

OTKA Nyilvántartási szám: T042618

Témavezető neve: **Dr. Damjanovich Sándor**

A téma címe: **Sejtfelszíni receptor minták mint lehetséges diagnosztikai eszközök**

A kutatás időtartama: **2003-2006.**

A jelen OTKA támogatással megvalósított kutatási program középpontjában a T sejtes immunválasz kiváltásában és szabályozásában szerepet játszó sejtfelszíni fehérjék (pl. IL-2/IL-15R rendszer, Kv1.3 kálium-csatorna, MHC glikoproteinek stb.) működésében szerepet játszó fehérje-fehérje kölcsönhatások felderítése állt, amelyet a szerveződés különböző szintjein vizsgáltunk: a több alegységből álló molekulák egyes alegységei közötti kölcsönhatásoktól kezdve a nm-es és μ m-es léptékű doménekbe szerveződésig. Feltételezésünk szerint a kialakuló mintázatok alapvető szerepet töltenek be a jelátvitel egyes lépéseinek szervezésében s így egyrészt alapvetően befolyásolják a sejtek fiziológiás működését, másrésztől potenciális célpontjai lehetnek az immunszuppressziós és a daganat-ellenes terápiáknak. Vizsgálataink során ezen problémákat főként – de nem kizárólagosan – különféle, a sejtfelszíni fehérjék kölcsönhatásainak illetve mozgásának vizsgálatára alkalmas biofizikai módszerekkel (fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET), konfokális mikroszkópia, fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia stb.) közelítettük meg.

I. Interleukin-2 és -15 receptorok alegységeinek szerveződése humán T limfóma/leukémia sejtek plazmamembránjában

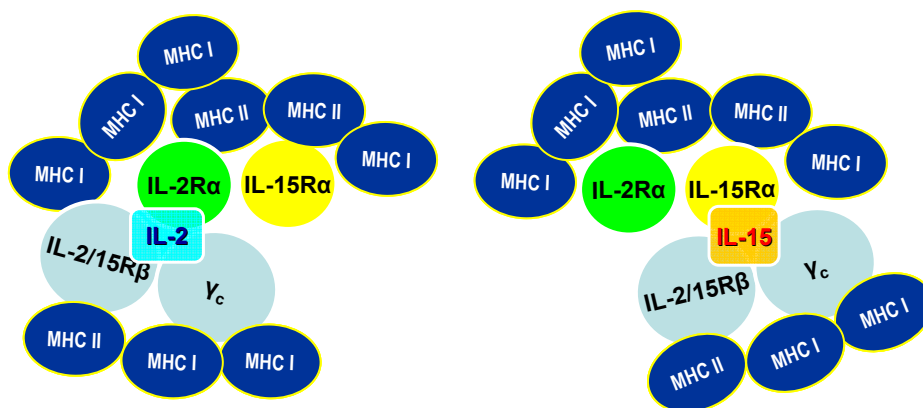
Az IL-2 és IL-15 citokinek fontos szerepet játszanak a T limfociták funkciójának és homeosztázisának szabályozásában. Receptoraik felépítésében három alegység vehet részt: a jeleátvitelért felelős, mindkét receptor által használt β és γ_c lánc, valamint az adott citokinre specifikus α alegység. Az azonos receptor alegységek és a közösen használt jelátviteli mechanizmusok ellenére a két citokin hatásspektruma csak részben fed át, a kiváltott sejtválasz akár teljesen ellentétes is lehet. Vizsgálataink célja az IL-2R és IL-15R alegységek sejtfelszíni eloszlásának és kölcsönhatásainak feltérképezése, a receptorok összeszerelődésének és végső soron az IL-2/IL-15 receptor-rendszerek jelátviteli folyamatainak, a két citokin közös és eltérő hatásainak hátterében álló ok-okozati összefüggéseknek a megértése.

Eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

- (1) Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérésekkel kimutattuk, hogy a vizsgált Kit225 FT7.10 humán T limfóma eredetű sejtek plazmamembránjában a magas affinitású IL-15R komplex (IL-15R $\alpha\beta\gamma_c$) előre összeszerelt állapotban van jelen. Korábban hasonló eredményt kaptunk az IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ heterotrimerre vonatkozóan.
- (2) Konfokális mikroszkópiás méréseink alapján az FT7.10 sejteken az IL-15R α és az IL-2R α közös membrán doménekben (ún. lipid tutajokban, koleszterinben és szfingolipidekben gazdag membrán mikrodomének) helyezkedik el. FRET mérésekkel igazoltuk a két alegység molekuláris szintű együttállását is. Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) alkalmazásával megállapítottuk, hogy a két α alegység asszociációja stabil. Keresztkorrelációs méréseink a módszer első alkalmazását jelentik a membránfehérjék hetero-asszociációjának kimutatására.
- (3) Korábban kimutattuk a heterotrimer IL-2R komplex és az MHC glikoproteinek asszociációját különböző humán, T limfóma eredetű sejteken. Az FT7.10 sejten végzett méréseink feltárták az IL-15R α és az MHC molekulák közvetlen molekuláris közelségét/asszociációját is, amely – hasonlóan az IL-2R/MHC együttálláshoz – a lipid tutajokban valósul meg. Mindezek (és korábbi adatok) alapján

feltételezzük, hogy az IL-2/IL-15R és az MHC glikoproteinek (az ICAM-1 adhéziós molekulával egyetemben) fehérje „szuperklasztereket” alkotnak a T sejtek lipid tutajaiban.

- (4) Eredményeinket a korábbi adatokkal összevetve az IL-2/IL-15 receptor rendszer a következőképpen modellezhető: az egyes receptor alegységek eleve egymás molekuláris közelségében helyezkednek el („tetramer” struktúra). IL-2 vagy IL-15 hatására átrendeződik a tetramer komplex szerkezete: kialakul a megfelelő magas affinitású heterotrimer ($\alpha\beta\gamma_c$) receptorkomplex, míg az éppen nem használt α lánc eltávolodik a citokin-receptor kölcsönhatás helyétől. A viszonylag alacsony expressziójú β és γ_c alegységek megosztása a két receptorkomplex között így sokkal hatékonyabb és gazdaságosabb. A receptor alegységek közös lipid doménekben történő kompartmentalizációja elősegíti a heterotetramer komplex megfelelő konformációjának kialakítását.



1. ábra: Az IL-2/15R rendszer és az MHC glikoproteinek által kialakított szuperklaszterek modellje

- (5) RNS interferenciás kísérletekkel tanulmányoztuk az MHC I szerepét a fenti szuperklaszterekben. Az MHC I expresszió RNS interferenciával történő leszabályozása az IL-2R α és IL-15R α közti kölcsönhatást gyengítette (miközben a két alegység expressziós szintje nem változott), amiből arra következtetünk, hogy az MHC I központi szervező szerepet tölthet be a klaszterek kialakításában, stabilitásában.
- (6) FRET mérésekkel kimutattuk mind az IL-15R α , mind az IL-2R α homoasszociációját a vizsgált FT7.10 sejteken. Egyre több bizonyíték utal a $\beta\gamma_c$ heterodimertől független, az IL-15 és az IL-15R α kölcsönhatása által kiváltott jelátviteli útvonalak létezésére, amelyek – más növekedési faktorhoz hasonlóan – a receptorok homodimerizációját/oligomerizációját fontos szerepet játszhat.
- (7) Amerikai kollaborációs partnerünk laboratóriumában felfedeztek egy eddig nem ismert, Kit225 K6 humán T sejteken az IL-2R α alegységével asszociálódó fehérjét (ILRAP: interleukin receptorral asszociált protein), amely feltételezéseink szerint szerepet játszhat az IL-2R jelátvitel szabályozásában. FRET és konfokális mikroszkópiás mérésekkel kimutattuk az ILRAP és az IL-2R α együttállását, valamint az MHC glikoproteinekkel való kolokalizációját több más humán T limfóma eredetű sejten is. Ugyanakkor az ILRAP nincs molekuláris közelségben a β és γ_c alegységekkel. Kimutattuk, hogy az IL-2/IL-15R rendszer elemeihez hasonlóan az ILRAP legnagyobb részben lipid tutajokban helyezkedik el. Mindezek alapján feltehető, hogy az ILRAP szintén az IL-15/IL-2R rendszer és az MHC glikoproteinek által kialakított receptor "szuperklaszterek" egyik komponense. Az ILRAP-pel való kölcsönhatás további vizsgálata olyan jelátviteli útvonalak felfedezéséhez vezethet,

OTKA Nyilvántartási szám: T042618

melyek függetlenek a közös β/γ_c alegységektől és/vagy az ILRAP-pel való különböző kölcsönhatás révén megmagyarázhatják a két citokin által kiváltott sejtválaszok különbözőségét.

