

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

IL-2 és -15 receptorok kölcsönhatásainak vizsgálata humán T limfóma sejteken

Mocsár Gábor

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

IL-2 és -15 receptorok kölcsönhatásainak vizsgálata humán T limfóma sejteken

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Mocsár Gábor, okleveles fizikus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Vámosi György, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Balkay László, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Immunológiai Intézet Diskussziós terme
2015. december 15. 12:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Jóna István, az MTA doktora
Dr. Bugyi Beáta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Jóna István, az MTA doktora
Dr. Bugyi Beáta, PhD
Dr. Koncz Gábor, PhD
Dr. Osváth Szabolcs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme, 2017. szeptember 04. 13:00 óra.

1 Bevezetés

1.1. Membránmodellek, membránfehérjék laterális organizációja

A sejtek membránjának fő feladata a sejt saját folyamatainak elválasztása a külső környezettől, illetve az azzal való szabályozott anyagtranszport és kommunikáció fenntartása. Az utóbbi évtizedekben számos megfigyelés mutatott rá, hogy a Singer-ről és Nicolson-ról elnevezett modellt szükséges kiegészíteni. 1997-ben Simons és Ikonen enyhe detergens kezelésnek ellenálló, ún. detergens-rezisztens membrán frakciókat talált (DRM). Ez alapján terjedt el az ún. lipid tutaj hipotézis. A lipid tutajok speciális összetételű membrándomének, főként koleszterinből, szfingomielinből, glikoszfingolipidekből (GSL) és GPI-horgonyzott fehérjékből felépülő dinamikus struktúrák. A lipid tutajok mind strukturális, mind funkcionális fehérjeplatformként jellemezhetőek, nagyságuk változatos eloszlást mutat (10-300 nm).

A membránfehérjék szabad elmozdulását a viszkózus környezet mellett a citoszkeleton is gátolhatja. Az inhomogén sejtfelszíni fehérjeeloszlások több tényező együttes hatásával magyarázhatóak:

1. Membránban működő erők: lipid domén struktúra, viszkózus membránrégiók, fehérje-fehérje kölcsönhatások
2. Intracellulárisan ható tényezők: a citoszkeleton direkt vagy indirekt módon gátló hatása, vezikuláris transzport folyamatok általi akkumuláció, jelátviteli folyamatok által indukált klaszterizáció
3. Extracellulárisan ható tényezők: elektrosztatikus erők, keresztkötő ligandumok valamint az extracelluláris mátrix
4. Egyéb tényezők: pl. a membránpotenciál megváltozása, különféle perturbáló tényezők, amelyek akár a fehérjék konformációjának megváltoztatásán, akár az előző pontokban felsorolt tényezők módosításán keresztül fejthetik ki hatásukat.

A felsorolt tényezők nem egymástól függetlenül, hanem egymás hatását kiegészítve működnek, jelenlétük szükséges a fehérjék mobilitásának, eloszlásának, aggregációs állapotának szabályozásában.

1.2. Interleukin-2 és -15 receptorok

Az IL-2 és IL-15 citokineknek fontos szerepük van az immunsejtek aktivációjában, túlélésében és sejthalálában. Receptor alegységeik, illetve az ezekből létrejövő különféle komplexek más-más affinitással képesek a citokinek megkötésére. Receptoraik három alegységből állnak, melyekből kettőt, a β és γ_c alegységet a két citokin megosztva használ, de az

α alegységek citokin specifikusak. A sejtmembránban a receptorok ligandjuk nélkül is összeszerelt formában találhatók, és lipid tutajokban dúsulnak fel. A közös jelátvivő láncoknak köszönhetően az IL-2 és IL-15 receptorok részben hasonló funkciókkal rendelkeznek, pl. segítik a $CD4^+$ T limfociták proliferációját, a $CD8^+$ effektor sejtek aktivációját, a T és NK sejtek citotoxicitását. Emellett ellentétes funkcióik is vannak: az IL-2 apoptotikus folyamatot, ún. aktiváció indukálta sejthalált vált ki az immunválasz lecsengése során, míg az IL-15 gátolja ezt a folyamatot és elősegíti a $CD8^+$ memória T sejtek túlélését. A receptorok fontosságát jelzi, hogy a γ_c alegységek génmutációi az úgynevezett X-kromoszómához kapcsolt kombinált immunhiányos tünetcsoport (X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID) kialakulását eredményezik.

1.3. Az I. és II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekulák

Az immunfolyamatokban, legfőképpen az antigén prezentációban kulcsszerepet játszó glikoproteineknek, fő hisztokompatibilitási komplexnek két típusát, az első és második osztályú MHC glikoproteineket (MHC I és MHC II) különböztetjük meg. Az MHC I glikoprotein heterodimer egy transzmembrán nehézláncból és egy perifériás könnyűláncból áll. Az MHC II molekulák két hasonló méretű transzmembrán láncból állnak.

A legtöbb, sejtmaggal rendelkező sejt felszínén kimutatták az MHC I jelenlétét. Az MHC II molekulák expressziója több sejtípuson indukálható, de normál körülmények között csak professzionális antigénprezentáló sejteken: B sejteken, makrofágokon és dendritikus sejteken található meg. Klasszikus funkciójuk szerint a B sejteken expresszálandó MHC I molekulák az általuk felismert endogén eredetű (pl. tumorantigének, vírusfehérjék) peptideket prezentálják a T sejt receptornak. Az MHC II molekulák exogén peptideket prezentálnak a $CD4^+$ T sejteknek. Az aktivált $CD4^+$ sejtek funkciója a többi immunsejt (B sejtek, makrofágok, $CD8^+$ T sejtek) folyamatainak, így az immunválasz szabályozása, elsősorban citokinek (interferon- γ , IL-2, -4, -5, -6, -9, -10, -13) szekréciója révén.

A plazmamembránban az MHC I molekulák oligomereket képeznek, és lipid tutajokban dúsulnak fel. Az MHC I glikoproteineknek többféle sejtípusban számos interakciós partnerét sikerült korábban feltérképezni: az EGF receptort, a transzferin receptort, az interleukin-2/15 receptor alegységeit (IL-2R α , IL-2/15R β , γ_c , IL-15R α), az inzulin receptort, a tetraspan molekulákat (CD53, CD81, CD82), az intracelluláris sejtdhéziós molekulákat (ICAM 1).

Az első kísérletes eredmények az MHC I és az IL-2 receptorok molekuláris közelségéről Förster rezonancia energiatranszfer (FRET) méréseken alapultak. A kísérleteket előbb T sejtvonalon majd perifériás T sejteken is elvégezték. Fluoreszcencia visszatérési görbék

analízisével (FRAP mérésekkel) kimutatták, hogy az IL-2R α mobilitása csökken az MHC I-ellenes antitesttel történő jelölés hatására, ami tovább valószínűsítette közvetlen molekuláris közelségüket. Transzmissziós elektronmikroszkóppal készült képek segítségével T limfóma sejteken kimutatták az immunogold jelöléssel ellátott IL-2R α és MHC I közös klaszterezettségét.

Genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az MHC gének polimorfizmusa szoros kapcsolatban van több betegség kialakulásával is: szklerózis multiplex, I. típusú diabétesz (T1D), szisztémás lupus erythematosus, colitis ulcerosa (fekélyes vastagbélgyulladás), Crohn-betegség; rheumatoid arthritis. Így az MHC I molekulának többféle szabályozó funkciója látszik körvonalazódni, mely kiegészíti az antigénprezentációban betöltött szerepét.

1.4. c-Jun és c-Fos transzkripció faktorok

A sejtek génátírását szabályozó DNS-kötő fehérjéket transzkripció faktoroknak nevezzük. Specifikus DNS promóter vagy enhanszer régiókhoz kötődve célgénjeik kifejeződését növelhetik vagy csökkenthetik, így működésük hatással lehet a sejtek különféle élettani folyamataira. A c-Fos és c-Jun transzkripció faktorok leucin cipzárral összekapcsolódó homo- vagy heterodimerek, melyek az AP-1 (Activator protein 1) válaszadó elemeihez kötődnek. A c-Fos-c-Jun dimer funkciója sejt típus függést mutat, egyes sejt típusokban pl. sejtproliferációt indukál, más sejt típusokban apoptózishoz járul hozzá. DNS-hez való kötődésükben számos különféle stimulus által elindított jelátviteli útvonal közrejátszhat: pl. a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, növekedési faktorok (TGF β , EGFR), neurotranszmitterek, UV sugárzás, onkofehérjék, mitogén aktiválta protein kináz-, ciklikus AMP vagy Ca²⁺-függő jelátviteli útvonalak. A Fos-Jun komplex proliferációt indukáló hatását a növekedési faktor receptorokon keresztül a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalon keresztül is kifejezheti. Számos patológiás esetben a c-Fos magas expressziós szintjét figyelték meg, pl. Tamoxifen rezisztens emlőtumorban, szájüregi rákban; az overexpresszió szerepét valószínűsítették májrák karcinogenezisében. Magas expressziós szintje befolyásolható például a pajzsmirigy hormon $\alpha 1$ magreceptorán keresztül. Néhány sejt típusban a c-Fos magas expressziója apoptózis indukcióját eredményezi. A c-Jun-nak a sejtciklus szabályozásában van szerepe, a ciklin D transzkripció faktort aktiválja, az aktiváció hiányában a sejtciklus progressziója a G1 fázisban megrekedhet. A c-Jun overexpressziója egyes tumor szupresszorok (p53, p21) expresszióját csökkenti, miáltal felgyorsult sejtosztódás valósulhat meg.

1.5. A multiple- τ algoritmus, FPGA - programozható logikai kapumátrix

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) fluoreszcensen jelzett molekulák diffúzióját, koncentrációját, fotofizikai tulajdonságait jellemző paraméterek becslésére alkalmazható módszer élő sejtekben vagy oldatban. Az FCS mérések során a fluoreszcencia intenzitást a jellemezni kívánt folyamatok feloldásához szükséges időbeli felbontással kell detektálni. Mivel a fotofizikai folyamatok korrelációs ideje tipikusan a $10^{-9} - 10^{-6}$ s tartományban, míg az élő sejtekben diffundáló részecskék diffúziós ideje $10^{-3} - 1$ s tartományban várható, így ha azonos beosztású pontokban határoznánk meg a korrelációs függvényeket, több nagyságrendnyi adatmennyiség tárolására, hozzáférhetőségére és módosítására lenne szükség. A multiple- τ algoritmus a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiában alkalmazott eljárás, segítségével kisebb adatmennyiség mellett a korrelációs függvények logaritmikusan ekvidisztáns késleltetési időpontokban számolhatóak ki.

Az FPGA (field-programmable gate array, programozható logikai kapumátrix) egy olyan újraprogramozható félvezető eszköz, amely programozható logikai blokkok mátrixából áll. Ezen áramkörü elemek a felhasználó által szabadon programozhatóak, így egy meghatározott célú hardver hozható általuk létre. Az FPGA eszközök ötvözik az integrálható áramkörök alkalmazás-specifikusságát és a processzor alapú rendszerek flexibilitását. Figyelembe véve az FPGA chipek memória és számítási kapacitását, valamint a multiple- τ algoritmus sajátosságait egy modern FPGA-n, akár egy többsatornás (hardver) korrelátor is kivitelezhető lehet.

2. Célkitűzések

Dolgozatom fő témája az immunfolyamatokban alapvető szerepet játszó membránfehérjék által alkotott kis- és nagyméretű molekulaklaszterek szerkezetének és dinamikájának vizsgálata. Az MHC I molekula és az interleukin-2 és -15 receptorok asszociációját már korábban kimutatták, de ennek a kölcsönhatásnak a szerepe ismeretlen. Munkánk során az MHC I molekulák szabályozó szerepét vizsgáltuk az IL-2 és -15 citokin receptorok és MHC I molekulák klaszterizációjában és mobilitásában MHC I géncsendesítés segítségével. Dolgozatomban egy többszoros multiple- τ korrelátor validálását is be fogom mutatni, melyet mobilitás és ko-mobilitás vizsgálatokra is fel lehet használni. Értekezésem további részében az IL-2 jelátvitel által is aktivált c-Jun/c-Fos transzkripciós faktorok heterodimerjének konformációját és DNS-kötődését vizsgáltam meg.

Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen szerepe van az MHC I molekulának az IL-2/15 receptorok klaszterizációjában és dinamikájában?
- Az MHC I molekulák expressziója hogyan változtatja meg azok mobilitását és klaszterezettségét?
- A c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok dimerjének milyen a konformációja élő sejtekben?

Eredményeink segíthetnek megérteni a membránfehérjék klaszterizációját és a transzkripciós faktorok dinamikáját, valamint például szolgálhatnak a modern mikroszkópos technikák komplementer információkat nyújtó alkalmazására.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Sejtvonal, sejtenyésztés, jelölés

A T sejtek sejtfelszíni fehérjeinek vizsgálatához IL-2-függő FT7.10 humán T limfóma sejtvonalat használtuk, amely a Kit 225 sejtvonalból származik. A sejtvonal stabilan transzfektálva van FLAG peptiddel ellátott IL-15R α -val, és az IL-2R mindhárom alegységét konstitutívan expresszálja. Az MHC I molekuláknak a klaszterizációjában betöltött szerepének a vizsgálatához a glikoproteinek expresszióját siRNA transzfekcióval csökkentettük le. A sejtfelszíni fehérjéket fluoreszcens monoklonális antitestekkel, a GM-1 gangliozidot kolera toxin B-vel jelöltük.

