
	AH9R7	anti-Tac	6,6 $\pm$ 2,1	6,1 $\pm$ 3,4
IL-9Rα + MHC I HC	AH9R7	W6/32	17,2 $\pm$ 6,1	13,5 $\pm$ 7,0
IL-9Rα + MHC II	AH9R7	L243	15,9 $\pm$ 5,1	10,2 $\pm$ 5,2
IL-2Rα + MHC I HC	anti-Tac	W6/32	21,7 $\pm$ 5,7	22,5 $\pm$ 5,2
IL-2Rα + MHC II	anti-Tac	L243	21,9 $\pm$ 3,9	11,9 $\pm$ 2,9
TrfrR + GM1	MEM75	CTX B	0,2 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 1,5
β2m + MHC I HC	L368	W6/32	30,3 $\pm$ 5,3	35,4 $\pm$ 5,4



13. ÁBRA: AZ IL-9R α ÉS AZ IL-2R α /MHC KLASZTEREK MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSA KIT225/IL-9R SEJTEKEN (A-C) Pixelenkénti FRET hatásfok térképek és gyakorisági hisztogramok az IL-9R α és az IL-2R/MHC klaszterek feltüntetett tagjai között. Minden esetben az Alexa Fluor 546 festéket hordozó antitesttel (AH9R4 vagy AH9R7) jelzett IL-9R α szolgált donorként. Az IL-2R α , MHC I és II fehérjéket akceptor fluorofórral (Alexa Fluor 647) konjugált monoklonális antitestekkel (antiTac, W6/32, illetve L243) jelöltük.

(D-E) Pixelenkénti FRET hatásfok térképek és gyakorisági hisztogramok a pozitív (β 2m és MHC I HC) és a negatív kontroll (GM1 gangliozid és TrfR) esetén. Jelölések: β 2m – Alexa Fluor 546-L368, MHC I HC – Alexa Fluor 647-W6/32, GM1 - Alexa Fluor 555-CTX, TrfR- Alexa Fluor 647-MEM75

A FRET hatásfok térképeket a donor csatornában az akceptor kiégetése előtt és után felvett képek alapján határoztuk meg. A szinkódolt skála a -100% (fekete) és a +100% (fehér) közötti FRET hatásfok értékeket mutatja. A háttértől alacsonyabb intenzitású pixeleket fekete színnel jelöltük. Skála: 2 μ m.

Mint az várható is volt, a β 2m és az MHC I HC között mindkét sejtvonal esetén magas pozitív FRET hatásfokot kaptunk (~30-35%), míg a negatív kontroll (GM1 gangliozid és transferrin receptor) esetén alacsony, nullához közelítő (~1-2%) átlagos FRET értéket detektáltunk (X. táblázat, 9. és 13/D,E. ábra).

Ezt követően ellenőriztük, hogy az IL-2R és az MHC glikoproteinek korábban számos aktivált, illetve limfóma eredetű T sejten feltárt molekuláris közelsége az általunk vizsgált sejtvonalakon is megfigyelhető-e. Az IL-2R α és az MHC I között mindkét sejtvonalon magas (~22%) FRET hatásfokot detektáltunk. Hasonló nagyságrendű FRET hatásfokot kaptunk az IL-2R α és az MHC II fehérjék között a Kit225/IL-9R sejtvonalon, míg az MT-2 sejtvonalon a FRET hatásfok értéke valamelyest alacsonyabbnak, de a negatív kontrolltól továbbra is szignifikánsan magasabbnak adódott (X. táblázat, $\langle E \rangle \sim 12\%$, $p < 0,02$). Eredményeink alapján tehát mindkét sejtvonalon kimutatható az IL-2R és az MHC glikoproteinek molekuláris közelsége.

A továbbiakban megvizsgáltuk az IL-9R α és az IL-2R/MHC klaszterek elemeinek molekuláris közelségét (13/A,B,C ábra, X. táblázat). Mindkét sejtvonal esetén magas FRET hatásfokot detektáltunk az IL-9R α és mindkét típusú MHC fehérje között (MHC I: $\langle E \rangle \sim$

17% és ~13%, MHC II: $\langle E \rangle$ ~16% és ~10% a Kit225/IL-9R, illetve az MT-2 sejteken). Az IL-9R α és az IL-2R α közötti FRET hatásfok alacsonyabbnak adódott ($\langle E \rangle$ ~5-6%), de szignifikánsan meghaladta a negatív kontrollra kapott értéket ($p < 0,02$).

A következőkben számítással ellenőriztük, hogy a detektált FRET hatásfok értékek esetén mekkora lehet a random (véletlen által generált) FRET hozzájárulása. A sejtek méretének, illetve az egyes fehérjék (pontosabban antitest kötőhelyek) abszolút számának ismeretében (lásd 5.1 fejezet) meghatároztuk a vizsgált fehérjék átlagos sejtfelszíni denzitását. Monomer jellegű akceptorok esetén kb. 7000 molekula/ μm^2 denzitás esetén lenne a random FRET értéke az általunk detektált hatásfokokkal összemérhető (King et al., 2014). Esetünkben a legmagasabb expresszióval rendelkező MHC I és MHC II esetén a denzitás értéke ~3700, illetve ~2000 molekula/ μm^2 , emellett mindkét molekula jellemzően oligomerek formájában van jelen (Matko et al., 2002), így a véletlen által generált FRET hozzájárulása MHC I vagy II akceptor esetén csupán néhány százalék lenne. Az IL-2R α esetén az átlagos receptor denzitás kb. 500-600 molekula/ μm^2 , így amennyiben az IL-2R α szerepelt akceptorként, a random FRET esetleges hozzájárulása még inkább elhanyagolható.

5.4 Az IL-9R és az IL-2R membrándomén szintű kapcsolata: Manders-féle együttes előfordulás (co-occurrence) analízis

Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk az IL-9R α és IL-2R α kapcsolatáról, illetve hogy megnézzük, hogy a korrelációs analízissel kimutatott átfedő- és szegregált membránrégiók vajon előfordulhatnak-e ugyanazon a sejten, a konfokális mikroszkópos képek korrelációs analízisét kiegészítettük a Manders-féle együttes előfordulás (co-occurrence) analízissel. Ezzel a módszerrel a membránalkotók egymással átfedő hányada határozható meg.

Amellett, hogy az átfedő hányad mértékét jellemző együtthatókat meghatároztuk azokra a sejtekre, amelyekre vonatkozóan a Pearson-féle korrelációs analízis eredményét korábban már bemutattam (IX. táblázat), új kísérleteket is végeztünk, ahol mindkét típusú analízist elvégeztük.

Eredményeinket a XI. táblázatban foglalom össze. A 2.6.2 és 4.4.2 fejezetekben ismertetett kétféle (intenzitás- és területalapú) kolokalizációs együtthatók értékét hibahatáron belül azonosnak találtuk. Ezen egyezés lehetséges magyarázatát a Megbeszélés fejezetben tárgyalom. Az egyezés miatt a továbbiakban csak az intenzitásalapú Manders együtthatókat ismertetem, mégpedig a Costes-féle konfidencia intervallum módszerrel meghatározott, korrelációs kategóriánkénti bontásban. Az analízist két különböző festékpár (Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647, illetve Alexa Fluor 488 és Alexa Fluor 546) esetén is elvégeztük.

XI. TÁBLÁZAT: IL-9R α ÉS IL-2R α DOMÉNSZINTŰ KAPCSOLATA KIT225/IL-9R SEJTEKEN: KOMBINÁLT KORRELÁCIÓS ÉS EGYÜTTES ELŐFORDULÁS ANALÍZIS EREDMÉNYEI

A táblázat a Pearson-féle korrelációs együttható (C), illetve a Manders-féle intenzitás alapú kolokalizációs együtthatók ($M_{IL-9R\alpha}$ és $M_{IL-2R\alpha}$) értékét (átlag $\pm$ SD) mutatja a Costes módszer alapján meghatározott korrelációs kategóriákban két különböző festékpár esetén. Az M együtthatók esetén indexben jeleztem, hogy mely fehérje másikkal átfedő hányadára vonatkozik. Az IL-9R α -et és IL-2R α -et a feltüntetett, spektrálisan elkülöníthető fluorofórokat hordozó AH9R4, illetve antiTac monoklonális antitesttel jelöltük meg. [a] n=19; [b] n=27

	KORRELÁCIÓS KATEGÓRIÁK		
	“valódi negatív”	“0”	“valódi pozitív”
Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 647-antiTac ^a			
Százalékos eloszlás	37 %	37 %	26 %
<C>$\pm$SD	-0,34 $\pm$ 0,15	0,03 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,19
<M_{IL-9R}>$\pm$SD	0,39 $\pm$ 0,18	0,59 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,12
<M_{IL-2R}>$\pm$SD	0,17 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,15
Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 488-antiTac ^b			
Százalékos eloszlás	22 %	37 %	41 %
<C>$\pm$SD	-0,35 $\pm$ 0,16	0,04 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,17
<M_{IL-9R}>$\pm$SD	0,30 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,16	0,74 $\pm$ 0,19
<M_{IL-2R}>$\pm$SD	0,24 $\pm$ 0,09	0,46 $\pm$ 0,22	0,49 $\pm$ 0,29

A különböző festékpárokkal történő vizsgálatok között nem volt szignifikáns különbség, azaz jelöléstől függetlenül ugyanolyan eredményeket kaptunk a két α alegység átfedő hányadára vonatkozóan.

A Pearson-analízishez hasonlóan a Manders együtthatók esetében is meghatároztuk minden sejt esetén a véletlenszerű eloszláshoz tartozó konfidencia intervallumot (lásd 4.4.1 fejezet), ugyanakkor – az együttható értéke által hordozott információ eltérő jellege miatt – ebben az esetben egyoldali összehasonlítást végeztünk. A kapott együtthatók értéke minden egyes vizsgált sejt esetén a konfidencia intervallum felé esett, azaz az átfedés mértéke minden esetben szignifikánsan meghaladta a csupán a véletlen által generált együttes előfordulásra vonatkozó értéket.

Várákozásainknak megfelelően a „valódi pozitív” korrelációs kategóriába eső sejtek esetén mind az IL-9, mind pedig az IL-2 receptor α alegysége jelentős mértékű átfedést mutatott a másik receptor α alegységével. Az IL-9R α esetén az átfedő hányad összemérhető volt a pozitív biológiai kontrollként használt β 2m és az MHC I HC egymással átfedő hányadára kapott értékekkel ($M_{\beta 2m} = 0,70 \pm 0,22$ és $M_{HC} 0,83 \pm 0,13$). Eszerint az IL-9R α döntő többsége az IL-2R α alegységgel azonos membránrégióban helyezkedik el. Az IL-2R α esetén az átfedő hányad valamivel kisebbnek, kb. 50%-nak adódott.

A „valódi negatív” kategóriába eső sejtek esetén jóval alacsonyabb, ugyanakkor – a véletlen által generálthoz képest – még mindig szignifikáns mértékű átfedést tapasztaltunk a két receptor α alegysége között, azaz a két fehérje szegregációja nem teljes. Ezt támasztja alá az is, hogy a negatív biológiai kontrollként használt transferrin receptor és GM1 gangliosid esetén kapott értékektől ($M_{TfR} = 0,16 \pm 0,11$; $M_{GM1} = 0,14 \pm 0,16$; $C = -0,47 \pm 0,15$) szignifikánsan magasabb a két α alegység átfedését jellemző együttható értéke.

A középső, azaz „0” kategória esetén a Manders-féle kolokalizációs együtthatók értéke a „valódi pozitív” és „valódi negatív” kategóriákban kapott értékekhez képest köztes nagyságúnak tekinthető. Ez alól egyetlen kivétel volt, mégpedig az Alexa Fluor 546-AH9R4 és Alexa Fluor 488-antiTac pár, ahol az IL-2R α alegységnek az IL-9R α láncsal átfedő hányada hasonló mértékűnek adódott a „valódi pozitív” kategóriában tapasztaltnak.

Fontos megemlíteni, hogy az IL-9R α alegységnek az IL-2R α láncsal átfedő hányada minden esetben nagyobbak adódott, mint az IL-2R α alegység IL-9R α láncsal átfedő hányada. Az Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 647-antiTac pár esetén minden korrelációs kategóriában szignifikánsan nagyobb volt az IL-9R α átfedő hányada. Az Alexa

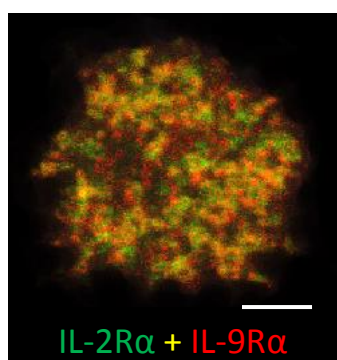
Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 488-antiTac pár esetén hasonló tendenciát láttunk minden korrelációs kategóriában, de csak a „valódi pozitív” kategória esetén sikerült statisztikai szignifikanciát kimutatni.

