

**AZ ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS ENERGIA TRANSZFER MÓDSZER  
TOVÁBBFEJLESZTÉSE AZ AUTOFLUORESZCENCIA SEJTENKÉNTI  
KORREKCIÓJÁVAL: ÚT A KÜLÖNBÖZŐ CD45 IZOFORMÁK T SEJT  
JELÁTVITELBEN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK MEGISMERÉSÉHEZ**

**SEBESTYÉN ZSOLT**



**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET**

**DEBRECEN, 2002**

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>6</b>
2.1 A CD45 tirozin foszfatáz feltételezett szerepe a TCR jelátvitelben.....	6
2.2 A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer elmélete és alkalmazhatósága.....	11
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>17</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>19</b>
4.1 Sejtek tenyésztése .....	19
4.2 Antitestek.....	19
4.2.1 Antitestek a rutin FACS analízishez és sejt szortírozáshoz.....	19
4.2.2 Antitestek a FCET kísérletekhez.....	20
4.2.3 Antitestek a stimulációs Western blot kísérletekhez.....	20
4.2.4 Fab fragmentumok preparálása.....	21
4.2.5 Antitestek és Fab fragmentumok konjugálása fluoreszcens festékekkel.....	21
4.3 Sejtfelszíni antigének jelölése antitestekkel FCET mérésekhez.....	21
4.4 Áramlási citometriás energia transzfer mérések.....	22
4.5 Az antitesthez konjugált fluoreszcens festékek abszorpciós és gerjesztési spektrumának meghatározása .....	23
4.6 Immunprecipitáció és immunoblotting.....	24
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....</b>	<b>26</b>
5.1 Áramlási citometriás energia transzfer mérések sejtenkénti háttérlevonással.....	26
5.2 Az $\alpha$ faktor meghatározása.....	31
5.3 A FCET módszer megnövelt érzékenysége a háttér sejtenkénti levonását követően... .....	32
5.3.1 Alacsony számban kifejeződő CD45 molekulák homoasszociációjának meghatározása.....	33
5.3.2 Endogén TCR kifejeződés, mint “kontamináció” kimutatása T sejtek felszínén scTCR:CD3. $\zeta$ kiméra receptor retrovírusos transzdukcióját követően.....	34
5.4 Az immunfluoreszcens jelölés geometriája befolyásolja a FRET hatékonyságot....	37
5.5 Különböző CD45 izoformák asszociációinak vizsgálata HPB-ALL T sejteken.....	43
5.6 A TCR-on keresztüli jelátvitel vizsgálata.....	48
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>54</b>

<b>7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG.....</b>	<b>56</b>
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>57</b>
<b>9. KÖZLEMÉNYEK.....</b>	<b>63</b>
<b>10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai .....</b>	<b>65</b>

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

EGF: epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)

FACS: fluoreszcencia aktivált sejt szortírozás

FCET: áramlási citometriás energia transzfer (Flow Cytometric Energy Transfer)

FCS: Fetal Calf Serum

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

GAMiG: kecskében termeltetett egér ellenes antitest (Goat anti-Mouse Immunglobulin)

HPB-ALL: Human Peripheral Blood – Acute Lymphoid Leuchemia

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

Lck: p56<sup>lck</sup>

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)

PBL: peripheral blood lymphocyte

PTPáz: fehérje tirozin foszfatáz (protein tyrosine phosphatase)

RAMiG: nyúlban termeltetett egér ellenes antitest (Rabbit anti-Mouse Immunglobulin)

TCR: T sejt receptor

TRITC: tetrametil-rodamin-izotiocianát

$\beta$ 2m: béta-2-mikroglobulin

V $\alpha$ / $\beta$ : T sejt receptor variábilis alfa és béta lánca

## **1. BEVEZETÉS**

A fehérje-fehérje kölcsönhatások a makromolekulás szerkezetek és enzim-komplexek kialakulásától kezdve egészen a jelátviteli folyamatok szabályozásáig kulcsszerepet töltenek be a legtöbb biológiai folyamatban. A sejten kívüli környezet és a sejt belső tere között a különböző szignálok, ionok és tápanyagok állandó cseréje játszódik le, ami alapvetően meghatározza a sejtek működését. A már meglévő vagy ligandum hatására kialakuló membrán fehérje kölcsönhatások kulcsfontosságúak a fenti folyamatokhoz.

A CD45 fehérje tirozin foszfatáz az egyik legnagyobb számban megtalálható glikoprotein az immunsejtek felszínén, melynek eltérő méretű és glikoziláltságú izoformái igen változatosan, de szigorúan szabályozva fejeződnek ki a T sejtek fejlődése során. Bár az immunológiai kutatásoknak gyakran képezte tárgyát, a CD45, különösen pedig különböző izoformáinak pontos szerepét a mai napig nem ismerjük pontosan. Feltételezik, hogy a TCR jelátvitel szabályozását „felülről” végzi: negatív és pozitív regulátor funkciót egyaránt betölthet, így a jelátviteli folyamatok erősségének a küszöbértékét határozza meg.

Ahhoz, hogy a membránfehérjék, mint például a CD45, szerepét meghatározzuk, a funkcionális vizsgálatok mellett a molekula sejt felszíni topográfiájának, más lehetséges fehérjékkel képzett asszociációinak vizsgálata szükséges. A membránfehérjék kapcsolatainak feltérképezésére a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérés áramlási citometriás (FCET) módszerét írták le, amely nagy számú élő sejten, nagyon jó statisztikával teszi lehetővé a molekulák szoros kölcsönhatásának nyomon követését (Trón L és *mtsai*, 1984).

Bár a CD45 és más molekulák kölcsönhatásait illetően vannak már ismereteink, ezeket elsősorban invazív, a membrán struktúrájának megőrzését figyelmen kívül hagyó módszerek szolgáltatták. A FCET technikával a fehérjék topográfiája azok *in vivo* membrán-környezetében vizsgálható, azonban a felhasználásának nagymértékben határt szab az, hogy a vizsgált molekula viszonylag nagy számú kifejeződését igényli.

Munkánk során különböző CD45 izoformák szerepét vizsgáltuk a TCR jelátviteli folyamatokban. A CD45 részvételével kialakított fehérjemintázatok karakterizálása révén kívántuk megmagyarázni az egyes izoformák esetlegesen eltérő szabályozó szerepét a jelátvitel küszöbértékének meghatározásában. Ehhez a korábbinál érzékenyebb FCET módszerre volt szükség, amit az autofluoreszcencia sejtenkénti korrekciója révén kívántunk elérni.

A sejt autofluoreszcencia csökkentésének első lépéseként a FRET vizsgálatokban korábban elterjedt fluoreszcein-rodamin festékpár helyett olyan fluorofórokat alkalmaztunk, amelyek a vörös tartományban fluoreszkálnak, s így emissziós spektrumuk kis átfedést mutat az autofluoreszcenciával. A mérések jel-zaj arányának további növelése érdekében az autofluoreszcencia detektálására egy független fluoreszcencia paramétert vezettünk be, aminek segítségével az autofluoreszcencia sejtenkénti korrekciójára alkalmas matematikai algoritmust fejlesztettünk ki.

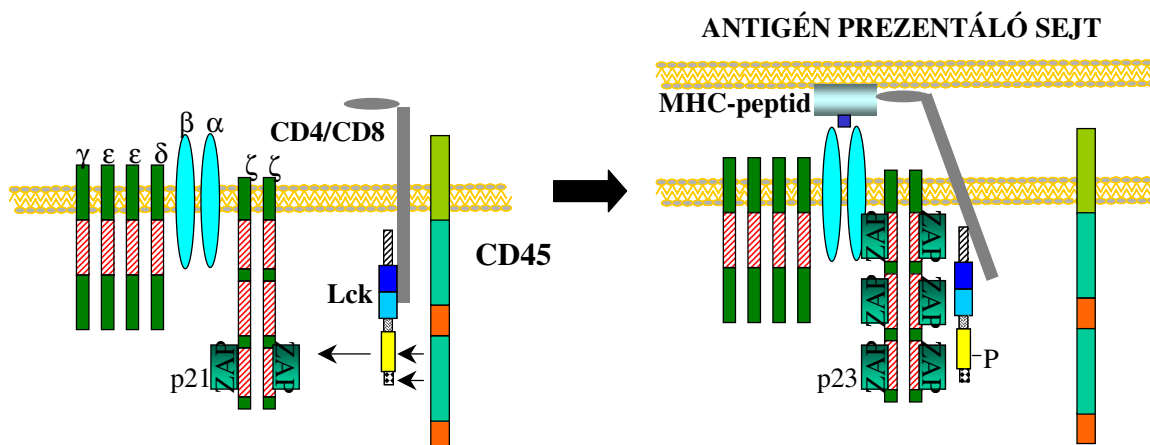
Mivel a sejt felszíni fehérjék immunfluoreszcens jelölésére bizonyos esetekben (megfelelő fluorofórral jelzett monoklonális antitest hiánya; fluoreszcens jel erősítése) direkt helyett indirekt módszert használnak, ezért vizsgálni kívántuk, milyen hatása van a különböző jelölési protokolloknak az energia transzfer hatékonyságára.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A CD45 tirozin foszfatáz feltételezett szerepe a TCR jelátvitelben

A CD45 tirozin foszfatáz az egyik leggyakoribb glikoprotein az immunsejtek felszínén. Nagyméretű, receptor-szerű struktúrájú külső doménnel rendelkezik, bár fiziológiásan releváns ligandumját még nem azonosították. Szerepét elsősorban abban látják, hogy a T illetve B sejt receptoron (TCR illetve BCR) keresztül lezajló jelátvitel küszöbértékét határozza meg az Src családba tartozó tirozin kinázok, a p56<sup>lck</sup> és p59<sup>fyn</sup> szabályozásán keresztül (Alexander, D. R., 2000; Ashwell, J. D. és D'Oro, U., 1999; Frearson, J. A. és Alexander, D. R., 1996; Thomas, M. és Brown, E., 1999).

