

Sejtfelszíni és magreceptorok többszörös asszociációjának és dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia és energia transzfer segítségével

Az interleukin-2 és -15 citokinek fontos szerepet játszanak a T sejtek funkciójának és homeosztázisának szabályozásában (Vámosi *et al*, *Imm. Lett.* 2006, Bodnár *et al*, *Imm. Lett.* 2008). Receptoraik felépítésében 3-3 alegység vehet részt: a jelátvitelért felelős, mindkét receptor által használt β és γ 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. Korábbi vizsgálataink számos információt szolgáltatottak 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.

Az ILRAP molekula IL-2 receptorral való kölcsönhatásának vizsgálata, az ILRAP viszonya lipid tutajokhoz

A két receptor jelátvivő alegységei (béta, gamma lánc), illetve számos jelátviteli útvonaluk közösek. Ugyanakkor a két citokin által kiváltott biológiai hatások – az *in vitro* többnyire megegyező funkció mellett – *in vivo* ellentétesek is lehetnek. Az IL-2 vs. IL-15 jelátvitel megértésében fontos szerepet játszhatnak a receptorok differenciális kölcsönhatásai. Kollaborációs partnereink kimutattak egy olyan molekulát (ILRAP: interleukin receptorral asszociált molekula), amely specifikusan hat kölcsön az IL-2R alfa alegységével. Hipotézisük szerint az ILRAP molekuláris kapcsoló szerepet játszhat az IL-2 és IL-15 jelátvitelében.

Az IL-2R alegységek, valamint az ILRAP molekula sejtfelszíni eloszlását, egymással való kölcsönhatását a Kit 225 K6, valamint a HTLV-1+ Dukes T limfóma sejtvonalon tanulmányoztuk. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy az IL-2R alfa alegysége és az ILRAP molekula mindkét sejt típuson kolokalizálódik, azonos membrán mikrodoménekben helyezkedik el. Mindkét fehérje nagymérvű együttállást mutat a GM1 gangliozidokkal (lipid tutajokban található glikoszfinfolipid), illetve a CD48 GPI-kapcsolt fehérjékkel, amiből arra következtethetünk, hogy az IL-2R alfa és az ILRAP molekula lipid tutajokban dúsul fel. Áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) kísérletek segítségével azt is igazoltuk, hogy az IL-2R alfa és az ILRAP fehérje mindkét sejt vonalon egymás molekuláris közelségében helyezkedik el citokinek hiányában, illetve IL-2 vagy IL-15 jelenlétében egyaránt. FRET kísérleteink szerint ugyanakkor az ILRAP nincs az IL-2R béta és gamma alegységének 1-10 nm-es környezetében. Jelentős pozitív energia transzfer határfokot mértünk az ILRAP és az MHC I, illetve MHC II glikoproteinek között is, tehát az ILRAP valószínűleg nagyobb fehérjeklaszterek egyik összetevőjeként fordul elő.

Eredményeinkből kézirat készül, melynek publikálása az ILRAP fehérje szekvenciájának (kollaborációs partnereink – Dr. T.A. Waldman és mtsai - által történő) publikálása után várható.

MHC I organizáló szerepe IL-2/15R - MHC I fehérjeklaszter elemeinek kölcsönhatásában

Az MHC I glikoproteinek homo- és heteroklasztereket alkotnak humán T sejtek membránjában. A klaszterekben többek között MHC II, IL-2 és IL-15 receptorok is jelen vannak. Az MHC I-ről kimutatták, hogy számos receptorral (EGFR, inzulin, TCR) asszociál, sőt azt is igazolták, hogy az InsR működésében fontos szerepet játszik. Annak ellenőrzésére, hogy az IL-2/15 receptorok működését, kölcsönhatásait hogyan befolyásolja a klaszter legnagyobb mennyiségben kifejeződő

tagja, az MHC I, RNS interferencia segítségével <20%-ra csendesítettük az MHC I expressziót. Az FT7.10 T limfóma sejteken az IL-2R alfa és IL-15R alfa kölcsönhatása az MHC I molekulákkal gyengült, és csökkent az IL-2R alfa és IL-15R alfa közti heteroasszociáció is. Hasonlóan csökkent az IL-2R alfa és az IL-15R alfa homoasszociációja is. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával kimutattuk, hogy csendesített MHC I expresszió mellett az MHC I, az IL-15R alfa és az IL-2R alfa mobilitása is megnő, azaz a klaszterek kisebbek lesznek és/vagy elemeik közt a kölcsönhatások gyengülnek. Eredményeinkből közlemény készül. Eredményeinkből konferencia poszttereket mutattunk be és kézirat készül.