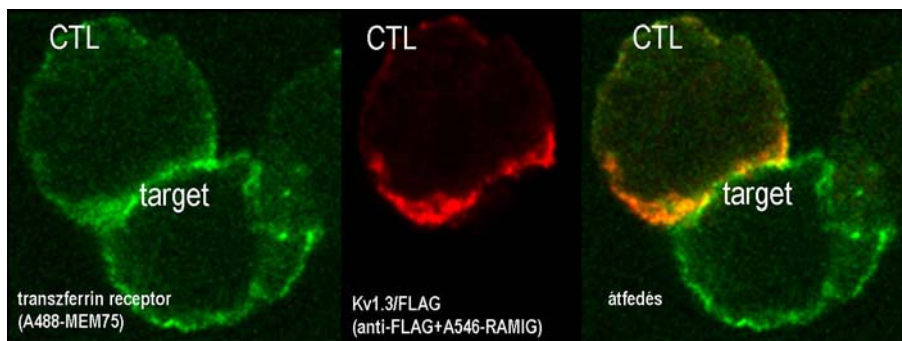
II. Kv1.3 csatornák és az immunológiai szinapszis kapcsolata

A T limfociták domináns, feszültség vezérelt K^+ csatornája, a Kv1.3 fontos szerepet tölt be a T sejt immunválasz kialakulásában. A T limfociták aktivációja során a Kv1.3 expressziós szintje sokszorosára emelkedik, mely a proliferációhoz elengedhetetlen negatív membránpotenciál kialakulását eredményezi. Következésképp e csatornák funkciójában bekövetkező változások befolyásolhatják a hatékony immunválasz kialakulását.

A Kv1.3 csatornák lokalizációját a T sejtek plazma membránjában FLAG epitópot kódoló Kv1.3 csatorna gén alkalmazásával térképeztük fel. A FLAG epitóp klónozása a csatorna-génbe lehetővé tette az expresszált csatornák antitestekkel történő specifikus jelölését.

Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

- (1) A Kv1.3 membránbeli eloszlását kolloidális arannyal konjugált antitestek alkalmazását követően készített elektronmikroszkópos képek analízisével határoztuk meg. Eredményeink szerint a csatornák eloszlása a vizsgált Jurkat sejtek membránjában nem véletlenszerű, hanem karakterisztikus mintázatot mutat. Konfokális mikroszkópiás vizsgálataink alapján a fluoreszcencián jelölt Kv1.3/FLAG és a T sejt receptor integráns részét képező CD3 átfedő membrán-doménekből (lipid tutajokban), mégpedig – FRET méréseik alapján – egymás közvetlen molekuláris közelségében (2-10 nm) helyezkednek el.
- (2) A Kv1.3 lokalizációját a citotikus T limfociták (CTL) és a target sejtek közötti interakció során is megvizsgáltuk. Az allogén aktivált CTL-k ioncsatornáinak biofizikai és farmakológiai karakterizálása alapján megállapítottuk, hogy ezen sejtek nagy mennyiségben fejeznek ki Kv1.3 csatornákat (kb 1500 csatorna/sejt) a nyugvó, CD8⁺ citotikus sejtekhez képest (500-800 csatorna/sejt). Ennek megfelelően a Kv1.3/FLAG transzfekciója az allogén aktivált CTL-be a natív (nem transzfektált) sejtekben is megtalálható csatornák bevitelét jelentette.
- (3) Vizsgálataink alapján a Kv1.3 a CTL-eken is a CD3 molekulákkal átfedő membrán doménekből helyezkedik el. FRET méréseink szerint a két molekula igen szoros kapcsolatban, molekuláris közelségben (1-10 nm) áll egymással a kontaktust nem képező CTL-eken. A CD3 és a Kv1.3/FLAG közötti FRET hatásfok a szinapszist képező sejteken csökken, ami a Kv1.3 és a TCR/CD3 egymáshoz képest történő átrendeződését jelenti az IS kialakítása során.