Itt szükséges megjegyezni, hogy a kiterjesztett vizsgálatok alapján az egyes korrelációs kategóriákba tartozó sejtek százalékos aránya jóval homogénebb eloszlást mutat, mint arra a korábbi vizsgálatok alapján következtethettünk (12. ábra).

5.5 A citokin miliő hatása az IL-9R és az IL-2R membrándomén szintű kapcsolatára

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy vajon az IL-9 kötődése befolyásolja-e a két interleukin receptor membrándomén szintű kapcsolatát. Az MT-2 sejtek termelik az IL-9 citokint, így ezen kísérleteinket a Kit225/IL-9R sejteken végeztük el. Ezen sejtek tenyésztése során a tápfolyadékhoz rendszeres időközönként IL-2-t szükséges adni. Miután fennáll annak az esélye, hogy az IL-9 hatását a sejten maradt IL-2 esetleg befolyásolja, ezért az IL-9 hatásának vizsgálatánál olyan sejteket használtam, amelyeket passzálást követően IL-2 mentes médiumban tenyésztettünk 48 órán keresztül („éheztetett” sejtek). Ezen sejteket IL-9 jelenlétében inkubáltuk, majd vizsgáltuk, hogy a citokin kötődés hatására változik-e és ha igen, hogyan, az IL-9 és IL-2 receptorok kapcsolata. A receptoralegységek expresszióját az IL-2 megvonása, illetve az IL-9-cel történő kezelés nem befolyásolta szignifikánsan.

A 14. ábrán egy reprezentatív konfokális mikroszkópos kép látható, amely az IL-9R α és IL-2R α sejtfelszíni eloszlását mutatja éheztetett sejteken.



14. ÁBRA: AZ IL-9R α ÉS IL-2R α KOLOKALIZÁCIÓJA ÉHEZTETETT KIT225/IL-9R SEJTEKEN.

Az IL-9R α és IL-2R α alegységeket spektrálisan eltérő fluorofórral konjugált monoklonális antitesttel jelöltük (Alexa Fluor 546-AH9R7, illetve , Alexa Fluor 488-anti-Tac), majd konfokális képeket vettünk fel az egyes fehérjék egyedi eloszlásáról. A kép az egymásra vetített egyedi eloszlásokat mutatja. Sárga szín jelzi azokat a területeket, ahol mindkét fehérje kifejeződik. Skála: 2 μ m.

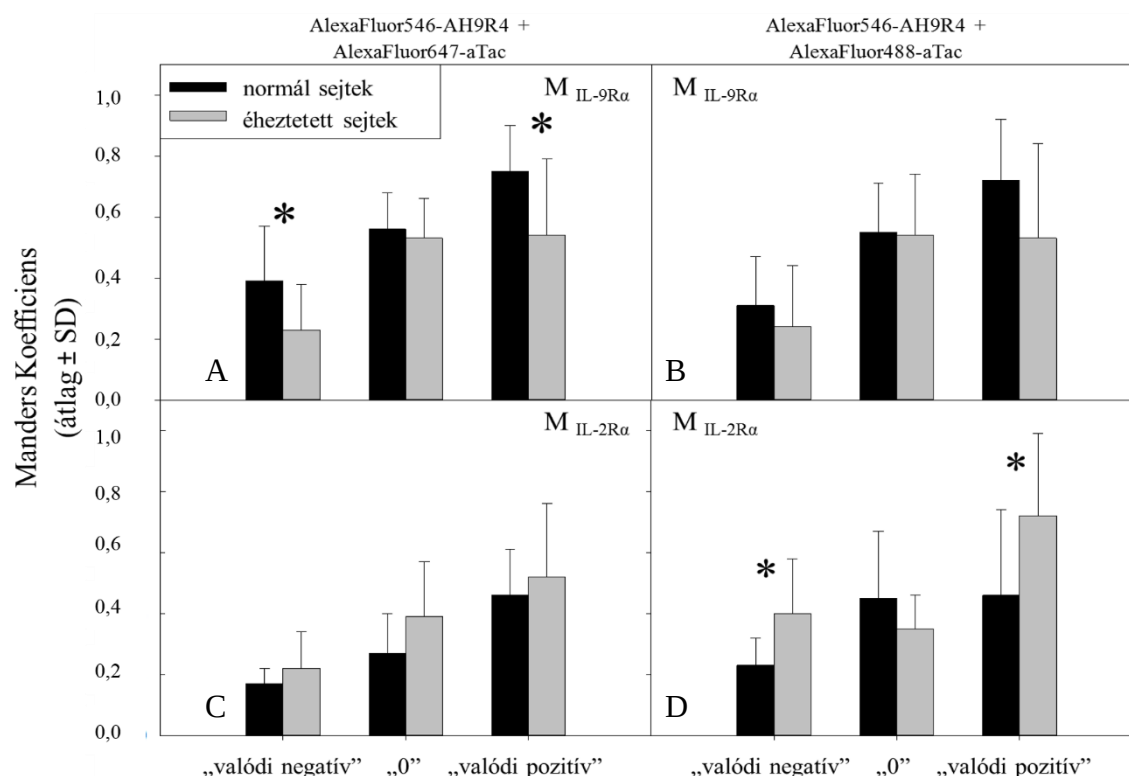
A CLSM képek és azok kvantitatív analízise alapján „éheztetett” sejteken is megtalálhatók mind a közös, mind pedig a szegregált membránterületek. Sem a Pearson-féle

korrelációs koefficiensek átlagértéke, sem pedig a sejtek egyes korrelációs kategóriákban való százalékos eloszlása nem különbözik szignifikánsan az „éheztetett” és az IL-2 jelenlétében tenyésztett (továbbiakban „normál”) sejtek között (XI. és XII. táblázat).

XII. TÁBLÁZAT: KOMBINÁLT PEARSON ÉS MANDERS ANALÍZIS ÉHEZTETETT ÉS IL-9 KEZELT KIT225/IL-9R SEJTEKEN.

A Pearson-féle korrelációs koefficiens (C), illetve a Manders-féle intenzitás alapú kolokalizációs együtthatók ($M_{IL-9R\alpha}$ és $M_{IL-2R\alpha}$) értéke (átlag $\pm$ SD) a Costes módszer alapján meghatározott korrelációs kategóriákban. Az M együtthatók esetén indexben jeleztem, hogy mely fehérje másikkal átfedő hányadára vonatkozik. (IL-9 kezelés leírása: 5.1 fejezet)

		Korrelációs kategóriák		
		“valódi negatív”	“0”	“valódi pozitív”
Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 647-antiTac ^a				
Százalékos eloszlás	éheztetett sejtek (n=47)	23 %	40 %	36 %
<C>±SD		-0,46 ± 0,17	-0,01 ± 0,10	0,35 ± 0,15
<M _{IL-9R} >±SD		0,23 ± 0,15	0,55 ± 0,13	0,57 ± 0,23
<M _{IL-2R} >±SD		0,22 ± 0,12	0,41 ± 0,18	0,55 ± 0,24
Százalékos eloszlás	+IL-9 (n=30)	30 %	43 %	27 %
<C>±SD		-0,34 ± 0,11	0,06 ± 0,06	0,34 ± 0,19
<M _{IL-9R} >±SD		0,28 ± 0,07	0,48 ± 0,21	0,69 ± 0,18
<M _{IL-2R} >±SD		0,35 ± 0,15	0,52 ± 0,18	0,56 ± 0,28
Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 488-antiTac ^b				
Százalékos eloszlás	éheztetett sejtek (n=18)	33 %	28 %	39 %
<C>±SD		-0,25 ± 0,09	-0,06 ± 0,08	0,45 ± 0,09
<M _{IL-9R} >±SD		0,25 ± 0,20	0,56 ± 0,19	0,56 ± 0,31
<M _{IL-2R} >±SD		0,40 ± 0,18	0,36 ± 0,10	0,74 ± 0,26
Százalékos eloszlás	+IL-9 (n=14)	50 %	14 %	36 %
<C>±SD		-0,37 ± 0,14	0,10 ± 0,02	0,33 ± 0,12
<M _{IL-9R} >±SD		0,18 ± 0,13	0,66 ± 0,01	0,74 ± 0,22
<M _{IL-2R} >±SD		0,33 ± 0,24	0,40 ± 0,24	0,48 ± 0,28



15. ÁBRA: IL-2 MEGVONÁS HATÁSA AZ IL-9Rα ÉS az IL-2Rα ÁTFEDŐ HÁNYADÁRA.

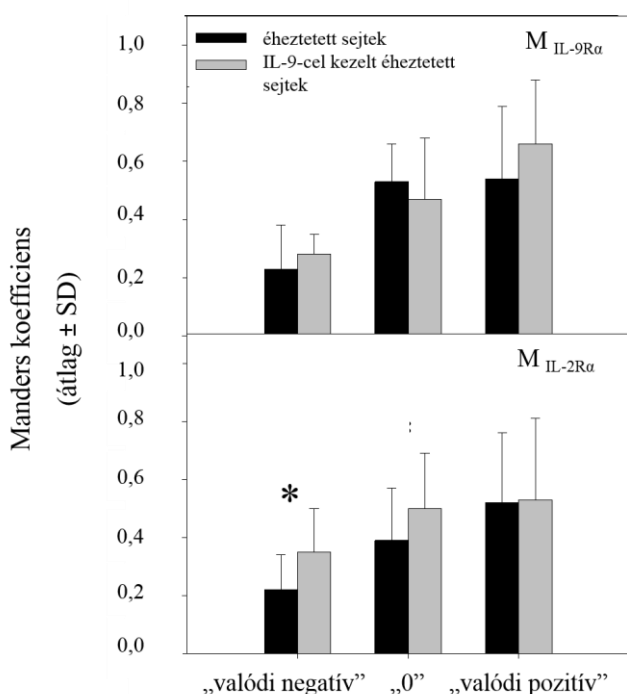
A Manders kolokalizációs együttható átlagos értéke a Pearson analízis során meghatározott korrelációs kategóriákban normál és éheztetett Kit225/IL-9R sejteken. A felső panelek (A és B) az IL-9Rα átfedő hányadát, míg az alsó 2 panel (C és D) az IL-2Rα átfedő hányadát mutatja a másik receptor α láncával. A receptoralegységeket az A és C panelek esetén AlexaFluor546-AH9R4 + AlexaFluor647-aTac, míg a B és D esetben AlexaFluor546-AH9R4 + AlexaFluor488-aTac fluorofórokkal konjugált antitestekkel jelöltük. (* p < 0,05)

Tendenciáját tekintve az $M_{IL-9R\alpha}$ alacsonyabbnak, az $M_{IL-2R\alpha}$ pedig magasabbnak bizonyult az éheztetett sejtek esetében mind a „valódi pozitív”, mind pedig a „valódi negatív” korrelációs kategóriákban mindkét festékpár esetén. A kétmintás t-próbával nyert szignifikáns különbséget (p < 0,05) az Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 647-antiTac festékpárnál az $M_{IL-9R\alpha}$, az Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 488-antiTac festékpárnál pedig az $M_{IL-2R\alpha}$ koefficiensek összehasonlításakor tapasztaltunk. A „0” kategóriába eső sejtek esetén nem volt számottevő különbség az „éheztetett” és a „normál” sejtek között.

Miután a két festékpárral történt vizsgálatok 2-mintás t-próbával történő statisztikai elemzése során eltérő statisztikai szignifikanciát tapasztaltunk az IL-2 megvonás hatását tekintve (15. ábra), 4-szemponos ANOVA elemzés segítségével is megvizsgáltuk az IL-2 megvonás hatását az α alegységek doménszintű átfedésére. A következő szempontok szerint történt az analízis: kezelés típusa („normál” és „éheztetett” sejtek), alkalmazott festékpár (Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa Fluor 647-antiTac és Alexa Fluor 546-AH9R4 + Alexa

Fluor 488-antiTac), citokinreceptor fajtája ($M_{IL-9R\alpha}$ és $M_{IL-2R\alpha}$), illetve a korrelációs kategória („valódi negatív”, „0”, „valódi pozitív”). Az analízis eredménye alapján az IL-2 megvonás hatása független az alkalmazott festékpártól ($p = 0,19$). A 2-mintás t-próba során tapasztalt eltérést a szignifikancia szintben a kis elemszám, illetve a mérési bizonytalanság okozhatta. Összességében azt mondhatjuk, hogy az IL-2 megvonása különbözőképpen hat az $M_{IL-9R\alpha}$ és $M_{IL-2R\alpha}$ együtthatókra, ami a változások irányának tendenciája is igazol.