Ezen eredményekhez kapcsolódóan azt is megvizsgáltuk, hogyan változik az MHC I molekulák homo-oligomerizációja, ha egy vele kölcsönható másik molekula, az ICAM-1 expressziója változik. Méréseinket LS-174T kolorektális adenokarcinóma sejteken végeztük. Az ICAM-1 expresszió megnövelése (IFN- γ stimulációval) csökkentette, míg az ICAM-1 expresszió visszacsökkentése (RNS interferenciával) megnövelte az MHC I molekulák közt mérhető FRET hatásfokot. Úgy tűnik tehát, hogy az ICAM-1 az MHC molekulák közé ékelődve csökkenti az MHC homo-oligomerizáció mértékét. A fehérjemintázatok a fiziológias ingerrel vagy mesterségesen kiváltott expressziós szint módosulások hatására dinamikusan megváltozhatnak (*Nagy P et al, BBRC, 2006*).

Citoszkeleton és lipid tutajok szerepe a fehérjeklasztereket összetartó erők stabilitásában

A fehérjeklaszterek elemei közötti kölcsönhatásokat számos tényező befolyásolhatja, ilyen pl. a membrán mikrodomén szerkezete és a citoszkeleton. Ezek szerepét membrán blebek segítségével vizsgáltuk. Tápanyag megvonás vagy egyéb tényezők hatására a sejteken apoptotikus/nekrotikus membrán hólyagok, blebek alakulnak ki. A nagyméretű blebek membránja nem rendelkezik citoskeletális kapcsolatokkal, és a fehérjék és lipidek eloszlása 200 nm-es feloldással homogénnek tűnik, megszűnik az ép membránokban megfigyelhető, a mikrodoménes szerkezetre jellemző foltos lipid- és fehérjeeloszlás. FRET segítségével megvizsgáltuk az MHC I és II, illetve IL-2R alfa és IL-15R alfa közötti páronkénti homo- és heteroasszociációkat. Azt tapasztaltuk, hogy a FRET hatásfok nem változik szignifikáns mértékben a blebekben az ép sejtmembránban mért értékekhez képest. A kisméretű molekulaklaszterek tehát a blebekben is fennmaradnak, a fehérje-fehérje kölcsönhatások nem függenek kritikus módon a citoszkeletontól és a membrán mikrodomén szerkezetétől. A blebekben a vizsgált molekulák mobilitása magasabb volt, ami feltehetően a citoskeletális kapcsolatok megszűnésével vagy a molekulaklaszterek méretének csökkenésével magyarázható. Eredményeinkből konferencia poszttereket mutattunk be és kézirat készül.

IL-2/15R eloszlása, együttállása a diffrakciós limit alatt

Míg konfokális mikroszkóppal a fehérje-kolokalizáció a néhány száz nm-es mérettartományban tanulmányozható, a pásztázó közeli mező mikroszkópiás mérések (holland kollaboráció) betekintést engednek a domének belső szerkezetébe. SNOM méréseink feltárták, hogy az IL-2R és IL-15R az ismert nagyméretű domének mellett kisebb, néhány molekulából álló klaszterekben vagy akár egyedi molekulaként is megtalálható FT7.10 T limfóma sejteken. Míg az IL-2R α -nak csak kis hányada, addig az IL-15R α 30%-a van kisméretű klaszterekben. Az IL-2R és IL-15R domének átlagos mérete hasonló (~450 ill. 360 nm). A mérések megerősítették a két fehérje kolokalizációjára vonatkozó eredményeinket. A domének denzitása mérettől függetlenül közel állandó volt. A domének tehát hasonló összetételű/szerkezetű blokkokból épülhetnek fel, amelyek lehetnek a korábbi FRET és CLSM adataink alapján valószínűsített, az IL-2/IL-15R rendszer és az MHC glikoproteinek által kialakított „szuperklaszterek” (*de Bakker et al., J. Cell Sci., 2008*).

