

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Interleukin receptorok összeszerelődése és működése az endoplazmatikus retikulumtól a sejtmembránig

Volkó Julianna

Témavezetők: Dr. Vámosi György

Prof. Dr. Damjanovich László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Interleukin receptorok összeszerelődése és működése az endoplazmatikus retikulumtól a sejtmembránig

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

Írta: Volkó Julianna
okleveles biológus/biotechnológus

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

Témavezetők: Dr. Vámosi György, PhD
Prof. Dr. Damjanovich László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Immunológiai Intézet diszkussziós terme
2015. december 15. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Koncz Gábor, PhD
Dr. Steinbach Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Koncz Gábor, PhD
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Steinbach Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2020. január 14. 13:00 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. T limfociták

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

Bár a T és B sejtek, valamint a természetes ölősejtek (NK sejtek) fejlődése különböző irányban történik, közös előalakból származnak és mindhárom sejtvonallal fejlődésében fontos az IL-2 receptorcsalád γ_c lánc és a JAK3 kináz. Az egyes érési fázisokat jellegzetes membránstruktúrák, receptorok megjelenése és eltűnése kíséri. A T sejtek differenciálódása a periférián is folytatódik, ahol kialakulnak a különböző effektor funkciókkal rendelkező alpopulációk. A T sejtek többsége nyugvó állapotban kering a perifériás nyirokszervek között, aktiválásukhoz legalább két jel szükséges, a naiv T sejtek antigén-specifikus aktivációja és a kostimulációs jelek együttesen eredményezik a sejtosztódást és differenciálódást elősegítő új gének kifejeződését és sejt felszíni receptorok fokozott expresszióját. Sorsukat az dönti el, hogy a másodlagos nyirokszervekben történő vándorlásuk során találkoznak-e számukra felismerhető MHC-peptid komplexeket bemutató antigénprezentáló sejtrel (APC-vel), továbbá attól, hogy milyen kostimuláló jelet kapnak környezetükből és az APC-től. Ezek a kölcsönhatások határozzák meg, hogy a T sejt receptor (TCR) által közvetített jelek hatására a sejtek effektor sejtekké differenciálódnak-e, válaszképtelenség (anergia) állapotába kerülnek vagy a programozott sejthalál (apoptózis) következtében elpusztulnak.

1.2. IL-2 és IL-15 citokinek

Az I-es típusú citokinek családjába tartozó interleukin-2 egy 15,5 kDa tömegű glikoprotein, melyet 1976-ban fedeztek fel, mint a csontvelői eredetű T limfociták növekedési faktorát. A citokincsaládból elsőként klónozták génjét 1983-ban, ill. receptorának génjét egy évvel később, majd kristályszerkezetét 1992-ben határozták meg. Az interleukin-15-öt egymástól függetlenül 2 kutatócsoport is azonosította 18 évvel az IL-2 felfedezése után azon sajátja alapján, hogy az IL-2-függő CTLL-2 T-sejt vonal proliferációját neutralizáló anti-IL-2 antitestek jelenlétében is stimulálja.

Az IL-2-t elsősorban CD4⁺ T limfociták termelik az antigén stimulációt követően, de kisebb mennyiségben CD8⁺ T sejtek, NKT sejtek, aktivált dendritikus sejtek és hízósejtek is szekretálják, makrofágok azonban egyáltalán nem. Egyaránt tekinthető autokrin és parakrin növekedési faktornak, mivel visszahat az őt termelő sejtre, de ugyanakkor a környezetében lévő más T sejtek növekedését is elősegíti. Emellett pleiotrop hatást fejt ki más sejttípusokra, pl. növeli az NK sejtek citolitikus aktivitását vagy elősegíti a B sejtek immunglobulin termelését.

IL-15-öt termelnek a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, sztróma sejtek és néhány epitél sejt. Receptorának alfa alegységével együtt szimultán ko-expresszálják az aktivált monociták és dendritikus sejtek. A ligand hozzákötődik az IL-15R α -hoz az endoplazmatikus retikulumban aztán együtt transzportálódnak a sejtfelületre, lehetővé téve a transzprezentációt az NK progenitor sejtek felé.

Míg az IL-15 kiemelkedő jelentőségű a konvencionális T_h sejtek túlélésében és proliferációjában, az IL-2 közvetítette szignálok a T_{reg}-ek homeosztázisának fenntartásához esszenciálisak. Az IL-2 fő szerepe *in vivo* a perifériás immuntolerancia fenntartásában nyilvánul meg, a tímuszbeli éréshez nem esszenciális. A B sejtek proliferációjának és ellenanyag-termelésének elősegítésében az IL-2 és az IL-15 is szerepet játszik. Mindkét citokin stimulálja az NK sejtek fejlődését és proliferációját is. Az AICD folyamatát az IL-2 elősegíti, míg az IL-15 gátolja azt. Utóbbi citokin ugyanakkor a CD8⁺ memória T sejtek túlélésében is meghatározó faktor.

1.3. Citokinreceptorok: IL-2R és IL-15R

Mindkét membránreceptor három alegységből épül fel: a β (CD122) és a γ_c (CD132) alegységeket közösen használják, melyek a jelátviteli folyamatokhoz szükségesek; míg saját, ligand-specifikus α láncok (az IL-2R α vagy CD25 és az IL-15R α vagy CD215) a citokin megkötéséért felelősek. Alegység-összetételüktől függően, a receptorok különböző ligandkötő affinitással rendelkező komplexeket alkothatnak a sejtmembránban. Az IL-2R α tranziensen expresszálódik a T sejt receptor aktivációt vagy az IL-2-nek a többi alegységhez való kapcsolódását követően. Önmagában alacsony affinitással köti a citokint ($K_d=10^{-8}$ M), szignál továbbítása nélkül. A heterodimer IL-2/15R $\beta\gamma_c$ közepes affinitással köti az IL-2-t vagy az IL-15-öt ($K_d=10^{-9}$ M), míg a heterotrimer IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ és IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$ nagy ligandkötő affinitású ($K_d=10^{-11}$ M). A heterodimerek és a heterotrimerek hatékony jelátvitelre képesek. Az IL-2R α -val ellentétben az IL-15R α önmagában is nagy affinitással köti a ligandját ($K_d=10^{-11}$ M). A β

láncot az IL-2-n kívül csak az IL-15 használja (IL-2/15R β), míg a γ_c lánc az IL-15-ön kívül része még az IL-4, IL-7, IL-9 és az IL-21 receptorának is.