Ezt követően megvizsgáltuk az IL-9 kötődés hatását a két fehérje térbeli viszonyára. Az éheztetett sejteket 20 perces IL-9 kezelésnek vetettük alá (előzetes vizsgálatainkban a 20 perces stimulációt követően tapasztaltunk maximális STAT1 aktivációt). Az IL-9 kötődése nem okozott szignifikáns eltérést sem a Pearson-féle korrelációs együttható értékében, sem pedig a sejtek egyes korrelációs kategóriák közötti megoszlásában (16. ábra, XII. táblázat). Az IL-9 $R\alpha$ átfedő hányada növekedő tendenciát mutatott a „valódi pozitív” kategóriában a használt festékpároktól függetlenül, bár nem tudtunk szignifikáns változást kimutatni. A másik két kategóriában nem tudtunk konzisztens tendenciát kimutatni. Habár az $M_{IL-2R\alpha}$ értéke szignifikáns megnövekedett a „valódi negatív” korrelációs kategóriában a többi korrelációs kategóriában nem tapasztaltunk szignifikáns változást.



16. ÁBRA: IL-9 HATÁSA AZ IL-9 $R\alpha$ ÉS AZ IL-2 $R\alpha$ KOLOKALIZÁCIÓJÁRA KIT225/IL-9R SEJTEKEN.

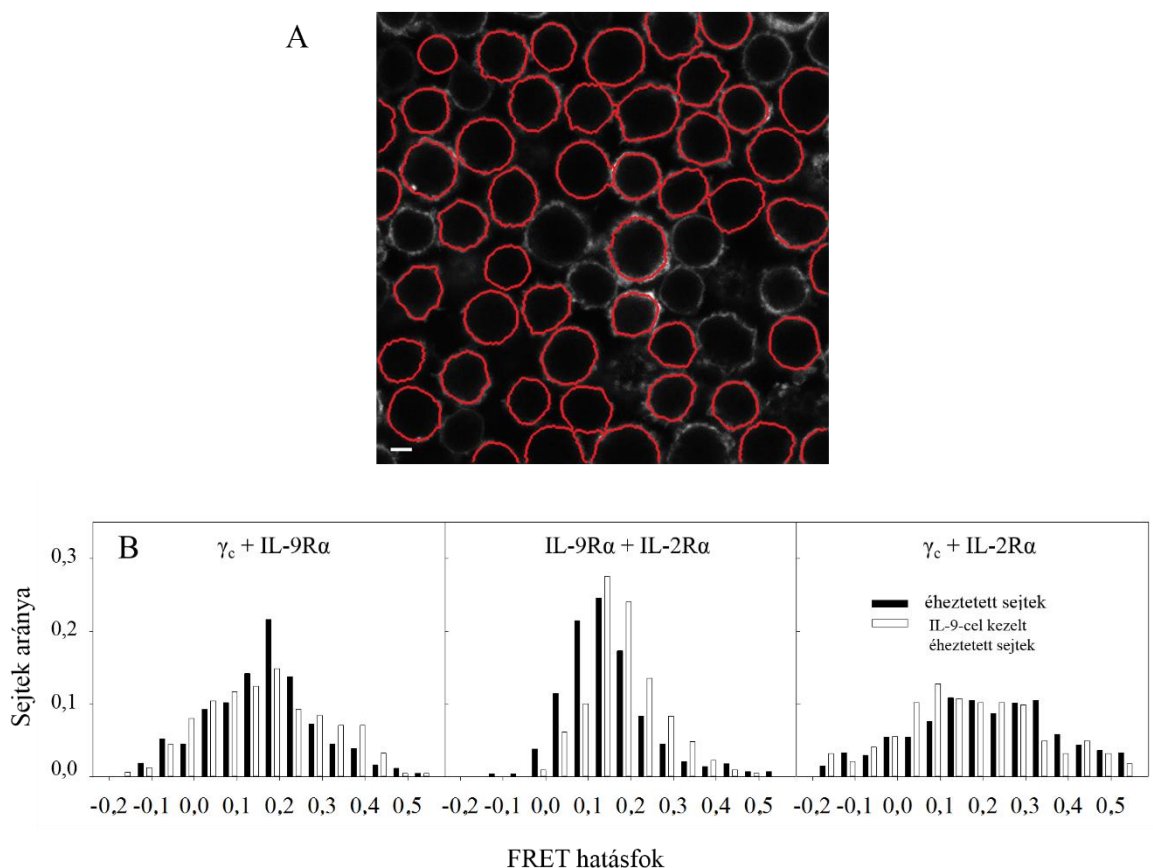
Az ábra az IL-9 $R\alpha$ (A) és az IL-2 $R\alpha$ (B) másik α alegységgel átfedő hányadát mutatja az egyes korrelációs kategóriákban éheztetett, illetve IL-9 citokinnel kezelt sejteken. Az IL-9 $R\alpha$ -t Alexa Fluor 546-AH9R4 antitesttel, míg az IL-2 $R\alpha$ Alexa Fluor 647-antiTac antitesttel jelöltük. (* $p < 0,05$)

5.6 IL-9 hatása a γ_c , az IL-9R α és az IL-2R α molekuláris kölcsönhatására

Mint láthattuk, membrándomén szinten az IL-9 kötődése nem befolyásolta az IL-9R és az IL-2R α alegységeinek térbeli kapcsolatát. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a két α alegység, illetve a mindkét citokin receptorának felépítésében részt vevő γ_c lánc és az α alegységek molekuláris kölcsönhatását befolyásolja-e az IL-9 kötődése. Hasonlóan a doménszintű kapcsolat vizsgálata során alkalmazott protokollhoz (lásd 4.1 fejezet), az IL-9 kötődés hatását 20 perces stimulációnak alávetett, „éheztetett” Kit225/IL-9R sejteken tanulmányoztuk. A FRET hatásfokot az arányalapú FRET (rFRET) módszerrel, sejtenként határoztuk meg a donor, akceptor, illetve FRET csatornában felvett képeken detektált intenzitások alapján (lásd 4.5.1 fejezet). Azért ezt a módszert választottuk, mert irodalmi adatok alapján más mikroszkópos FRET technikákkal (pl. accpbFRET) összehasonlítva, alacsony expressziójú fehérjék (pl. γ_c lánc) kölcsönhatásainak vizsgálatakor ez bizonyult statisztikailag a legmegbízhatóbbnak (P. Nagy et al., 2016; Roszik et al., 2009).

A γ_c lánc sejtfelszíni számossága jelentősen alacsonyabb mind az IL-9R α , mind pedig az IL-2R α számosságánál (relatív expressziós szintek: $\gamma_c \rightarrow 0,5$, IL-9R $\alpha \rightarrow 1$, IL-2R $\alpha \rightarrow 10$), így a γ_c alegység és az egyes α láncok kölcsönhatásának vizsgálata során minden esetben a γ_c láncot jelöltük meg a donor fluorofórt hordozó antitesttel. A kétfajta α alegység kölcsönhatásának vizsgálata során – az accpbFRET mérésekhez hasonlóan (lásd 5.3 fejezet) – az IL-9R α hordozta a donor, míg az IL-2R α az akceptor fluorofórt. A FRET hatásfok meghatározása az 4.5.1 fejezetben ismertetett módon történt: a sejtmembrán pixelek „kijelölése” után (17/A ábra) sejtenként meghatároztuk a FRET hatásfokot, majd az így kapott értékek eloszlását hisztogram formájában ábrázoltuk (17/B ábra).

Eredményeink alapján a FRET hatásfok gyakorisági hisztogramok középértéke a γ_c – IL-9R α pár esetén ~18%, az IL-9R α – IL-2R α pár esetén ~17%, míg a γ_c – IL-2R α pár esetén ~25% éheztetett sejteken, ami a vizsgált fehérjék molekuláris kölcsönhatására utal. Tekintve az akceptorként használt α alegységek átlagos sejtfelszíni denzitását (lásd 5.1 fejezet), a random FRET hozzájárulása a tényleges detektált hatásfokhoz elhanyagolható (bővebb magyarázatot lásd 5.3 fejezet) (King et al., 2014), amely alátámasztja azt, hogy a detektált FRET értékek valódi, nem véletlenszerű kapcsolatot jeleznek.



17. ÁBRA: IL-9 HATÁSA AZ IL-9R α , IL-2R α ÉS A γ_c MOLEKULÁRIS KÖLCÖNHATÁSÁRA

(A) A képek membrán és nem-membrán pixelekre történő szegmentálása „manually seeded watershed” algoritmussal az akceptor (IL-2R α) csatornában felvett képen (bővebben lásd 4.5.1.). Az IL-9R α -t Alexa Fluor 546-AH9R4, míg az IL-2R α -t Alexa Fluor 647-anti-Tac antitesttel jelöltük. Skála: 5 μ m.

(B) Sejtenkénti FRET hatásfok gyakorisági hisztogramok a γ_c /IL-9R α ($n_{\text{éheztetett}}=444$, $n_{+IL-9}=501$), az IL-9R α /IL-2R α ($n_{\text{éheztetett}}=292$, $n_{+IL-9}=229$) és a γ_c /IL-2R α ($n_{\text{éheztetett}}=292$, $n_{+IL-9}=367$) párok esetén éheztetett, illetve IL-9 citokinnel kezelt Kit225/IL-9R sejteken. A γ_c , IL-9R α és IL-2R α receptor alegységeket TugH4, AH9R4 és anti-Tac monoklonális antitestekkel jelöltük. A donor epitópot jelölő antitesteket Alexa Fluor 546 festékkel, míg az akceptor epitópot Alexa Fluor 647-tel konjugált antitesttel jelöltük. Donorként a párok elsőként, akceptorként a párok másodikként feltüntetett tagja szolgált.

Ahogy az a 17/B ábrán bemutatott reprezentatív mérésből kitűnik, IL-9 kötődés hatására a heterodimer IL-9R komplex elemei közötti FRET hatásfok nem változott szignifikánsan. Ezzel szemben az IL-9R α – IL-2R α és a γ_c – IL-2R α kapcsolatát jellemző FRET hisztogramok esetén szignifikáns eltolódást tapasztaltunk IL-9 kezelés hatására ($p < 0,007$, Kolmogorov-Smirnov teszt): a hisztogramok középértéke az IL-9R α – IL-2R α pár esetén 17%-ról 20%-ra nőtt, míg a γ_c – IL-2R α pár esetén 25%-ról 20%-ra csökkent (17/B ábra).

A 17/B ábrán bemutatott változásokat a további méréseink is megerősítették: az IL-9R α – IL-2R α estén szignifikáns növekedést (20-50%), míg γ_c – IL-2R α esetén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (20-30%). A γ_c –IL-9R α párnál nem tapasztaltunk konzekvens eltolódást a FRET középértékében (átlagos eltolódás mértéke: $-1,7 \pm 7\%$). A mérés, illetve kiértékelés megbízhatóságát az Alexa Fluor 546 – Cy5 donor-akceptor párral is ellenőriztük: az eddigiekben ismertettekkel összhangban álló változást tapasztaltunk, annyi különbséggel, hogy a FRET hatásfokok értéke magasabb volt.

Szükséges megemlíteni, hogy a FRET gyakorisági hisztogramok szórása relatíve magasnak adódott, különösen azon esetekben, amikor a γ_c szerepelt donorként. Ennek oka elsősorban a γ_c alacsony expressziója: a kiértékelés során meghatározott paraméterek (lásd 4.5.1 fejezet) erősen függenek a fluoreszcencia intenzitástól, amelyből számítjuk őket (azaz „zajos” kép esetén a számított FRET hatásfok is magasabb szórással határozható meg). Emellett a FRET értékeket sejtenként számítottuk, így az egyes sejtek egyedi akceptor eloszlása a különböző tulajdonságú membrándomének között szintén befolyásolhatja a számított értéket.

6. MEGBESZÉLÉS

Disszertációm célja az interleukin-9 receptor sejtfelszíni szerveződésének feltérképezése volt humán T limfóma eredetű sejteken. Az IL-9R a γ_c citokinreceptor család egyik heterodimer összetételű tagja, amelynek expressziója elsősorban a magas affinitású, heterotrimer IL-2R komplexet is kifejező T sejt típusokon figyelhető meg. Korábban intézetünkben kimutatták, hogy a szintén a γ_c receptorok közé tartozó IL-2R aktivált T limfociták, illetve számos humán T limfóma eredetű sejt felszínén az MHC I és II glikoproteinekkal közös, ún. szuperklasztereket alkot, amelyek kialakításában és fenntartásában kiemelt szerepet játszanak a lipid tutajok (Matko et al., 2002; Vereb et al., 2000). Az IL-15R α alegysége szintén ezen szuperklaszterekben dúsul fel a mindkét receptorfajtát expresszáló sejteken (Vamosi et al., 2004). Vizsgálataink egyik fontos kérdése a fentiek alapján az IL-9 receptor és az IL-2R/MHC szuperklaszterek térbeli kapcsolatának feltárása, amelyet több hierarchikus szinten tanulmányoztunk.