IL-15 transz prezentációja

Korábban T limfóma sejtvonalon kimutattuk az IL-15R alegységeinek együttállását. Egyre több adat (funkcionális tesztek, krisztallográfia) utal arra, hogy az IL-15R alegységei nemcsak egyazon T

sejten elhelyezkedve alkotnak funkcionális komplexet, hanem ún. transz prezentáció is létrejöhet, amikor egy a T sejttel kölcsönható, az IL-15R α alegységet kifejező dendritikus sejt vagy monocita mutatja be a ligandumot egy másik sejten kifejeződő, jelátvivő $\beta\gamma$ heterodimernek. Célunk olyan kísérleti rendszer létrehozása volt, amelyben a két sejten kifejeződő receptor alegységek közötti kölcsönhatás közvetlenül, nemcsak annak hatásain keresztül vizsgálható. Ehhez olyan sejtvonalakat használtunk, amelyek egyike (JFCI) csak az α , a másik (KWT) csak a $\beta\gamma$ alegységeket fejezi ki. Kimutattuk, hogy a KWT sejtek osztódását serkenti az IL-15-tel kezelt JFCI sejtek jelenléte. Konfokális mikroszkópiával sikerült az immunszinapszishoz hasonló kapcsolódást kimutatni a két sejt típus között. Akceptor fotokiégetéses FRET módszerrel elsőként adtuk közvetlen bizonyítékát annak, hogy a KWT sejtek által kifejezett β alegységek a JFCI sejteken lévő IL-15R α alegységekkel molekuláris szinten is együttállnak a szinapszisban. Eredményeinkből kézirat készül.

Interleukin-2/15 receptor klaszterek kolorektális tumor környéki CD4+ limfocitákon

Korábban T limfóma sejtvonalakon leírtuk olyan funkcionális membránfehérje klaszterek jelenlétét, amelyek IL-2 és -15 receptorokat, MHC I/II glikoproteineket és ICAM-1 adhéziós fehérjéket tartalmaztak. Azonos sejtípushoz tartozó, különböző fiziológiás/patológiás állapotú sejtek receptormintázatai eltérőek lehetnek. Ezért analizáltuk kolorektális karcinómában szenvedő betegek tumor környéki nyirokcsomóiból, valamint a betegek, ill. egészséges kontrollok perifériás véréből származó CD4+ T sejtek sejt felszíni receptormintáit. Mindhárom csoportban sikerült a sejtvonalakon találtakhoz hasonló, MHC molekulákat, IL-2/15R-t és ICAM-1-et tartalmazó klasztereket azonosítani konfokális mikroszkópiával. FRET méréseink szerint ezen molekulák egymás 2-10 nm-es közelségében helyezkednek el. A nyirokcsomókból nyert sejteken az említett fehérjék expressziója alacsonyabb volt, és a molekuláris kölcsönhatások – különösen az IL-2/15R és az MHC molekulák között – gyengültek a kontrollhoz képest. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a sejtet érő különféle stimulusok/szöveti környezet átrendezhetik a fehérjemintázatokat egyazon páciens azonos típusú sejtjein. A mintázatok változása egyrészt tükrözheti a sejt állapotát, másrészt befolyásolhatja a sejt sorsot (*Bene et al., BBRC, 2007*)

IL-9R szerkezete és kölcsönhatásai

A főként TH2 sejtek által termelt interleukin-9 (IL-9) számos sejt típus működését szabályozza. Több megfigyelés utal a T sejtek onkogenezisében betöltött potenciális szerepére. A heterodimer IL-9 receptor az IL-9 specifikus alfa láncból és a közös γ c alegységből áll, amely pl. az IL-2 és az IL-15 receptorának is alkotóeleme. Kísérleteink során az IL-9R sejt felszíni elrendeződését, az IL-2R/MHC szuperklasztterekhez való viszonyát tanulmányoztuk humán T limfóma sejteken. CLSM vizsgálataink szerint az IL-9R jelentős hányada lipid tutajokban dúsul fel. Kimutattuk az IL-9R kolokalizációját és molekuláris közelségét mind az IL-2 receptorral, mind pedig az MHC I és II glikoproteinekkal, ami arra utal, hogy az IL-9R a fent említett szuperklasztterek egyik komponense. Munkacsoportunkban az itt bemutatott vizsgálatainkkal párhuzamosan feltárták az IL-9R alegységek IL-9 kötődése által szabályozott molekuláris közelségét. Eredményeink alapján a γ c citokin receptorok sejt felszíni szerveződésében egy általános rendező elv uralkodik, ami elősegíti a közös alegységek megosztását és a hatékony jelátvitelt (*Nizsalóczki et al, submitted to J. Immunol.*).