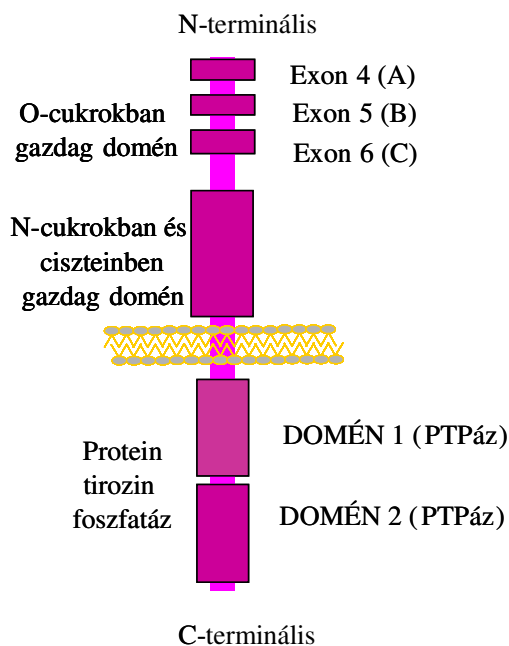
A CD4 illetve a CD8 koreceptorokhoz kapcsolódó p56<sup>lck</sup> kináz a TCR $\zeta$  illetve a CD3 $\epsilon$  láncán található ITAM-ek (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) foszforilálásán keresztül a TCR jelátviteli kaszkádot indítja el (Chan, A. C. és *mtsai*, 1994; van-Oers, N. és *mtsai*, 1996). Nyugalmi állapotban a CD45 alapszinten fenntartja a CD4-hez kötött p56<sup>lck</sup> aktivitását, ami elegendő a p21 TCR- $\zeta$  foszfoizomerjeinek létrehozásához. Az MHC-peptid komplex hatására a CD4 és a TCR összekapcsolódik, ami az alapaktivitású p56<sup>lck</sup>-t közel viszi a CD3/TCR- $\zeta$  molekulához. Mindezek eredményeképpen teljesen foszforilált p23 TCR- $\zeta$  foszfoizomerek képződnek, illetve minden ITAM motívum ZAP-70-nel kapcsolódik össze (1. ábra).



**1. ábra:** A CD45 fehérje tirozin foszfatáz szerepe a TCR jelátvitel folyamatában a  $p56^{lck}$  szabályozása révén

T sejteken a CD45 fehérje tirozin foszfatáz eddig azonosított szubsztrátja a tirozin kinázok Src családjába tartozó  $p56^{lck}$  (összefoglalót ld. Thomas, M. és Brown E., 1999). A CD45 közel kerülve a CD4/CD8-asszociált  $p56^{lck}$ -hoz, azt defoszforilált állapotban tartja. CD45 hiányában a  $p56^{lck}$  gátló foszforilációs helye hiper-foszforilált állapotban van, és a kináz saját SH2 doménjéhez kapcsolódik, így működésképtelen, úgynevezett zárt konformációt alakít ki. A gátló tirozin hiperfoszforilált állapota már a CD45 expresszió helyreállításával is megszüntethető, defoszforilálódásukhoz nem szükséges antigén stimuláció, integrin receptorok vagy egy esetleges CD45-ligandum kötődése sem (Sieh, M. és *mtsai*, 1993; Stone, J. D. és *mtsai*, 1997). CD45 negatív egerekben a T sejt fejlődés zavara figyelhető meg (Byth, K. F. és *mtsai*, 1996; Kishihara, K. és *mtsai*, 1993), ezen kívül a működésképtelen  $p56^{lck}$ , és ennek következtében a TCR $\zeta$  lánc hiányos foszforilációja és a ZAP-70 felállás zavara miatt jelentősen megemelkedik a TCR jelátvitel küszöbértéke (Stone, J. D. és *mtsai*, 1997). Ezek a fejlődési és működési zavarok helyreállíthatóak a Tyr-505-nél mutált aktív lck transzgén kifejezésével (Pingel, S. és *mtsai*, 1999; Seavitt, J. R. és *mtsai*, 1999), ami szintén azt támasztja alá, hogy a  $p56^{lck}$  C-terminálisa a CD45 fiziológias szubsztrátja.

A CD45 pozitív és negatív hatást is képes kifejteni a p56<sup>lck</sup> kinázra. Egyrészt a gátló C-terminális pTyr-505 defoszforilálása révén pozitívan (Hurley, T. R. és *mtsai*, 1993; McFarland, E. D. és *mtsai*, 1993; Ostergaard, H. L. és *mtsai*, 1989), míg a pTyr-394 autofoszforilációs hely defoszforilálásával negatívan szabályozza a kináz aktivitását (D'Oro, U. és Ashwell, J. D., 1999). (Baker, M. és *mtsai*, 2000) Úgy tűnik azonban, hogy a CD45 legfőbb szabályozó hatása a T sejtek fejlődésére a pTyr-505 helyhez kötődik. A CD45 és p56<sup>lck</sup> között lejátszódó folyamatok CD4 pozitív T sejtekben egyértelműen azokra a kinázokra korlátozódnak, amelyek CD4 molekulával asszociálódtak (Biffen, M. és *mtsai*, 1994).



**2. ábra: A CD45 molekula domén stuktúrája**

A CD45 molekulák extracelluláris része az alternatív hasításnak (*RNS splicing*) köszönhetően 8 különböző izoformaként fejeződik ki a T sejtek felszínén (Ralph, S. J. és *mtsai*, 1987) (Streuli, M. és *mtsai*, 1987) (2. ábra), melyek közül számottevő mértékben 5 található meg T sejteken (Rogers, P. R. és *mtsai*, 1992). Mindegyik T sejt több mint egy CD45 izoformát fejez ki, azonban ezek expressziója szigorúan szabályozott a sejtek

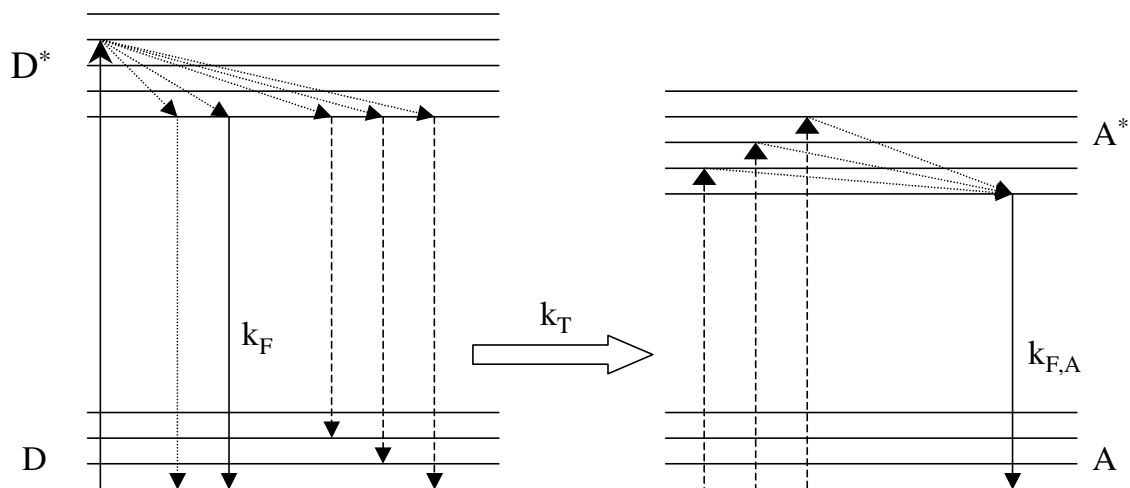
aktivációja és differenciációja során. A naiv CD4<sup>+</sup> T sejtek magas molekulásúlyú CD45 izoformákat (A, B, C) fejeznek ki. Az érett CD4<sup>+</sup> memória T sejtek megváltoztatják CD45 izoforma-mintázatukat, és elsősorban egy alacsony molekulásúlyú, a három exon által kódolt szekvenciák közül egyiket sem tartalmazó CD45R0 vagy null-izoformát expresszálnak (Akbar, A. N. és *mtsai*, 1988; Sanders, M. E. és *mtsai*, 1988). A CD45 hasítás ezen kívül a T sejtek fejlődése során is szabályozott: a timociták túlnyomórészt CD45R0 izoformát, míg az érett T sejtek többféle izoformát fejeznek ki felszínükön (Hathcock, K. S. és *mtsai*, 1992; Lefrancois, L. és Goodman, T., 1987). Annak a molekuláris magyarázata azonban, hogy az egyes CD45 izoformák miként hatnak a TCR jelátvitelre, mindeddig tisztázatlan. Különböző CD45 izoformákkal transzfektált CD45-negatív patkány sejteken végzett kísérletek igazolták, hogy TCR és az MHC-peptid komplex összekapcsolásával kiváltott interleukin-2 szekréció nagyobb mértékű a CD45R0 izoformát kifejező sejtek esetén, mint más izoformáknál (Novak, T. J. és *mtsai*, 1994). „Co-capping” vizsgálatokkal a CD45R0 és CD4 asszociációját mutatták ki különböző CD45 izoformákkal transzfektált timóma sejteken (Leitenberg, D. és *mtsai*, 1996). További, részletesebb „co-capping” és immunprecipitációs kísérletek ellenben a CD45R0 izoforma és a TCR között mutattak ki egy alapszintű, a CD4 expressziótól független kölcsönhatást. Mindez arra utalhat, hogy a CD4 és a CD45R0 együttállása a már meglévő TCR-CD45R0 asszociáció hatására jött létre (Leitenberg, D. és *mtsai*, 1999). Mindemellett CD4<sup>+</sup> primer T sejteken is kimutatták a CD4 és CD45R0 asszociációját (Bonnard, M. és *mtsai*, 1997; Mittler, R. S. és *mtsai*, 1991). Különböző CD45 izoformákkal transzfektált T sejteket összehasonlítva a CD45R0 pozitív sejtekben nagyobb interleukin-2 szekréciót mértek, mint a CD45RABC-t kifejező sejtekben. Azonban a TCR által közvetített fehérje tirozin foszforiláció a CD45RABC<sup>+</sup> sejtekben általában nagyobb volt, mint CD45R0<sup>+</sup> sejtek esetén (McKenney, D. W. és *mtsai*, 1995).