Az IL-9R és az IL-2R/MHC tartalmú lipid tutajok térbeli kapcsolatának a néhány száz nanométeres távolságskálán történő feltárása konfokális mikroszkópiás képek Pearson-féle korrelációs, illetve Manders-féle együttes előfordulás (co-occurrence) analízisével történt. A Pearson analízis során sikeresen adaptáltuk a Costes és munkatársai által korábban intracelluláris sejtalkotók térbeli korrelációjának vizsgálatára bevezetett konfidencia intervallum módszert (Costes et al., 2004). Ezzel az eljárással lehetőségünk van az adott sejtre meghatározott korrelációs koefficiens kategorizálására (konfidencia intervallum alá, felé vagy éppen beleesik), így a tényleges korreláció (anti-korreláció) felismerésére/valószínűsítésére a potenciális torzító tényezők kiküszöbölése révén (pl. expresszióbeli különbségek, stb.). A módszert ismert térbeli kapcsolattal rendelkező molekulapárok segítségével validáltuk: mind a pozitív kontrollként alkalmazott molekulapár (MHC I nehéz- és könnyű lánc), mind pedig a negatív kontroll (lipid tutaj-rezidens GM1 gangliozid és burkolt csapdákból kifejeződő transferrin receptor) esetén jellemzően a várt kategóriákba („valódi pozitív”, illetve „valódi negatív”) estek a sejtenként meghatározott korrelációs koefficiens értékek (lásd 5.2 fejezet).

A konfidencia intervallum módszert a megfelelő módosítással a membránfehérjék átfedő hányadának (együttes előfordulás) analízise során is alkalmaztuk: itt az intervallum felső határánál magasabb kolokalizációs együttható esetén tekintettük az átfedést

statisztikailag megalapozottnak. Itt szintén az előzőekben említett pozitív és negatív kontrollok segítségével történt meg a módszer validálása (lásd 5.2.3 fejezet).

A konfokális mikroszkópiás képek Pearson analízise a sejtek egy jelentős hányadában „valódi pozitív” korrelációt tárt fel az IL-9R α és az IL-2R α /MHC tartalmú lipid domének (lipid tutajok) között mindkét vizsgált humán T limfóma sejtípus esetén. Vizsgálatainkat FRET mérésekkel kiegészítve kimutattuk az IL-9R α és az IL-2R/MHC klaszterek elemeinek molekuláris közelségét, azaz az IL-9R ezen fehérjemintázatok további komponense.

Eredményeinket az IL-2 és IL-15 receptorokra vonatkozó korábbi adatokkal összevetve valószínűsíthető, hogy a γ_c citokinreceptorok szerveződését egy olyan általános rendező elv vezérli aktivált vagy transzformált T sejtek plazmamembránjában, amelyben mind a lipid tutajok, mind pedig az MHC glikoproteinek kulcsszerepet játszanak. Az így kialakult fehérjeklaszterek pontos funkciója még tisztázásra vár, de valószínűsíthető szerepük a funkcionális receptorkomplexek kialakításában, így a jelátviteli folyamatok kiváltásában, hatékonyságuk szabályozásában. Az IL-9 és IL-2 receptorok kolokalizációjának lehetséges funkcionális következményeit később tárgyalom.

Az MHC I glikoproteinek jelenléte – egyebek mellett – befolyásolhatja a γ_c receptorok dinamikus sajátságait, s ezen keresztül, indirekt módon beavatkozhat azok jelátviteli folyamataiba. Korábbi FCS, STED és FRET adatok alapján az általunk vizsgált Kit225/IL-9R sejtekkel „rokon” Kit225/FT7.10 sejtek lipid tutajaiban feldúsuló IL-2R, IL-15R α és MHC I fehérjék kisebb méretű, változatos összetételű, ún. szoros aggregátumok formájában léteznek az adott membránrégió belül. Ezen egységek egy része mobilis, más részük korlátozott mobilitással rendelkezik. A sejtfelszíni MHC I expresszió csökkentése jelentősen megnövelte az IL-2R α /IL-15R α tartalmú fehérje aggregátumok mobilitását, anélkül, hogy az IL-2R α /IL-15R α kapcsolat geometriáját módosította volna.

További lehetőség, hogy az MHC glikoproteinek közvetlenül is részt vesznek a citokinek által aktivált jelátviteli útvonalakban, pl. hasonló kereszt-szabályozási mechanizmusok révén, amelyeket korábban az inzulinreceptor és az MHC I relációjában már leírtak. A humán MHC I és az inzulin receptor (IR) fizikai kölcsönhatását és annak funkcionális következményeit liposzóma modellrendszeren és B limfóma sejt vonalakon egyaránt feltárták (Ramalingam et al., 1997). Kimutatták, hogy az MHC I/IR arány növelése megnöveli az IR ligandum-kötő affinitását, tirozin kináz aktivitását, valamint az IRS-1 foszforilációjának és a PI-3 kináz aktiválódásának mértékét egyaránt fokozza. Inzulin

stimuláció hatására az MHC I nehézlánc is foszforilálódik, majd asszociál a PI-3 kinázzal. Az MHC I szabályozó szerepét kimutatták idegsejtekben is *in vivo*, ahol az MHC I negatívan szabályozta a szinapszis számot az inzulin receptor szinapszis formálódását elősegítő hatásainak gátlásával (Dixon-Salazar et al., 2014). Az MHC I specifikus monoklonális antitestekkel történő ligálása olyan jelátviteli útvonalak aktiválódását eredményezheti, amelyek a γ_c citokinek jelátviteli folyamataiban is megjelennek (Skov et al., 1998; Xu et al., 2012). Az MHC I negatív szabályozó szerepét a Toll-like receptorok által triggerelt gyulladásos folyamatokban szintén leírták (Xu et al., 2012).

A CLSM képek Pearson-féle korrelációs analízise alapján az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek a közös membránrégiók (lipid tutajok) mellett egymástól szegregált membrán területeken is előfordulnak, ahogy ezt a sejtek egy jelentős hányada esetén tapasztalható, a „valódi negatív” kategóriába sorolható korrelációs koefficiens mutatja. A CLSM képek vizuális analízise alapján a szegregált domének jelenléte nem korlátozódott a magasabb számosságú membránalkotóra. A dolgozatomban nem említett STAT1 aktivációs (tirozin foszforilációs) kísérleteink eredménye alátámasztotta az IL-9R és az IL-2R/MHC tartalmú lipid tutajok kettős térbeli viszonyát. A telítési koncentráció alatt alkalmazott IL-9 hatására a STAT1 aktiváció jellemzően 2 fázisban megy végbe a Kit225/IL-9R sejteken: egy gyors, minden sejtet érintő pY-STAT1 szint emelkedést okozó fázist egy lassabb, ugyanakkor szignifikánsabb magasabb aktivált STAT1 szinttel jellemezhető fázis követ. A lipid tutajok integritásának (koleszterin kivonással történő) megbontása eltérően befolyásolta ezt a két fázist: míg az első, gyors fázis kialakulására nem volt hatással, a második, lassabb fázis kialakulását késleltette, összhangban az IL-9R lipid tutajokhoz köthető, illetve azon kívüli előfordulásával.

Megjegyzendő, hogy a sejtek egy része esetén a vonatkozó konfidencia intervallumon belülre (azaz a „nulla” kategóriába) esett az IL-9R α és az IL-2R/MHC klaszterek, valamint a lipid tutajok térbeli kapcsolatát jellemző korrelációs koefficiens értéke. Ez utalhat arra, hogy ezen sejteken véletlenszerű az adott membránkomponensek térbeli viszonya, de arra is, hogy az átfedő és szegregált membránrégiók együttes jelenléte kompenzálja egymást a korrelációs együttható számítása során. accpbFRET adataink ez utóbbi magyarázatot valószínűsítették, tekintve a medián FRET értékek egymódusú frekvenciaeloszlását. Sőt, a szignifikánsan pozitív irányba eltolódó medián FRET határfok értékek arra utalnak, hogy az IL-9R α és az IL-2R/MHC klaszterek kolokalizációja a „valódi negatív” korrelációs kategóriába tartozó sejteken is jelen van. Összevetve a STAT1

aktivációs mérésekkel, mindez arra utal, hogy az IL-9R α és az IL-2R/MHC tartalmú lipid tutajok kétfajta térbeli kapcsolata (átfedő, illetve szegregált membrándomén) nem zárja ki egymást, ugyanazon sejt felszínén is előfordulhatnak. Az egyes párok esetén az átfedő és nem átfedő membránterületek aránya sejtenként változó mértékű lehet, ami az adott sejtre vonatkozó korrelációs koefficiens értékében tükröződik.

Érdekes módon az IL-2R α /MHC I viszonylatában is találtunk a „valódi negatív” korrelációs kategóriába eső sejteket, azaz itt is léteznek nemcsak átfedő, hanem szegregált membránrégiók is. Ennek oka feltehetően az, hogy az MHC I nemcsak lipid tutajokban, hanem azokon kívül is előfordulhat (Goebel et al., 2002; Knorr et al., 2009; Matko et al., 2002; Vamosi et al., 2004; Vereb et al., 2000).

Fontos megjegyezni, hogy eredményeink függetlenek a vizsgált sejt típusától: a transzfektált IL-9R-t kifejező Kit225/IL-9R és az IL-9R α -t konstitutívan expresszáló MT-2 sejtek esetén hasonló eredményeket kaptunk. Az MT-2 sejtvonal a szabályozó T sejtek (Treg) modellrendszerül szolgálhat, így az itt nyert információk a későbbiekben hozzájárulhatnak az IL-9 jelátvitel Treg sejtekben betöltött szerepének megismeréséhez is (Hamano et al., 2015).

Azért, hogy az IL-9R α és az IL-2R α alegységek térbeli kapcsolatáról átfogóbb képet kapjunk, a korrelációs analízissel nyerhető információt kiegészítettük az együttes előfordulás („co-occurrence”) vizsgálatával (Aaron et al., 2018). E két módszer kombinációjával jellemezték korábban az EGF receptor szubcelluláris eloszlását, illetve követték nyomon annak sejten belüli útvonalát (trafficking) (Pike et al., 2017). Miután egyik célunk a citokin millió hatásának tanulmányozása volt, ezen vizsgálatokat a Kit225/IL-9R sejteken végeztük el, tekintve az MT-2 sejtek IL-9 termelő képességét (Lee et al., 1989).

A kétféle számítási módszerrel (területalapú és a klasszikus, Manders-féle intenzitásalapú számítások, 2.6.2 és 4.4.2 fejezetek) meghatározott kolokalizációs együtthatók hibahatáron belül azonosak voltak, függetlenül az alkalmazott kísérleti körülményektől (normál és éheztetett sejt, IL-9 hozzáadása). Ez arra utal, hogy az IL-9R α , illetve az IL-2R α részvételével kialakult klaszterek átlagos sűrűsége (packing density), s így az egységnyi membrán területen detektálható átlagos fluoreszcencia intenzitás, állandónak tekinthető az őket tartalmazó pixelblokkokban (legalábbis az α alegységek tekintetében). Ez összhangban áll korábbi közeli mező pásztázó optikai mikroszkópiás (NSOM) vizsgálatok eredményével, ahol azt találták, hogy a már korábban említett, „rokon” Kit225/FT7.10

sejteken az IL-2R α (és IL-15R α) által kialakított klaszterekben az α alegységek átlagos sűrűsége konstans (de Bakker et al., 2008).

Az együttes előfordulás analízissel igazoltuk, hogy az IL-9R α és az IL-2R α egy minimális, de a véletlen által generálttól szignifikánsan nagyobb mértékű átfedése korrelációs kategóriától függetlenül minden sejten, így az összességében negatív korrelációt mutató (azaz a két receptort döntően elkülönülő membránterületeken kifejező), valamint a konfidencia intervallumba eső korrelációs koefficienssel jellemezhető sejteken is megfigyelhető, alátámasztva ezzel az elkülönülő és átfedő domének együttes előfordulását, amelyet korábbi eredményeink alapján már valószínűsítettünk. rFRET vizsgálataink további bizonyítékot szolgáltatottak: az IL-9R α és IL-2R α között sejtenként meghatározott FRET hatásfokok egy módusszal jellemezhető frekvenciaeloszlása, valamint a FRET hatásfok sejtek döntő többségében szignifikánsan pozitív értéke egyaránt ezt támasztja alá. Különösen erős ez a bizonyíték, ha figyelembe vesszük, hogy az rFRET módszerrel a korábbi accpbFRET módszerhez képest jelentősen magasabb számú sejt analizálható, így statisztikailag is megbízhatóbb módszernek tekinthető.

Az α alegységek átfedő hányadának mértéke a „valódi negatív” korrelációs kategóriában hasonlóan adódott a két receptor esetében (25-30%). Figyelembe véve az IL-2R α közel 10-szeres sejtfelszíni számosságát, ez arra utal, hogy az IL-9R α és az IL-2R α 1:10 sztöchiometriában található a közös klaszterekben.

