

## Az interleukin-15 receptor molekuláris kölcsönhatásainak vizsgálata humán T sejteken

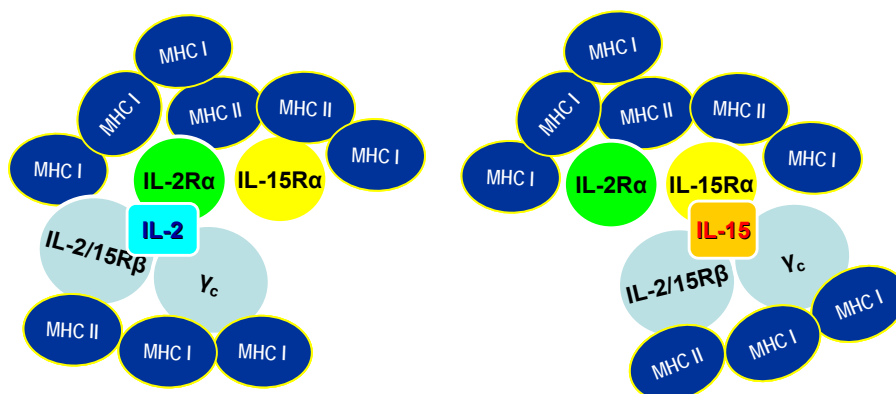
Az interleukin-15 (IL-15) és interleukin-2 (IL-2) citokinek fontos szerepet játszanak a T sejtek funkciójának és homeosztázisának szabályozásában. Receptoraik felépítésében három alegység vehet részt: a jelátvitelért felelős, mindkét receptor által használt  $\beta$  és  $\gamma_c$  lánc, valamint az adott citokinre specifikus  $\alpha$  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.

Korábbi vizsgálataink számos információt szolgáltattak az IL-2R összeszerelődésére és laterális szerveződésére, sejtfelszíni lokalizációjára vonatkozóan. Jelen pályázat keretében az IL-15R komplex összeszerelődését, sejtfelszíni elrendeződését, az IL-2R-ral és más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásait tanulmányoztuk humán T sejtek felszínén, főként –de nem kizárólagosan– a membránfehérjék molekuláris kölcsönhatásainak illetve domén-szintű elrendeződésének vizsgálatára alkalmas biofizikai módszerekkel.

### Eredmények:

➤ 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 a heterotrimer IL-2R-ra vonatkozóan. Konfokális mikroszkópiás méréseink alapján az FT7.10 sejteken az IL-15R $\alpha$  és az IL-2R $\alpha$  közös membrán doménekben (ún. lipid tutajokban) helyezkedik el. FRET mérésekkel igazoltuk a két alegység molekuláris szintű együttállását. Az egyedi molekulák kimutatására alkalmas FCCS módszerrel (fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópa) igazoltuk az  $\alpha$ -láncok együttes laterális diffúzióját, ami asszociációjuk stabil voltára utal (legalábbis a néhány 10 ms-os időskálán).

Eredményeinket a korábbiakkal összevetve az IL-2/15R rendszer a következőképp modellezhető: az alegységek citokinek nélkül is egymás molekuláris közelségében helyezkednek el („tetramer” struktúra). FRET méréseink alapján az IL-2 ill. IL-15 átrendezi ezt a heterotetramert: kialakul a megfelelő magas affinitású receptor (IL-XR $\alpha\beta\gamma_c$ ), a nem használt  $\alpha$  lánc pedig távolabb kerül. Az alegységek közös lipid doménekben történő kompartmentalizációja elősegíti a heterotetramer megfelelő konformációjának kialakítását. A relatíve alacsony expressziójú  $\beta$  és  $\gamma_c$  alegységek megosztása a két receptor között így sokkal hatékonyabb.



Az IL-2/15R és MHC fehérjék részvételével kialakuló „szuperklaszterek” lehetséges modellje

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 $\alpha$  és az MHC molekulák közvetlen molekuláris közelségét/asszociációját is, amely –hasonlóan az IL-2R/MHC együttálláshoz– 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.

FRET mérésekkel kimutattuk mind az IL-15R $\alpha$ , mind az IL-2R $\alpha$  homoasszociációját a vizsgált FT7.10 sejteken. Egyre több bizonyíték utal a  $\beta\gamma_c$  heterodimertől független, az IL-15 és az IL-15R $\alpha$  kölcsönhatása által kiváltott jelátviteli útvonalak létezésére, amelyekben –más növekedési faktorhoz hasonlóan– a receptorok homodimerizációja (oligomerizációja) fontos szerepet játszhat. (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11082-11087)