1.4. IL-2 transzmembrán jelátvitel

A receptorhoz való kötődést követően az IL-2 – és mivel a jelátvitelben résztvevő receptor alegységeket közösen használják, így az IL-15 is – több jelátviteli utat aktivál. A β és a γ_c láncok citoplazmatikus doménjének heterodimerizációja a Janus család tirozin kinázainak (JAK1, JAK3) aktivációjához vezet, a JAK1 a β alegységgel, míg a JAK3 a γ_c -vel asszociál. A JAK kinázok aktiválják egymást és foszforilálják a receptorláncokat. Az Y338 foszforiláció a β láncon lehetővé teszi az SHC adaptor fehérjével való asszociációt, ami platformot szolgáltat a Ras-MAP kináz aktivációhoz és elősegíti a sejtnövekedést. Az Y392 és Y510 foszforiláció a STAT1, STAT3 és STAT5 (A és B) transzkripciós faktorok toborzását mediálja, a STAT5 fehérjék leghatékonyabb aktivációjával. Szintén aktiválódik a foszfinozitol-3-kináz (PI3K)-Akt-p70-S6K jelátviteli út, ami a sejtnövekedést és -túlélést segíti elő. A STAT5A és STAT5B molekulák az IL-2/15R β láncon dokkolódnak, foszforilálódnak, dimerizálódnak és transzlokálódnak a sejtmagba, ahol azon célgénekhez kapcsolódnak, melyek a T sejtek növekedéséhez, differenciálódásához és effektor funkcióihoz esszenciálisak.

1.5. Az IL-2R α és a Daclizumab

Az IL-2 receptor ligand-specifikus alfa alegysége kivételesen értékes immunterápiás célpont, mivel nyugvó sejtek közül csak T_{reg} sejteken és CD56^{hi}CD16^{lo} NK sejteken jelenik meg, viszont konstitutív expresszióját mutatták ki egy sor malignus és benignus betegséggel (szervkilökődés, neoplázia, különféle autoimmun- és fertőző betegségek) asszociáltan. 1981-ben írták le először az IL-2R α -ellenes monoklonális antitestet, az anti-Tac-ot (T cell activation antigen), ami megakadályozza a citokin és a receptor interakcióját, azaz blokkolja az IL-2 kötődését az IL-2R α -hoz. Ennek a humanizált változatát daclizumab (Zenapax, Roche) néven 1997-ben engedélyezte az FDA vese allograft kilökődés megakadályozására. Ez volt a harmadik monoklonális, az első humanizált illetve az első olyan antitest, amit citokin receptor kapcsán használtak a terápiában. A T sejt proliferáció gátlását megcélzandó (és bár csekély sikerrel), de alkalmazzák T-sejt-mediált autoimmun betegségek (pl. szklerózis multiplex, aplasztikus anaemia) vagy különböző neopláziák (felnttkori T-sejtes leukémia) kezelésében is.

1.6. Felnőttkori T-sejtes leukémia (ATL)

A felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma (ATL) a legagresszívabb T sejtes leukémia/limfóma, melyet a CD4⁺ T sejtek HTLV-1 retrovírus általi fertőzése okoz. A perifériás vérben nagy mennyiségű CD25-öt is kifejező CD4⁺ T sejtet lehet kimutatni. Változatos klinikai tulajdonságai alapján akut, limfóma, krónikus és smoldering („parázsló”) ATL altípusokat különböztetnek meg. Bár az utóbbi két típus a fehérvérsejtek normál vagy kissé emelkedett számával jellemezhető és jobb prognózisú, az akut ATL-es betegek kezelésében a hatékony terápia jelenleg limitált, szervműködési zavarokkal és rossz prognózissal társul (4-10 hónapos átlagos túlélési idővel). A korai fázisban a leukémiás CD4⁺ T sejtek autokrin növekedési periódusa figyelhető meg az IL-2 és funkcionális IL-2 receptorok expressziójával. Az ATL-nek ebben a fázisában a sejtek proliferációja csökkenthető anti-IL-2R α (anti-Tac) antitest alkalmazásával. Idővel bár az IL-2 szekréció megszűnik, a CD25 sejtfelszíni expressziója még folyamatos. Ez a késői fázis IL-2-independens növekedéssel jellemezhető. Sok betegnél a késői fázis konstitutívan aktivált JAK-STAT jelátviteli útvonallal asszociált.

1.7. Szekretált és plazmamembrán fehérjék vezikuláris transzportja

A szekréciós fehérjék – köztük az interleukin-2 és -15 is – a bioszintetikus-szekréciós úton keresztül jutnak el a szintézis helyétől a plazmamembránig. Erre az útra csak azok a fehérjék terelődnek, amelyek speciális szignálszekvenciával rendelkeznek. Ez teszi lehetővé, hogy a szintézist végző riboszómáról az endoplazmatikus retikulum membránján keresztül a retikulum üregrendszerébe kerüljenek. Innen a Golgi-készülék ciszternáiba áramlanak át, ahol válogatás után egy részük vezikulumokba csomagolódva hagyja el a Golgit és jut el a plazmamembránig, ahol exocitózissal kiürül, míg más fehérjék az endoszóma/lizoszóma rendszerbe kerülnek.