2. ábra: A Kv1.3/FLAG polarizált expressziója CTL-target sejt kölcsönhatása során (konfokális mikroszkópos felvétel)

OTKA Nyilvántartási szám: T042618

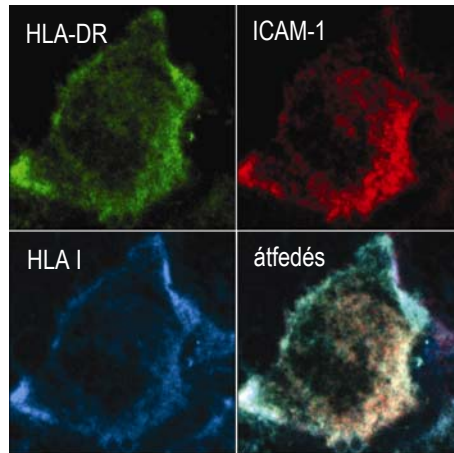
- (4) Eredményeink szerint a CTL–target sejt kölcsönhatás során a CTL-k Kv1.3 csatornai polarizált expressziót mutatnak: az esetek egy részében a két sejt közötti immunológiai szinapszisban (IS) halmozódnak fel, más esetekben azt övszerűen veszik körül. A kétfajta elrendeződés nagyon hasonlít az IS-t kialakító egyéb molekuláknak az IS érése során tapasztalt dinamikus átrendeződésére. A Kv1.3 dinamikus átrendeződésére azok lipid tutaj asszociációja adhat lehetőséget, melyet a Kv1.3/FLAG és a GM1 gangliozid (lipid tutaj marker) kolokalizációjának konfokális mikroszkópiás is altámasztott.
- (5) Kombinált elektrofiziológiai és fluoreszcenciás mérések alkalmazásával kimutattuk a Kv1.3 és a HLA-DR molekulák molekuláris közelségét.

III. Az MHC glikoproteinek és az ICAM-1 „konzervatív” asszociációs mintázatainak vizsgálata

A hatékony T sejt immunválasz a célsejttel kialakított kontakt régió (immunológiai szinapszis, IS) elemeinek gondosan szervezett, ugyanakkor dinamikus elrendeződését feltételezi mind az antigén prezentáló, mind pedig a T sejt részéről. Hipotézisünk szerint a releváns molekulák sejtfelszíni szerveződése már eleve nem teljesen véletlenszerű, hanem egyfajta, a kontakt régió kialakulását megkönnyítő rendezettséget mutat, ami az egyes fehérjék közvetlen molekuláris közelségét, fizikai asszociációját is jelentheti. Korábban többféle sejtípus esetén kimutattuk az antigén prezentáció folyamatában fontos szerepet betöltő molekulák (MHC I, MHC II, ICAM-1 stb.) közreműködésével kialakult komplex fehérjecsoportosulások (homo- és hetero-asszociációk) létezését. Jelen támogatás segítségével folytattuk ezen „konzervatív” asszociációs mintázatok vizsgálatát illetve vizsgáltuk funkcionális jelentőségüket.

Főbb eredményeink:

- (1) Áramlási citometriás illetve pásztázó közeli mező mikroszkópiás méréseink szerint a szabad ($\beta 2m$ -t nem kötő) MHC I nehézláncok és az intakt MHC I heterodimerek, legalábbis részben, azonos fehérjemintázatok kialakításában vesznek részt a JY humán B limfoblaszt sejtek felszínén. FRET méréseink alapján a sejtfelszínen elérhető $\beta 2$ -mikroglobulin szint – feltehetően a nehézlánc különböző megjelenési formái közötti egyensúly módosításán keresztül – fontos szerepet tölt be az MHC I oligomerizáció mértékének szabályozásában. Allospecifikus citotoxikus T limfociták alkalmazásával kimutattuk, hogy az antigén prezentáló sejt felszínén elérhető $\beta 2m$ szint – feltehetően az MHC I oligomerizáció mértékének módosításán keresztül – fontos szerepet tölt be a T sejt aktiváció illetve effektor funkció hatékonyságának szabályozásában is.
- (2) Az OCM-1 és OCM-3 humán uveális melanóma sejteken FRET és konfokális mikroszkópia alkalmazásával kimutattuk, hogy a HLA I, HLA DR és az ICAM-1 molekulák nagyrészt közös membrán-doménekből helyezkednek el, ahol hasonló fehérje-mintázatok (homo- és hetero-asszociációk) alakítanak ki, mint amelyeket korábban limfoid és kolorektális carcinóma sejteken tártunk fel. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk a fenti fehérjék és a GM1 gangliozid valamint a CD59 GPI-horgonyzott fehérje kolokalizációját, ami arra utal, hogy a vizsgált sejteken a HLA I, HLA-DR és ICAM-1 molekulák lipid tutajokban (koleszterinben és szfingolipidekben gazdag membrán mikrodoménekből) dúsulnak fel. A sejtek IFN-gammával történő kezelése jelentősen megnövelte a vizsgált fehérjék expressziós szintjét és átrendezte az általuk kialakított asszociációs motívumokat, ami feltételezésünk szerint befolyásolhatja az adaptív immunválasz hatékonyságát.



