

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

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

Írta: Nizsalóczki Enikő, okleveles matematika-fizika szakos tanár

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

Témavezető: Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus
tagok: Dr. Balkay László, PhD
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológia Intézet
2014. szeptember 08. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Gombos Imre, PhD
Dr. Pázmándi Kitti, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Gombos Imre, PhD
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Papp-Balogh Andrea, PhD
Dr. Pázmándi Kitti, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021. november 4. 14:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a biophys@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2021. november 3.) 14 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. BEVEZETÉS

1.1 A γ_c citokinek és receptoraik a T sejtek működésében

A γ_c citokincsalád, amely az interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 és IL-21 citokineket foglalja magába, a közösen használt γ_c (common γ) 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.

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. A család tagjai a közös receptor alegység és a közös jelátviteli molekulák használatából eredően biológiai hatások tekintetében bizonyos fokú redundanciát mutatnak. Az átfedő funkciók mellett ugyanakkor egyedi, gyakran ellentétes funkciókat is 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. A γ_c citokinek hatásának erősítése, gátlása vagy más módon történő befolyásolása így terápiás potenciállal bír(hat) számos betegség kezelésében.

1.2 Az IL-9 és IL-2 receptorok

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). Amellett, hogy számos esetben T sejt növekedési faktorként viselkedik, az IL-2 jelenléte az aktiváció indukálta sejthalál (AICD) folyamatában is kritikus, emellett fontos szerepet játszik különböző $CD4^+$ és $CD8^+$ T sejt alpopulációk funkciójának és homeosztázisának szabályozásában. Az IL-2 citokinnek központi szerepet tulajdonítanak a citokin család többi tagjának szabályozásában is. 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. Korábban intézetünkben

kimutatták, hogy aktivált T limfociták, illetve számos humán T limfóma eredetű sejt felszínén az IL-2R az MHC I és II glikoproteinekkal közös szuperklaszterekben fejeződik ki, amelyek kialakításában és fenntartásában kiemelt szerepet játszanak a lipid tutajok. Az IL-15R α alegysége szintén ezen szuperklaszterekben dúsul fel a mindkét receptorfajtát expresszáló sejteken.

Az IL-9 citokint elsőként helper T sejt növekedési faktorként azonosították egerekben, potenciális onkogén aktivitással. 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 sejt tumorok kialakulásának elősegítésében játszott szerepe, amelyet egér modellrendszeren, illetve humán biopsziákon egyaránt bizonyítottak. Az IL-9 hatása érvényesülhet közvetlenül a tumor sejteken, illetve a limfómák kialakulását szabályozó tényezők (pl. T_{reg} sejtek, tumor mikrokörnyezet) befolyásolásán keresztül is; a pontos mechanizmus ugyanakkor még nem tisztázott. Az IL-9R a közös γ_c citokin receptor család egyik heterodimer összetételű tagja, amelynek expressziója elsősorban a magas affinitású, heterotrimer IL-2R komplexet is kifejező T sejt típusokon figyelhető meg.

1.3 A membránfehérjék sejt felszíni szerveződésének vizsgálata

A sejtek kommunikációjában, az anyag- és információ-áramlásban, valamint ezek szabályozásában a plazmamembrán alapvető szerepet játszik. A membrán komponenseinek szerveződése/kompartmentalizációja számos fiziológiai sejt funkció, így az intra- és intercelluláris jelátvitel, koordinálásában és végrehajtásában kritikus szerepet játszik. 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 általam vizsgált interleukin-9 és -2 receptorok esetén is, a legalapvetőbb szerveződési szintet az alegységek közvetlen molekuláris kölcsönhatása, s ezáltal a funkcionális receptorkomplexek kialakulása jelenti. Az egyes fehérjekomponensek fizikai közelsége (homo-, illetve hetero-asszociációja) játssza a főszerepet

a membránfehérjék nanométeres távolságskálán megvalósuló szerveződésében, az ún. kisméretű molekulaklaszterek (nanodomének) kialakulásában is. A membránfehérjék, illetve az általuk alkotott kisméretű fehérjeklaszterek nagyobb léptékű, a több száz nanométeres (vagy akár mikrométeres) mérettartományban megvalósuló kompartmentalizációját is számos esetben feltárták.

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. Ennek vizsgálatára számos biokémiai és biofizikai módszer ad lehetőséget. Utóbbiak előnye, hogy 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 vizsgálódni, a leginkább célravezető, ha a fehérjék és egyéb membránalkotók által kialakított struktúrákat több szinten vizsgáljuk egyidejűleg.