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

1.8. MHC fehérjék

A 6. kromoszóma rövid karján található az emberi genom legnagyobb polimorfizmussal rendelkező komplexe, a fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC). A klasszikus MHC-gének két fő régiója által kódolt MHC I és MHC II fehérjék a plazmamembránban megjelenő HLA (human leukocyte locus A) antigének. Kiemelkedő jelentőséggel bírnak az immunrendszer működésében, főként a T sejt immunválasz kiváltásában és lezajlásában. Az I. osztályba tartozó MHC glikoproteinek minden, sejtmaggal rendelkező humán sejt felszínén kifejeződnek, míg az MHC II molekulákat állandó jelleggel csak a hivatásos antigénprezentáló sejtek expresszálják, de megjelennek egyes tumoros sejtek felszínén illetve IFN γ -val indukálhatóak. Az MHC I fő funkciója az endogén eredetű antigének (peptid fragmentumainak) bemutatása a CD8⁺ T limfocitáknak, de a sejtek jelátviteli folyamatainak szabályozásában is részt vesznek. Ezzel szemben az MHC II molekulák az APC-k által endoszomális úton processzált exogén eredetű antigéneket ismerik fel és prezentálják a CD4⁺ T limfocitákon megjelenő T sejt receptornak. A kétféle glikoprotein szerkezetében is különbözik. Az MHC I heterodimer: polimorf (α) nehézláncához nem kovalensen kapcsolódik a könnyűlánc, egy β_2 -mikroglobulin molekula. A peptidkötésre alkalmas konformáció kialakításához és a molekulák sejtfelszínre jutásához elengedhetetlen a β_2 -mikroglobulin kapcsolódása. Az MHC II molekulát egymáshoz nem-kovalens módon kapcsolódó polimorf α - és polimorf β -lánc építi fel.

Az MHC I (nehézláncának polimorfizmusából adódóan) alléljainak száma a humán populációban ezres nagyságrendű. Napjainkig az egyes MHC I allélekkel asszociált betegségek egész sorát leírták már, melyek főként autoimmun betegségeket (Crohn-betegség, sclerosis multiplex) néhány gyulladásszerű betegséget (pl. Bechterew-kór, hajlamosító gén: HLA-B27) vagy fertőzéseket érintenek, számos esetben mindmáig tisztázatlan patogenezissel.

1.9. Fehérjeklaszterek a sejtmembránban

Az MHC I molekula jelentős mértékű homoasszociációját mutatták ki különböző immunsejtek felszínén, emellett leírták számos membránfehérjével, pl. sejtfelszíni receptorokkal – IL-2R-ral, IL-15R-ral, EGFR-ral, transzferrin receptorral – vagy az ICAM-1 adhézios fehérjével, ill. az MHC II-vel való kölcsönhatását is. Megfigyeltek IL-2R α homoasszociációt is egyes T sejt vonalakon. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy a négy receptor alegység (IL-2R α , IL-15R α , IL-2/15R β és γ_c) heterotetramer komplexet alkot citokin hiányában is T limfóma sejtek plazmamembránjában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejttenyésztés, géncsendesítés

Az IL-2/15 receptorok alegységeinek összeszerelődését humán méhnyak karcinóma (HeLa) sejtvonalon vizsgáltam, melyet 10% (v/v) foetális borjú szérummal (FBS), L-glutaminnal és gentamycinnel kiegészített RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettem. Az intracelluláris jelátvitel ellenőrzéséhez ED40515(+) vad típusú és annak az IL-2-t stabilan expresszáló változatát, az ED/IL-2 humán ATL sejtvonalakat használtam. Előbbi sejtek növekedésükhöz 100 U/ml humán rekombináns IL-2-t kaptak.

A plazmamembránbeli fehérjeklaszterek vizsgálatához a Kit 225 K6 vad típusú sejtekből létrehozott FT7.10 nevű, az IL-15R α alegységet stabilan kifejező, CD4⁺ humán T limfóma sejtvonalat használtam. A sejtek növekedését 48 óránként 500 pM humán rekombináns IL-2 hozzáadásával, az IL-15R α pozitív sejtek szelekcióját 0,8 mg/ml Geneticin hozzáadásával biztosítottam.

Az FT7.10 sejtek géncsendesítését az MHC I könnyűláncára, a β 2-mikroglobulinra specifikus siRNS szekvenciával végeztem, melyet AMAXA Nucleofector II elektroporátorral juttattam be a sejtekbe, a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Kontrollként elektroporálatlan és irreleváns (GFP-ellenes vagy negatív kontroll) siRNS-sel transzfektált mintákat alkalmaztam. A sejtek életképességét fluoreszcein-diacetát/propidium-jodid festéssel ellenőriztem az elektroporáció után 48 órával. Az MHC I, MHC II, IL-2R α és IL-15R α molekulák sejtenkénti abszolút mennyiségét Dako QIFIKIT fluoreszcens gyöngyök segítségével határozam meg, a gyártó által ajánlott protokollt követve.

3.2. Klónozás, tranziens transzfekció

A humán IL-2R α és IL-15R α cDNS-ét EcoRI/BamHI hasítóhelyekkel pEGFP-N1 és pmCherry-N1 expressziós vektorokba klónoztam a fluoreszcens proteint kódoló rész előtt elhelyezkedő MCS-be (multiple cloning site). Marha pre-prolaktin szignálpeptidet BglII/EcoRI hasítóhelyekkel vittem be ugyanabba a vektorba a receptor génje elé.