A CD45 molekulák dimerizációjának is fontos szerepe lehet a TCR által közvetített jelátviteli folyamatok szabályozásában. Korábbi kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy a CD45 homodimerizációja a tirozin foszfatáz funkciót gátolja (Majeti, R. és *mtsai*, 1998; Majeti, R. és *mtsai*, 2000). Ennek *in situ* vizsgálatához epidermális növekedési faktor (EGF) receptor külső doménből és CD45 citoplazmatikus részből álló kiméra receptort használtak. Míg a kiméra receptor expressziója képes volt a TCR jelátvitelt helyreállítani CD45-sejtvonalban, addig EGF hozzáadása, valószínűleg a receptorok dimerizációja miatt, a TCR jelátvitelt rövid időn belül gátolta (Desai, D. M. és *mtsai*, 1993). Egy másik transzmembrán fehérje tirozin foszfatáz, a PTP $\alpha$  kristályszerkezetét tanulmányozva szimmetrikus dimer struktúrákat találtak, amelyekben az egyik monomeren található ék alakú „helix-turn-helix” elem ráilleszkedett a másik monomer aktív helyére. Az aktív helyek ilyen módon történő kölcsönös lefedése gátló hatással bír (Bilwes, A. M. és *mtsai*, 1996; Jiang, G. és *mtsai*, 1999). Az epidermális növekedési faktor-CD45 kiméra receptor az előzővel analóg ék alakú doménjének mutációja megakadályozta a kiméra receptorok homoasszociációját és így csökkentette az EGF gátló hatását a TCR által közvetített jelátviteli folyamatokra (Majeti, R. és *mtsai*, 1998). Ugyanez a pontmutáció egerek autoimmunitását okozta, amit a CD45 fehérje tirozin foszfatáz funkció gátlásának a megszűnése magyarázhat meg (Majeti, R. és *mtsai*, 2000). CD45 molekulák dimerizált formáit néhány esetben már kimutatták: kémiai keresztkötéses kísérletekkel (Takeda, A. és *mtsai*, 1992), illetve azáltal, hogy a CD45 transzmembránhoz közeli extracelluláris doménjéhez ciszteint kapcsoltak, ami a homodimert stabilizálta a kialakult diszulfid-kötéseken keresztül (Majeti, R. és *mtsai*, 2000). Feltételezik, hogy a CD45R0 izoforma spontán, vagy esetleg egy exogén ligandum kötődésének a hatására képes dimerizálódni, így ez az izoforma lehet a negatív szabályozás kulcsfigurája (Majeti, R. és *mtsai*, 2000). Ez a modell tehát azt sugallja, hogy a CD45R0 homodimerek negatív hatást gyakorolnak a TCR által közvetített jelátvitelre.

## **2.2 A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer elmélete és alkalmazhatósága**

A sejt felszíni fehérjék kölcsönhatásai kulcsszerepet töltenek be a transzmembrán jelátvitel folyamataiban. A receptorok csoportosulása illetve konformációjuk változása gyakran nélkülözhetetlen tényezők a ligandum-receptor kapcsolódás végkimenetelét illetően. Bár a leginkább elterjedt biokémiai és immunológiai vizsgáló módszerek („co-capping”, „co-precipitáció”, kémiai keresztkötés) értékes információt szolgáltatnak a sejt felszíni fehérjék topográfiájáról, számos hátránnyal rendelkeznek. A szükségszerűen alkalmazott kivonási és izolálási eljárások eleve megakadályozzák azt, hogy a fehérjéket saját környezetükben vizsgáljuk. Emellett ezek a módszerek megbonthatják a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, másrészt mesterséges protein-aggregátumok kialakulását okozhatják (Shiroyo, M. és *mtsai*, 1992). Ezzel szemben a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) kiváló megoldást jelent a fenti problémára, mivel élő sejteken alkalmazható anélkül, hogy a sejtek fiziológiás állapotába jelentősen beavatkoznánk.

A Förster típusú rezonancia energia transzfer során egy gerjesztett állapotú donor festékmolekula egy közeli akceptor festékmolekulának adja át az energiáját sugárzásmentes dipólus kölcsönhatáson keresztül (összefoglalót ld. Stryer L., 1978). A donor és az akceptor fluorofórok energiaszintjeit és lehetséges átmeneteit foglalja össze a 3. ábra.



**3. ábra: Donor (D) és akceptor (A) fluoreszcens festékmolekulák energiaszintjei és lehetséges átmenetei.** A folytonos nyilak a donor abszorpcióját illetve a gerjesztett állapotú donor és akceptor molekulák emisszióját jelölik. A pontozott vonalak az egyéb belső legerjesztődési folyamatokat mutatják. A szaggatott vonalak utalnak a donor emisszió valamint az akceptor abszorpció átfedő energiájú átmeneteire, amelyek révén az energia transzfer létrejöhet.

Egy donor és egy akceptor molekula között lejárló energia transzfer valószínűsége ( $k_T$ ) főként a donor molekula emissziós spektruma és az akceptor molekula abszorpciós spektruma közötti átfedés mértékétől ( $J$ ), a donor emissziós dipólusának és az akceptor abszorpciós dipólusának relatív orientációjától ( $\kappa^2$ ) valamint a két fluorofór távolságától ( $R$ ) függ:

$$k_T \propto JR^{-6} \kappa^2 \quad (1)$$

A donor és akceptor molekulák energiaszintjei közötti átmenetek (3. ábra) sebességi állandóit figyelembe véve, az energia transzfer hatásfoka ( $E$ ) a következő egyenlettel írható le:

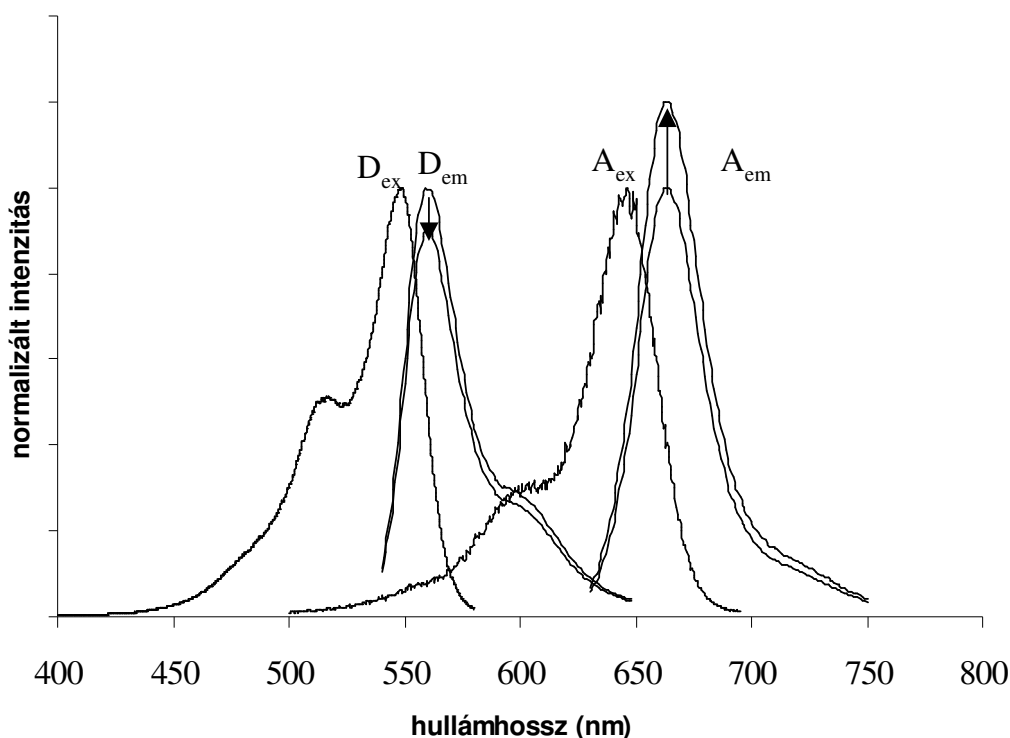
$$E = \frac{k_T}{k_T + k_F + k_E} \quad (2)$$