Az AP-1 komplex vizsgálatát a C-terminálison EGFP vagy mRFP1 fluoreszcens fehérjével jelölt c-Fos és c-Jun transzfekciójával, HeLa sejteken végeztük. A dimerizációs doméntól számított C-terminális domén a Fos fehérjében hosszabb, mint a Jun-ban, így a C-végen elhelyezett festékek távol vannak egymástól a dimerben. Ezért a teljes hosszúságú c-Fos fehérjék mellett használtunk egy olyan mutánt is, melynek C végéről eltávolítottak 164 aminosavat (c-Fos²¹⁵).

3.2. Förster rezonancia energiatranszfer (FRET)

A fehérjék asszociációinak, térszerkezetének feltérképezéséhez gyakran használt módszer a Förster rezonancia energiatranszfer mérése. Mivel a FRET hatásfoka a donor-akceptor távolság negatív hatodik hatványának függvénye, így gyakran és széleskörűen alkalmazott módszer a fehérjék molekuláris távolságának monitorozásához. Az akceptor fotoelhalványítás módszere azon alapul, hogy ha az akceptor festéket irreverzibilisen kiégetjük, azok már nem képesek a FRET kölcsönhatásban részt venni, így a donor fluoreszcenciája megnő. Figyelembe véve az FT 7.10 sejtvonalon az IL-2R β alacsony expressziós szintjét, a FRET hatásfokot Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal, akceptor elhalványítás módszerrel határoztuk meg. A c-Jun és c-Fos transzkripció faktorok közötti kölcsönhatás vizsgálatához a FRET méréseket Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Németország) végeztük.

3.3. Szuperfeloldású STED mikroszkópia, digitális képfeldolgozás

A szuperfeloldású mikroszkópia alkalmazásával az Abbé-féle feloldási határnál kisebb struktúrákat is láthatóvá lehet tenni. Dolgozatomban az MHC I molekulák és IL-2/15 receptorok klaszterméretét stimulated emission depletion (STED) mikroszkópiával határoztuk meg. Az IL-2/15R α és az MHC I fehérjeklaszterek nagyságát három módszerrel számszerűsítettük. A három

módszer három eltérő megközelítésen alapul, így az eredmények direkt összehasonlítása helyett az adatok értelmezésénél célszerű a klaszterméret változások trendjeit alapul venni. Elsőként a fluoreszcencia intenzitásmaximumok félértékszélességét (full width at half maximum, FWHM) mértük meg. Második módszerként a STED képek térbeli autokorrelációs függvényének alakjából következtettünk az IL-2/15R α és MHC I klaszterméret nagyságára. A klaszterek méreteit képszegmentációs módszerrel is meghatároztuk.

A fehérjék asszociált hányadaira a mindkét csatornában a küszöbérték feletti összintenzitás és a teljes sejtfelszíni intenzitás hányadosaiból következtettünk. A párkölcsönhatások valamint a domén szintű együttállás számszerűsítéséhez a Pearson-féle korrelációs együtthatót is felhasználtam.

3.4. Fluoreszcencia korrelációs és keresztkorrelációs spektroszkópia (FCS, FCCS)

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia fluoreszcensen jelzett molekulák diffúzióját, koncentrációját, fotofizikai tulajdonságait jellemző paraméterek becslésére alkalmazható módszer élő sejtekben vagy oldatban. Az MHC I glikoproteinek és az IL-2/15 receptorok sejtfelszíni mobilitását fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával mértük meg. A korrelációs mérésekhez Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot használtunk, melynek negyedik detektálási csatornája fotonszámláló lavina fotodiódákkal van felszerelve. A fotonok beérkezésének idejét egy NI7833 FPGA mérőkártyával (National Instruments, Austin, TX) regisztráltuk 80 MHz-es mintavételezési frekvenciával, saját készítésű szoftverrel. Az autokorrelációs görbéket a foton beérkezési adatokból, saját fejlesztésű programmal, multiple- τ algoritmussal számoltuk ki.

Meghatároztuk a molekulák diffúziós állandóit, átlagos részecskeszámát, a kiégetett molekulahányadokat, és ezekből a paraméterekből készítettünk statisztikákat.

A c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok mobilitási viszonyait a kollaborációs partnerünk laboratóriumában kifejlesztett konfokális mikroszkóppal, valamint az arra felszerelt korrelációs modullal vizsgáltuk meg. Az FCCS gyakran alkalmazott eljárás a fehérje-fehérje párkölcsönhatások kimutatására és jellemzésére. A keresztkorrelációs függvények lassú komponensének paraméterbecslésével a transzkripciós faktor dimerek DNS-hez való kötődésének arányát jellemeztük. Az auto- és keresztkorrelációs görbéket a Quickfit 3.0 programmal, a triplet állapot jelenlétét figyelembe véve illesztettük meg.

4. Eredmények

4.1. MHC I géncsendesítés hatásának a vizsgálata az IL-2/15 citokin receptorokra

4.1.1. MHC I géncsendesítés hatása az IL-2/15R α alegységek és MHC I glikoproteinek sejtfelszíni részecskeszámaira

Az MHC I molekuláknak a klaszterizációjában betöltött szerepének a vizsgálatához az MHC I expresszióját siRNS transzfekcióval csökkentettük le. A géncsendesítés specifikusan csak az MHC I glikoproteinek sejtfelszíni expresszióját csökkentette. Az siRNS-t 100 μ g/ml koncentrációban alkalmazva az eredeti MHC I mennyiség 5-10%-a maradt meg.

A konfokális térfogatban lévő részecskeszámokból a teljes sejtfelszíni részecskeszámokat is megbecsültük, az így kapott intervallumok átfedésben voltak a teljes populációban áramlási citometriával, kalibrációs gyönggyel meghatározott értékekkel.

4.1.2. Az IL-2/15R α alegységek és az MHC I aggregációs állapotának becslése a molekuláris fényességek analízisével

A molekuláris fényesség az egy diffundáló részecskétől időegység alatt detektált fotonok számát jelenti (F/N). A molekuláris fényesség arányos az együtt diffundáló komplexben levő fluorofórok számával, ismeretében a fehérjék homoaggregációs képességét lehet megbecsülni. A molekuláris fényességek összehasonlítása előtt megvizsgáltuk, hogy a fluoreszcencia intenzitás milyen mértékben csökken a mérés megkezdését követően a festékmolekulák irreverzibilis fotoelhalványodása következtében. A csökkenés mértékét a fotoelhalványodási hányadossal (*bleaching fraction*) számszerűsítettük. Mivel a fotoelhalványodási hányadosok 20 s után meghaladták az 50%-ot, így indokolt, hogy csak a mérési idő első 15 s-ából származó F/N adatokból készítsünk statisztikákat.