Az IL-2/15R β és γ_c génjét tartalmazó IL-2/15R β -YFP és γ_c -YFP plazmidokat Dr. Thierry Rose-tól kaptuk (Institute Pasteur, Párizs). Ezekben a konstrukciókban az YFP fluoreszcens proteint EGFP-re és mCherry-re cseréltem. A megfelelő FP-t tartalmazó vektorból standard PCR segítségével amplifikáltam a szükséges DNS szakaszt, amit aztán AgeI/NotI hasítóhelyekkel az

adott receptor génjét kódoló plazmidba ligáltam, miután abból az YFP-t kivágtam. A konfokális mikroszkópos FRET mérések során néhány kísérletben az IL-2/15R β lánc rövidített variánsát használtam (β -C7), amit 279 aminosav C-terminálisról való eltávolításával készítettem. Az így csupán 7 aminosav hosszúságú intracelluláris doménnel rendelkező alegységet kódoló DNS-t a pEGFP-N1 vektorba ligáltam EcoRI/BamHI hasítóhelyekkel.

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

A HeLa sejtek tranziens transzfekcióját 8-lyukú kamrában, FuGene HD transzfekciós reagens segítségével végeztem el, a gyártó által javasolt protokoll szerint. A transzfekció után 24 órával, közvetlenül a mérés előtt, lecseréltem a tápoldatot a sejtekről Leibovitz's L-15 „imaging” médiumra.

3.3. Retrovirális transzdukció

Az egyes receptor alegységeket stabilan expresszáló HeLa sejtvonalakat virális transzdukcióval hoztam létre, melyhez retrovirális pBMN-Z-IN transzfer vektort és ún. pakoló sejtvonalként, (DMEM-ben tenyésztett) HEK293T humán embrionális vesesejteket használtam. A vektorba a lacZ helyére előzőleg BamHI/SalI hasítóhelyekkel ligáltam a megfelelő receptorlánc cDNS-ét (IL-2R α , IL-2/15R β vagy γ_c). A pakoló sejtekbe kalcium-foszfátos módszerrel transzfektáltam a receptor inzertet tartalmazó transzfer vektort, a VSVG és PAX2 csomagoló („helper”) plazmidokkal együtt. 4-6 óra elteltével a médiumot friss DMEM-re cseréltem a sejteken. 48 órával később 2 ml, már érett vírusokat tartalmazó átszűrt felülúszóval fertőztem az előző nap kitapasztott HeLa sejteket ($0,5 \times 10^6$ sejt/lyuk). Az infekció hatékonyságának növelése érdekében (mintánként 10 μ g/ml) polybrene-t alkalmaztam. A receptor alegységek kifejeződését immunfluoreszcens jelölést követően konfokális mikroszkóppal ellenőriztem.

3.4. Immunfluoreszcens jelölés

A virális transzdukcióval létrehozott HeLa-IL-2R α , HeLa- β és HeLa- γ_c sejtvonalak nem fejeznek ki semmilyen fluoreszcens fehérjét, ezért sejtmembránbeli expressziójukat immunfluoreszcens jelöléssel tettem láthatóvá. A jelölés előtt 24 órával 8-lyukú kamrába tettem lyukanként $1,5 \times 10^4$ sejtet, 300 μ l médiumban. Jéghideg HBSS oldattal való mosást követően a

sejteket 50 µg/ml végkoncentrációjú, Alexa Fluor 546 festékkel konjugált antitestekkel inkubáltam 30 percig jégen, majd kétszer mostam jéghideg HBSS oldattal, végül fixáltam 2% formaldehid/HBSS oldattal. A jelölés során a következő monoklonális egér antitesteket használtam: az IL-2R α citokinkötő epitópját felismerő anti-Tac, az IL-2/15R β -hoz kötődő Mik β 3, a γ_c alegységre specifikus TUGh4.

Az FT7.10 sejtek membránfehérjéinek jelöléséhez a következő monoklonális egér antitesteket használtam fel: MHC I nehézláncára specifikus W6/32, β 2-mikroglobulinhoz kötődő L368, IL-2R α citokinkötő epitópját felismerő anti-Tac, IL-15R α -hoz kötődő anti-FLAG-M2 vagy 7A4-24, transferrin receptort felismerő MEM-75 és GPI-horgonyzott CD48 fehérje elleni MEM102. A jelölést megelőzően Alexa Fluor 488, 546, vagy 647 fluoreszcens festékek szukcinimidil-észteréhez konjugáltam az antitesteket.

3.5. FRET hatások meghatározása konfokális mikroszkópiával

A receptorláncok közötti molekuláris együttállást 2-10 nm-es szinten mikroszkópos, pixelenkénti FRET technikával vizsgáltam, Zeiss LSM 880 vagy Leica TCS SP5 II konfokális mikroszkópok segítségével. Az EGFP gerjesztéséhez egy argon-ion lézer 488-nm vonalát, az mCherry gerjesztéséhez 543 nm-es (Zeiss) vagy 594- nm-es (Leica) HeNe lézert használtam. A fluoreszcencia intenzitásokat 3 csatornában detektáltam: donor (ex: 488 nm, em: 500-550 nm), transzfer (ex: 488 nm, em: 604-687 nm) és akceptor (ex: 543 vagy 594 nm, em: 604-687 nm). A spektrális átvilágítási faktorokat ki azon mintákból számoltam, ahol a sejtek egyszeresen voltak transzfektálva EGFP-vel (mint FRET donor), vagy mCherry-vel (akceptor). A háttér korrekció minden csatornában az átlagos autofluoreszcencia intenzitások levonásával történt, amiket a nem-transzfektált sejtek alapján határoztam meg. Az α faktor, amit az azonos mennyiségben kifejeződő gerjesztett donor és akceptor fehérjék donor és transzfer csatornákból érkező fluoreszcencia intenzitásai határoznak meg, a pSV-EGFP-mCherry fúziós plazmiddal transzfektált sejtekből (a két fluoreszcens fehérjét 1:1 arányban kifejezve) lett kiszámolva. Az energiatranszfer határfokát (E) minden donor- és akceptor FP-vel jelölt fehérjét ko-expresszáló mintára meghatároztam.