ahol  $k_F$  és  $k_E$  a donor emissziójának és egyéb legerjesztődési folyamatainak sebességi állandója.  $E$  közvetlenül függ a fluorofórok távolságától ( $R$ ):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (3)$$

ahol  $R_0$  az a távolság, amelynél az energia transzfer hatásfok 50%. Az egyik legfontosabb, az energia transzfer hatásfokát befolyásoló tényező, a donor és akceptor molekulák távolsága ( $R$ ): az energia transzfer hatékonysága a donor és akceptor távolság hatodik hatványának reciprokával arányos és meredeken változik 1-10 nm távolságon belül, így mintegy „spektroszkópiás vonalzóként” használható és molekuláris asszociációk becsülhetők meg a segítségével (Stryer L., 1978).

Az ideális FRET festék-pár esetén a donor emissziós spektruma átfed az akceptor molekula gerjesztési spektrumával. Az energia transzfer eredményeként a donor molekulák kioltódnak (donor quenching), míg az akceptor molekulák gerjesztett állapotba kerülnek és saját kvantum-hatékonyságukkal fluoreszkálnak. Az utóbbi folyamat a szenitizált emisszió (4. ábra).



**4. ábra:** Egy ideális donor-akceptor pár normalizált fluoreszcencia gerjesztési és emissziós spektrumai. A ↓ jel a donor kioltást mutatja, míg a ↑ jel az akceptor szenzitizált emissziójára utal. A kioltás és a szenzitizált emisszió mértéke a szemléletesség érdekében torzított.

Az áramlási citometriára kifejlesztett fluoreszcencia rezonancia energia transzfer módszer (FCET) rendkívül nagy számú sejten, rövid időn belül nyújt információt a membránfehérjék sejtfelszíni eloszlásáról és a biológiailag aktív molekulák konformációjának változásairól. Ezt a módszert számos biológiai rendszeren sikerrel alkalmazták már: például membránfehérjék asszociációs állapotának nyomon követésére immunológiailag kompetens vagy különféle tumorsejtek esetében (összefoglalót ld. Szöllősi J és *mtsai*, 1998). Bár a FCET módszer nagy érzékenységgel és statisztikával használható a molekulák laterális elrendeződésének vizsgálatára, széles körű elterjedése két fő okból nem valósulhatott meg:

- Kutatási célokra kifejlesztett, bonyolult műszert igényel, amely a donor-akceptor festékpárra specifikus gerjesztési hullámhosszal rendelkezik. Bár a

FRET-indukált donor kioltás méréséhez nem szükséges két lézerrel felszerelt műszer vagy bonyolult kiértékelés, a donor kioltás nem használható a FRET hatékonyság sejtenkénti meghatározására (Szöllősi J és *mtsai*, 1998).

- A FRET méréseknek mind a pontosságát, mind a reprodukálhatóságát veszélyezteti, ha a fluoreszcens próbával megjelölt fehérje expressziós szintje alacsony. Ilyen esetekben az autofluoreszcencia részesevé igen jelentős lehet a teljes fluoreszcencia jelhez képest.

Az áramlási citometriás mérések során a sejtek autofluoreszcenciája a mérési zaj legfőbb forrása. Az autofluoreszcencia főként a citoplazmából származik. Ismert, hogy oxidatív folyamatok, illetve specifikus molekulák (pl. NADH és katekolaminok) hozzájárulnak a magas autofluoreszcenciához (Aubin JE, 1979). Az autofluoreszcencia szintje tehát erősen függ a sejtek metabolikus állapotától és még azonos eredetű sejt kultúrák esetében is nagyfokú heterogenitást mutathat. Számos közleményben számolnak be olyan megoldásokról, amelyekkel az autofluoreszcencia zavaró hatását csökkentik és így megnövelik a specifikus fluoreszcencia jel detektálásának hatékonyságát. Alveoláris makrofágokat kék fényel gerjesztve magas autofluoreszcencia tapasztalható, amit kristályibolyával sikeresen kioltottak, azonban a kristályibolya a specifikus jelet is gyengítheti (Hallden G és *mtsai*, 1991). Nátrium-tetrahidridoborát alkalmazásával redukálni tudták immunfluoreszcens módszerrel festett sejtek autofluoreszcenciáját (Beisker W és *mtsai*, 1987). Eurórium-kelátok fluoreszcenciáját idő-felbontással detektálva nagymértékben javították a jel-zaj arányt még glutaraldehiddel fixált minták esetében is, ahol az autofluoreszcencia mindig magas. Ezt úgy érték el, hogy a hosszú élettartamú eurórium lumineszcenciát elkülönítetten detektálták egy időablakban, ahol a rövid-élettartamú autofluoreszcencia már lecsengett (Seveus L és *mtsai*, 1994). Kifejezetten áramlási citometriás alkalmazásokra fejlesztettek ki egy olyan matematikai modellt, amely az

autofluoreszcencia és a specifikus fluoreszcencia közötti lehetséges korrelációra épül (Corsetti J.P. és *mtsai*, 1988). Ez a modell azonban sejtenkénti autofluoreszcencia korrekcióra nem alkalmas, csak az eloszlás hisztogramok korrekcióját végzi az úgynevezett pozitív és negatív sejtek jobb elkülönítése érdekében (Corsetti J.P. és *mtsai*, 1988). Az autofluoreszcencia sejtenkénti „több-szín” (multicolor) kompenzációját fejlesztették ki áramlási citométerre egy- (Roederer M és Murphy RF, 1986; Schreiber S és *mtsai*, 1991), illetve két-lézeres gerjesztés alkalmazásával (Alberti S és *mtsai*, 1987; Alberti S és *mtsai*, 1991; Malley A és *mtsai*, 1988; Steinkamp JA és Stewart CC, 1986). Ezek az eljárások azon a megfigyelésen alapulnak, hogy az autofluoreszcencia és a specifikus fluoreszcencia gerjesztési és emissziós spektrumai különbözőek. Az autofluoreszcencia legalább két spektrális tartományban jelentkezik erőteljesebben. Az egyik 365 nm-en gerjeszhető és 445 nm körül detektálható (kék), míg a másik komponens 440 nm-en gerjeszhető és 520 nm-en emittál (zöld). A zöld emisszió különösen zavarja a fluoreszcencia emisszióját. Mivel a kék és zöld spektrális tartományokban az autofluoreszcencia magasabb, mint a vörösben, ezért a hosszabb hullámhosszokon történő gerjesztés és emisszió detektálás csökkenti az autofluoreszcencia részesedését a specifikus fluoreszcencia jelhez képest (Fuchs HJ és *mtsai*, 1988; Loken MR és *mtsai*, 1987). Így azok az újonnan kifejlesztett fluoreszkáló festékek, amelyek gerjesztési és emissziós spektruma a vörös régióban van, alkalmasabbak FRET vizsgálatokhoz, mint a sokkal népszerűbb, konvencionálisan használt fluoreszcencia-rodamin pár. Ebben a vonatkozásban ígéretesnek bizonyulnak a karbocianin Cy3, Cy5 és Cy7 festékek, melyeket FRET mikroszkópiás mérésekhez korábban már sikeresen alkalmaztak (Bastiaens PI és *mtsai*, 1996; Kenworthy AK, 2001; Ng T és *mtsai*, 1999; Wouters F.S. és *mtsai*, 1998).

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Munkánk során elsődleges célunk az volt, hogy megismerjük a CD45 fehérje tirozin foszfatáz különböző izoformáinak – feltehetően eltérő - szerepét a TCR által közvetített jelátviteli folyamatok szabályozásában. Ezt az alábbi kérdésekkel kívántuk megközelíteni:

- Kimutatható-e fizikai kapcsolat a CD45 és a CD4/CD8 ko-receptorok között a membrán *intakt* struktúráját megőrző módszerrel? Van-e eltérés a CD45R0, CD45RBC és a CD45RABC izoformák között a fenti heteroasszociációt tekintve?
- Megfigyelhető-e a CD45 molekulák homoasszociációja, és ez hogyan változik az egyes izoformák esetén?
- Van-e funkcionális következménye az egyes CD45 izoformák esetében megfigyelhető hetero- és homoasszociációs eltéréseknek? Különbözik-e az egyes CD45 izoformákat kifejező sejtvonalak esetében a TCR jelátvitel erőssége?
- Az áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer módszer az alacsony számban kifejeződő sejt felszíni molekulák (mint például a CD45 izoformák expressziója transzfektált HPB-ALL T sejteken) esetében nem szolgáltat megbízható eredményt a membránfehérjék asszociációjáról. Ezért célul tűztük ki egy új, érzékenyebb módszer kidolgozását, ahol a magas autofluoreszcenciát sejtenként lehet korrigálni.
- Mivel a fluoreszcensen jelölt elsődleges antitestek hiányában, illetve a fluoreszcencia jel növelése érdekében gyakran indirekt immunfluoreszcens jelölés használata indokolt, ezért meg kívántuk vizsgálni, hogy ugyanazon intramolekuláris távolság esetén hogyan változik az energia transzfer

hatékonyság értéke, ha az építópokat különböző direkt illetve indirekt módszerekkel jelöljük meg.