Az F/N értékek pozitívan korreláltak az abban a mérési szakaszban mért átlagos fluoreszcencia intenzitással. Megállapítottuk, hogy a molekuláris fényesség lineárisan nő a fehérjetartalom függvényében, magasabb lokális expressziós szint mellett az MHC I fehérjék jobban aggregálódnak. Az adatokból megállapítottuk, hogy az MHC I homoaggregációja szignifikánsan csökkent a géncsendesítés következtében. Eredményeink szerint mind az IL-2/15R α , mind az MHC II homoaggregációs hajlandósága független az MHC I jelenlététől.

4.1.3. Az IL-2R α , IL-15R α alegységek és az MHC I mobilitásának változása MHC I géncsendesítés hatására

Amennyiben a fehérjék aggregációs állapota megváltozik, az aggregátum méret változása következtében azt várhatjuk, hogy a molekuláris mobilitásuk is változni fog. A molekuláris fényességgel ellentétben a fehérjék mobilitásai függetlennek voltak a mérés kezdete óta eltelt időtől, így indokolt az összes mobilitási adatból statisztikát számolni. Megvizsgáltuk, hogy a diffúziós állandó milyen trend szerint függ az átlagos fehérjetartalomtól. Megállapítottuk, hogy az MHC I glikoproteinek átlagos diffúziós állandója negatívan korrelált az abban a mérési szakaszban számolt átlagos fluoreszcencia intenzitással, a több fehérjét tartalmazó klaszterek lassabban diffundálnak. Mind az MHC I, mint az IL-2/15R α mobilitása szignifikánsan nagyobb volt az MHC I géncsendesített sejteken. Ezen adatok ismeretében kijelenthetjük, hogy az MHC I glikoproteineknek a sejtmembránban jelentős szerepe lehet a mobilitás szabályozásában. Megvizsgáltuk, hogy vajon a sejtfelszínen található inhomogén mintázatokban milyenek a lokális fehérjemobilitások. A sejtek magas és alacsony intenzitású területein vizsgáltuk az IL-2/15R α alegységek diffúziós állandóit. Megállapítottuk, hogy mind az IL-2R α , mind az IL-15R α alegységek mobilitása kisebb volt azon területeken, ahol a lokális koncentrációjuk magasabb volt. Adataink teljes összhangban voltak a korábbi eredményekkel, miszerint az MHC I expressziójának csökkentése az IL-2/15R α fehérjemobilitások növekedését eredményezte.

4.1.4. Fehérjeklaszterek méretének meghatározása szuperfeloldású mikroszkóppal

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópai módszerrel kimutattuk, hogy a vizsgált fehérjék mobilitására és aggregációs képességére szignifikáns hatással volt az MHC I expressziójának csökkentése. Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy az MHC I expresszióinak mind az interleukin receptorok, mind az MHC I sejtfelszíni klaszterizációjának szabályozásában szerepe lehet. Hipotézisünket 20 nm-es feloldású STED mikroszkópos képek analízisével teszteltük. A ko-disztribúciós analízis lehetősége érdekében mind a kontroll, mind a kezelt sejteket duplán jelöltük, a zöld csatornában MHC I ellenes antitesttel, a vörös csatornában IL-2R α - vagy IL-15R α -ellenes antitestekkel. A klaszterméretek kvantitatív jellemzéséhez három különböző megközelítésen alapuló képelemzési eljárást használtunk. Géncsendesített sejteken a klaszterek félértékszélességéből származtatott MHC I klaszterméret sűrűséghisztogramja balra tolódott, az átlagos klaszterméret 640 ± 120 nm-ről 260 ± 80 nm-re csökkent (átlag $\pm$ SEM), a különbség szignifikáns volt. Az IL-2R α hisztogramja nem változott az MHC I géncsendesítés hatására, az átlagértékek közötti különbségek nem voltak szignifikánsak. Az IL-15R α átlagos klasztermérete a géncsendesített sejteken 360 ± 60 nm volt, a kontroll

sejteken 300 ± 60 nm (átlag $\pm$ SEM). Második módszerként a szuperfeloldású képek térbeli intenzitás korrelációs függvényeinek paraméterbecslésével határoztuk meg a fehérjék sejtfelszíni klaszterméreteit. Az MHC I klaszterek átlagos mérete szignifikánsan csökkent a géncsendesítés hatására, 340 ± 120 nm-ről 200 ± 120 nm-re (átlag $\pm$ SEM). Az IL-2R α és IL-15R α átlagos klaszterméretei a géncsendesítés hatására nem változtak szignifikánsan. Harmadik eljárásként a fehérjeklaszterek méretét képszegmentációs eljárással kvantitáltuk. Géncsendesített sejteken az MHC I klaszterméret sűrűség-hisztogramja a kontroll mintához képest balra tolódott, a területek átlagértéke $(7.2 \pm 0.9) \times 10^4$ nm²-ről szignifikánsan csökkent $(1.8 \pm 0.2) \times 10^4$ nm²-re. Az IL-2R α és IL-15R α klasztereinek átlagos területe független volt az MHC I jelenlététől, az átlagos klaszter nagyságok nem különböztek szignifikánsan egymástól.

4.1.5. Fehérjeklaszterek méret szerinti betöltöttségének vizsgálata

A képek analízise során azt is megvizsgáltuk, hogy vajon a klaszterek méret szerinti átlagos fehérjetartalma hogyan változik a géncsendesítés hatására. Összhangban a klaszterméretetek változásával az MHC I klaszterek kisebb fehérjetartalmú klaszterekre estek szét. Ezen képelemzési módszer is megerősítette azt a korábbi tapasztalatunkat, miszerint az IL-2R α klaszterizációja változatlan maradt, annak ellenére, hogy a receptor alegységek mobilitása szignifikánsan megnőtt. Megállapítottuk, hogy az MHC I glikoproteinek mobilitást moduláló szerepét nem az IL-2R α és IL-15R α klaszterméret változtatásán keresztül fejtí.

4.1.6. Kolokalizált molekulafrakciók meghatározása

A további képelemzési vizsgálatokban a receptor alegységek és MHC I glikoproteinek közötti párkölcsönhatásokat kvantitáltuk. Az IL-2/15R α receptor alegységek MHC I melletti asszociált hányadait számszerűsítettük kontroll és géncsendesített sejteken egyaránt. A géncsendesítés következtében az MHC I expressziója 90%-kal csökkent, az IL-2R α és IL-15R α szintjei változatlanok maradtak. Az IL-2R α MHC I melletti asszociált hányada $75 \pm 3\%$ -ról $5,4 \pm 3\%$ -ra csökkent. Hasonlóan az IL-15R α MHC I-gyel asszociált hányada is szignifikánsan csökkent, $91 \pm 4\%$ -ról $20 \pm 6\%$ -ra. Ilyen mértékű csökkenést az MHC I asszociált hányadaiban nem tapasztaltunk, az IL-2R α -al való asszociációja $61 \pm 8\%$ -ról csökkent $52 \pm 7\%$ -ra, míg az IL-15R α -al való asszociációja $12 \pm 2\%$ -ról $19 \pm 5\%$ -ra nőtt (átlag $\pm$ SD). Ezen utóbbi adatok ismeretében megállapítottuk, hogy a géncsendesítés után megmaradó MHC I molekulák közös sejt felszíni komplexeket alkotnak az IL-2R α valamint IL-15R α molekulákkal.