A „valódi pozitív” korrelációs kategóriába eső sejteken az IL-9R α többsége az IL-2R α alegységgel átfedő membránrégiókban fejeződött ki. Az IL-2R α átfedő hányada ennél kisebb mértékű, ami lehet egyszerűen a két alegység eltérő expressziós szintjének következménye, ugyanakkor a térbeli elkülönülés biológiai/funkcionális okai sem zárhatók ki. Ez utóbbi feltételezést támasztja alá az is, hogy IL-2 megvonás (éheztetés) hatására az IL-2R α alegység IL-9R α alegységgel átfedő hányada mind a „valódi pozitív”, mind pedig a „valódi negatív” kategóriákban kismértékben megnövekedett, miközben az expressziós viszonyok nem változtak szignifikánsan. Ez arra utal, hogy a szegregált IL-2R α domének megjelenésének hátterében egyéb, az IL-2/IL-2R komplex aktív részvételével kialakuló folyamatok is szerepet játszhatnak. A szegregált IL-2R α domének kialakulását okozhatja pl. az IL-2R α láncok korai endoszómák segítségével történő reciklizációja (Hemar et al., 1995).

Korábbi röntgenkrisztallográfiás adatok jelentős hasonlóságot tártak fel az IL-2/IL-2R α és az IL-15/IL-15R α komplexek topológiájában. Ennek alapján felvetődött, hogy az IL-15R α alegységhez hasonlóan, az IL-2R α is képes a megkötött citokin transzprezentációjára

(Chirifu et al., 2007). Ennek az alternatív, nem kanonikus IL-2 jelátviteli útvonalnak a létezését sejtproliferációs kísérletek is alátámasztják: az IL-2R α alegységét hordozó sejtek jelenléte jelentősen felerősítette a csak az IL-2R $\beta\gamma_c$ heterodimert kifejező T leukémia eredetű sejtek IL-2 által kiváltott proliferációjának mértékét (Eicher et al., 1998). Ahogy azt a Bevezetésben említettem, az IL-2R α – az IL-15R α alegységgel ellentétben – alapvetően alacsony citokinkötő affinitással bír. A szegregált IL-2R α klaszterek kialakulása elősegítheti az IL-2-t kötött IL-2R α koncentráltabb megjelenését, ezáltal megnövelheti a transzprezentáció kialakulásának valószínűségét (de Bakker et al., 2008; Liparoto et al., 2002).

Az IL-9R α IL-2R α alegységgel átfedő hányada IL-2 megvonás (éheztetés) hatására csökkent, ami arra utal, hogy az IL-2 szabályozó szerepet tölthet be az IL-9R sejtfelszíni szerveződésében, ezáltal a receptor komplex jelátviteli hatékonyságának szabályozásában.

Az IL-9 kezelés sem az egyes α alegységek térbeli korrelációjában, sem pedig egymással átfedő hányadában nem okozott szignifikáns változást. Korábbi NSOM és STED vizsgálatok alapján Kit225/FT7.10 sejteken az IL-2R α domének átlagos sugara ~300-400 nm (de Bakker et al., 2008; Mocsar et al., 2016). Saját eredményeink szerint, ha az IL-9 kötődése okoz is valamekkora átrendeződést, annak mértéke nem elegendő arra, hogy a két receptorfajta térbeli kapcsolatát kimutatható mértékben megváltoztassa a néhány 100 nanométeres mérettartományban.

A heterodimer IL-9R összeszerelődését, valamint az IL-9 kötődésének hatását az IL-9R komplex szerkezetére/konformációjára és az IL-2R α alegységgel kialakított molekuláris kölcsönhatásra szintén éheztetett Kit225/IL-9R sejteken, az rFRET módszerrel tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy az IL-9R α és a γ_c alegységek IL-9 hiányában is egymás közvetlen molekuláris közelségében találhatók, tehát a heterodimer IL-9R komplexek – legalábbis részben – előre összeszerelt állapotban vannak jelen a Kit225/IL-9R sejteken. Korábbi, antitest indukált fluoreszcens co-patching kísérletekben hasonló eredményre jutottak emberi és egér eredetű sejteken egyaránt (Malka et al., 2008). A preformált IL-9R heterodimerek mennyisége IL-9 kötődés hatására közel kétszeresére nőtt. Hasonló eredményeket kaptak az IL-2R β és a γ_c vonatkozásában is. Az előre összeszerelt heterodimerek jelenléte önmagában nem váltott ki STAT foszforilációt, ahhoz szükséges volt a releváns citokin kötődése is. Megjegyzendő, hogy a hivatkozott kísérletekben használt sejtekben eredetileg nem fejeződik ki γ_c citokinreceptor, így az IL-9R α alegységet, az IL-2R β alegységet, a γ_c láncot és a γ_c citokinek jelátvitelében kritikus JAK3 kinázt is

transzfekció segítségével juttatták be a sejtekbe. Mindez, figyelembe véve az IL-2, IL-15 és IL-7 receptorok összeszerelődésére vonatkozó adatokat (Damjanovich et al., 1997; Vamosi et al., 2004; Waickman et al., 2020) arra utalhat, hogy a γ_c és a citokin specifikus alegységek asszociációja általános jelenség, amelyet sejtípustól független tényezők hoznak létre, feltehetően az egyes alegységek szerkezetéből adódó preferenciális fehérje-fehérje és/vagy fehérje-lipid kölcsönhatások révén. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy az IL-2/15R β és a γ_c asszociációja már az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-komplexben is kimutatható volt transzfektált alegységeket tartalmazó HeLa sejtekben (Volkó et al., 2019)

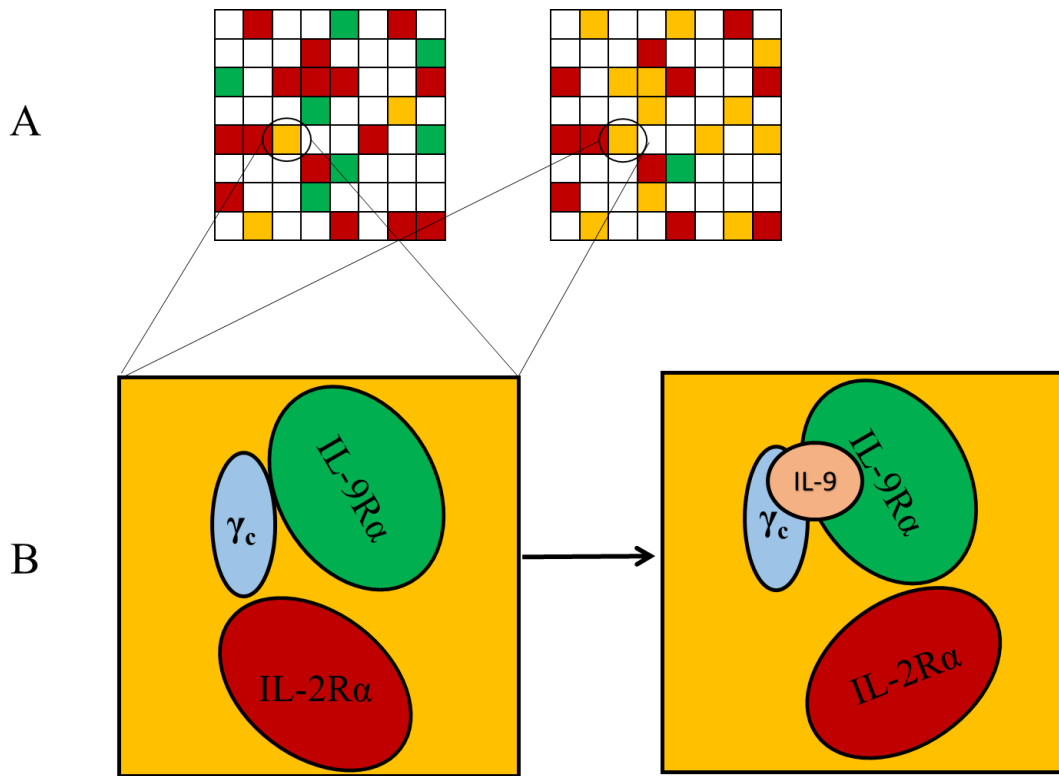
Ellentétben a fent említett co-patching vizsgálatok eredményeivel, mi nem tapasztaltunk szignifikáns változást a γ_c és IL-9R α között detektálható FRET hatásfok értékében IL-9 kötődés hatására. Ezzel szemben a γ_c /IL-2R α és az IL-2R α /IL-9R α párok esetén detektált FRET hatásfokok eloszlása szignifikánsan eltolódott, ami az IL-9/2R klaszterek belső struktúrájának (konformációjának és/vagy összetételének) megváltozását valószínűsíti. A co-patching módszerrel kapott eredmények és a saját FRET adataink közötti ellentmondás csak látszólagos: az IL-9R heterodimerek számának növekedése nem feltétlenül jelenti azt, hogy a két alegység közötti átlagos távolságban FRET szinten detektálható változás történik (legalábbis az adott epitópok vonatkozásában).

Eredményeinket az irodalmi adatok tükrében a következőképp interpretálhatjuk (18. ábra): Az IL-9R az IL-2 receptorral (és feltehetően egyéb fehérjékkel, pl. MHC I és II glikoproteinekkal) együtt laza szerkezetű, átrendeződésre képes fehérjeklasztereket alakít ki a vizsgált humán T limfóma eredetű sejtek lipid tutajaiban, amelyek „forró pontként” (jelátviteli centrumként) szolgálva lehetővé teszik a jelátviteli folyamatok gyors elindulását a citokin kötődését követően. Citokin kötődés hatására egyrészt kialakul a receptorkomplexek funkcionális (jelátvitelre képes) konformációja, másrészt megnő az összeszerelődött receptorkomplexek száma is, ezáltal szabályozva a jelátvitel hatékonyságát. Az IL-9R és IL-2R korrelációs kategóriától függetlenül minden sejten megfigyelhető közös membrándoménjei egyfajta „niche”-ként szolgálhatnak a receptorkomplexek számára. Azáltal, hogy az adott membránrégióban koncentrálják az IL-9/2R alegységeket, szabályozhatják a funkcionális receptorkomplexek kialakulásának sebességét, valamint a γ_c alegység hatékony megosztását elősegítő platformot biztosítanak az IL-2 és IL-9 számára.

Egyre több bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a γ_c lánc szintje kulcsszerepet játszik a γ_c citokinek jelátviteli hatékonyságának (citokin küszöbkonzentrációja, jelátvitel erőssége) meghatározásában (King et al., 2014). Az IL-2R és az IL-9R (vagy más γ_c

citokinreceptorok) kolokalizációja egy olyan lehetőséget vet fel az elérhető γ_c szint szabályozására, amely nem igényli az expressziós szint tényleges módosítását (pl. downreguláció vagy új fehérje szintézise révén), ezáltal gyorsabb és hatékonyabb. Az IL-2 kötődése a γ_c láncok és a kapcsolódó jelátviteli elemek (legalább egy részének) elvonásával csökkentheti a többi citokin számára hozzáférhető γ_c láncok számát. A sejt mikrokörnyezetében megjelenő aktuális citokinmilióttól függően ez a mechanizmus lehetővé teszi az IL-9 (és más γ_c citokin) által kiváltott jel erősségének finomhangolását. Ezt támasztják alá STAT1 aktivációs vizsgálataink is, amelyekben az IL-9 által kiváltott STAT1 aktiváció hatékonyságát az IL-2-vel történő előkezelés koncentrációfüggő módon gyengítette. Ez a mechanizmus természetesen nemcsak az IL-2 szabályozó szerepének vonatkozásában működhet, hanem bármely két (vagy több) γ_c citokin esetén. Így pl. a közelmúltban mutatták ki, hogy az IL-2 jelátvitel hatékonysága fordítottan korrelál az IL-7R α expressziójával Treg sejteken, amelynek hátterében az IL-7R α és a γ_c láncok preasszociációja áll (Waickman et al., 2020).

A disszertációmban bemutatott eredményeink alapján a γ_c citokinreceptorok és az IL-2R kolokalizációja általános érvényű jelenség, amelynek kialakulása az adott receptorkomplex összetételétől (heterodimer vagy heterotrimer) független. Amellett, hogy ez az elrendezés lehetővé teszi a citokin-specifikus α alegységekhez képest szignifikánsan alacsonyabb expressziós szinttel rendelkező γ_c gazdaságos és hatékony megosztását a különböző receptorfajták között, elősegítheti az IL-2 feltételezett szabályozó szerepének betöltését a γ_c citokinek rendszerében (Liao et al., 2011a). Továbbá megfigyeléseink alátámasztják, hogy membránfehérjék szerveződésének különböző hierarchikus szinten történő vizsgálatakor szükséges az elérhető biofizikai módszerek kombinált felhasználása, valamint többféle, egymást kiegészítő kiértékelési módszeré is ahhoz, hogy megbízható képet kapjunk a membránfehérjék eloszlásáról, mely hozzájárulhat a jelátviteli folyamatok jobb megértéséhez is (Aaron et al., 2018; Bodnar et al., 2005; Lagache et al., 2015).



18. ÁBRA: AZ IL-9R ÉS IL-2R SEJTFELSZÍNI ELOSZLÁSÁNAK LEHETSÉGES MODELLJE KIT225/IL-9R SEJTEKEN

(A) Az IL-9Rα és IL-2Rα doménszintű ko-lokalizációja a „valódi negatív” (bal oldali) és „valódi pozitív” (jobb oldali) korrelációs kategóriákba eső sejteken

Piros szín jelöli a kizárólag IL-2Rα-t, zöld szín a kizárólag IL-9Rα-t, míg sárga szín a mindkét alegységet tartalmazó pixelblokkokat.