3. ábra: A HLA-DR, HLA I és ICAM-1 kolokalizációja OCM-3 humán uveális melanóma sejteken. A sejteket Cy2-L243 (HLA-DR), TAMRAX-MEM111 (ICAM-1) és Cy5-W6/32 (MHC I) monoklonális antitestekkel jelöltük meg. (konfokális mikroszkópos felvétel)

- (3) Korábban az LS-174T kolorektális karcinóma eredetű sejteken kimutattuk, hogy IFN- γ hatására mind az MHC I, mind az ICAM-1 sejt felszíni expressziója/denzitása s ezzel összhangban az MHC I/ICAM-1 heteroasszociáció mértéke növekszik. Ugyanakkor az MHC I homoasszociáció mértékét az IFN- γ kezelés jelentősen csökkentette. Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MHC I oligomerizáció mértékének csökkenése a megnövekedett ICAM-1 expresszió közvetlen hatása-e vagy indirekt módon az IFN- γ által kiváltott különböző transzkripciós események okozzák. ICAM-1 specifikus siRNS transzfekciója és IFN- γ kezelés kombinációjával magas MHC I expressziójú, ugyanakkor az ICAM-1-et különböző mértékben kifejező sejteket hoztunk létre és vizsgáltuk az ICAM-1 expresszió és az MHC I homoasszociáció mértéke közötti kapcsolatot. Eredményeink szerint az ICAM-1 szint csökkenése növelte az MHC I homoasszociáció mértékét (negatív korreláció), ami azt bizonyítja, hogy az ICAM-1 közvetlenül befolyásolja az MHC I klasztereket és alátámasztja korábbi modellünket, miszerint az ICAM-1 kompetál az MHC I homoasszociációval. Az MHC I és ICAM-1 klasztereit és doménszintű elrendeződését e két fehérje relatív expressziós szintje dinamikus módon szabályozza. Hipotézisünk szerint, ez a jelenség általános, azaz egy fehérjeklaszter bármely komponensének megváltozott expressziója a fehérjecsoportosulás egészének összetételére és elrendeződésére hatással lehet (végsősoron a sejt fenotípusát is megváltoztathatja), ami fontos funkcionális következményekkel járhat.

IV. Colorectalis carcinómában szenvedő betegek draining lymph node-jaiból származó T limfocitáinak sejt felszíni receptormintázata

A korábban - főként tumor eredetű vagy egyéb immortalizált limfocita sejtvonalakon - talált sejt felszíni receptor mintázatok számos esetben konzervatív motívumokat tartalmaznak. Ezekben az asszociációs motívumokban meglévő hasonlóságok vagy eltérések a sejtek közvetlen múltjáról tartalmaznak információkat, így diagnosztikai jelentőséggel bírhatnak, illetve mivel gyakran a jelátvitelben fontos szerepet betöltő receptorokról van szó, befolyásolhatják a sejtek közvetlen jövőjét, válaszkészségét, s ezáltal a betegség prognózisát is érinthetik. Az MHC I glikoproteinek és az IL-2/15R rendszer kolokalizációját több limfoid sejtvonalon kimutattuk (ld. I. alpont). Jelen vizsgálatainkban kolorektális karcinóma páciensek műtéti anyagából draining lymph node-okat preparáltunk, melyekből T sejteket izoláltunk. Célunk ezen T sejteken