4.1.7. Párkölcönhatások jellemzése Pearson-korrelációs koefficienssel

Az MHC I és IL-2/15R α közötti asszociált hányadok meghatározása után a molekuláris együttállás mértékét a Pearson-féle korrelációs koefficiens meghatározásával is számszerűsítettük. Az együtttható meghatározását több különböző intenzitásra vonatkozó küszöbérték feltétel mellett is elvégeztük. A géncsendesítés hatására a korrelációs koefficiens értéke mindkét fehérjepárra (MHC I - IL-2R α valamint MHC I - IL-15R α), mindegyik feltétel mellett szignifikánsan csökkent. Az analízissel megerősítettük korábbi eredményünket, miszerint a géncsendesítés után az IL-2R α és IL-15R α többsége MHC I mentes területen foglal helyet.

A szuperfeloldású képek analízise mellett ugyanazon sejtekről készült, 200 nm felbontású konfokális képek ugyanilyen mélységű analízisét is elvégeztük. A konfokális módban készült képek vizsgálatának eredményei összhangban voltak a STED eredményekkel. Az IL-2R α és IL-15R α MHC I melletti asszociált hányadai csökkentek az MHC I expressziójának a csökkentése következtében. Eközben a megmaradó MHC I glikoproteineknek az interleukin receptorokkal asszociált hányadai nem változtak szignifikánsan.

4.1.8. MHC I, IL-2/15R α alegységek lipid tutajokban való lokalizációja

A mobilitás és aggregációs viszonyok változásának az ismeretében hipotézisként feltehetjük, hogy a receptoroknak és az MHC glikoproteineknek nemcsak a mikro-, hanem akár a makrokörnyezetére is befolyással lehet az MHC I expressziójának változása. Ezt a kérdést konfokális mikroszkóppal készült képekkel, a lipid tutajok és a receptor alegységek közötti Pearson korrelációs koefficiensek összehasonlításával teszteltük. A Pearson korrelációs koefficiensek átlagértékei az IL-2R α vagy IL-15R α és a GM₁ lipid tutaj marker között nem változtak szignifikánsan a géncsendesítés hatására. Eredményeink azt mutatták, hogy az IL-2R α és az IL-15R α membrán mikrodomén lokalizációjára nem volt szignifikáns hatással az MHC I molekulák jelenlétének csökkentése. Az MHC I molekulák és lipid tutajok közötti korrelációs együtttható csökkent. Adataink alapján megállapíthatjuk, hogy az expressziós szint változása következtében a sejtfelszíni MHC I lipid tutajbeli lokalizációja szignifikánsan csökkent. A korrelációs együtttható csökkenésének másik lehetséges oka az, hogy a részecskeszám redukciója a jel/zaj viszonyt is csökkenti, így az együtttható csökkenni fog.

4.1.9. IL-2R β - IL-2R α kölcsönhatás vizsgálata akceptor fotoelhaványításos FRET méréssel

A fehérjemobilitási és klaszterizációs változások jellemzésén túlmenően megvizsgáltuk, hogy vajon az MHC I molekuláknak van-e kritikus szerepe az IL-2/15R β - IL-2R α dimer létrejöttében, konformációjában? A receptor alegységek közötti FRET hatásfokot akceptor elhavlányításos módszerrel mértük meg. A kontroll és géncsendesített sejteken az alegységek között mért FRET értékek átlagértékei hibahatáron belül megegyeztek, szignifikánsan nem különböztek egymástól. Megállapítottuk, hogy az az IL-2/-15R β - IL-2R α asszociációja, konformációja független az MHC I glikoproteinek jelenlététől.

4.2. Az AP-1 komplex vizsgálata

Munkám következő részében az IL-2 jelátvitel által is aktivált c-Jun–c-Fos transzkripciós faktorok heterodimerjének konformációját vizsgáltuk FRET segítségével. A heterodimerek DNS-hez való kötődését fluoreszcencia korrelációs és keresztkorrelációs görbék analízisével vizsgáltuk.

4.2.1. c-Fos és c-Jun heterodimerizációjának vizsgálata FRET segítségével

A transzkripciós faktor dimerek konformációjának vizsgálatához FRET méréseket végeztünk. A C terminális végén rövidített EGFP-Fos²¹⁵-nak, valamint az mRFP1-Jun-nak sejtmagon belüli eloszlását homogénnek tapasztaltuk, de a molekuláris szintű interakciójukat a lokális fehérjekörnyezet is befolyásolhatja. Megállapítottuk, hogy a transzkripciós faktorok közötti FRET hatásfok a sejtmagon belül homogén volt. A molekuláris környezet heterogenitását tükröző FRET hisztogram keskeny volt, a közvetlen molekuláris környezet feltehetően csak kismértékben befolyásolja a C-terminális végeik közötti átlagos távolságot és a dimerizációs hajlandóságot. Az átlagos FRET hatásfok a pozitív kontroll mintában (fúziós EGFP-mRFP1) $22,1 \pm 2,8\%$ volt, míg a negatív kontroll sejtekben $0,3 \pm 0,8\%$. A c-Fos lerövidítése az átlagos FRET hatásfok növekedését eredményezte: a teljes hosszúságú c-Fos-EGFP és c-Jun-mRFP1 közötti érték $3,0 \pm 1\%$ -volt, ami $8,4 \pm 0,5$ nm donor-akceptor távolságnak felel meg (4,7 nm Förster rádiust feltételezve), míg c-Fos²¹⁵-EGFP és c-Jun-mRFP1 között $9,9 \pm 0,5\%$ ($6,8 \pm 0,1$ nm). Ezen FRET változás összhangban van azzal, hogy a teljes hosszúságú heterodimerben a C terminális c-Fos 165 aminosavval távolabb helyezkedik el a Jun-tól, így várható volt, hogy a molekuláris rövidítés a FRET hatásfok növekedését eredményezi.