Lipid tutajok heterogenitásának és biofizikai jellemzőinek vizsgálata humán limfocitákon

Többféle biofizikai módszer alkalmazásával összevettük a lipid tutajokban feldúsuló GM1 gangliozidok, a koleszterin, illetve egy telített zsírsavláncú lipid analóg, a DiI eloszlását, illetve kolokalizációját egyes GPI-kapcsolt és transzmembrán fehérjékkel. Megvizsgáltuk a membrán rendezett folyadék fázisának, a lipid próbák lokális mobilitásának és a lipid tutajoknak a viszonyát is. Míg a GM1 és a koleszterin nagyfokú kolokalizációt mutat, a lipid tutajokban elhelyezkedő fehérjék nem mindegyike kolokalizálódik egymással. Méréseink a lipid tutajok összetételének

heterogenitását igazolják, tehát a „lipid tutaj” kifejezés egy adott sejten belül is különböző összetételű membrán mikrodoméneket jelölhet (*Gombos et al, Cytometry A, 2008*).

Jun/Fos komplex konformációja, FRET adaptálása nukleáris fehérjék asszociációjának vizsgálatára

A c-Jun és a c-Fos transzkripciós faktorok számos sejt folyamatot szabályoznak (pl. szerepük van az IL-2/15 indukálta proliferáció kiváltásában is). Egymáshoz leucin-cipzár motívummal kapcsolódó heterodimert alkotnak. A komplexből csak a DNS-kötő régiók és a hozzá közel eső dimerizációs régiók kristályszerkezete ismert, a C terminális domének konformációja ismeretlen. Célunk ennek a régióknak a feltérképezése volt FRET, FCCS és modellezés segítségével. A teljes hosszúságú Fos-GFP és Jun-mRFP C terminális kromoförjai között ~4% FRET határfokot mértünk, ami ~8 nm távolságnak felel meg. Molekuladinamikai szimulációink több lehetséges 6-20 nm távolsággal jellemezhető konformációt jósolnak; a FRET mérések szerint a komplexek túlnyomó része kompaktabb konformációt vesz fel. A Fos túlnyúló végét 164 aminosavval megrövidítve ~6.1 nm-es GFP-mRFP távolságot kaptunk, ami jól egyik a szimulációval. FCCS méréseink alapján a megrövidített komplex is képes a DNS-hez kötődni, de affinitása kisebb a teljes hosszúságú komplexénél. Így feltehetően nemcsak az N-végen lévő ismert funkciójú transzaktivációs domének, hanem a C terminális domének is hozzájárulnak a DNS-kötéshez.

Kidolgoztunk egy megbízható FRET határfok meghatározási módszert fluoreszcens fehérjékkel (pl. GFP-mRFP) történő mérésekhez: egyrészt létrehoztuk a FRET mérésekhez szükséges kontrollokat, illetve kidolgoztuk a FRET mérések kiértékelési módját. Az így létrehozott kontrollokat: EGFP-vel vagy mRFP-vel egyszeresen jelölt sejt vonalakat, EGFP-mRFP fúziós fehérjét kifejező pozitív kontrollt, illetve a két fehérjét függetlenül kifejező negatív kontrollt további vizsgálatainkban is alkalmazni tudjuk. Adaptáltuk az intenzitásmérésen alapuló konfokális mikroszkópos és áramlási citometriás FRET mérési és kiértékelési módszereket az EGFP-mRFP donor-akceptor párra (*Vámosi et al, Biophys. J., 2008*).