➤ Míg konfokális mikroszkópiával a fehérjék laterális elrendeződése és kolokalizációja a néhány 100 nm-es mérettartományban tanulmányozható, a holland kollaborációs partnereinknél rendelkezésre álló egyedi molekula érzékenységu NSOM (közeli mező optikai mikroszkópia) módszer betekintést enged a domének belső szerkezetébe. NSOM méréseink feltárták, hogy az IL-2R $\alpha$  és az IL-15R $\alpha$  a nagyméretű (pl. CLSM-mel feltárható, néhány 100 nm-es) domének mellett kisméretű, csak néhány molekulából álló klaszterekben (vagy akár egyedi molekulaként) is megtalálható a Kit225 FT7.10 T limfóma sejteken. Az IL-2R $\alpha$ -nak csak kis hányada található a nagyméretű doménekön kívül, az IL-15R $\alpha$  esetén ez a hányad ~30 %. Az IL-2R $\alpha$  és IL-15R $\alpha$  domének mérete nagyon hasonlóan (átlagos átmérő: ~ 450 ill. ~ 360 nm) adódott. Az NSOM mérések megerősítették a két  $\alpha$ -lánc kolokalizációjára vonatkozó eredményeket. A domének denzitását (fehérje/területegység) a domének mérete nem befolyásolta számottevően, ami arra utalhat, hogy az egyes domének hasonló összetételű építőelemekből épülnek fel, amelyek lehetnek pl. a korábbi FRET és CLSM adataink alapján valószínűsített, az IL-2/IL-15R rendszer és az MHC glikoproteinek által kialakított „szuperklaszterek”. (*J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 5): 627-633)

➤ RNS interferenciával tanulmányoztuk az MHC I szerepét az IL-2/15R és az MHC glikoproteinek által kialakított szuperklaszterekben. Az MHC I expresszió leszályozása nem befolyásolta az  $\alpha$ -láncok expresszióját, ugyanakkor gyengült a kétféle  $\alpha$  alegység kölcsönhatása. Az  $\alpha$ -láncok és az MHC I kölcsönhatása szintén gyengült. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiás vizsgálataink alapján a csökkentett (leszályozott) MHC I expressziójú sejteken mind az MHC I, mind pedig az  $\alpha$  alegységek mobilitása megnövekedett, ami a klaszterek méretének csökkenésére és/vagy a komponensek közötti kölcsönhatások gyengülésére utal. Eredményeink az MHC I központi, organizáló szerepére utalnak az IL-15/IL-2 receptorok klasztereinek kialakításában.

➤ Amerikai kollaborációs partnereink felfedeztek egy a Kit225 K6 T sejteken az IL-2R $\alpha$ -val asszociálódó fehérjét (ILRAP). Az ILRAP és az IL-2R $\alpha$  kolokalizációját, az MHC glikoproteinnel való asszociációját és lipid raft lokalizációját több humán T limfóma sejten is feltártuk. Feltételezzük, hogy az ILRAP szintén a fent említett "szuperklaszterek" egyik komponense. Az ILRAP-pel való kölcsönhatás vizsgálata olyan jelátviteli útvonalak felfedezéséhez vezethet, melyek függetlenek a közös  $\beta\gamma_c$  heterodimertől és/vagy az ILRAP-pel való különböző kölcsönhatás révén megmagyarázhatják a két citokin által kiváltott sejt válaszok különbözőségét.

➤ A citoszkeleton fehérjeklaszterek kialakításában betöltött szerepét membránblebeken tanulmányoztuk. A blebek kialakulása során a plazmamembrán és a citoszkeleton közötti kapcsolat gyengül, nagyméretű blebek esetén gyakorlatilag megszűnik. FRET módszerrel vizsgáltuk az IL-15R $\alpha$ , az IL-2R $\alpha$  és az MHC glikoproteinek közötti asszociációkat FT7.10 sejtek membránblebjein. Eredményeink szerint a blebeken a FRET hatások nem változik jelentősen az ép membránban mért értékekhez képest, ami arra utal, hogy a fenti fehérjék kisméretű klaszterei nem függenek kritikus módon a citoszkeletontól, azaz kialakításukban elsősorban a komponensek közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások vesznek részt. A blebekben a vizsgált molekulák mobilitása magasabb volt, ami feltehetően a citoszkeletonális kapcsolatok megszűnésével magyarázható. Emellett membránblebeken megszűnik az ép membránokban megfigyelhető, a mikrodoménes szerkezetre jellemző foltos lipid- és fehérjeeloszlás (200 nm-es feloldáson homogénnek tekinthető). Ez arra utal, hogy magasabb hierarchikus szinten csökken a fehérjék kolokalizációja, csökken ezen klaszterek mérete, ami szintén okozhatja a nagyobb mobilitást.