4.2.2. c-Jun és c-Fos transzkripció faktorok DNS-kötődésének vizsgálata FCCS-el

A c-Fos–c-Jun heterodimerek DNS-hez való kötődését FCS és FCCS görbék analízisével végeztük el. Megvizsgáltuk, hogy a c-Fos rövidítése vajon befolyásolja-e a dimer mobilitását, DNS-hez való kötődését és dimerizációját. A keresztkorrelációs amplitúdó a c-Fos²¹⁵ EGFP amplitúdójának átlagosan $34 \pm 6\%$ -a volt. Ez a hányados hasonló a korábban teljes hosszúságú heterodimerek között mért $31 \pm 6\%$ értékhez. A negatív kontroll sejteken a keresztkorrelációs hányados $13 \pm 3\%$ volt, a nem nulla érték a csatornák közötti spektrális átvilágításból származik. A pozitív kontroll sejteken a fúziós EGFP-mRFP1 fehérjével mért keresztkorrelációs hányados $45 \pm 4\%$ volt. A korrelációs görbék lecsengésének analíziséből a transzkripció faktorok mobilitási viszonyaira, valamint a DNS-hez való kötődés arányára lehet következtetni. A gyors komponens diffúziós ideje 1,0 - 1,4 ms volt, míg a lassú komponensé a 67–91 ms tartományba esett. A teljes hosszúságú c-Fos–c-Jun kotranszfektált minta esetén a lassú komponens aránya $77 \pm 13\%$ -volt, míg a rövidített Fos²¹⁵–Jun minta esetén mindösszesen $56 \pm 4\%$. A Fos–Jun komplex gyors és lassú komponenseinek diffúziós ideje hasonló nagyságúnak adódott az irodalomban más transzkripció faktorok szabad és kötött komponensére vonatkozó adatokhoz, így a paraméter jól tükrözi a még szabadon diffundáló, illetve a DNS-hez kötődött transzkripció faktorok mobilitási viszonyait. A lassú komponens arányának megváltozása a Fos C-terminális szakaszának a DNS-kötésben való funkcióját valószínűsíti. Megállapítottuk, hogy a korrelációs függvények lassú komponenseinek hányadaiból levont következtetés egyezésben van korábbi megfigyelésekkel, miszerint fibroblaszt sejtekben a C-terminális régiónak transzaktivációs szerepe van.

4.3. FPGA korrelátor validálása

Értekezésemben bemutatom a membránfehérjék mobilitásának és aggregációs állapotának jellemzéséhez használt szoftverkorrelátor, valamint a munkacsoportunkban fejlesztett FPGA hardverkorrelátor validálását, amit tesztoldatok korrelációs függvényeinek összehasonlításával és paraméterbecslésével végeztük el.

Az antitestek autokorrelációs függvényeinek illesztéséhez a szabad, valamint az antitestekhez kötött festékek különböző diffúziós állandóit is figyelembe vevő kétkomponensű modellfüggvényt használtuk. Az antitestek keresztkorrelációs modellfüggvényében a szabad festékek valamint a triplet átmenet keresztkorrelációs járuléka nem szerepel, így a függvényeket az egykomponensű diffúziót leíró egyenlettel illesztettük meg.

Az keresztkorrelációs adatok összevetésekor lényeges, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható ALV 5000E korrelátor nem alkalmas az auto- és keresztkorreláció egyidejű mérésére, a

függvényeket csak egymás után, külön mérésekből lehet meghatározni. Ezzel szemben az FPGA-korrelátorral az eszköz adattárolási kapacitásának és jelfeldolgozási sebességének köszönhetően az auto- és keresztkorrelációs függvények egyidejűleg is kiszámolhatóak. Az illesztett paraméterek a két korrelátor eszközön közel azonosak voltak.

5. Megbeszélés

5.1. MHC I géncsendesítés hatásának vizsgálata az IL-2/15 citokin receptorokra

A membránfehérjékből felépülő sejtfelszíni struktúrák változatos térbeli és időbeli szerkezettel rendelkeznek, több hierarchikus szinten szerveződnek. A sokrétű fehérjeszerveződés több tényező és kölcsönhatás együttes következménye. A struktúrák méretének és életidejének eloszlását mind a membránban ható, mind intra- és extracellulárisan ható kölcsönhatások egyaránt befolyásolhatják.

Értekezésemben az immunfolyamatokban fontos szereppel rendelkező IL-2 és -15 citokin receptorok és MHC I molekulák által alkotott kisméretű molekulaklaszterek dinamikáját vizsgáltam meg.

Korábbi eredmények szerint az MHC glikoproteinek néhány nanométeres nagyságú szerveződését azok akár mikrométer méretű doménekben való akkumulációja követi. A nagyméretű, MHC I-et és IL-2R-t tartalmazó klaszterek között dinamikus részecskekiecsérlődés történik, és mindegyik klaszterbeli elem lipid tutajokban dúsul fel. Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia segítségével kimutatták az IL-2/15 receptorok és MHC I molekulák legalább néhány tíz ms életidejű együttmozgását. Irodalmi adatok szerint a nagyméretű MHC I klaszterek stabilizálásában a citoszkeletonnak is szerepe lehet.

Ezen előzmények ismeretében megvizsgáltuk, hogy egy klaszterbeli komponens eltávolítása milyen következményekkel jár a molekulaklaszterek aggregációjára és dinamikusságára. A fehérjék klaszterizációjának vizsgálatához különféle módszereket kombináltunk, melyek különböző hierarchikus szinteket vizsgálnak.

A molekuláris fényességek analízisével kimutattuk, hogy a kisméretű MHC I komplexekben több MHC I molekula is jelen van, az aggregáció mértéke csökkent az expressziós szint csökkentésével. Az MHC I glikoproteinekkel ellentétben az IL-2/15 receptor alegységek homo- és egymással történő heteroaggregációját függetlennek találtuk az MHC I expressziójától. Eredményeink kiemelik, hogy egyes membránalkotók homoaggregációs készsége a koncentrációjuk függvénye, míg más membránfehérjék aggregációja nem mutat ilyen összefüggést. Méréseink kimutatták a lipid nanodoménekhez hasonló méretű kisméretű fehérje nanoklaszterek jelenlétét, hozzájárultak a több szintű szerveződés építőelemeinek kialakulásához szükséges tényezők megértéséhez.

Az MHC I molekulák mobilitása következetesen magasabbnak bizonyult a kölcsönható fehérjék által alkotott aggregátum méretének csökkentésével. Az IL-2/15R α alegységek mobilitása ugyancsak megnőtt a kölcsönható partnerek (MHC I) számának a csökkentésével. Eredményeink rávilágítanak, hogy a citokin receptorok dinamikája érzékeny a mikrokörnyezet változására.

Feltételeztük, hogy a vizsgált fehérjék megnövekedett mobilitásának hátterében azok klaszterizációs hajlandóságának megváltozása állhat. A fehérjék magasabb szintű organizációját szuperfeloldású mikroszkópiával vizsgáltuk meg. A klaszterméret változást három eltérő megközelítést alkalmazó klaszterméret meghatározó algoritmussal teszteltük. Mindhárom eljárás eredménye egyhangúan azt támasztotta alá, hogy az MHC I molekulák klasztermérete az expressziós szint függvénye. Az IL-2/15R α alegységek klaszterizációját, valamint az IL-2/15R β és IL-2R α vagy IL-15R α közötti átlagos távolságot az MHC I eliminálása nem volt képes szignifikánsan befolyásolni. Megállapítottuk, hogy az MHC I proteinek nagyméretű klaszterméretének, valamint a nano-homoaggregátumok méretének a csökkenése összhangban áll a mobilitások változásával, a kisebb méretű klaszterekben átlagosan nagyobb volt a nanoklaszterek mobilitása.