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1 Sejtek tenyésztése**

Kísérleteinkhez CD45 negatív HPB-ALL sejtekből CD45R0, RBC és RABC izoformák stabil transzfekciójával nyert sejtvonalakat használtunk. Az egyes sejtvonalakat áramlási citometriás módszerrel szortírozták, melynek eredményeképpen az egyes klónok CD3, CD4, CD8 és CD45 expressziója összemérhető lett. A HPB-ALL T sejtvonalakat és az EBV transzformált JY humán B sejtvonalat (Frances Brodsky ajándéka, UCSF, San Francisco) RPMI 1640 médiumban tenyésztettük 10 % FCS és antibiotikumok jelenlétében (Hederer, R. A. és *mtsai*, 2000). A stimulációs kísérletekhez a HPB-ALL sejteket FCS-mentes RPMI-ben felfuszpendáltuk majd 20 percig 37 °C-on tartottuk. Ezután a sejteket biotinnal jelzett anti CD4 antitesttel, vagy biotin-anti-CD3 és biotin-anti-CD4 antitestek keverékével (1µg/ml) 2 percig inkubáltuk, majd a szuszpenzióhoz sztreptavidint adtunk (20 µg/ml).

Egészséges donorokból PBL-eket (peripheral blood lymphocytes) izoláltunk és egyláncú (sc) TCR:CD3ζ kiméra gén konstrukciót vittünk be retrovírusos transzdukcióval. A T limfociták tenyésztésére/felnövesztésére 25 mM Hepes, L-glutamin, 10 % humán szérum és 360 U/ml rIL-2 tartalmú RPMI 1640 médiumot használtunk (Willemsen R.A. és *mtsai*, 2000).

### **4.2 Antitestek**

#### *4.2.1 Antitestek a rutin FACS analízishez és sejt szortírozáshoz*

A CD3 ellenes UCHT1, a CD45 ellenes pán-CD45-FITC (F10-89-4 klón), a CD45R0 izoformára specifikus UCHL1-PE, a CD45RA ellenes CD45RA-PE (F8-11-13 klón) illetve a CD45RC (YTH80.103 klón) ellenes monoklonális antitestek a Serotec-től

származtak; a CD4 ellenes mAb-t (13B8.2 klón) a Beckman Coulter-től; a CD8 ellenes UCT4 mAb-t a Sigma-tól; míg a CD45RB ellenes PD7/26 antitestet a DAKO-tól szereztük be.

#### *4.2.2 Antitestek a FCET kísérletekhez*

A CD3 (MEM57, IgG2a), CD4 (MEM115, IgG2a) és CD8 (MEM31, IgG2a) ellenes monoklonális antitestek Prof. Vaclav Horejsitől származtak (Prága, Cseh Köztársaság); a pán-CD45 ellenes antitest (CD45.2, IgG1) S. Meuer (Heidelberg, Németország) ajándéka volt.

Az MHC-I molekulák nehéz lánc (W6/32, IgG2a $\kappa$ ) és a  $\beta$ 2-mikroglobulin (L368, IgG1 $\kappa$ ) ellenes antitestek Frances Brodsky ajándékai voltak. Az affinitás kromatográfiával tisztított, nyúlban termeltetett, egér ellenes  $\gamma$ 2a láncra specifikus IgG2a, és a nyúlban termeltetett, egér ellenes  $\gamma$ 1 láncra specifikus IgG1 a Rockland-től származott (Gilbertswille, PA.). Az affinitás kromatográfiával tisztított, Cy3- és Cy5-jelölt kecskében termeltetett, egér ellenes antitestek (könnyű és nehéz lánc specifikus) Fab fragmentumait a Jackson ImmunoResearch-től (West Grove, PA.) kaptuk. Az OKT-3 (CD3 ellenes) antitest a European Collection of Cell Cultures-től (Salisbury, Nagy-Britannia), míg a T sejt receptor V $\beta$ 1 lánc ellenes antitest (TCR V $\beta$ 1, IgG1) az Immunotech-től származott.

#### *4.2.3 Antitestek a stimulációs Western blot kísérletekhez*

A CD3-biotin (MCA-463B klón) és a CD4-biotin (MCA-1267B) antitestek a Serotec-től származtak. Az antitesteket streptavidinnel (Sigma) kötöttük keresztbe. Az immunprecipitációhoz Fb2 foszfortirozin, CD4 (QS4120) monoklonális antitesteket és kecske anti- $\zeta$  N39 (CT-11) antiszérumot használtunk. A Western blot kísérletekhez foszfortirozin (4G10), Vav és c-Cbl, ERK-1, ERK-2 és syk, p59fyn, foszfo-p44/42 MAP kináz, LAT és p56<sup>lck</sup>, SLP-76, ZAP-70, TCR- $\zeta$  lánc ellenes antitesteket használtunk.

#### 4.2.4 *Fab fragmentumok preparálása*

Az antitestek Fab fragmentumait egy már korábban ismertetett módszer szerint állítottuk elő (Szöllősi és mtsai, 1996). A teljes antitestet pH = 8.00 PBS-be (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) átdializáltuk, majd L-cisztein jelenlétében (11 percig 37 °C-on) papainnal emésztettük. Az emésztést jódeacetammiddal állítottuk le, az Fab és Fc fragmentumokat tartalmazó frakciókat Sephadex G-100 oszlopon választottuk el. Végül az Fab fragmentumokat protein A oszlop alkalmazásával szeparáltuk el az Fc résztől.

#### 4.2.5 *Antitestek és Fab fragmentumok konjugálása fluoreszcens festékekkel*

Az antitesteket vagy azok Fab fragmentumait fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) vagy tetrametil-rodamin-izotiocianáttal (TRITC) illetve szulfoindocianin festékek (Cy3 és Cy5) szukcinimidil észter származékaival jelöltük korábban leírt módszerek alapján (Jenei, A. és mtsai, 1997; Szöllősi J és mtsai, 1989; Szöllősi, J. és mtsai, 1987). Az antitesthez nem kötődött festéket gél-szűréssel távolítottuk el Sephadex G-25 oszlop segítségével. A festék-fehérje jelölési arányt spektrofotometriásan határoztuk meg, melynek értéke körülbelül 3:1 volt teljes IgG esetében, míg Fab fragmentumoknál 1:1.

### **4.3 Sejtfelszíni antigének jelölése antitestekkel FCET mérésekhez**

A sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben (pH 7.4), majd kb. 1 millió sejtet szuszpendáltunk fel 100 µl 1% BSA (Bovine Serum Albumin) tartalmú PBS-ben. A sejteket ezután 40 percig, jégen, sötétben jelöltük a megfelelő fluorofórral konjugált monoklonális antitestek vagy azok Fab fragmentumainak telítő koncentrációjával. Indirekt jelölés esetén a sejteket jelöletlen monoklonális antitestekkel inkubáltuk, majd kétszer mostuk hideg PBS-ben, ezután jelöltük Cy3- vagy Cy5-konjugált poliklonális, másodlagos (nyúlban termeltetett,

egér ellenes IgG  $\gamma 1$  vagy  $\gamma 2a$  láncra specifikus) antitesttel. Az alosztály specifikus másodlagos antitesteknél nem tapasztaltunk kimutatható keresztreakciót más IgG alosztályokkal. Ezt megfelelő kontroll mintákkal igazoltunk (elsődleges antitest IgG1, másodlagos antitest IgG2a-ellenes). Azokban az esetekben, amikor kecskében termeltetett egér ellenes, nem alosztály specifikus poliklonális antitestek (GAMiG) Fab fragmentumait használtuk indirekt jelölésre, az alábbi jelölési szekvenciát alkalmaztuk: (1) jelöletlen W6/32 antitest; (2) Cy3-jelölt GAMiG Fab fragmentumok; (3) jelöletlen GAMiG Fab fragmentumok 50  $\mu\text{l/ml}$  koncentrációban (célja a W6/32 antitesten megmaradt szabad másodlagos antitest kötőhelyek blokkolása). A következő lépésben (4) a sejteket L368 monoklonális antitesttel jelöltük, amit (5) Cy5-konjugált GAMiG Fab fragmentumaival való jelölés követett. A Cy5-jelölt másodlagos antitest nem kötődött a W6/32 antitesthez, amit megfelelő kontroll mintákkal igazoltunk (elsődleges monoklonális antitest, Cy3-konjugált másodlagos Fab fragmentumok, blokkolás, Cy5-jelölt másodlagos Fab fragmentumok). Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk és 1%-os hideg formaldehidben fixáltuk. Az élő illetve a formaldehiddel fixált sejteken kapott eredmények között a mérési hibán belül nem volt eltérés.