➤ Sejtvonalak mellett klinikai mintákból származó sejteken is megvizsgáltuk az IL-15/IL-2R sejtfelszíni szerveződését, kölcsönhatásait. Kolorektális karcinómában szenvedő betegek tumor környéki nyirokcsomóiból származó CD4<sup>+</sup> T sejtek felszínén található receptor mintázatokat hasonlítottuk össze a betegek perifériás véréből izolált sejtek mintázataival. Kontrollként egészséges donorok perifériás sejtjeit használtuk. Mindegyik esetben azonosítottuk az IL-2/15R és az MHC glikoproteinek szupramolekuláris klasztereit konfokális mikroszkópiával. FRET méréseink alapján az előbb felsorolt fehérjék és az ICAM-1 egymás molekuláris közelségében helyezkedik el. A tumor környéki nyirokcsomókból származó sejteken a fehérjék expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt és a molekuláris kölcsönhatások – különösen az IL-2/15R és az MHC viszonylatában – gyengültek a kontrollhoz képest. Eredményeink alapján a sejtet érő külső stimulusok és a szöveti környezet átrendezheti a fehérjemintázatokat akár egyazon páciens különböző helyről származó, azonos típusú sejtjein, ami befolyásolhatja a sejtműködést és a sejtorsót. (*Biochem Biophys Res Commun.* 2007, 361: 202-207)

Eltérések az eredeti kutatási tervtől:

#### I. pbFRET analízáló szoftver fejlesztése

Az áramlási citometriás FRET módszerrel a membránfehérjék eloszlása, kölcsönhatása rövid idő alatt nagyszámú sejten vizsgálható, viszont nem képes a sejten belüli heterogenitások feltárására. 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 –a donor fluoreszcencia időbeli csökkenését, elhalványodását okozó– irreverzibilis fotokémiai átalakulásának (photobleaching) sebessége FRET hatására lecsökken. A mérés során a mintákat a donor gerjesztésének megfelelő hullámhosszúságú fényel világítjuk meg és időről-időre digitális felvételeket készítünk, melyeken rögzítjük a donor fluoreszcencia intenzitását. A képszekvenciák analízisával kapjuk meg a fotohalványodási időállandó értékeket akár képpontonként. A donor fotohalványítási időállandóját akceptor jelenlétében illetve anélkül megmérve, meghatározható a FRET hatások. Munkánk során kifejlesztettünk egy szoftver csomagot a fotohalványodási képsorozatok értékeléséhez, melynek segítségével leegyszerűsödik a nyert adatok feldolgozása és az eredmények interpretálása. Bár a kutatási tervben nem szerepelt pbFRET

analizáló szoftver kifejlesztése, ez a fejlesztés elősegíti a FRET mérések analizálását így hozzájárul a kutatási tervben felvázolt feladatok megvalósításához. (*Cytometry A*, 2005, 67: 119-128)

## II. IL-15 transz-prezentáció vizsgálata

Kollaborációs partnereink kimutatták, hogy az IL-15-t nagy affinitással kötő IL-15R $\alpha$  a megkötött IL-15-t prezentálhatja egy másik sejten lévő közepes affinitású  $\beta\gamma_c$ -heterodimernek (transz-prezentáció). Terveink között szerepelt a transz-prezentáció *in situ* vizsgálata konfokális mikroszkópiával. Monoklonális antitestekkel végzett kísérletek nehézségbe ütköztek, ezért a továbbiakban olyan sejtes rendszert kívánunk előállítani, amely fluoreszcens fehérjével fuzionáltatott receptor alegységeket tartalmaz. Jelenleg zajlik ezen alegységek előállítása.

## III. IL-9 receptor kölcsönhatásának vizsgálata az IL-2R/MHC fehérjeklaszterekkel

Az egyebek mellett a T sejtek működésében is szerepet játszó IL-9 citokin biológiai hatását a specifikus IL-9R $\alpha$  láncból és a más citokinek, így az IL-15 és IL-2 által is használt közös  $\gamma_c$  alegységből felépülő heterodimer IL-9R komplexhez kötődve fejt ki. IL-9R $\alpha$ -val transzfektált Kit225 sejteken kimutattuk, hogy az IL-9R $\alpha$  –legalábbis részben– az MHC glikoproteinekkal és az IL-2R-ral közös membrándoménekből, azok közvetlen molekuláris közelségében helyezkedik el, azaz a vizsgált T sejteken az IL-9R szintén az IL-2R és az MHC glikoproteinek által kialakított szuperklaszterek egyik komponense. Bár az eredeti munkatervben nem szerepelt az IL-9R vizsgálata, ezen vizsgálatok hozzájárulnak a  $\gamma_c$  citokin receptorok működésének megértéséhez. Rámutatnak arra, hogy a T sejtek életében szerepet játszó, a közös  $\gamma_c$  alegységet alkalmazó citokinek receptorainak eloszlását feltételezhetően valamilyen általános "rendező elv" alakítja ki. (Emellett az alkalmazott módszerek, felhasznált reagensek egy része közös a két témában.)