Az ER és a Golgi azonosításához TagBFP-t is kifejező (Sac1 és giantin) plazmidokat használtam, melyek segítségével organelum-specifikus módon analizáltam a FRET adatokat azokban a pixelekből, ahol a TagBFP fluoreszcencia intenzitása egy beállított küszöbérték felett volt. A mérési adatok kiértékelése a FiJi ImageJ programmal, RiFRET plugin-nal történt.

3.6. FRET hatásfok meghatározása áramlási citometriával

A mérésekhez egyszeresen (csak donor vagy csak akceptor) és duplán ((donor- (AlexaFluor546) illetve akceptor- (AlexaFluor647) festékkel konjugált monoklonális antitestekkel)) jelölt sejteket használtam. FACSAria III áramlási citométerrel az összes sejtről három csatornában (donor, FRET és akceptor) detektáltam a fluoreszcencia intenzitásokat. A következő gerjesztési hullámhosszakot és detektálási tartományokat alkalmaztam: 561/595±25, 561/>635 és 633/>635 nm. Az átvilágítási faktorok és a donor és az akceptor detektálási hatékonyságát jellemző α faktor egyszeresen jelölt (csak donoros vagy csak akceptoros) mintákból lettek meghatározva. A döglött sejteket kizártam az analízisből az oldalszórás/előre szórás dot plot-ok alapján. A FRET adatokat az intézet korábbi munkatársa által írt REFLEX nevű programmal értékeltem ki.

3.7. Golgi izolálás ATL sejtekből

Az ED40515(+) vad típusú sejtekből (48 órás IL-2 éhezést követően) és az ED/IL-2 sejtekből ultracentrifugálással izoláltunk Golgi apparátust tartalmazó frakciókat Golgi Izoláló Kit segítségével a gyártó protokolljának megfelelően (Sigma-Aldrich).

3.8. Fehérje kimutatása Golgi izolátumokban Western blot technikával

Az ATL sejtek totál sejtfrakcióit és Golgi izolátumait proteáz inhibítort és foszfatáz inhibítort tartalmazó fehérje lízis pufferben oldottuk 4°C-on majd fehérje koncentrációjukat Bradford esszével határoztuk meg. A 2 mg/mL koncentrációjúra beállított lizátumokat azonos térfogatú futtató pufferrel elegyítettük és elfőztük (99°C, 10 perc). Mintánként 20 µg fehérjét 8%-os SDS–poliakrilamid gélen választottunk szét, majd PVDF membránra blottoltunk. Az ER és Golgi jelenlétén kívüli lehetséges, szennyező organellemek azonosítását azokra specifikus antitestekkel végeztük.

3.9. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzésekhez Student'féle t-tesztet használtam a GraphPad Prism program segítségével. Azokat a változásokat tekintettem szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az IL-2/15 receptorok intracelluláris összeszerelődése

4.1.1. A kotranszfektált IL-2/15 receptor alegységek részleges kolokalizációt mutatnak az ER és a Golgi területén

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

A kolokalizáció mértéke a két csatornában készült kép zöld és vörös pixel intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs koefficiensek (C) meghatározásával fejezhető ki, melynél az elméleti maximum 1, ami azonos képekre, míg a 0-hoz közel eső érték a jelölt fehérjék egymástól független lokalizációjára utal. A pozitív kontrollként használt EGFP-mCherry fúziós fehérje, amelynél a zöld és a vörös csatornában lévő intenzitások homogén sárga színű átfedő képet eredményeznek, magas átlagos korrelációs koefficienssel rendelkeznek ($C=0,93$). A negatív kontrollnál, a többszörösen randomizált képek pixeleiből a kolokalizációs együttható értéke 0-nak adódott.

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

Az IL-2R α -EGFP és a β -C7-mCherry (az IL-2/15R β alegység C-terminálison rövidített verziója) esetében, az ER-ben és a Golgi-ban is magasabb korreláció volt mérhető ($C\approx 0,7$) és még magasabb a plazmamembránban ($C=0,83$). Az IL-15R α -EGFP és a β -C7-mCherry esetén hasonló tendenciát kaptam: részleges kolokalizáció az ER-ben és a Golgi-ban ($C=0,62$ és $0,67$) és nagyobb mértékű a plazma membránban ($C=0,83$).

Az EGFP-IL-2R α és az mCherry-IL-15R α alegységek közepes C értéket adtak az ER/Golgi területén (0,54 és 0,48) és igen magas értéket a plazmamembránban (0,89). A kotranszfektált γ_c -EGFP és γ_c -mCherry kolokalizációja az ER-ben és a Golgi-ban szintén részleges volt ($C=0,5$ és $0,68$). A γ_c lánc sejtfelszíni gyenge fluoreszcencia intenzitása nehezen elkülöníthető az autofluoreszcenciától, ezért ennél a fehérje-párnál csak az intracelluláris organellumok területén határoztam meg a korrelációs együtthatókat, a plazmamembránban nem.

4.1.2. A konfokális mikroszkópiás FRET mérések során alkalmazott kontrollok

Az IL-2/15 receptor alegységek molekuláris szintű intracelluláris összeszerelődését konfokális mikroszkópiás, intenzitás-alapú FRET mérésekkel vizsgáltam, organelum-specifikus módon.