#### **4.4 Áramlási citometriás energia transzfer mérések**

A fluoreszcenncel és rodaminnal jelzett antitestek közötti energia transzfer mérésekhez FACScan (Becton Dickinson) áramlási citométert használtunk. A donor fluoreszcenciát egy argon ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, és  $530\pm 30$  nm-es sávszűrő alkalmazásával detektáltuk. A donor fluoreszcenciáját hasonlítottuk össze duplán jelölt (donor és akceptor) sejtek, illetve olyan minták között, ahol az akceptoros antitestet annak jelöletlen formájával helyettesítettük. Így ki tudtuk küszöbölni a donor és akceptor

antitest esetleges kompetíciója okozta hatásokat. Az energia transzfer hatékonyságot a donor fluoreszcenciájának az akceptor jelenlétében tapasztalt százalékos csökkenéséből számítottuk.

A Cy3 és Cy5 festékpár alkalmazásakor kísérleteinkhez a Becton Dickinson FACSCalibur típusú áramlási citométerét (Becton Dickinson, San Jose, CA) használtuk. Négy fluoreszcencia intenzitást mértünk, melyek paramétereit az I. táblázat foglalja össze. Az előre és oldalra irányuló fényszórás alapján kapuztuk ki a sejtörmeléket és az élettelen sejteket. A donor és akceptor jelölt antitestek átlagos távolságát jellemző energia transzfer hatékonyságot a detektált négy fluoreszcencia paraméterből sejtenként számoltuk ki. Az energia transzfert 10000 sejten számolt értékek átlagaként adjuk meg. A sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciót az eredmények fejezetben tárgyaljuk.

csatorna	gerjesztési hullámhossz	emissziós hullámhossz
<i>FL1</i> (autofluoreszcencia)	488 nm	530±15 nm
<i>FL2</i> (donor)	488 nm	585±21 nm
<i>FL3</i> (energia transzfer)	488 nm	670 nm felett
<i>FL4</i> (akceptor)	635 nm	661±8 nm

**I. táblázat** Az áramlási citometriás energia transzfer mérések során használt detektálási csatornák gerjesztési és emissziós jellemzői.

#### **4.5 Az antitesthez konjugált fluoreszcens festékek abszorpció és gerjesztési spektrumának meghatározása**

A FCET számítások az úgynevezett effektív jelölési arányon alapulnak, ami a fluoreszkáló konjugátum festék részének kvantum hatékonyság változásait veszi figyelembe. A fluoreszcensen jelölt IgG-k és Fab fragmentumok relatív kvantumhatásfokát spektrofluorimetriásan határoztuk meg. Először a jelölt antitest oldat abszorbanciáját határoztuk meg a festék gerjesztési hullámhosszán. Ezután a jelölt antitest korigált

fluoreszcencia emissziós spektrumát vettük fel, majd a teljes emissziós hullámhossz tartományra integráltuk. Standardként 0.1 M NaOH-ban feloldott fluoresceint használtunk, aminek a fluoreszcencia kvantumhatásfoka ilyen körülmények között a hullámhossztól függetlenül 0.92 volt. Az ismeretlen fluoreszcencia kvantumhatásfokát az (1.4) egyenlet szerint számítottuk ki:

$$Q_{dye} = \frac{E_{dye}}{E_{st}} \cdot \frac{A_{st}}{A_{dye}} \cdot Q_{st} \quad (4)$$

ahol az  $E_{dye}$  és  $E_{st}$  a jelölt antitest és a fluoreszcein standard integrált fluoreszcencia intenzitását jelöli, az  $A_{dye}$  és  $A_{st}$  az antitest és a standard festék oldat abszorbancia értékeit mutatja, amit a fluoreszcencia emissziós spektrum meghatározásánál használt gerjesztés hullámhosszán mértünk, és a  $Q_{st}$  a standard fluoreszcencia kvantum hozama.

#### **4.6 Immunprecipitáció és immunoblotting**

A stimulált sejteket 10 percig, 4 °C-on az alábbi oldatban lizáltuk: 1 % Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM Na-ortovanadát és proteáz gátlók. A sejtmagokat és a sejtörmeléket centrifugálással (10 perc, 10,000 rpm, 4 °C) távolítottuk el. A teljes sejtízátum immunoblot analíziséhez a mintákat ( $10^6$  sejt) Laemmler pufferbe tettük és 5 percig főztük. A TCR $\zeta$  immunprecipitációhoz a mintákat 40  $\mu$ l 50 % protein G-Sepharose Bead-del forgattuk. Az így előtisztított lizátumokat 4 °C-on 60 percig vagy egy éjszakán keresztül inkubáltuk az immunprecipitáló antitesttel. Az immun-komplexek kinyeréséhez 50 % G-Sepharose Bead-eket használtunk. A pelletet lízis pufferben mostuk, majd szeparálásához 7.5-15 % gradiens gélt használtunk. A CD4 immunprecipitációhoz a sejteket CD4 antitesttel fedtük. Az *in vitro* kináz mérés során az immun-komplexeket kináz pufferben mostuk (Pipes, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na-ortovanadát,

AEBSF). A kináz reakció elindítását ditiotreitól, ATP és [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP tartalmú kináz pufferrel végeztük. 10 perces szobahőmérsékleten való inkubálás után a reakciót Laemmli puffer hozzáadásával és, forralással állítottuk le. Az immunoblotok és autoradiográfok kiértékelését LAS-1000 CCD kamera és AIDA képelemző szoftver segítségével végeztük.

## **5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK**

### **5.1 Áramlási citometriás energia transzfer mérések sejtenkénti háttérlevonással**

Az áramlási citometriás energia transzfer (FCET) mérés a sejtfelszíni molekulák közötti, illetve a molekulákon belüli távolságviszonyok vizsgálatára alkalmas érzékeny módszer. Azokban az esetekben, amikor a vizsgált sejtfelszíni receptorok száma megfelelően magas, tehát a sejtek autofluoreszcenciája csak kis mértékben járul hozzá a mért fluoreszcencia jelhez, a hagyományosan használt fluoreszcein és rodamin, vagy az ezekhez hasonló spektrális tulajdonságokkal rendelkező festékek jól alkalmazhatóak donor-akceptor párként. Az olyan vizsgálati rendszerekben azonban, ahol a jel/zaj arány alacsony (például az alacsony számban kifejeződő CD45 molekulák homoasszociációjának vizsgálata transzfectált HPB-ALL T sejteken), tapasztalataink szerint a korábban kifejlesztett FCET módszer nem alkalmazható. Cy3 és Cy5 festékeket használtunk donor/akceptor párként, melyek vörös tartományba eső emissziója nagymértékben csökkentette a sejtek autofluoreszcenciáját. Mivel a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma közötti átfedés mértéke a Cy3 és Cy5 illetve a fluoreszcein és rodamin festékpárok esetén igen hasonló, így az  $R_0$  értékeik is igen közeliak (5.0 nm és 5.6 nm) (Bastiaens PI és Jovin TM, 1996; Kosk-Kosicka, D. és mtsai, 1989).

Ezen kívül, a FCET módszert egy olyan matematikai összefüggéssel egészítettük ki, amely lehetővé teszi az autofluoreszcencia sejtenkénti korrekcióját. A konvencionális alkalmazás ugyanis minden jelölt sejt fluoreszcenciájából egy konstans autofluoreszcencia értéket vont le, amelyet a jelöletlen sejtek esetében mért autofluoreszcencia átlagértékéből számítanak. Mivel az autofluoreszcencia minden egyes sejt esetében különböző, a fenti korrekció jelentősen torzíthatja a specifikus fluoreszcencia értékét. Egyrészt az átlagosnál

alacsonyabb autofluoreszcenciájú sejtek így túlzott korrekciót szenvednek, ami alacsony specifikus jel esetében még negatív FRET értékeket is eredményezhet. Másrészt a magas autofluoreszcenciával rendelkező sejtek alul-korrigáltak. A fluoreszcencia jelek ilyen módon történő pontatlan korrekciója jelentős mértékben hathat az energia transzfer értékére, mivel a mért paraméterek egymással történő osztása elengedhetetlen, ami végül többszörös hibát eredményez a származtatott paraméterekben.

A hagyományos alkalmazásban a közvetlen donor fluoreszcenciát és a szenzitizált emissziót egyaránt egy argon ion lézer 488 nm-es vonala, míg az akceptor közvetlen emisszióját egy 514 nm-es lézervonal gerjeszti, így összesen három fluoreszcencia jel detektálása szükséges. A módosított FCET módszerben egy negyedik fluoreszcencia jel mérését vezettük be, amely független paraméterként a sejtenkénti autofluoreszcencia meghatározását tette lehetővé. Mivel Cy3 és Cy5 festékeket használtunk donor-akceptor párként, ezek gerjesztésére egy argon ion lézer 488 nm-es vonalát illetve egy vörös dióda lézer 635 nm-es vonalát használtuk. A Cy3 emissziós maximuma (565 nm) az *FL2* csatorna detektálási tartományába esik, míg a Cy5 emissziójának maximuma (667 nm) az *FL3* és *FL4* csatornában detektálható. Az autofluoreszcencia detektálására használt *FL1* csatornába (530 nm) a Cy5 egyáltalán nem, míg a Cy3 csak kis mértékben világít át.