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 konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM) alkalmazásával fluoreszcensen jelzett membránalkotók plazmamembránbeli eloszlása a néhány száz nanométeres mérettartományban vizsgálható. Két membránalkotó térbeli viszonyának vizsgálatakor az elsődleges kérdés az, hogy kolokalizálnak-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) a meghatározása. Mindkét esetben a vizsgált molekulák eloszlását rögzítő képpárok segítségével határozzák meg a kolokalizáció jellemzésére alkalmazott kvantitatív paramétert, ugyanakkor az így kapott értékek a molekulák térbeli viszonyát más-más szempontból jellemzik.

A kolokalizációs, különösen a korrelációs vizsgálatok sarkalatos pontja a valós kolokalizáció (vagy éppen szegregáció) elkülönítése a véletlen által létrehozott „látszólagos” korrelációtól (anti-korrelációtól). A véletlenszerűség ellenőrzésére 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: adott sejt esetén a két molekula eloszlásáról detektált mikroszkópos képek pixeleinek keverésével modellezzik azok véletlenszerű kapcsolatát és számítanak korrelációs koeficiens 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 koeficiens értékét ehhez az intervallumhoz hasonlítják. Amennyiben a koeficiens 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.

Míg a konfokális mikroszkóp néhány 100 nm-es mérettartományban ad információt a vizsgált fehérjék laterális eloszlásáról, addig a Förster-féle fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) módszer lehetővé teszi a fehérjék molekuláris asszociációjának, közvetlen fizikai közelségének a vizsgálatát (nanométeres lépték). Viszonylagos egyszerűsége miatt a sejtfelszíni 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. 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. A FRET hatásfok a direkt gerjesztett donor és akceptor fluoreszcencia intenzitása, valamint az akceptor szenzitizált (azaz a FRET által kiváltott) emissziója alapján számítható ki. Ezzel az eljárással a FRET hatásfok sejtenként meghatározható akár áramlási citométer, akár konfokális mikroszkóp alkalmazásával. Az accpbFRET módszer alapja, hogy a donor fluoreszcencia intenzitása akceptor jelenlétében csökken a FRET következtében. 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.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az IL-2R és IL-15R azonos membrán mikrodoménekben, hasonló molekuláris környezetben fejtik ki hatásukat humán T limfóma sejteken. Feltételezhető, hogy más, a közös 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 kifejezi és ahol az IL-2 fontos szabályozó szerepet tölt be. Emellett az IL-9R α jelentős homológiát mutat az IL-2/15R β láncsal, amely hasonló fehérje-fehérje, ill. 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.

Célkitűzéseim az alábbi fő pontokban foglalhatók össze:

- (1) IL-9R kapcsolata az IL-2R/MHC szuperklaszterekkel, beleértve a lipid tutajok szerepét az IL-9R sejt felszíni 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 co-occurrence analízisében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1.1. Sejttenyésztés és citokin kezelés

Vizsgálatainkat 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-1 asszociált, helper/inducer fenotípusú(Th/i) humán T-limfóma sejtvonal, amelyet a Kit225 sejtvonal 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. Az MT-2 sejtek IL-9-et termelő sejtek.

Mindkét sejtvonalat RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, ami 10%-os FBS-t, penicillint és sztreptomocint tartalmazott. A Kit225/IL9R sejtek médiuma 30 U/ml humán rekombináns IL-2-t, valamint a vad típusú sejtek növekedését gátló G418-at (800 μ g/ml) is tartalmazott. A sejt kultúrákat 37 °C-on, állandó parciális nyomású CO₂ atmoszféra (CO₂ tartalom 5%), ill. 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.

3.2 Sejtalkotók fluoreszcens jelzése

A membránfehérjéket fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel, a GM1 gangliozidot pedig fluoreszcensen jelzett kolera toxin B alegységgel jelöltük. Alkalmazott antitestek: MHC I könnyű lánc - L368, MHC I nehéz lánc – W6/32, MHC II – L243, IL-2R α – anti-Tac, IL-9R α – AH9R4 és AH9R7, γ_c lánc – TugH4, transzferrin receptor – MEM75. A TS1H9RA3 proliferációs esszé alapján az AH9R4 kismértékben, míg az AH9R7 erősen gátolja az IL-9 citokin kötődését/hatását. Így az IL-9 kötődés hatását célzó kísérleteinkben az AH9R4 antitestet alkalmaztuk.