A szuperfeloldású képek analízisével kimutattuk, hogy az MHC I géncsendesítése az MHC I és a receptorok asszociált hányadát és a Pearson-féle korrelációs koefficienseket is csökkentette, így az MHC I eliminálása nem a klaszterméret változtatásán keresztül, hanem a kölcsönható partnerek számának csökkenésével járult hozzá a receptorok mobilitásának növekedéséhez. Az asszociált hányad adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a géncsendesítés után megmaradó MHC I molekulák az IL-2R α és IL-15R α alegységek mellett maradtak, ami stabil kapcsolatot feltételez az MHC I és a receptorok között.

Mivel mind az IL-2R α és IL-15R α , mind az MHC I proteinek lipid tutajokkal asszociált struktúrát alkotnak, és az MHC I géncsendesítés következtében mind a receptorok, mind az MHC I mobilitása megnőtt, felvetődik a kérdés, hogy vajon a receptor alegységek lipid tutajokban való feldúsulására hatással van-e a kölcsönható partnerek számának, az aggregátumok méretének csökkentése. Kolokalizációs adataink alapján megállapítottuk, hogy a receptorok lipid tutajokban való akkumulációjára nincsen hatással a géncsendesítés. Az eddigi irodalmi adatok alapján lipid tutajokban való feldúsulásukat csak koleszterin kivonással és ligandjuk hozzáadásával lehetett megváltoztatni.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az IL-2 és -15 citokin receptorok és az MHC I glikoproteinek klaszterizációjára szignifikáns hatással volt a legmagasabb szinten expresszált klaszterbeli komponens, az MHC I géncsendesítése.

Bár értekezésemben funkcionális vizsgálatokat nem végeztem, általánosságban elmondhatjuk, hogy a fehérje nano- és mikroklaszterek jelátviteli platformként szolgálhatnak, így a membránfehérjék klaszterizációja több jelátviteli útvonalra és sejtfunkcióra jelentős hatással lehet. A membránfehérjék hierarchikus és dinamikus klaszterizációjának pontos megértése

feltételezi az intra- és extracelluláris, valamint a membránban ható tényezők alapos feltárását. Értekezésemben megvizsgáltam, hogy a legnagyobb számban jelenlevő klaszterbeli elem permanens csökkentése milyen konzekvenciákkal jár egyes nano- és mikroméretű formációkra.

5.2. Az AP-1 komplex vizsgálata

Az AP-1 komplex a Fos, Jun és ATF (Activating transcription factor) fehérjecsaldók elemeiből felépülő transzkripciós faktor. Értekezésem második részében a c-Jun–c-Fos heterodimer transzkripciós faktor konformációját és DNS-hez való kötődési képességét vizsgáltam meg. A c-Fos és c-Jun leucin cipzárral összekapcsolódó dimer, számos gén szabályozásában van szerepük, aktivációjuk az IL-2 általi jelátvitel egyik lehetséges végpontja. A C-terminális doménjük konformációja ismeretlen, az irodalomban csak dimerizációs és DNS-kötő doménjükről áll rendelkezésre kristályszerkezeti struktúra.

A két molekula C-végén elhelyezkedő GFP és mRFP1 között FRET-tel meghatározott távolságadatok segítségével a molekuláris dinamikai modellek közül kiválaszthattuk azokat, melyek kompatibilisek méréseinkkel. Ez alapján megállapíthattuk, hogy a két fehérje C-terminális szakaszai a lineáris hosszak által lehetővé tett távolságoknál jelentősen közelebb, helyezkednek el, ami a transzaktivációs domének közelségére utal a dimerben. A fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópai analízis segítségével megállapítottuk, hogy DNS-hez kötött dimer transzkripciós faktorok aránya csökkent, ha a c-Fos C-terminálisát 165 aminosavval megrövidítettük, tehát a C terminális régiónak funkciója van a DNS-hez való kötődésben. Ez egybecseng a C-terminális domén transzaktivációs szerepével. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a molekuláris dinamikai szimulációkból számolt lehetséges konformációk körét jelentősen szűkíteni lehet FRET mérésekből kapott átlagos távolságok segítségével.

Mivel a c-Fos és c-Jun heterodimerizációja régóta ismert, így jó modellrendszerként használható GFP-mRFP1 közötti FRET mérések optimalizálására és tervezésére. Az IL-2 receptorok sejtfelszíni összeszerelődését ligand hiányában is a receptor alegységek közötti FRET mérések bizonyították. Munkacsoportunkban jelenleg kutatásokat folytat az IL-2 és -15 receptor alegységek sejten belüli összeszerelődésének nyomon követésére az endoplazmás retikulumban és a Golgiban, így a c-Fos és c-Jun közötti FRET mérésének a kidolgozását használni lehet más az interleukin receptorokhoz kötött GFP-mRFP1 donor-akceptor párok közötti FRET mérésekhez is.

5.3. Az FPGA korrelátor validálása

Értekezésem harmadik részében egy multifunkciós újraprogramozható mérőeszköz FCS/FCCS mérésekben való alkalmazását mutattam be. A mérések során gyakran szükség van a korrelációs függvények futásidőben való kiszámolására és megjelenítésére, így a görbék kiszámolását célhardver (hardver korrelátor) használata megkönnyíti. A korrelációs görbék kiszámolásához gyakran használt eljárás a multiple- τ algoritmus, használatával a korrelációs függvényeket logaritmikusan ekvidisztáns késleltetési időpontokban lehet kiszámolni. Az algoritmus nem túl nagy adattárolási igénye, valamint az adatblokkonkénti számolás eredményeképpen az általunk elérhető FPGA eszközön lehetséges volt többcsatornás multiple- τ hardver korrelátort fejleszteni. Az FPGA eszközök előnyei között szerepel a kereskedelmi forgalomban kapható korrelátorokhoz képesti olcsóságuk. További előnyük az újraprogramozhatóságuk, valamint a többszörös analóg illetve digitális áramköri bemenetelük, így nem csak korrelátor elemként, hanem általános célú mérésvezérlő és adatgyűjtő eszközként is használhatóak. A korábban rendelkezésünkre álló ALV 5000E korrelátor egyszerre csak vagy a két csatorna autokorrelációs függvényeit, vagy pedig azok keresztkorrelációs függvényeit tudja kiszámolni. Mivel a membrán inhomogén, így az érzékeny térfogatban milliszekundumos időskálán kicserélődő fehérjekomplexek aggregációs és diffúziós paraméterei változékonyak. Ezért az egymás után elvégzett auto- és keresztkorrelációs mérések más molekulapopulációt jellemeznek, ami hátrányos, ha pl. az autokorrelációs és keresztkorrelációs függvények ismeretét is igénylő asszociált hányad meghatározása a célunk. Az FPGA kártya egyidejűleg képes az összes korrelációs függvény meghatározására, kiküszöbölve ezt a problémát.