(B) IL-9 hatása az IL-9Rα, IL-2Rα és γc receptor alegységek molekuláris szintű asszociációjára

Az egyes alegységek IL-9 hiányában jellemző (bal panel), illetve IL-9 hozzáadását követően kialakuló

7. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám során az immunrendszer szabályozásában fontos szerepet játszó interleukin-9 receptorának sejtfelszíni összeszerelődését és az IL-2R/MHC szuperklaszter elemeivel való térbeli kapcsolatát tanulmányoztam több hierarchikus szinten, humán T limfóma sejteken.

FRET és CLSM méréseink bizonyították, hogy a korábban más T sejteken feltárt, az IL-2R és az MHC glikoproteinek részvételével kialakított fehérjemintázatok mind az MT-2, mind pedig a Kit225/IL-9R sejteken megtalálhatók. Az IL-9R, legalábbis részben, az IL-2R/MHC klaszterekkel közös lipid tutajokban, az IL-2R és az MHC fehérjék molekuláris közelségében fejeződik ki, azaz az IL-9R ezen klaszterek további összetevője. Korábbi, az IL-2 és IL-15 vonatkozó adatokkal összevetve eredményünket valószínűsíthető, hogy a γ_c citokinreceptorok szerveződését egy olyan általános rendező elv vezérli aktivált vagy transzformált T sejtek plazmamembránjában, amelyben mind a lipid tutajok, mind pedig az MHC glikoproteinek kulcsszerepet játszanak.

A CLSM képek Pearson-féle korrelációs analízise feltárta, hogy a közös domének mellett az IL-9R és az IL-2R/MHC klaszterek szegregált membránterületeken is előfordulhatnak, akár ugyanazon a sejten is. Az átfedő és nem átfedő membránterületek aránya – a korrelációs koefficiens értékében is tetten érhető mértékben – sejtenként változó lehet. Ezt támasztja alá a korrelációs analízis kiegészítésül szolgáló együttes előfordulás módszere is, mellyel igazoltuk az IL-9R α és az IL-2R α egy minimális, de a véletlen által generálttól szignifikánsan nagyobb mértékű átfedését korrelációs kategóriától függetlenül minden sejten.

Kit225/IL-9R sejteken FRET mérésekkel feltártuk a γ_c alegység és az IL-9R α molekuláris közelségét már IL-9 távollétében is. Rövid ideig tartó IL-9 kezelés hatására pedig sikerült az IL-9/2R klaszter belső struktúrájának (konformáció és/vagy összetétel) megváltozását kimutatni. Hipotézisünk szerint a vizsgált humán T limfóma sejtek felszínén az IL-9R és IL-2R komplexek (valamint egyéb fehérjék, pl. MHC I és II glikoproteinek) közreműködésével létrejövő, átrendeződésre képes, laza szerkezetű klaszterek egyrészt elősegítik a hatékony jelátvitelt a ligandum kötést követően, másrészt lehetővé teszik a γ_c receptoralegységek hatékony megosztását, s így a kiváltott válasz finomhangolását.

8. SUMMARY

In my PhD work, I investigated the cell surface assembly of the receptor of interleukin-9, which plays an important role in the regulation of the immune system. I also studied the spatial relationship of the IL-9R with the IL-2R/MHC supercluster at different hierarchical levels in human T lymphoma cells.

Our FRET and CLSM measurements indicated that IL-9R α forms supramolecular clusters with IL-2R and MHC molecules in lipid rafts on both MT-2 and Kit225/IL-9R cells. IL-9R is an additional component of these clusters. Taking into account our current and previous results on IL-9, IL-15 and IL-2 receptors it is plausible to assume that superclusters of γ_c cytokine receptors with MHC glycoproteins may be generally present in the plasma membrane of activated or transformed T cells in which both lipid rafts and MHC glycoproteins play a key role.

Pearson's correlation analysis of CLSM images revealed that in addition to common domains, IL-9R and IL-2R / MHC clusters may also occur in segregated membrane regions, even on the same cell. The ratio of overlapping and non-overlapping membrane areas can vary from cell to cell that can be achieved in the value of the correlation coefficient. This is also supported by the co-occurrence method, by which we demonstrated a minimal but still significant fraction of both between IL-9R α and IL-2R α receptor types overlap with the other one, in all cells, regardless of the correlation category.

On Kit225/IL-9R cells, FRET measurements revealed the molecular proximity of the common γ_c subunit and IL-9R α even in the absence of IL-9. As a result of short-term IL-9 treatment, a change in the internal structure (conformation and/or composition) of the IL-9/2R cluster was detected. Clusters with the IL-9R and IL-2R complexes (and other proteins such as MHC I and II glycoproteins) on the surface of the studied human T lymphoma cells are loosely structured and capable of properly initiating efficient signaling following ligand binding.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1 Hivatkozott közlemények jegyzéke

- A. U. K. Bintha, A. S. Amadou, Huzzatul, M. M. Fauziyya, M. (2021). Therapeutic Potential of IL-9 in Allergic and Autoimmune Diseases *Interleukin*. doi:10.5772/intechopen.96266
- Aaron, J. S., Taylor, A. B. Chew, T. L. (2018). Image co-localization - co-occurrence versus correlation. *J Cell Sci*, 131(3). doi:10.1242/jcs.211847
- Angkasekwinai, P. Dong, C. (2021). IL-9-producing T cells: potential players in allergy and cancer. *Nat Rev Immunol*, 21(1), 37-48. doi:10.1038/s41577-020-0396-0
- Bauer, J. H., Liu, K. D., You, Y., Lai, S. Y. Goldsmith, M. A. (1998). Heteromerization of the gamma chain with the interleukin-9 receptor alpha subunit leads to STAT activation and prevention of apoptosis. *J Biol Chem*, 273(15), 9255-9260. doi:10.1074/jbc.273.15.9255
- Berney, C. Danuser, G. (2003). FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophys J*, 84(6), 3992-4010. doi:10.1016/S0006-3495(03)75126-1
- Bittner, C., Merz, H., Krokowski, M., Briese, J., Wiedemann, G. J. Feller, A. C. (2000). [New immunotherapeutic approaches for the treatment of anaplastic large cell lymphoma in a mouse model]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 84, 187-198. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11217440>
- Bodnar, A., Nizsaloczki, E., Mocsar, G., Szaloki, N., Waldmann, T. A., Damjanovich, S. Vamosi, G. (2008). A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol Lett*, 116(2), 117-125. doi:10.1016/j.imlet.2007.12.014
- Bodnar, A., Vamosi, G., Toth, K., Jenei, A., Matyus, L. Damjanovich, S. (2005). Non-random patterns of membrane proteins and their roles in transmembrane signaling. In S. Damjanovich (Ed.), *Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling* (Vol. 8, pp. 71-95). Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag. (Reprinted from: Not in File). doi:DOI: 10.1007/3-540-26511-2_3
- Burton, J., Goldman, C. K., Rao, P., Moos, M. Waldmann, T. A. (1990). Association of intercellular adhesion molecule 1 with the multichain high-affinity interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18), 7329-7333. doi:10.1073/pnas.87.18.7329
- Chakraborty, S., Kubatzky, K. F. Mitra, D. K. (2019). An Update on Interleukin-9: From Its Cellular Source and Signal Transduction to Its Role in Immunopathogenesis. *Int J Mol Sci*, 20(9). doi:10.3390/ijms20092113
- Chen, N., Lv, X., Li, P., Lu, K. Wang, X. (2014). Role of high expression of IL-9 in prognosis of CLL. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(2), 716-721. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925918/pdf/ijcep0007-0716.pdf>
- Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H., Yamagata, Y., Davis, S. J. Ikemizu, S. (2007). Crystal structure of the IL-15-IL-15Ralpha complex, a cytokine-receptor unit presented in trans. *Nat Immunol*, 8(9), 1001-1007. doi:10.1038/ni1492
- Clegg, R. M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 6(1), 103-110. doi:10.1016/0958-1669(95)80016-6
- Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G. Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J*, 86(6), 3993-4003. doi:10.1529/biophysj.103.038422
- Damjanovich, S., Bene, L., Matko, J., Alileche, A., Goldman, C. K., Sharrow, S. Waldmann, T. A. (1997). 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*, 94(24), 13134-13139. doi:10.1073/pnas.94.24.13134
- de Bakker, B. I., Bodnar, A., van Dijk, E. M., Vamosi, G., Damjanovich, S., Waldmann, T. A., van Hulst, N. F., Jenei, A. Garcia-Parajo, M. F. (2008). Nanometer-scale organization of the alpha subunits of the receptors for IL2 and IL15 in human T lymphoma cells. *J Cell Sci*, 121(Pt 5), 627-633. doi:10.1242/jcs.019513
- De Smedt, M., Verhasselt, B., Kerre, T., Vanhecke, D., Naessens, E., Leclercq, G., Renauld, J. C., Van Snick, J. Plum, J. (2000). Signals from the IL-9 receptor are critical for the early stages of human intrathymic T cell development. *J Immunol*, 164(4), 1761-1767. doi:10.4049/jimmunol.164.4.1761

- Demoulin, J. B., Louahed, J., Dumoutier, L., Stevens, M., Renauld, J. C. (2003). MAP kinase activation by interleukin-9 in lymphoid and mast cell lines. *Oncogene*, 22(12), 1763-1770. doi:10.1038/sj.onc.1206253
- Demoulin, J. B., Renauld, J. C. (1998a). Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function. *Int Rev Immunol*, 16(3-4), 345-364. doi:10.3109/08830189809043001
- Demoulin, J. B., Renauld, J. C. (1998b). Signalling by cytokines interacting with the interleukin-2 receptor gamma chain. *Cytokines Cell Mol Ther*, 4(4), 243-256. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068058>
- Demoulin, J. B., Uyttenhove, C., Lejeune, D., Mui, A., Groner, B., Renauld, J. C. (2000). STAT5 activation is required for interleukin-9-dependent growth and transformation of lymphoid cells. *Cancer Res*, 60(14), 3971-3977. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000088365300044
- Demoulin, J. B., Uyttenhove, C., VanRoost, E., deLestre, B., Donckers, D., VanSnick, J., Renauld, J. C. (1996). A single tyrosine of the interleukin-9 (IL-9) receptor is required for STAT activation, antiapoptotic activity, and growth regulation by IL-9. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4710-4716. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1996VC89700014
- Demoulin, J. B., Van Roost, E., Stevens, M., Groner, B., Renauld, J. C. (1999). Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin-9. *J Biol Chem*, 274(36), 25855-25861. doi:10.1074/jbc.274.36.25855
- Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Krönke, M., Waldmann, T. A., Greene, W. C. (1985). Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(12), 4230-4234. doi:10.1073/pnas.82.12.4230
- Dixon-Salazar, T. J., Fourgeaud, L., Tyler, C. M., Poole, J. R., Park, J. J., Boulanger, L. M. (2014). MHC class I limits hippocampal synapse density by inhibiting neuronal insulin receptor signaling. *J Neurosci*, 34(35), 11844-11856. doi:10.1523/JNEUROSCI.4642-12.2014
- Donahue, R. E., Yang, Y. C., Clark, S. C. (1990). Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation. *Blood*, 75(12), 2271-2275. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1693525>
- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A., Tagaya, Y. (2002). IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*, 17(5), 537-547. doi:10.1016/s1074-7613(02)00429-6
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(4), C723-742. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010
- Edidin, M., Aszalos, A., Damjanovich, S., Waldmann, T. A. (1988). Lateral diffusion measurements give evidence for association of the Tac peptide of the IL-2 receptor with the T27 peptide in the plasma membrane of HUT-102-B2 T cells. *J Immunol*, 141(4), 1206-1210.
- Eicher, D. M., Waldmann, T. A. (1998). IL-2R alpha on one cell can present IL-2 to IL-2R beta/gamma(c) on another cell to augment IL-2 signaling. *J Immunol*, 161(10), 5430-5437. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820518>
- Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J. C., Kuchroo, V. K., Khoury, S. J. (2009). IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), 12885-12890. doi:10.1073/pnas.0812530106
- Erdei, A., Sármay, G. (2006). *Immunológia*. ISBN:978 963 226 370 0
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Caligiuri, M. A. (2002). Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(2), 169-183.
- Feng, L. L., Gao, J. M., Li, P. P., Wang, X. (2011). IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Immunol*, 31(6), 1084-1094. doi:10.1007/s10875-011-9584-9
- Fujiki, H., Kimura, T., Minamiguchi, H., Harada, S., Wang, J., Nakao, M., Yokota, S., Urata, Y., Ueda, Y., Yamagishi, H., Sonoda, Y. (2002). Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture. *Exp Hematol*, 30(12), 1373-1380. doi:10.1016/s0301-472x(02)00966-9
- Goebel, J., Forrest, K., Flynn, D., Rao, R., Roszman, T. L. (2002). Lipid rafts, major histocompatibility complex molecules, and immune regulation. *Hum Immunol*, 63(10), 813-820. doi:10.1016/s0198-8859(02)00458-5
- Goh, T. S., Hong, C. (2017). New insights of common gamma chain in hematological malignancies. *Cytokine*, 89, 179-184. doi:10.1016/j.cyto.2015.12.009
- Goswami, R., Kaplan, M. H. (2011). A brief history of IL-9. *J Immunol*, 186(6), 3283-3288. doi:10.4049/jimmunol.1003049
- Gounni, A. S., Gregory, B., Nutku, E., Aris, F., Latifa, K., Minshall, E., North, J., Tavernier, J., Levit, R., Nicolaides, N., Robinson, D., Hamid, Q. (2000). Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor

- expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood*, 96(6), 2163-2171. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979962>
- Gruss, H. J., Brach, M. A., Drexler, H. G., Bross, K. J.Herrmann, F. (1992). Interleukin 9 is expressed by primary and cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res*, 52(4), 1026-1031. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1737332>
- Gutcher, I.Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*, 117(5), 1119-1127. doi:10.1172/JCI31720
- Hamano, R., Wu, X., Wang, Y., Oppenheim, J. J.Chen, X. (2015). Characterization of MT-2 cells as a human regulatory T cell-like cell line. *Cell Mol Immunol*, 12(6), 780-782. doi:10.1038/cmi.2014.123
- Harder, T.Simons, K. (1999). Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol*, 29(2), 556-562. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199902)29:02<556::AID-IMMU556>3.0.CO;2-2
- Hemar, A., Subtil, A., Lieb, M., Morelon, E., Hellio, R.Dautry-Varsat, A. (1995). 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*, 129(1), 55-64. doi:10.1083/jcb.129.1.55
- Hori, T., Uchiyama, T., Tsudo, M., Umadome, H., Ohno, H., Fukuhara, S., Kita, K.Uchino, H. (1987). 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*, 70(4), 1069-1072. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120818564?via%3Dihub>
- Jenei, A., Kormos, J., Szentesi, G., Veres, A. J., Varga, S., Bodnar, A., Damjanovich, S.Matyus, L. (2009). Non-random distribution of interleukin receptors on the cell surface. *Chemphyschem*, 10(9-10), 1577-1585. doi:10.1002/cphc.200900242
- Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., Gupta, S., Chen, Y. Q., Giri, J. D.et al. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 8705-8709. doi:10.1073/pnas.92.19.8705
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W. N., Smith, K. A.Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity*, 32(1), 91-103. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.010
- King, C., Sarabipour, S., Byrne, P., Leahy, D. J.Hristova, K. (2014). The FRET signatures of noninteracting proteins in membranes: simulations and experiments. *Biophys J*, 106(6), 1309-1317. doi:10.1016/j.bpj.2014.01.039
- Knoops, L.Renauld, J. C. (2004). IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors*, 22(4), 207-215. doi:10.1080/08977190410001720879
- Knorr, R., Karacsonyi, C.Lindner, R. (2009). Endocytosis of MHC molecules by distinct membrane rafts. *J Cell Sci*, 122(Pt 10), 1584-1594. doi:10.1242/jcs.039727
- Lagache, T., Sauvonnnet, N., Danglot, L.Olivo-Marin, J. C. (2015). Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. *Cytometry A*, 87(6), 568-579. doi:10.1002/cyto.a.22629
- Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P.He, H. T. (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol*, 12(3), 250-255. doi:10.1016/s0952-7915(00)00084-4
- Lee, B., Tanaka, Y.Tozawa, H. (1989). Monoclonal antibody defining tax protein of human T-cell leukemia virus type-I. *Tohoku J Exp Med*, 157(1), 1-11. doi:10.1620/tjem.157.1
- Lemoli, R. M., Fortuna, A., Tafuri, A., Grande, A., Amabile, M., Martinelli, G., Ferrari, S.Tura, S. (1997). Interleukin-9 in human myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, 26(5-6), 563-573. doi:10.3109/10428199709050892
- Leonard, W. J., Lin, J. X.O'Shea, J. J. (2019). The gammac Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity*, 50(4), 832-850. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.028
- Li, H. J., Sun, Q. M., Liu, L. Z., Zhang, J., Huang, J., Wang, C. H., Ding, R., Song, K.Tong, Z. (2015). High expression of IL-9R promotes the progression of human hepatocellular carcinoma and indicates a poor clinical outcome. *Oncol Rep*, 34(2), 795-802. doi:10.3892/or.2015.4060
- Liao, W., Lin, J. X.Leonard, W. J. (2011a). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 23(5), 598-604. doi:10.1016/j.coi.2011.08.003
- Liao, W., Lin, J. X.Leonard, W. J. (2013). Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38(1), 13-25. doi:10.1016/j.immuni.2013.01.004
- Liao, W., Lin, J. X., Wang, L., Li, P.Leonard, W. J. (2011b). Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol*, 12(6), 551-559. doi:10.1038/ni.2030

- Liao, W., Schones, D. E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T. Y., Zhao, K., Leonard, W. J. (2008). Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol*, 9(11), 1288-1296. doi:10.1038/ni.1656
- Lin, J. X., Leonard, W. J. (2018). The Common Cytokine Receptor gamma Chain Family of Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(9). doi:10.1101/cshperspect.a028449
- Lin, J. X., Migone, T. S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S. et al. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*, 2(4), 331-339. doi:10.1016/1074-7613(95)90141-8
- Liparoto, S. F., Myszka, D. G., Wu, Z., Goldstein, B., Laue, T. M., Ciardelli, T. L. (2002). Analysis of the role of the interleukin-2 receptor gamma chain in ligand binding. *Biochemistry*, 41(8), 2543-2551. doi:10.1021/bi011692m
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J. Yi, Q. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest*, 122(11), 4160-4171. doi:10.1172/JCI65459
- Lv, X., Wang, X. (2013). The role of interleukin-9 in lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 54(7), 1367-1372. doi:10.3109/10428194.2012.745072
- Malek, T. R., Castro, I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, 33(2), 153-165. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.004
- Malka, Y., Hornakova, T., Royer, Y., Knoops, L., Renauld, J. C., Constantinescu, S. N., Henis, Y. I. (2008). Ligand-independent Homomeric and Heteromeric Complexes between Interleukin-2 or-9 Receptor Subunits and the gamma Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33569-33577. doi:10.1074/jbc.M803125200
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc*, 169(3), 375-382. doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- Matko, J., Bodnar, A., Vereb, G., Bene, L., Vamosi, G., Szentesi, G., Szollosi, J., Gaspar, R., Horejsi, V., Waldmann, T. A., Damjanovich, S. (2002). GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur J Biochem*, 269(4), 1199-1208. doi:10.1046/j.0014-2956.2002.02759.x
- McDonald, J. H., Dunn, K. W. (2013). Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy. *J Microsc*, 252(3), 295-302. doi:10.1111/jmi.12093
- Merz, H., Houssiau, F. A., Orscheschek, K., Renauld, J. C., Flidner, A., Herin, M., Noel, H., Kadin, M., Mueller-Hermelink, H. K., Van Snick, J. et al. (1991). Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood*, 78(5), 1311-1317. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908723>
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Shiraishi, Y. (1981). A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gan*, 72(6), 978-981. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6281119>
- Mocsar, G., Volko, J., Ronnlund, D., Widengren, J., Nagy, P., Szollosi, J., Toth, K., Goldman, C. K., Damjanovich, S., Waldmann, T. A., Bodnar, A., Vamosi, G. (2016). MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells. *Biophys J*, 111(1), 100-112. doi:10.1016/j.bpj.2016.05.044
- Mortier, E., Advincula, R., Kim, L., Chmura, S., Barrera, J., Reizis, B., Malynn, B. A., Ma, A. (2009). Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity*, 31(5), 811-822. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.017
- Nagato, T., Kobayashi, H., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Ishii, H., Oikawa, K., Aoki, N., Sato, K., Kimura, S., Shimizu, N., Tateno, M., Harabuchi, Y. (2005). Expression of interleukin-9 in nasal natural killer/T-cell lymphoma cell lines and patients. *Clin Cancer Res*, 11(23), 8250-8257. doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-1426
- Nagy, P. (2012). *Az ERBB fehérjék klaszterizációjának biofizikai karakterizálása és biológiai jelentősége. Akadémiai doktori thesis, Debreceni Egyetem OEC*
- Nagy, P., Szabo, A., Varadi, T., Kovacs, T., Batta, G., Szollosi, J. (2016). rFRET: A comprehensive, Matlab-based program for analyzing intensity-based ratiometric microscopic FRET experiments. *Cytometry A*, 89(4), 376-384. doi:10.1002/cyto.a.22828
- Neurath, M. F., Finotto, S. (2016). IL-9 signaling as key driver of chronic inflammation in mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 29, 93-99. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.02.002
- Noelle, R. J., Nowak, E. C. (2010). Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol*, 10(10), 683-687. doi:10.1038/nri2848

- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W., Leonard, W. J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*, 73(1), 147-157. doi:10.1016/0092-8674(93)90167-o
- Parham, P. (2009). *The Immune System*: Garland Science. ISBN:978-0815341468
- Paul, W. E. (2013). *Fundamental immunology*. ISBN:9781451117837 1451117833
- Perera, P. Y., Lichy, J. H., Waldmann, T. A., Perera, L. P. (2012). The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect*, 14(3), 247-261. doi:10.1016/j.micinf.2011.10.006
- Pike, J. A., Styles, I. B., Rappoport, J. Z., Heath, J. K. (2017). Quantifying receptor trafficking and colocalization with confocal microscopy. *Methods*, 115, 42-54. doi:10.1016/j.ymeth.2017.01.005
- Pilipow, K., Roberto, A., Roederer, M., Waldmann, T. A., Mavilio, D., Lugli, E. (2015). IL15 and T-cell Stemness in T-cell-Based Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*, 75(24), 5187-5193. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1498
- Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H. S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A. M., Khoury, S. J., Fuhlbrigge, R. C., Kuchroo, V. K., Clark, R. A., Kupper, T. S. (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*, 18(8), 1248-1253. doi:10.1038/nm.2856
- Qiu, L., Lai, R., Lin, Q., Lau, E., Thomazy, D. M., Calame, D., Ford, R. J., Kwak, L. W., Kirken, R. A., Amin, H. M. (2006). Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*, 108(7), 2407-2415. doi:10.1182/blood-2006-04-020305
- Ramalingam, T. S., Chakrabarti, A., Edidin, M. (1997). Interaction of class I human leukocyte antigen (HLA-I) molecules with insulin receptors and its effect on the insulin-signaling cascade. *Mol Biol Cell*, 8(12), 2463-2474. doi:10.1091/mbc.8.12.2463
- Renauld, J. C. (1995). Interleukin-9: structural characteristics and biologic properties. *Cancer Treat Res*, 80, 287-303. doi:10.1007/978-1-4613-1241-3_11
- Renauld, J. C., Druetz, C., Kermouni, A., Houssiau, F., Uyttenhove, C., Van Roost, E., Van Snick, J. (1992). Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), 5690-5694. doi:10.1073/pnas.89.12.5690
- Renauld, J. C., Goethals, A., Houssiau, F., Van Roost, E., Van Snick, J. (1990). Cloning and expression of a cDNA for the human homolog of mouse T cell and mast cell growth factor P40. *Cytokine*, 2(1), 9-12. doi:10.1016/1043-4666(90)90037-t
- Renauld, J. C., Kermouni, A., Vink, A., Louahed, J., Van Snick, J. (1995a). Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *J Leukoc Biol*, 57(3), 353-360. doi:10.1002/jlb.57.3.353
- Renauld, J. C., van der Lugt, N., Vink, A., van Roon, M., Godfraind, C., Warnier, G., Merz, H., Feller, A., Berns, A., Van Snick, J. (1994). Thymic lymphomas in interleukin 9 transgenic mice. *Oncogene*, 9(5), 1327-1332. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8152793>
- Renauld, J. C., Vink, A., Louahed, J., Vansnick, J. (1995b). Interleukin-9 Is a Major Anti-Apoptotic Factor for Thymic Lymphomas. *Blood*, 85(5), 1300-1305. doi:DOI 10.1182/blood.V85.5.1300.bloodjournal8551300
- Rivera Vargas, T., Humblin, E., Vegran, F., Ghiringhelli, F., Apetoh, L. (2017). TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin Immunopathol*, 39(1), 39-46. doi:10.1007/s00281-016-0599-4
- Rojas-Zuleta, W. G., Sanchez, E. (2017). IL-9: Function, Sources, and Detection. *Methods Mol Biol*, 1585, 21-35. doi:10.1007/978-1-4939-6877-0_2
- Rosenberg, S. A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*, 192(12), 5451-5458. doi:10.4049/jimmunol.1490019
- Roszik, J., Lisboa, D., Szollosi, J., Vereb, G. (2009). Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry--approaches and a software solution. *Cytometry A*, 75(9), 761-767. doi:10.1002/cyto.a.20747
- Roszik, J., Szollosi, J., Vereb, G. (2008). AccPbFRET: an ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images. *BMC Bioinformatics*, 9, 346. doi:10.1186/1471-2105-9-346
- Schluns, K. S., Stoklasek, T., Lefrancois, L. (2005). The roles of interleukin-15 receptor alpha: Trans-presentation, receptor component, or both? *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(8), 1567-1571. doi:10.1016/j.biocel.2005.02.017
- Shang, Y., Kakinuma, S., Amasaki, Y., Nishimura, M., Kobayashi, Y., Shimada, Y. (2008). Aberrant activation of interleukin-9 receptor and downstream Stat3/5 in primary T-cell lymphomas in vivo in susceptible B6 and resistant C3H mice. *In Vivo*, 22(6), 713-720. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180996>