RAR és RXR dinamikája és működése

A magreceptorok olyan transzkripciós faktorok, amelyek ligandfüggő módon képesek szabályozni célgénjeik átíródását. A molekuláris kapcsoló modell szerint a receptorok agonista hiányában a korepresszor komplex részeként kötődnek a DNS-hez. Agonista jelenlétében a korepresszor disszociál, helyére koaktivátor kötődik, megindítva a transzkripciós eseménysorozatot az adott génszakaszon. Célunk a receptorműködés kezdeti lépéseinek és dinamikájának vizsgálata volt biofizikai módszerekkel. A magreceptorok dinamikájának vizsgálatához létrehoztuk az EGFP-vel és mRFP-vel vagy mCherry-vel jelölt retinsav receptor (RAR) és retinoid X receptor (RXR) fehérjéket, illetve ezek mutánsait kódoló plazmidokat, amelyek expresszióját és maglokalizációját mikroszkóppal ellenőriztük. Elkészítettük három kofaktor: a SMRT, az ACTR és a DRIP interakciós doménjeit kódoló GFP-plazmidokat is. GFP-RXR-rel és GFP-RAR-rel transzfektált stabil HeLa sejt vonalakat hoztunk létre. A receptorok mobilitását fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (FCS) vizsgáltuk, ebből következtettünk a receptorok szabad vagy kötött állapotára, a kölcsönható komplex méretére és jellegére.

A GFP-RAR és GFP-RXR konstrukttal végzett mérésekből származó autokorrelációs függvényeket kétkomponensű modellhez tudtuk jó közelítéssel illeszteni. Ezek alapján a receptorok a sejt magban dinamikai szempontból alapvetően két populációba oszthatóak: a $t_1 = 1-10$ ms és a $t_2 = 50-100$ ms átlagos diffúziós idővel rendelkező populációkra. A diffúziós időkből megbecsülhető a diffundáló molekulakomplex tömege. A két diffúziós idő a magreceptor tömegénél 1-2 \times , illetve 10 6 \times nagyobb tömegű molekulakomplexnek felel meg. Az 1-es és 2-es populációk aránya GFP-RAR esetén 70-30%, GFP-RXR esetén 90-10%. Ez arra utal, hogy ligand hiányában a receptorok jelentős hányada szabadon, vagy kisméretű komplex részeként diffundál. A 2-es populáció tartalmazza azokat a

receptorokat, amelyek valamilyen nagyméretű fehérjekomplexhez, illetve stabilan vagy tranziensen DNS-hez kötött állapotban vannak. Legfontosabb következtetésünk ezekből a kísérletekből az, hogy a molekuláris kapcsoló modellel ellentétben stimulálatlan sejtekben a molekuláknak csak kisebb hányada van valamely lassan mozgó, nagy komplexben vagy DNS-kötött állapotban, nagyobb része szabadon diffundál (monomer vagy dimer receptorként) a sejtmagban. A szabadon diffundáló receptorok magas aránya meglepő a működésüket leíró modell fényében, mely szerint ligand hiányában az RAR-RXR magreceptorok minden esetben korepresszor-komplexhez kötődnek.

Az AM580 kódnevű szintetikus, szelektív RAR-agonista ligand hatására a nagyobb diffúziós idővel rendelkező populáció aránya megemelkedik 10%-kal (az RXR esetében megfelelő specifikus liganddal stimulálva ez a növekedés még kifejezettebb, kb. 20%). Ennek alapján felvetődik a kérdés, hogy milyen állapotot takar az alacsony mobilitású (2-es) populáció; a DNS-hez kötött állapotot, vagy egyszerűen csak a koregulátor-kötött állapotot. Ennek felderítésére két - megváltozott koregulátorkötő, illetve DNS-kötő képességgel rendelkező - mutáncsoportot hoztunk létre. Ligandkötő domén mutánsaink a koregulátorkötésben mutatnak eltérést: konstitutív korepresszorkötő, konstitutív koaktivátorkötő, illetve a koregulátorkötésre képtelen konstruktok. Az autokorrelációs mérésekből származó eredmények alapján a koregulátorkötés képessége jelentősen befolyásolja a lassú és a gyors populáció arányát, de alig változtatja a diffúziós koefficiens értékeit.

A magreceptor dinamikát szintén jelentős mértékben befolyásolhatja a DNS-kötő képesség. Ennek felderítésére DNS-kötő mutánsokat hoztunk létre, melyek karakterizálását elkezdtük. Előzetes méréseink alapján mind az aspecifikus DNS-kötést befolyásoló Zn-ujjak, mind a receptor válaszadó elemhez történő specifikus kötődésért felelős aminosavak mutációja megváltoztatta a lassú és a gyors komponens arányát, de csekélyebb mértékben, mint a koregulátor kötő képességet érintő mutációk.