Értekezésemben a mérőeszköz validálásaként két színnel jelölt, oldatban diffundáló antitest korrelációs függvényeinek a paraméterbecsléseit végeztem el. A paramétereket a kereskedelmi forgalomban kapható ALV 5000E korrelátorral meghatározott függvények nemlineáris illesztésével is megbecsültem. Az illesztett paraméterek a két eszközön közel azonosak voltak.

A párhuzamos auto- és keresztkorrelációs függvények kiszámolásával a molekulakomplexek asszociált hányadát lehet egy mérésen belül pontosabban megbecsülni, valamint az együttmozgó komplexek stabilitását is lehetséges jellemezni. Terveink szerint az eszközt sejtfelszíni fehérjekomplexben való asszociált hányad meghatározására is használni fogjuk. További terveink szerint az eszközön háromcsatornás hardver korrelátort is fogunk fejleszteni, mellyel három más-más színnel jelölt fehérje mobilitási viszonyait és asszociált hányadait fogjuk megmérni (pl.: IL-2R α - IL-2R β - IL-2R γ).

6. Összefoglalás

A membránfehérjékből felépülő sejtfelszíni struktúrák változatos térbeli és időbeli szerkezettel rendelkeznek, több hierarchikus szinten szerveződnek. Az immunfolyamatokban fontos szereppel rendelkező interleukin-2 és -15 citokin receptorok és az MHC I és II molekulák közös klaszterekben fejeződnek ki T sejtek membránjában. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a legmagasabb expressziójú komponens, az MHC I hogyan befolyásolja a klaszter elemeinek aggregációját és dinamikáját. Ezért az MHC I expresszióját siRNS-sel csendesítettük. Szuperfelfodású képek analízisével kimutattuk, hogy az MHC I molekulák klasztermérete azok expressziós szintjének a függvénye. Az IL-2R α és IL-15R α alegységek klaszterizációját, valamint az IL-2/15R β és IL-2R α közötti átlagos távolságot az MHC I csendesítése nem befolyásolta. Molekuláris fényességek analízisével kimutattuk, hogy a kisméretű MHC I komplexekben a homoaggregáció mértéke csökkent az expressziós szint csökkentésével. FCS mérések segítségével megállapítottuk, hogy az MHC I molekulák mobilitása következetesen nagyobb a kölcsönható fehérjék által alkotott aggregátum méretének csökkentésével. Az IL-2/15R α alegységek mobilitása is megnőtt az MHC I számának a csökkentésével. Az MHC I és az IL-2R α /IL-15R α stabil kölcsönhatása következtében a géncsökkentés után megmaradó MHC I molekulák az IL-2R α /IL-15R α alegységek mellett maradtak. A receptorok lipid tutajokban való akkumulációjára nem volt hatással a géncsökkentés.

Értekezésem további részében az IL-2 jelútvonalban is szerepet játszó c-Jun és a c-Fos heterodimer transzkripciós faktorok konformációját és dinamikus sajátságait vizsgáltam meg. A dimerek konformációjának vizsgálatához a C-végükön elhelyezkedő fluoreszcens fehérjék között FRET méréseket végeztünk, a DNS-kötődés vizsgálatát fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiás (FCCS) analízis segítségével végeztük el. Megállapítottuk, hogy a DNS-hez kötött dimer transzkripciós faktorok aránya csökkent, ha a c-Fos C-terminális végét megrövidítettük, tehát a C terminális régiónak funkciója van a DNS-hez való kötődésben. A FRET adatok alapján számolt átlagos távolságok ismeretében a molekuláris dinamikai szimulációkból számolt lehetséges konformációk körét jelentősen szűkíteni lehetett.

Az értekezés utolsó részében egy újraprogramozható mérőeszköz (FPGA) biofizikai mérésekben való lehetséges alkalmazását, illetve validálását mutattam be fluoreszcencia (kereszt)korrelációs mérésekben. Az eszközzel, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható korrelátorral meghatározott korrelációs függvények paraméterbecslését nemlineáris illesztéssel végeztem el, a paraméterek a két eszközön közel azonosak voltak. Az eszköz segítségével megbecsülhető a molekulakomplexekben levő fehérjék asszociált hányada és mobilitása, lehetővé téve pontosabb biofizikai modellek felállítását.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/284/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mocsár Gábor
Neptun kód: W56ZNY
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034348

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mocsár, G.**, Volkó, J., Rönnlund, D., Widengren, J., Nagy, P., Szöllősi, J., Tóth, K., Goldman, C. K., Damjanovich, S., Waldmann, T. A., Dóczy-Bodnár, A., Vámosi, G.: MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells. *Biophys. J.* 111 (1), 100-112, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.044>
IF: 3.632 (2015)
2. **Mocsár, G.**, Kreith, B., Buchholz, J., Krieger, J. W., Langowski, J., Vámosi, G.: Multiplexed multiple-tau auto- and cross-correlators on a single field programmable gate array. *Rev. Sci. Instrum.* 83 (4), 046101, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3700810>
IF: 1.602
3. Vámosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C. W., Szalóki, N., **Mocsár, G.**, Müller, G., Brázda, P., Waldeck, W., Damjanovich, S., Langowski, J., Tóth, K.: Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* 94 (7), 2859-2868, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120766>
IF: 4.683





További közlemények

4. Buchholz, J., Krieger, J. W., **Mocsár, G.**, Kreith, B., Charbon, E., Vámosi, G., Kebschull, U., Langowski, J.: FPGA implementation of a 32x32 autocorrelator array for analysis of fast image series.
Opt. Express. 20 (16), 17767-17782, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/OE.20.017767>
IF: 3.546
5. Beck, Z., Balogh, A., Kis, A., Izsépi, E., Cervenak, L., László, G., Bíró, A., Liliom, K., **Mocsár, G.**, Vámosi, G., Füst, G., Matkó, J.: New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production.
J. Lipid. Res. 51 (2), 286-296, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M000372>
IF: 6.115
6. Erdélyi, K., Bai, P., Kovács, I., Szabó, É., **Mocsár, G.**, Kakuk, A., Szabó, C., Gergely, P., Virág, L.: Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells.
FASEB J. 23 (10), 3553-3563, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-133264>
IF: 6.401
7. 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

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 28,837

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,917

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, 2016.10.26.