- Siegel, J. P., Sharon, M., Smith, P. L., Leonard, W. J. (1987). The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science*, 238(4823), 75-78. doi:10.1126/science.3116668
- Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731. doi:10.1126/science.175.4023.720
- Skov, S., Nielsen, M., Bregenholt, S., Odum, N., Claesson, M. H. (1998). Activation of Stat-3 is involved in the induction of apoptosis after ligation of major histocompatibility complex class I molecules on human Jurkat T cells. *Blood*, 91(10), 3566-3573. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000073515700003
- Spolski, R., Gromer, D., Leonard, W. J. (2017). The gamma c family of cytokines: fine-tuning signals from IL-2 and IL-21 in the regulation of the immune response. *F1000Res*, 6, 1872. doi:10.12688/f1000research.12202.1
- Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*, 47, 819-846. doi:10.1146/annurev.bi.47.070178.004131
- Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., Takeshita, T. (1996). The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol*, 14(0732-0582 (Print)), 179-205. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.179
- Szentesi, G., Horvath, G., Bori, I., Vamosi, G., Szollosi, J., Gaspar, R., Damjanovich, S., Jenei, A., Matyus, L. (2004). Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput Methods Programs Biomed*, 75(3), 201-211. doi:10.1016/j.cmpb.2004.02.004
- Szöllösi, J., Damjanovich, S., Goldman, C. K., Fulwyler, M. J., Aszalos, A. A., Goldstein, G., Rao, P., Talle, M. A., Waldmann, T. A. (1987). Flow cytometric resonance energy transfer measurements support the association of a 95-kDa peptide termed T27 with the 55-kDa Tac peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20), 7246-7250. doi:10.1073/pnas.84.20.7246
- Szollosi, J., Damjanovich, S., Nagy, P., Vereb, G., Matyus, L. (2006). Principles of resonance energy transfer. *Curr Protoc Cytom, Chapter 1*, Unit 12. doi:10.1002/0471142956.cy0112s38
- Turner, J. E., Morrison, P. J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renauld, J. C., Panzer, U., Helmby, H., Stockinger, B. (2013). IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J Exp Med*, 210(13), 2951-2965. doi:10.1084/jem.20130071
- Vamosi, G., Bodnar, A., Damjanovich, S., Nagy, P., Varga, Z., Damjanovich, L. (2006). The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes. *Immunol Lett*, 104(1-2), 53-58. doi:10.1016/j.imlet.2005.11.014
- Vamosi, G., Bodnar, A., Vereb, G., Jenei, A., Goldman, C. K., Langowski, J., Toth, K., Matyus, L., Szollosi, J., Waldmann, T. A., Damjanovich, S. (2004). IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(30), 11082-11087. doi:10.1073/pnas.0403916101
- Vantourout, P., Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*, 13(2), 88-100. doi:10.1038/nri3384
- Veldhoen, M., Uytendhoeve, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9(12), 1341-1346. doi:10.1038/ni.1659
- Vereb, G., Matko, J., Vamosi, G., Ibrahim, S. M., Magyar, E., Varga, S., Szollosi, J., Jenei, A., Gaspar, R., Jr., Waldmann, T. A., Damjanovich, S. (2000). 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*, 97(11), 6013-6018. doi:10.1073/pnas.97.11.6013
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8053-8058. doi:10.1073/pnas.1332550100
- Vink, A., Renauld, J. C., Warnier, G., Van Snick, J. (1993). Interleukin-9 stimulates in vitro growth of mouse thymic lymphomas. *Eur J Immunol*, 23(5), 1134-1138. doi:10.1002/eji.1830230523
- Volko, J., Kenesei, A., Zhang, M., Varnai, P., Mocsar, G., Petrus, M. N., Jambrovics, K., Balajthy, Z., Muller, G., Bodnar, A., Toth, K., Waldmann, T. A., Vamosi, G. (2019). IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Ralpha therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(42), 21120-21130. doi:10.1073/pnas.1901382116
- Waickman, A. T., Keller, H. R., Kim, T. H., Luckey, M. A., Tai, X., Hong, C., Molina-Paris, C., Walsh, S. T., R. Park, J. H. (2020). The Cytokine Receptor IL-7Ra Impairs IL-2 Receptor Signaling and Constrains

- the In Vitro Differentiation of Foxp3(+) Treg Cells. *iScience*, 23(8), 101421. doi:10.1016/j.isci.2020.101421
- Waickman, A. T., Park, J. Y., Park, J. H. (2016). The common gamma-chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell Mol Life Sci*, 73(2), 253-269. doi:10.1007/s00018-015-2062-4
- Wan, J., Wu, Y., Ji, X., Huang, L., Cai, W., Su, Z., Wang, S., Xu, H. (2020). IL-9 and IL-9-producing cells in tumor immunity. *Cell Commun Signal*, 18(1), 50. doi:10.1186/s12964-020-00538-5
- Wiener, Z., Falus, A., Toth, S. (2004). IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine*, 26(3), 122-130. doi:10.1016/j.cyto.2004.01.006
- Wilhelm, C., Hirota, K., Stieglitz, B., Van Snick, J., Tolaini, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Helmby, H., Stockinger, B. (2011). An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol*, 12(11), 1071-1077. doi:10.1038/ni.2133
- Williams, D. E., Morrissey, P. J., Mochizuki, D. Y., de Vries, P., Anderson, D., Cosman, D., Boswell, H. S., Cooper, S., Grabstein, K. H., Broxmeyer, H. E. (1990). T-cell growth factor P40 promotes the proliferation of myeloid cell lines and enhances erythroid burst formation by normal murine bone marrow cells in vitro. *Blood*, 76(5), 906-911. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2118397>
- Williams, M. A., Tyznik, A. J., Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature*, 441(7095), 890-893. doi:10.1038/nature04790
- Wouters, F. S., Bastiaens, P. I., Wirtz, K. W., Jovin, T. M. (1998). FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *Embo j*, 17(24), 7179-7189. doi:10.1093/emboj/17.24.7179
- Wuest, S. C., Edwan, J. H., Martin, J. F., Han, S., Perry, J. S., Cartagena, C. M., Matsuura, E., Maric, D., Waldmann, T. A., Bielekova, B. (2011). A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med*, 17(5), 604-609. doi:10.1038/nm.2365
- Xu, S., Liu, X., Bao, Y., Zhu, X., Han, C., Zhang, P., Zhang, X., Li, W., Cao, X. (2012). Constitutive MHC class I molecules negatively regulate TLR-triggered inflammatory responses via the Fps-SHP-2 pathway. *Nat Immunol*, 13(6), 551-559. doi:10.1038/ni.2283
- Xue, H. H., Kovanen, P. E., Pise-Masison, C. A., Berg, M., Radovich, M. F., Brady, J. N., Leonard, W. J. (2002). IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), 13759-13764. doi:10.1073/pnas.212214999
- Yen, C. H., Yang, Y. C., Ruscetti, S. K., Kirken, R. A., Dai, R. M., Li, C. C. (2000). Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of nontyrosine kinase-type cytokine receptors of IL-9, IL-2, and erythropoietin. *J Immunol*, 165(11), 6372-6380. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6372
- Ying He, L. D., Yejin Cao, Yujing Bi, Guangwei Liu. (2020). IL-9 and Th9 Cells in Tumor Immunity. In A. Birbrair (Ed.), *Tumor Microenvironment*. doi:DOI: 10.1007/978-3-030-38315-2_3
- Zhu, Y. X., Sun, H. B., Tsang, M. L., McMahon, J., Grigsby, S., Yin, T., Yang, Y. C. (1997). Critical cytoplasmic domains of human interleukin-9 receptor alpha chain in interleukin-9-mediated cell proliferation and signal transduction. *J Biol Chem*, 272(34), 21334-21340. doi:10.1074/jbc.272.34.21334

9.2 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//2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nizsalóczki Enikő
Neptun kód: FTTYNJ
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nizsalóczki, E.**, Nagy, P., Mocsár, G., Nagyné Szabó, Á. T., Csomós, I., Waldmann, T. A., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: a quantitative CLSM and FRET analysis. *Cytom. Part A*. 93 (11), 1106-1117, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.23634>
IF: 3.433
2. **Nizsalóczki, E.**, Csomós, I., Nagy, P., Fazekas, Z., Goldman, C. K., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells. *ChemPhysChem*. 15 (18), 3969-3978, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201402501>
IF: 3.419

További közlemények

3. Araki, N., Trencsényi, G., Krasznai, Z. T., **Nizsalóczki, E.**, Sakamoto, A., Kawano, N., Miyado, K., Yoshida, K., Yoshida, M.: Seminal Vesicle Secretion 2 Acts as a Protectant of Sperm Sterols and Prevents Ectopic Sperm Capacitation in Mice. *Biol. Reprod.* 92 (1), 1-10, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.114.120642>
IF: 3.471
4. Krasznai, Z. T., Trencsényi, G., Krasznai, Z., Mikecz, P., **Nizsalóczki, E.**, Szalóki, G., Péli-Szabó, J., Balkay, L., Márián, T., Goda, K.: 18FDG a PET tumor diagnostic tracer is not a substrate of the ABC transporter P-glycoprotein. *Eur. J. Pharm. Sci.* 64C, 1-8, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.002>
IF: 3.35



5. Czuriga, D., Tóth, A., Pásztorné Tóth, E., Balogh, Á., Dóczy-Bodnár, A., **Nizsalóczki, E.**, Lionetti, V., Recchia, F. A., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z.: Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure.
Basic Res. Cardiol. 107 (2), 1-13, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-012-0244-x>
IF: 5.904
6. Dóczy-Bodnár, A., **Nizsalóczki, E.**, Mocsár, G., Szalóki, N., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., Vámosi, G.: A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions.
Immun. Lett. 116 (2), 117-125, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2007.12.014>
IF: 2.858
7. Maksa, G., **Nizsalóczki, E.**: Quasi-sums in several variables.
Acta Math. Acad. Paedag. Nyíregyh. 22, 193-207, 2006.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,435

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,852

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, 2020.01.17.

10. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

Interleukin-9 és -2 receptor, fluoreszcencia, Förster-típusú rezonancia energia transzfer, konfokális lézer pásztázó mikroszkópia, humán T limfóma sejtek, fehérje kolokalizáció és együttes előfordulás

Interleukin-9 and -2 receptors, fluorescence, Förster-type resonance energy transfer, confocal laser scanning microscopy, human T lymphoma cells, colocalization and co-occurrence of proteins

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Dóczy-Bodnár Andreának a lehetőséget, hogy doktorandusz hallgatóként becsatlakozhattam a kutatómunkájába. Köszönöm alaposságát, szakmai fejlődésem támogatását, valamint a cikkek és a doktori disszertációm elkészítésében való részvételét és segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Mátyus Lászlónak, Prof. Dr. Nagy Péternek és Prof. Dr. Jenei Attilának a szakmai tanácsokért és támogatásukért.

Továbbá a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és korábbi vezetőinek, Prof. Dr. Panyi Györgynek, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak és Prof. Dr. Damjanovich Sándornak, hogy biztosították számomra intézetükben a kísérletes munkák anyagi és tárgyi feltételeit.

Munkacsoportunk asszisztenseinek: Utasi-Szabó Rita Katalinnak, Nagy Edinának, és Bagosi Adriennek, a kísérletek összeállításánál és kivitelezésénél adott gyakorlatias és pontos tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Mocsár Gábornak, Dr. Szalóki Nikolettának, Dr. Volkó Juliannának és Csomós Istvánnak a hosszú évek közös munkáját, szakmai segítségüket.

Dr. Szabó Ágnesnek, Dr. Váradi Tímeának és Rente Tündének a baráti támogatásukat.

Köszönöm Prof. Dr. Thomas A. Waldmann a kollaborációban nyújtott szakmai támogatását, hasznos tanácsait.

Végezetül köszönöm férjemnek és gyermekeimnek, valamint szüleimnek és testvéreimnek azt a sok-sok türelmet és szeretetet, amelyet kaptam tőlük.

12. FÜGGELÉK