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

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

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

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

4.1.3. Az IL-2/15R β lánc asszociál a γ_c alegységgel az ER-ben és a Golgi-ban

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

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

4.1.4. Az IL-2/15R β alegység részlegesen asszociál az IL-2R α -val és az IL-15R α -val a szekréciós útvonalon, mielőtt teljesen összeszerelődnek a sejtfelszínen

A későbbiekben az IL-2/15R β láncnak a citokin-specifikus IL-2R α -val és IL-15R α -val való kölcsönhatását vizsgáltam. Összehasonlítottam az N- és C-terminálison jelölt alegység-párokat és megvizsgáltam a β lánc rövidítésének és a harmadik alegység jelenlétének hatását. Az N-terminálison jelölt alegységek közötti FRET hatásfokok, EGFP-IL-2/15R β és mCherry-IL-2R α (5,5% \pm 1,3% az ER-ben, 5,0% \pm 1,7% a Golgi-ban) vagy mCherry-IL-15R α (6,9% \pm 2,4% az ER-ben, 6,2% \pm 2,3% a Golgi-ban) között szignifikánsan magasabbak voltak a negatív kontrollnál. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy mindkét α lánc legalább részlegesen asszociál a β láncsal, mielőtt kikerülne a sejtfelszínre. Alacsonyabb FRET értékeket kaptam a C-terminálison jelölt IL-2R α -EGFP és IL-2/15R β -mCherry esetén (4,3% \pm 1,1% - ER, 2,3% \pm

0,9% - Golgi, mint ugyanezen alegységek N-terminálison jelölt változatai között, ami valószínűleg a C-terminálisok közötti nagyobb távolságból fakad. Ezért megismételtem a FRET méréseket a rövid intracelluláris doménnel rendelkező β -C7-mCherry és IL-2R α -EGFP (5,0% \pm 1,7% - ER, 4,7% \pm 2,0% - Golgi) vagy IL-15R α -EGFP (4,9% \pm 1,6% - ER, 4,5% \pm 1,3% - Golgi) kotranszferkciókkal is. Ez magasabb FRET hatásfokokat eredményezett, mint amit a teljes hosszúságú β -láncsal kaptam. A β -C7-mCherry használatakor mind az IL-2R α -EGFP, mind az IL-15R α -EGFP esetén az alegységek erős sejtfelszíni expresszióját tapasztaltam és sokkal magasabb FRET hatásfokot sikerült elérni a plazmamembránban (21,6% \pm 5,4% az IL-2R α és 21,6% \pm 5,1% az IL-15R α esetén), mint az ER-ben vagy a Golgi-ban. A plazmamembránban mért magas energia transzfer arra utal, hogy ezen receptor alegységek teljes összeszerelődése csak a rendeltetési helyükön következik be, vagyis a szekréciós út során történő összeszerelődés részleges.

Annak kiderítésére, hogy vajon a γ_c alegység - mint a magas affinitású $\alpha\beta\gamma_c$ receptor heterotrimerek harmadik tagja - hatással van-e az α és β láncok kölcsönhatására, jelöletlen, fluoreszcens protein nélküli γ_c láncot stabilan kifejező HeLa- γ_c sejtvonalat használtam. A mérések eredménye szerint a γ_c alegység jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az IL-15R α és a β -C7 heterodimerek közötti kölcsönhatást.

4.1.5. Az IL-2R α és IL-15R α közös klaszterei

Intézetünkben korábban kimutatták, hogy az IL-2R α és az IL-15R α közös komplexben fejeződik ki a T sejteken, ami feltehetően a jelátvivő β és γ_c alegységek hatékony megosztásában játszik szerepet. Kíváncsiak voltunk, vajon a két α lánc már a trafficking során is asszociál-e egymással. Az N-terminálison EGFP-vel vagy mCherry-vel jelölt α láncok vizsgálata pozitív FRET hatásfokot eredményezett, ami intracelluláris heterodimerek kialakulására utal (ER: $E=4,8\% \pm 1,4\%$; Golgi: $3,8\% \pm 2,2\%$). A plazmamembránban magasabb energia transzfer ($E=9,5\% \pm 2,5\%$) volt mérhető, tehát a sejten belüli összeszerelődés feltehetően itt is részleges. Megvizsgáltam az IL-2/15R β alegység jelenlétének befolyását a két eltérő α lánc kölcsönhatására, fluoreszcens fehérje nélküli IL-2/15R β -t stabilan kifejező HeLa- β sejtvonalon megismételve a méréseket. Enyhe FRET hatásfok csökkenés volt tapasztalható mindkét sejtorganellum területén, ami kompetícióra enged következtetni a két α lánc kölcsönhatása és az IL-2/15R β alegységgel való heteroasszociációjuk között.

4.1.6. Sejtorganellumok átfedését vizsgáló kontroll mérések

A receptor alegységek vizsgálatakor méréseim az endoplazmatikus retikulum és a Golgi területére korlátozódtak, a receptorláncok elsődlegesen ezen intracelluláris organellumokban lokalizálódnak.

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

4.1.7. IL-2 jelátvitel az ATL sejtek Golgi apparátusában

Amennyiben a receptorok összeszerelődnek már a szintézisüket követően, elindíthatják a jelátvitelt felhasználva az endogén IL-2-t, mielőtt kijutnak a sejt felszínre. Felmerül a kérdés, hogy az ER-ben és a Golgi-ban részlegesen már összeszerelődött receptorok valóban képesek-e hatékony jelátvitelre. Ennek kiderítésére Golgi-t izoláltunk az ATL sejtvonalainkból és Western-blottal vizsgáltuk az IL-2 jelátvitelében szereplő fehérjék foszforilációját. A Jak1 a β lánchoz kötődik és foszforilálja azt, míg a Jak3 konstitutívan a γ_c alegységgel asszociál és azt foszforilálja. Sikerült kimutatni pJak1-et és pJak3-at, továbbá foszofotirozin sávot a γ_c lánc molekula tömege körül (65-70 kDa) az IL-2-t expresszáló ED/IL-2 sejtek Golgi frakciójában. Mindhárom foszforilált fehérje jele sokkal gyengébb volt az IL-2-t nem termelő, éheztetett (IL-2 megvonásnak alávetett) ED40515(+) vad típusú sejtek esetén. Az izolált Golgi frakciók GM130 (Golgi marker) pozitívak voltak, de calreticulint (ER-re jellemző fehérjét) is tartalmaztak. Az izolátumokban sem lizoszóma/késői endoszóma marker (LAMP1), sem recirkuláló endoszóma marker (Rab11), sem pedig plazmamembrán marker (a membránban különösen hosszú, >100 óra féléletidejű MDR1) nem volt detektálható.