OTKA Nyilvántartási szám: T042618

a korábban feltérképezett fehérje-fehérje kölcsönhatások kontroll limfocitákkal történő összehasonlító vizsgálata. Első vizsgálataink az IL-2 és IL-15 receptorra, illetve az MHC I glikoproteinekre irányultak. Konfokális mikroszkópos vizsgálataink kimutatták az MHC I és a két IL receptor α -alegységének doménszintű kolokalizációját mind CD4+, mind pedig CD8+ T limfocitákon. FRET méréseink szerint – hasonlóan a limfoid sejtvonalakon kapott eredményekhez – ezen fehérjék egymás molekuláris közelségében helyezkednek el. Eddigi eredményeink alapján ezen motívumok eltérőek lehetnek a kontroll ill. a betegek nyirokcsomójából izolált T sejteken. További kísérleteinkben a CD44 és ICAM-1 fehérjék kölcsönhatásait tanulmányozzuk, melyek a sejtek aktivációjában, metasztatizáló hajlamában fontos szerepet töltenek be.

V. FRET méréseket elősegítő fejlesztések

A sejtfelszíni fehérjék közvetlen molekuláris kölcsönhatásainak feltérképezésére alkalmasak a FRET határfokának mérésén alapuló áramlási citometriás illetve fluoreszcencia mikroszkópiás technikák. A pályázati támogatás segítségével újabb FRET mérési eljárást dolgoztunk ki illetve a FRET vizsgálatok kiértékelésére szolgáló analízáló szoftvereket fejlesztettünk ki.

- (1) A FRET határfokot konvencionálisan két, spektrálisan különböző fluorofór között detektáljuk (heteroFRET). Megfelelő spektrálid sajátosságokkal rendelkező fluorofór esetén a FRET azonos festékek között is detektálható (homoFRET). A homoFRET előnye, hogy csak egyféle festékre van szükség és lehetőséget ad a membránfehérje dimerek illetve oligomerek megkülönböztetésére. Munkánk során a homoFRET módszert adaptáltuk áramlási citomérré. A FRET hatékonyságot fluoreszcencia polarizáció mérésekkel határoztuk meg. Korábban heteroFRET mérésekkel kimutattuk az IL-2R α , az MHC I és MHC II glikoproteinek páronkénti együttállását. Jelen homoFRET vizsgálataink pedig feltárták, hogy ezek a kölcsönhatások azonos fehérjeklaszteren belül valósulnak meg, azaz a molekulák legalább heterotrimerek formájában vannak jelen a K₅₆₂ humán T limfóma sejteken.
- (2) Az áramlási citométerrel végzett FRET mérések lehetőséget adnak a sejtfelszíni fehérjék asszociációjának, molekuláris közelségének sejtenként, ugyanakkor nagy sejtpopulációkon történő meghatározására. A nagy mennyiségű adat és a viszonylag bonyolult számítások miatt a FRET analízis a kereskedelemben elérhető analízáló programokkal nem vagy csak nagyon körülményesen oldható meg, ezért kifejlesztettünk egy Windows-alapú programot, amely ezen speciális feltételeknek megfelel.
- (3) A FRET hatékonyság sejten belüli térbeli eloszlásának feltárására a fluoreszcens mikroszkópiás FRET vizsgálatok használhatók. A pbFRET módszer a donor fotohalványítási kinetikájának vizsgálatán alapszik, ui. a donor gerjesztett állapotban bekövetkező és fluoreszcenciájának időbeli csökkenését okozó irreverzibilis fotokémiai átalakulás (photobleaching) sebessége FRET hatására csökken. A mérés során a mintákat a donor gerjesztésének megfelelő hullámhosszúságú fényvel világítjuk meg és a donor fluoreszcencia intenzitását időről-időre digitális felvételeken rögzítjük. A képszekvenciák analízisével kapjuk meg a fotohalványodási időállandó értékeket akár képpontonként. A donor fotohalványítási időállandóját akceptor jelenlétében illetve anélkül megmérve, meghatározható a FRET határfok. Munkánk során kifejlesztettünk egy szoftver csomagot a fotohalványodási képsorozatok értékeléséhez, melynek segítségével leegyszerűsödik a nyert adatok feldolgozása és az eredmények interpretálása.

OTKA Nyilvántartási szám: T042618

A közleményjegyzékben a 2003-2005 közötti publikációknál a megjelenés éve szerinti, a 2006-os közleményeknél pedig (2006-os lista hiányában) a 2005-ös impakt faktorok lettek feltüntetve.