3.3 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 (FACS Aria áramlási citométer). A kötőhelyek relatív számát a sejtek fluoreszcencia intenzitás hisztogramjának autofluoreszcenciával korrigált és az alkalmazott antitest jelölési arányával normalizált középértékéből (Mean Fluorescence Intensity, MFI) számítottuk. Az elérhető kötőhelyek abszolút számának meghatározásához az MFI értékeket ismert számú festéket tartalmazó mikrogöngyök segítségével kalibráltuk (Quantum™ Alexa Fluor 488 MESF kit). A mérési adatokat a Szentesi Gergely által írt REFLEX programmal értékeltük ki.

3.4 Membránalkotók páronkénti kolokalizációjának kvantitatív jellemzés

A membrándomén szintű kolokalizációs vizsgálatokat Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal végeztük. A vizsgálatok során két vagy három sejtfelszíni alkotót (membránfehérje, illetve GM1 gangliozid) jelöltünk meg elkülöníthető spektrumú fluorofórral konjugált specifikus markerekkel.

A többcsatornás képek felvételét olyan optikai szeletekben végeztük, amelyekben a membránszelet merőleges (vagy közel merőleges) az optikai tengelyre: a fedőlemezhez közeli (alsó), illetve a tárgylemezhez közeli (felső) rétegben. Ebben az esetben mérhetünk a legkisebb zavaró jelet a vizsgált membránterületen kívüli részekből. A felvett optikai szeletek analízise Gauss szűrést követően történt. A csatornák közötti átvilágítás mértékének minimalizálására a képeket ún. „soronkénti szekvenciális üzemmódban” vettük fel, ami azt jelenti, hogy egymás után, soronként történik a különböző lézerekkel való gerjesztés és a gerjesztés hatására emittált fotonok detektálása az egyes csatornában.

A membránalkotók térbeli kapcsolatának kvantitatív analízise során a sejteket először manuálisan körberajzoltuk, 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.

Pearson-féle korrelációs analízis: A vizsgált membránalkotók eloszlását rögzítő képpár esetén meghatároztuk a Pearson-féle korrelációs együtthatót, majd a képpár egyik tagja esetén a pixelblokkokat 500 alkalommal véletlenszerűen újrandezve („megkeverve”), meghatároztuk a kevert kép, illetve a képpár másik, változatlanul hagyott tagja közötti korrelációs koeficiens értékét. Így megkaptuk a korrelációs koeficiens adott sejtre vonatkozó intenzitásviszonyoknak megfelelő eloszlását arra az esetre vonatkozóan, amikor a két membránalkotó sejtfelszíni elrendeződése 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 koeficiens tényleges korrelációt (anti-korrelációt) valószínűsít-e. Az adott sejthez tartozó konfidencia intervallum segítségével a korrelációs koeficiens tényleges értékét besoroltuk az alábbi három kategória valamelyikébe: „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.

Membránalkotók átfedő hányadának meghatározása: a membránalkotók átfedő hányadának kvantitatív jellemzésére (együttes előfordulás vagy „co-occurrence” analízis) szolgáló együtthatót intenzitás-, illetve területalapú megközelítéssel egyaránt meghatároztuk. Itt szintén alkalmaztuk a korrelációs együtthatók esetén bevezetett konfidencia intervallum módszert: 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.

3.5 Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatok

Arányalapú FRET (ratiometric FRET, rFRET) mérések kivitelezése: Az rFRET méréseket Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkópon végeztük. Minden látómezőben három fluoreszcencia intenzitást detektáltunk, melyek a donor, a FRET és az akceptor csatornáknak feleltek meg. A képek kiértékelése a Matlab alatt futó DipImage alkalmazással történt: a membrán és nem-membrán „tartalmú” pixelek szegmentálásához az ún. „manually seeded

watershed” algoritmust használtuk, majd meghatároztuk a FRET kiszámításához szükséges paramétereket az rFRET plugin segítségével. A korrekciós faktorok és a relatív fluoreszcencia hatások kiszámításához egyszeresen jelölt, azaz csak donorral és csak akceptorral jelzett mintákat használtunk. Végezetül a FRET hatások kiszámítása a duplán (donor és akceptor festékkel együttesen) jelölt sejteken történt, sejtenként.

Akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET (accpbFRET) vizsgálatok: Az accpbFRET vizsgálatokat Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal végeztük. A mérések során a duplán jelzett (donor- és akceptor fluofórt egyaránt hordozó) sejtek donor és akceptor intenzitás-eloszlásáról egyszeres, kétsatornás képet rögzítettünk alacsony gerjesztő lézerintenzitás mellett. 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 kétsatornás képet vettünk fel alacsony lézerintenzitás mellett és vizsgáltuk a donor intenzitás változását. A képek kiértékelése során lowpass szűréssel csökkentettük a háttérzajt. A pixelenkénti FRET hatásfokot az ImageJ AccPbFRET moduljával határoztuk meg, amely lehetővé tette a szükséges korrekciók (pl. donor nem kívánt kiegészítése, képek esetleges elcsúszása, stb.). A kiértékelés eredménye egy színskódolt FRET-térkép, illetve az adott sejtre vonatkozó, pixelenkénti FRET hatások eloszlás hisztogram. Egy adott fehérjepárra jellemző átlagos FRET hatásfokot a sejtenkénti FRET hisztogramok medián értékeinek átlagolásával határoztuk meg.

3.6 Statisztikai számítások

A kolokalizáció kvantitatív jellemzésére használt együttthatók összehasonlítására kétmintás t-próbát, illetve ANOVA tesztet használtunk, míg a rFRET értékek eloszlásának vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolata: Pearson-féle korrelációs analízis

Az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklaszterek membrándomén szintű kapcsolatát konfokális mikroszkópiás képek kvantitatív analízisével, a Pearson-féle korrelációs együttható segítségével jellemeztük. Az analízis során sikeresen adaptáltuk Costes és munkatársainak korábban intracelluláris sejtalkotók térbeli kapcsolatának vizsgálatára alkalmazott konfidencia intervallum módszerét, amelynek segítségével elkülöníthető a véletlenszerű, illetve a tényleges kolokalizáció két membránalkotó között. A módszer alkalmazhatóságát a pozitív és negatív biológiai kontrollok segítségével validáltuk (MHC I könnyű és nehéz lánc – pozitív kontroll, transzferrin receptor és GM1 gangliozid – negatív kontroll).

A Kit225/IL-9R sejt vonal a Kit225 sejt vonal 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: 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. Hasonló eredményeket kaptunk az eddig még nem vizsgált, az IL-9R α alegységét konstitutívan kifejező MT-2 sejtek esetén is.

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 sejt vonalon. A képek Pearson-féle korrelációs 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. Hasonló eredményt kaptunk az IL-9R α és a GM1 tartalmú lipid tutajok viszonylatában is. A korrelációs analízis ugyanakkor azt is feltárta, hogy a sejtek egy jelentős része esetén az IL-9R α és a többi vizsgált membránalkotó (elsősorban) egymástól különálló (szegregált) membránrégiókban fordul elő.

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

A következőkben fotoelhalványításon alapuló FRET módszerrel 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. Mint az várható is volt, a pozitív és negatív biológiai kontroll minták esetén, az MHC I glikoprotein könnyű és nehézlánc között mindkét sejtvonal esetén magas pozitív FRET hatásfokot kaptunk, míg a negatív kontroll (GM1 gangliosid és transferrin receptor) esetén alacsony, nullához közelítő átlagos FRET értéket detektáltunk.

Az IL-2R α és az MHC I, valamint az IL-2R α és az MHC II fehérjék között mindkét sejtvonal esetén pozitív, a negatív kontrolltól szignifikánsan magasabb FRET hatásfokot detektáltunk, azaz az IL-2R és az MHC glikoproteinek ezeken a sejteken is egymás molekuláris közelségében találhatók. Ugyancsak szignifikánsan pozitív FRET hatásfokot detektáltunk az IL-9R α és mindkét típusú MHC fehérje, valamint az IL-9R α és az IL-2R α között.

4.3 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, ill. megvizsgáljuk, hogy a korrelációs analízissel kimutatott átfedő- és szegregált membránrégiók előfordulhatnak-e ugyanazon a sejten, a CLSM 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 az előzőekben bemutattam, új kísérleteket is végeztünk, ahol mindkét típusú analízist elvégeztük.

Az egyes fehérjepárok átfedő hányadát jellemző együtthatók esetében is meghatároztuk a véletlenszerű eloszláshoz tartozó, sejtenkénti konfidencia intervallumokat, 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.

Várakozásainknak megfelelően a „valódi pozitív” korrelációs kategóriába eső sejtek esetén mind az IL-9R, mind pedig az IL-2R α alegysége jelentős mértékű átfedést mutatott a

másik receptor α láncával. Az IL-9R α esetén az átfedő hányad összemérhető volt a pozitív biológiai kontrollként használt MHC I glikoprotein könnyű ($\beta 2m$) és nehézlánc (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 gangliozid esetén kapott értékektől szignifikánsan magasabb a két α alegység átfedését jellemző együttható értéke.