Az (1.6-1.9) egyenletek a négy detektált intenzitás összetételét írják le abban az esetben, amikor minden egyes fluoreszcencia komponens minden csatornában világít. A zárójelben lévő számok az *FL1-FL4* csatornában mért fluoreszcenciák gerjesztési és detektálási hullámhosszára vonatkoznak. *AF* az 1. csatornában mért autofluoreszcencia intenzitást, *I<sub>D</sub>* a 2. csatornában mért kioltatlan donor fluoreszcenciát, *I<sub>A</sub>* a 4. csatornában mért direkt gerjesztett akceptor intenzitást, míg *E* az energia transzfer hatékonyságát jelöli.

$$FL1(488,530) = AF + I_D(1-E) \cdot S_5 + I_A \cdot S_6 + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{S_6}{S_2} \quad (5)$$

$$FL2(488,585) = AF \cdot B_2 + I_D(1-E) + I_A \cdot S_4 + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{S_4}{S_2} \quad (6)$$

$$FL3(488, > 670) = AF \cdot B_3 + I_D(1-E) \cdot S_1 + I_A \cdot S_2 + I_D \cdot E \cdot \alpha \quad (7)$$

$$FL4(635,661) = AF \cdot B_4 + I_D(1-E) \cdot S_3 + I_A + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{1}{S_2} \cdot \frac{\epsilon_{635}^D \cdot \epsilon_{488}^A}{\epsilon_{488}^D \cdot \epsilon_{635}^A} \quad (8)$$

Az  $S_1$ - $S_6$  és  $B_2$ - $B_4$  faktorok az egyes csatornák közötti un. spektrális átvilágítást számszerűsítik. A  $\frac{\epsilon_{488}^A \epsilon_{635}^D}{\epsilon_{635}^A \epsilon_{488}^D}$  kifejezés a donor és akceptor gerjesztési hullámhosszain (488 és 635 nm) meghatározott moláris abszorpciós együtthatók hányadosa. Az  $\alpha$  paraméter a donor és az akceptor detektálásának relatív hatékonyságát és relatív kvantum hasznosítását írja le, pontos meghatározása „Az  $\alpha$  faktor meghatározása” című alfejezetben található. Az  $S_1$ ,  $S_3$  és  $S_5$  meghatározását csak Cy3-mal (donor) jelölt sejteken végeztük az alábbi egyenletek szerint:

$$S_1 = \frac{FL3}{FL2} \quad (9)$$

$$S_3 = \frac{FL4}{FL2} \quad (10)$$

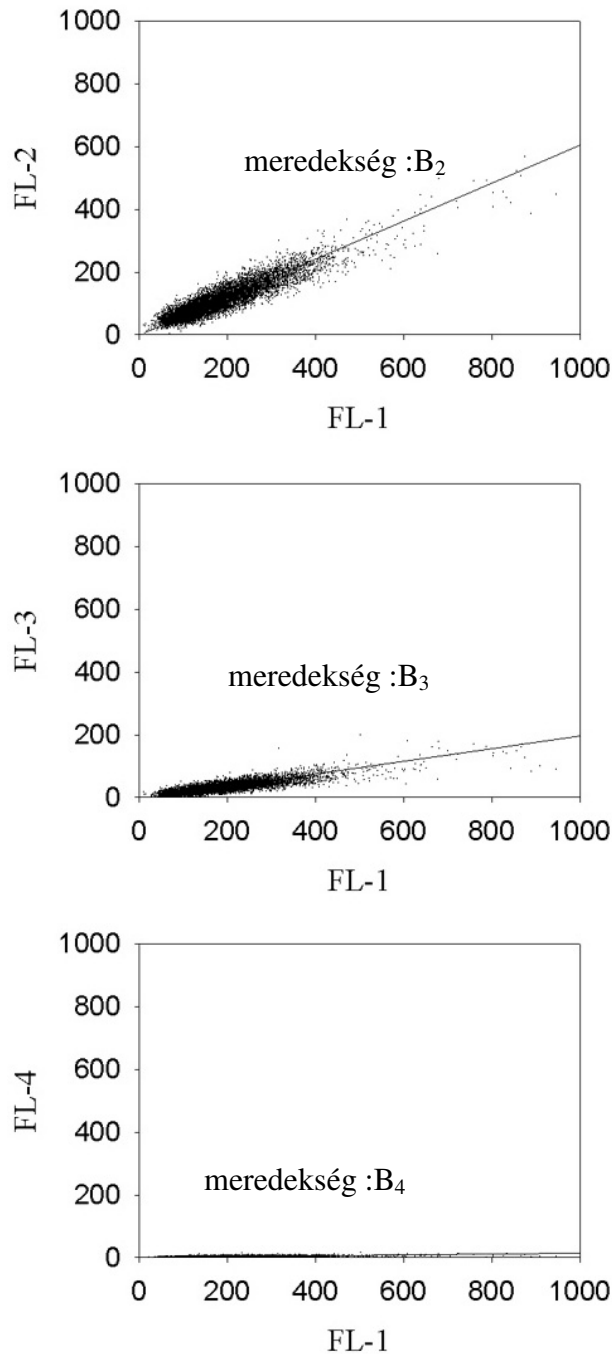
$$S_5 = \frac{FL1}{FL2} \quad (11)$$

Az  $S_2$ ,  $S_4$  és  $S_6$  faktorokat csak Cy5-tel (akceptor) jelölt sejteken határoztuk meg az alábbi egyenletek szerint:

$$S_2 = \frac{FL3}{FL4} \quad (12)$$

$$S_4 = \frac{FL2}{FL4} \quad (13)$$

$$S_6 = \frac{FL1}{FL4} \quad (14)$$



**5. ábra:** Az egyes csatornában detektált autofluoreszcencia jelek korrelációi. Az autofluoreszcencia spektrum egyes csatornában jelenlévő frakcióinak arányai a  $B$  faktorok, melyek megfelelnek az illesztett egyenesek meredekségeinek. Az  $FL1$  jelet 488 nm-es gerjesztésnél és 530±15 nm emisszióánál mértük, az  $FL2$ -t 488 nm-es gerjesztésnél és 585±21 nm-es emisszióánál, az  $FL3$ -at 488 nm-es gerjesztésnél és 670 nm feletti emisszióánál, míg az  $FL4$ -et 635 nm-en gerjesztve 661±8 nm-es emisszióánál detektáltuk.

A  $B_2$ ,  $B_3$  és  $B_4$  faktorokat jelöletlen sejteken határoztuk meg az alábbi egyenletek szerint:

$$B_2 = \frac{FL2}{FL1} \quad (15)$$

$$B_3 = \frac{FL3}{FL1} \quad (16)$$

$$B_4 = \frac{FL4}{FL1} \quad (17)$$

Az  $FL2$  és az  $FL3$  is jó korrelációt mutatott az  $FL1$ -gyel ( $r=0.91$  az  $FL2$ - $FL1$  korreláció esetében,  $r=0.85$  az  $FL3$ - $FL1$  esetében,  $p<0.001$  mindkét esetben), ami a  $B_2$  és  $B_3$  állandók használhatóságát hitelesíti a sejtenkénti autofluoreszcencia korrekcióban. Az  $FL4$  és  $FL1$  közötti korreláció szintén jó, azonban az  $FL4$  csatornában mérhető autofluoreszcencia olyan alacsony, hogy a  $B_4$  elhanyagolható lenne (5. ábra). A  $B_4$  konstans ellenére felhasználjuk a számításban a minél pontosabb energia transzfer hatékonyság értékek meghatározása érdekében. A sejtenkénti autofluoreszcencia korrekció az  $FL2$  és  $FL3$  csatornában a legfontosabb, mivel ezekben a csatornában, szemben az  $FL4$  csatornával az autofluoreszcencia nem elhanyagolható. Ezen kívül az  $FL2$  jel pontatlan meghatározása jelenti a legnagyobb hibaforrást az energia transzfer számításában (Szöllösi J és *mtsai*, 1987).