4.2. A sejt felszíni MHC I – IL-2R fehérjeklaszterek részleges szétszerelődése

Munkám második részében a sejt felszíni MHC I-IL2R fehérjeklasztereket illetve azok részleges szétszerelődését vizsgáltam.

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

Az IL-2R, IL-15R, MHC I és MHC II molekulák szuperklasztereket alkotnak a Kit 225 FT7.10 T limfóma sejtek lipid tutajaiban. Az MHC I – mint az ezen klaszterek szerveződésében legerősebben kifejeződő tag – szerepének a kiderítésére elvégeztem az MHC I expressziójának géncsendesítését a könnyűláncra specifikus anti- β_2m siRNS-sel. Az MHC I jelentős sejt felszíni megjelenése miatt fontos volt a csendesítés hatékonyságának maximalizálása. Az MHC I membránbeli expressziója a növekvő siRNS koncentrációval párhuzamosan csökkent, a maximális hatást 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnál érte el, ahol az expressziós szint az eredeti 5-10%-ára esett vissza. A géncsendesítés specifikuságát bizonyítja, hogy a többi vizsgált fehérje (az IL-2R α , IL-15R α és MHC II) kifejeződésére nem volt hatással. A kontrollként használt irreleváns siRNS-ek (anti-GFP vagy anti-erbB1) nem eredményeztek változást sem az MHC molekulák, sem pedig az interleukin receptorok expressziójában.

4.2.2. Az MHC I/IL-2R α /IL-15R α klaszterek részleges szétszerelődése, az MHC I homo- és heteroasszociációk mértékének csökkenése

A molekuláris együttállásokat, azaz az MHC I és II glikoproteinek homo- és heteroasszociációit, illetve az IL-2R α és az IL-15R α heteroasszociációit sejtenként, áramlási citometriás Förster rezonancia energia transzfer (FRET) mérések segítségével vizsgáltuk. Negatív kontrollként a burkolt csapdákból elhelyezkedő transzferrin receptorok és a lipid tutajokban lokalizálódó GPI-horgonyozott CD48 fehérjék között mértünk energiatranszferet, ami $3\pm 1\%$ FRET hatásfokot eredményezett. Pozitív kontrollként az MHC I könnyű- és nehézlánc közötti kölcsönhatásból adódó, átlagosan $52\pm 1\%$ -nak mért FRET-et tekintettük, amely az MHC I géncsendesítés hatására $28\pm 1\%$ -ra csökkent. Ebben az esetben az energiatranszfer csak részben intramolekuláris: az aggregátumokat alkotó MHC I molekulák asszociálhatnak egymással, egyik molekula könnyűlánc kölcsönhatva egy másik molekula nehézláncával. Az MHC I nehézláncok homoklasztereit jellemző energiatranszfer értéke szignifikáns csökkenést mutatott az MHC I géncsendesítésének következtében: a nehézláncok között mérhető $35\pm 1\%$ -

os FRET hatásfok $11\pm 1\%$ -ra esett vissza. Ennél a FRET párnál az intakt MHC I nehézláncára specifikus, donor és akceptor festékekkel jelölt antitestet használtunk.

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

Az IL-15R α + IL-2R α heteroasszociáció jelentéktelen változása az MHC I géncsendesítés következtében arra utal, hogy az interleukin receptorok kapcsolatára az MHC I molekulákkal való kölcsönhatásuk nincs befolyással.

4.2.3. A FRET hatásfok függése a donor- és akceptor-jelölt fehérjék expressziós szintjétől

Megvizsgáltuk, hogyan függ az energiatranszfer hatásfoka a kölcsönható fehérjék expressziós szintjétől. A donorral jelölt fehérjék expressziója alapján a sejteket három (alacsony, közepes, magas donorintenzitású) csoportba soroltuk. A donorral jelölt IL-15R α és az IL-2R α heteroasszociációt az akceptorral jelölt MHC I-gyel jól megfigyelhető tendencia jellemzi, a FRET hatásfok növekszik az egyre emelkedő N_A/N_D molekularány függvényében, és gyorsabb telítődést mutat magasabb donor expresszió esetén.

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

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az IL-2/15 receptorok intracelluláris összeszerelődése

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

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

Az autokrin jelátvitel a kóros elváltozásokban is jelentős szerepet kap, hozzájárul a különböző tumorsejtek önállóságához, azok növekedési és túlélési funkcióit, valamint az inváziós képességüket támogatva. Ilyen például a főként fibroblasztok, gyulladásosejtek és tumorsejtek által – hipoxia esetén nagyobb mennyiségben – termelt (legjelentősebb angiogén citokin, a) VEGF (vaszkuláris endotél növekedési faktor), melynek autokrin jelátvitele invazív emlő karcinóma és vastagbél karcinóma sejteken a tumorsejtek túlélését hivatott fenntartani, de elősegíti azok migrációját is a CXCR4 kemokin receptor expressziójának indukciója által

(hozzájárulva így a tumor progresszióhoz). A folyamat szabályozásában az $\alpha 6\beta 4$ integrin is szerepet játszik.

ED/IL-2 sejtek izolált Golgi frakciójából Western-blottal sikerült kimutatni a pJak1 és pJak3 jelenlétét és egy foszfortirozin sávot a γ_c alegység molekula tömegének megfelelő magasságban. Az IL-2-t termelő sejtekben ezek szerint lejátszódik a jelátvitel, míg a ligandfüggő vad típusú sejtekről ugyanez nem mondható el. Utóbbi sejtek Golgi izolátumában ugyanis 48 órás IL-2 éhezést követően nem volt detektálható egyik vizsgált foszfoprotein sem. Ezen eredmények háttérében az állhat, hogy a hatékony ligand-receptor jelátvivő komplexek kialakulása már intracellulárisan megtörténik, mielőtt a receptorok elérik a plazmamembránt.