4.4 A citokin milió 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 önmaguk is termelik az IL-9 citokint, így ezen kísérleteinket a Kit225/IL-9R sejteken végeztük el. A Kit225/IL-9R 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 befolyásolhatja, ezért az IL-9 hatásának vizsgálatánál olyan sejteket használtam, amelyeket passzálást követően IL-2 mentes médiumban tenyésztettünk 48 órán keresztül („éheztetett” sejtek).

A CLSM képek kvantitatív analízise alapján az „éheztetett” sejteken is megtalálhatók mind a közös, mind pedig a szegregált membránterületek. Sem a Pearson-féle korrelációs együtthatók értéke, sem pedig a sejtek egyes korrelációs kategóriákban való százalékos eloszlása nem különbözött szignifikánsan az „éheztetett” és az IL-2 jelenlétében tenyésztett (továbbiakban „normál”) sejtek között.

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 alkalmazott 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 $M_{IL-2R\alpha}$ együtthatók összehasonlításakor tapasztaltunk. A „0” kategóriába eső sejtek esetén nem volt számottevő különbség az „éheztetett” és a „normál” sejtek között.

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 a sejtek egyes korrelációs kategóriák közötti megoszlásában, sem pedig a két alegység átfedő hányadában. Tehát membrándomén szinten az IL-9 kötődése nem befolyásolta az IL-9R és az IL-2R α alegységeinek térbeli kapcsolatát.

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

A következőkben megvizsgáltuk, 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, 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. 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.

Eredményeink alapján a FRET hatásfok gyakorisági hisztogramok közéértéke 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. Az IL-9 kötődése nem okozott szignifikáns változást a heterodimer IL-9R komplex elemei közötti FRET hatásfok értékében. Ezzel szemben az IL-9R α –IL-2R α és a γ_c –IL-2R α kapcsolatát jellemző FRET gyakorisági hisztogramok szignifikánsan eltolódtak IL-9 kezelés hatására ($p < 0,007$, Kolmogorov-Smirnov teszt): a hisztogramok közéértéke az IL-9R α –IL-2R α pár esetén szignifikánsan megnőtt, míg a γ_c –IL-2R α pár esetén szignifikánsan csökkent IL-9 kötődését követően.

5. MEGBESZÉLÉS

Disszertációm célja az interleukin-9 receptor sejtfelszíni szerveződésének feltérképezése volt humán T limfóma eredetű sejteken. Az IL-9R a közös γ_c citokin receptor család egyik heterodimer összetételű tagja, amelynek expressziója elsősorban a magas affinitású, heterotrimer IL-2R komplexet is kifejező T sejtípusokon 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. Az IL-15R α alegysége szintén ezen szuperklaszterekben dúsul fel a mindkét receptorfajtát expresszáló sejteken. 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. Ezzel az eljárással lehetőségünk van az adott sejtre meghatározott korrelációs koefficiens kategorizálására, így a tényleges korreláció (anti-korreláció) felismerésére/valószínűsítésére a potenciális torzító tényezők kiküszöbölése révén (pl. expresszióbeli különbségek, stb.). 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.

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 membrándomének (lipid tutajok) között mindkét vizsgált humán T limfóma sejtvonal 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 citokin receptorok 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 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 membránrégiókn 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.

A CLSM képek Pearson-féle korrelációs analízise alapján az IL-9R α és az IL-2R/MHC szuperklasztterek 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.

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.

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. Miután egyik célunk a citokin milliő hatásának tanulmányozása volt, ezen vizsgálatokat a Kit225/IL-9R sejteken végeztük el, tekintve az MT-2 sejtek IL-9 termelő képességét. 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. Mindez alátámasztja az elkülönülő és átfedő domének ugyanazon a sejten történő együttes előfordulását. 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 IL-9 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 sejt felszíni szerveződésében, ezáltal a receptorkomplex 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. 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 kölcsönhatására 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.

Ellentétben az említett co-patching vizsgálatok eredményeivel, ahol IL-9 kötődés hatására jelentősen megnövekedett az γ_c /IL-9R α dimerek száma, 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 magyarázhatjuk: Az IL-9R az IL-2 receptorról (és feltehetően egyéb fehérjéjével, pl. MHC I és II glikoproteinnal) 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. 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 közös 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 citokinmiliótól 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 T_{reg} sejteken, amelynek hátterében az IL-7R α és a γ_c láncok preasszociációja áll.

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. Továbbá eredményeink 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.

6. 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 citokin receptorok 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 kiegészítéséül 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 közös 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 közös γ_c receptoralegységek hatékony megosztását, s így a kiváltott válasz finomhangolását.

7. Publikációk



**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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.01.17.