Az FCS módszer, alapelvéből adódóan nem alkalmas az immobilis, vagy nagyon alacsony mobilitású frakció detektálására. Alkalmas viszont erre a FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) módszer. Elsődleges FRAP eredményeink alapján nem kell számolnunk jelentős méretű immobilis populációval.

Méréseink egy olyan működési modellt valószínűsítenek, melyben a magreceptor ligand hiányában szabadon vagy kis molekulakomplex részeként diffundál a magban, agonista hatására pedig nagyobb komplex (koaktivátor komplex) részévé válik (*Brázda és mtsai, Biokémia, 2007*). A receptor tranziensen kötődik a DNS-hez, és a kötés affinitása megnő, ha a receptor agonistát köt, ehhez azonban meg kell őriznie koregulátor kötő képességét. A ligand hatására megváltozott DNS-kötő affinitást tükrözheti a lassú komponens megnövekedett aránya.

A komplexekben jelenlévő molekulák azonosítására is kísérletet tettünk RXR, RAR, illetve kofaktor interakciós domének kotranszfekciójával, FRET mérések segítségével. Az eddigiekben azonban negatív FRET eredményeket kaptunk, feltehetően azért, mert a makromolekulák nagy méretéből, és a festékek kedvezőtlen elhelyezkedéséből adódóan a donor-akceptor távolságok a FRET hatósugarán kívül estek. A továbbiakban olyan receptorokkal kísérletezünk, melyekben a festékek a C terminálison, illetve a megrövidített N terminálison helyezkednek el.

Eredményeinkből poszterekben és előadásban számoltunk be, valamint kézirat készül.

PPAR γ -RXR heterodimer szabályozza az ABCG2 transzporter transzkripcióját

Kimutattuk a PPAR γ -RXR heterodimer kötődését az ABCG2 géntől upstream elhelyezkedő enhancer régióhoz, ami arra utal, hogy az ABCG2 expresszióját a PPAR γ :RXR dimer közvetlenül szabályozza. A PPAR γ -aktivált dendritikus sejtekben megnőtt az ABCG2 expresszió, és nőtt a

xenobiotikumok, illetve a Hoechst festék kipumpálásának hatásfoka (*Szatmári et al, J. Biol. Chem., 2006*).

Szöveti transzglutamináz (TG2) szerepe a retinsav (RA) által indukált neutrofil granulocita differenciációban és funkcióban

RA kezelés hatására a promielocitikus NB4 leukémia sejtek granulocitákká differenciálódnak, miközben indukálódik a TG2 enzim expressziója. Igazoltuk, hogy a retinsav indukálta TG2 kétféleképpen is részt vesz a terminális differenciációban: feltehetően transzkripciós faktorként mediálja a szuperoxid termelésben kritikus NADPH-alegység (GP91PHOX) expresszióját (jelenlétét a magban konfokális mikroszkópiával kimutattuk), illetve szerepet játszik a sejtek migrációjában és fagocitáló képességében. A projektben a TG2 sejtmagbéli lokalizációjának igazolásával vettünk részt (*Balajthy et al, Blood, 2006*).

Eltérések a tervektől

Az ILRAP molekulával eredetileg olyan kísérleteket is terveztünk, amelyekben vizsgáltuk volna a molekula mobilitását. Ezeket a méréseket azért nem hajtottuk végre, mert a rendelkezésre álló multivalens IgM antitestek keresztkötéseket indukálnak, IgG típusú, illetve Fab antitesteket pedig nem bocsátott rendelkezésünkre kollaborációs partnerünk.

Nem szerepelt a tervezett kísérletek között az Interleukin-2/15 receptor klaszterek vizsgálata kolorektális tumor környéki CD4+ limfocitákon (ld. fentebb). Ez a munka a sejtvonalakon végzett mérések logikus kiterjesztése volt humán mintákra a Sebészeti Klinikával kollaborációban. Szintén nem szerepelt az eredeti tervekben a közös γ c receptorcsalád további tagjának, az IL-9 receptor szerkezetének és kölcsönhatásainak vizsgálata (ld. fentebb). Nem szerepelt az eredeti tervekben a PPAR γ -RXR heterodimernek az ABCG2 expressziójára kifejtett hatását, illetve a retinsavnak a neutrofilek differenciálódásában betöltött szerepét vizsgáló munka sem.

A terjedelmi korlátok miatt nem szerepel a jelentésben a pályázat témájához kapcsolódó, kollaborációban végzett további kutatások leírása.