Az IL-2 termelődése és receptorához való intracelluláris kötődése, csökkentheti az ezen immunreakciókban résztvevő T sejtekre irányuló antitest terápia hatékonyságát, amelyek csak a plazmamembránban kifejeződő receptorokat érik el, de nem jutnak be az intracelluláris organellekbe.

Azon hipotézisünk tesztelése érdekében, hogy vajon a receptorok összeszerelődnek-e, mielőtt elérik a plazmamembránt, ezáltal megteremtve az intracelluláris jelátvitel lehetőségét, megvizsgáltam az IL-2 és -15 receptor alegységek közötti kölcsönhatásokat az ER-ben és a Golgi-ban. A mikroszkópos FRET egy jól kidolgozott módszer, mely molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára kitűnően alkalmazható. A korábbiakban, intézetünkben ezzel a technikával tanulmányozták pl. az IL-2/-9/-15 receptorok alegységei közötti asszociációkat is. Az általam használt fluoreszcens ER és Golgi markerek segítségével organellem-specifikus módon tudtam fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgálni élő sejtekben. Meg kell említeni, hogy a konfokális mikroszkóp laterális feloldása ~ 200 nm, míg axiálisan ~ 500 nm, ezért pl. egy ER markerre pozitívnak látszó terület a sejtben nemcsak az ER membránját és lumenét tartalmazza, hanem a szomszédos ciszterna közötti citoplazmatikus részt is.

FRET mérésekkel tanulmányoztam a fluoreszcens fehérjével jelölt IL-2/15 receptor alegységeket expresszáló HeLa sejtek páronkénti asszociációit a $\beta + \gamma_c$, a $\beta + IL-2R\alpha$ valamint a $\beta + IL-15R\alpha$ láncok között az ER-ben és a Golgi-ban. Sikerült kimutatni az IL-2R és IL-15R saját α láncainak kölcsönhatásait is ezekben az organellekben korábbi méréseinkkel összhangban, melyek azonban a T sejtek plazmamembránjára korlátozódtak. Ezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy szintézisüket követően a vizsgált receptor alegységek elkezdnek összeszerelődni, asszociálni egymással már a szekréción úton, ami akár általános jelenség is lehet különböző receptorok esetén. A negatív kontrollként használt, EGFP-IL-2R α és az mCherry-GPI között detektált nagyon alacsony FRET hatásfokok bizonyítják, hogy az

egymástól független fehérjék közötti véletlen kolokalizáció a jelölt IL receptorokéhoz hasonló expressziós szinten nem eredményez szignifikáns random FRET-et sem a plazmamembránban, sem az ER-ben.

A β és az α láncok közötti, illetve az IL-2R α és IL-15R α alegységek közötti kölcsönhatásokat jellemző FRET hatásfokok is alacsonyabbak voltak az ER-ben és a Golgi-ban, mint a plazmamembránban. Ilyen eltérés adódhat a következő szituációkból. Egyrészt, a receptor láncok konformációja a különböző sejtorganellumokban eltérő lehet, eltérő donor-akceptor távolságokat és így eltérő FRET hatásfokokat eredményezve. Másrészt, az ER-ben és a Golgi-ban egyidejűleg lehetnek jelen összeszerelődött receptor komplexek és monomerek, míg ez az egyensúly a plazmamembránban az összeszerelődött receptor komplexek nagyobb arányának irányába tolódhat. A koexpresszált receptor alegységek fluoreszcencia intenzitás eloszlásainak átfedő képei alapján a relatív koncentráció arányok eltérőek voltak az ER és a Golgi különböző régióiban. Az ER különböző részeiben elhelyezkedő riboszómákon való szintézisük után a receptor láncok elkezdenek összekeveredni az endomembrán rendszerben diffúzió révén, de láthatóan nem keverednek össze teljesen. Amellett, hogy vannak olyan területek, ahol mindkét fehérje hasonló koncentrációban van jelen, olyan régiók is előfordulnak ahol az egyik vagy a másik alegység dominál. Ezzel szemben, a plazmamembránban a receptor láncok összekeveredése (a néhány száz nanométeres skálán) tökéletesebb. A Pearson-féle korrelációs együttható értéke – mely a kolokalizációt méri ezzel a felbontással - magasabb volt a plazmamembránban, mint az ER-ben/Golgi-ban az összes vizsgált receptor alegység-pár esetén.

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

FRET eredményeink, az IL-2-indukált proliferáció antitest-mediált blokk hatástalansága a saját IL-2-t szintetizáló sejtekben, illetve az ugyanezen sejtekben kimutatott működő jelátvitel rávilágít egy új autokrin jelátviteli mechanizmusra, melyet az intracelluláris

IL-2 vált ki a szekréción úton összeszerelődött receptorokhoz való kötődés révén. Ez a mechanizmus klinikai jelentőséggel bír azon antitest terápiákban, melyek a plazmamembránban expresszáldó receptorokat veszik célba.

5.2. A sejtfelszíni MHC I – IL-2R fehérjeklaszterek részleges szétszerelődése

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

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

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

6. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

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/338/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Volkó, J.**, Kenesei, Á., Zhang, M., Várnai, P., Mocsár, G., Petrus, M. N., Jambrovics, K., Balajthy, Z., Müller, G., Dóczy-Bodnár, A., Tóth, K., Waldmann, T. A., Vámosi, G.: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2R[alfa] therapies.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116 (42), 21120-21130, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1901382116>
IF: 9.58 (2018)
2. Mocsár, G.*, **Volkó, J.***, Rönnlund, D., Widengren, J., Nagy, P., Szöllösi, J., Tóth, K., Goldman, C. K., Damjanovich, S., Waldmann, T. A., Dóczy-Bodnár, A., Vámosi, G.: MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells.
Biophys. J. 111 (1), 100-112, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.044>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 3.656





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,612

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

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

Debrecen, 2019.11.05.