A FACSCalibur szűrő és dikroikus tükör szettjét használva az  $S_3$ ,  $S_4$  és  $S_6$  faktorok nullának bizonyultak, az  $\frac{\epsilon_{488}^A \epsilon_{635}^D}{\epsilon_{635}^A \epsilon_{488}^D}$  hányados értéke szintén nulla volt, ami a (1.5)-(1.8) egyenleteket nagymértékben leegyszerűsítette. Az egyenletek megoldása az  $A$  paramétert eredményezi:

$$\mathbf{A} = \frac{\mathbf{E}}{1 - \mathbf{E}} = \tag{18}$$

$$\frac{1}{\alpha} \cdot \frac{\mathbf{FL1} \cdot (\mathbf{B}_2 \mathbf{S}_1 + \mathbf{B}_4 \mathbf{S}_2 - \mathbf{B}_3) + \mathbf{FL2} \cdot (\mathbf{B}_3 \mathbf{S}_5 - \mathbf{S}_1 - \mathbf{B}_4 \mathbf{S}_2 \mathbf{S}_5) + \mathbf{FL3} \cdot (1 - \mathbf{B}_2 \mathbf{S}_5) + \mathbf{FL4} \cdot \mathbf{S}_2 \cdot (\mathbf{B}_2 \mathbf{S}_5 - 1)}{\mathbf{FL2} - \mathbf{FL1} \cdot \mathbf{B}_2}$$

A fenti egyenletből a FRET hatékonyság ( $E$ ) értéke az alábbi módon fejezhető ki:

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{A}}{1 + \mathbf{A}} \tag{19}$$

## 5.2 Az $\alpha$ faktor meghatározása

Az  $\alpha$  faktor egy gerjesztett akceptor molekula fluoreszcenciájának detektálási hatékonyságát határozza meg egy gerjesztett donor molekula emissziójának detektálási hatékonyságára vonatkoztatva. A szenzitizált akceptor emisszióból származó jel a donorról az akceptorra átszállított gerjesztő kvantumok számával arányos, így arányos az  $I_D E$  kifejezéssel. Az  $\alpha$  mint arányossági faktor kísérletesen is meghatározható az alábbi fluoreszcencia jelek arányából: az  $FL3$  jel  $N$  számú gerjesztett akceptor molekulától, míg az  $FL2$  jel  $N$  számú gerjesztett donor molekulától származik. Az  $\alpha$  függ a festékek kvantum hasznosításától (a donor esetében  $Q_D$ , az akceptor esetében  $Q_A$ ), és a megfelelő csatornák detektálási hatékonyságától, amint az alábbi egyenletben látható:

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_A}{Q_D \eta_D} \tag{20}$$

ahol  $\eta_D$  és  $\eta_A$  a 2. és 3. csatornák detektálási hatékonyságát mutatják azon fotonokra vonatkozva, melyek a donor illetve akceptor emisszió hullámhossz eloszlását mutatják. Az  $\alpha$  paramétert kísérleti úton úgy határoztuk meg, hogy a csak donorral jelölt minta  $FL2$  jelét a csak akceptorral jelölt minta  $FL3$  jeléhez viszonyítottuk:

$$\alpha = \frac{FL^3_A \cdot B_D \cdot L_D \cdot \varepsilon_D}{FL^2_D \cdot B_A \cdot L_A \cdot \varepsilon_A} \quad (21)$$

ahol  $B$  jelöli a megfelelő antitesttel megjelölt fehérje sejtenkénti átlagos számát,  $L$  mutatja a festékmolekulák átlagos számát egy antitest molekulán, míg  $\varepsilon$  a festékek 488 nm-en meghatározott moláris abszorpciós együtthatója; az  $A$  és  $D$  indexek a donorra illetve az akceptorra vonatkoznak. A  $B$ ,  $L$  és  $\varepsilon$  paramétereiből képzett arányok a csak donorral, illetve a csak akceptorral megjelölt minták által elnyelt fotonok számának különbségét korrigálják.

Az egyes festékek fluoreszcencia kvantum hasznosítása függhet attól, hogy milyen fajtájú antitesthez kapcsolódik, sőt ez változhat a jelölési aránnyal ( $L$ ) is. Mindez természetesen befolyásolja az  $\alpha$  értékét. Egy adott donor-akceptor antitest pár esetében meghatározott  $\alpha$  faktor más antitest párokra is használható, ha ezek ugyanazon festékekkel jelöltek, azzal a feltétellel, hogy az eredeti  $\alpha$  faktor értékét korrigálni kell a kvantum hasznosítás különbségével:

$$\alpha_2 = \alpha_1 \frac{Q_{A,2} \cdot Q_{D,1}}{Q_{A,1} \cdot Q_{D,2}} \quad (22)$$

ahol az „1” index jelöli azt az antitest párt, amelyre az  $\alpha$  faktort meghatároztuk, míg a „2” index az új antitest párra vonatkozik.

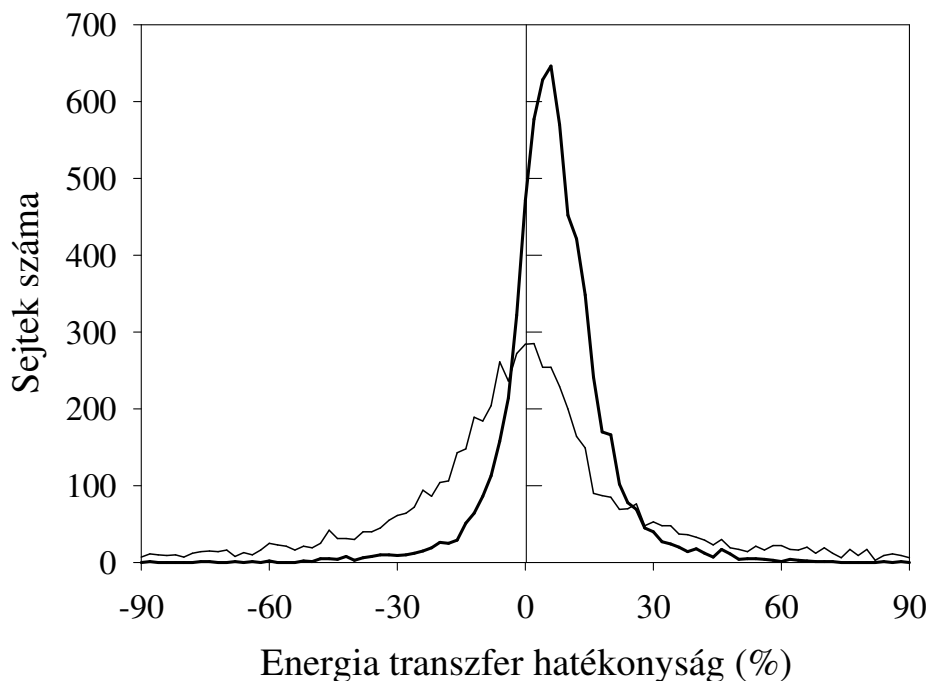
### **5.3 A FCET módszer megnövelt érzékenysége a háttér sejtenkénti levonását követően**

Az eredeti FCET módszer módosítása, amely az autofluoreszcencia sejtenkénti levonását is magában foglalja, a technika sokkal szélesebb körű alkalmazhatóságát teszi lehetővé. Olyan rendszereken is használhatóvá válik, ahol a vizsgálni kívánt receptorok száma alacsony. A továbbfejlesztett módszer érzékenységét két olyan biológiai rendszeren

ellenőriztük, melyeknél a korábbi FCET technika alkalmazása eredménytelen volt: az egyik rendszer esetében a receptorok homoasszociációjának meghatározását a rendkívül alacsony receptor-szám akadályozta, míg a másik esetben a sejtek heterogénnek mutatkoztak az adott sejtfelszíni molekulák kölcsönhatását illetően.

### *5.3.1 Alacsony számban kifejeződő CD45 molekulák homoasszociációjának meghatározása*

Transzfektált HPB-ALL T sejt vonalon a CD45R0 izoforma expressziója túl alacsony volt ahhoz, hogy a konvencionális FCET módszert használva pontosan meghatározzuk ezeknek a molekuláknak a homoasszociációját. A Cy3-CD45.2 Fab fragmentummal jelölt sejtek esetében kapott *FL2* hisztogram középértéke ugyanis mindössze kétszerese volt a jelöletlen sejteken mért autofluoreszcencia középértékének (jel:autofluoreszcencia aránya 1:1). Vizsgálatunkban összehasonlítottuk a hagyományos, illetve a sejtenkénti háttérlevonással módosított energia transzfer meghatározási módszert. A 6. ábrán a két módszerrel kapott energia transzfer eloszlás hisztogramok jól demonstrálják, hogy a módosított FCET módszer megbízhatóbb eredményt szolgáltat a homoasszociáció mérésére. A sejtenkénti háttérlevonást követően a hisztogram az energia transzfer hatékonyság pozitív tartománya felé tolódott, amihez a görbe standard deviációjának alacsony értéke társult (az *a* görbe esetén a hisztogram középértéke  $\pm$  SD = 4.9 ( $\pm$  2.6) %, összehasonlítva a hagyományos háttérlevonással kapott eredménnyel, ahol egy konstans autofluoreszcencia értéket használtunk (a *b* görbe esetén a hisztogram középértéke = -0.1 ( $\pm$  7.6) %).



**6. ábra:** A sejtenkénti háttérlevonás hatása a FRET hatékonyság eloszlására alacsony jel/zaj arány esetén. CD45 R0 izoformával transzfektált CD45 negatív HPB-ALL T sejteket jelöltünk Cy3-mal és Cy5-tel konjugált CD45 pán antitest Fab fragmentumaival. A FRET hatékonyságot sejtenkénti autofluoreszcencia korrekcióval (vastag vonalú görbe) (hisztogram középértéke  $\pm$  SD =  $(4.9 \pm 2.6)$  %) illetve a specifikus jelből konstans háttér érték levonásával is elvégeztük (vékony vonalú görbe) (hisztogram középértéke  $\pm$  SD =  $(-0.1 \pm 7.6)$  %).

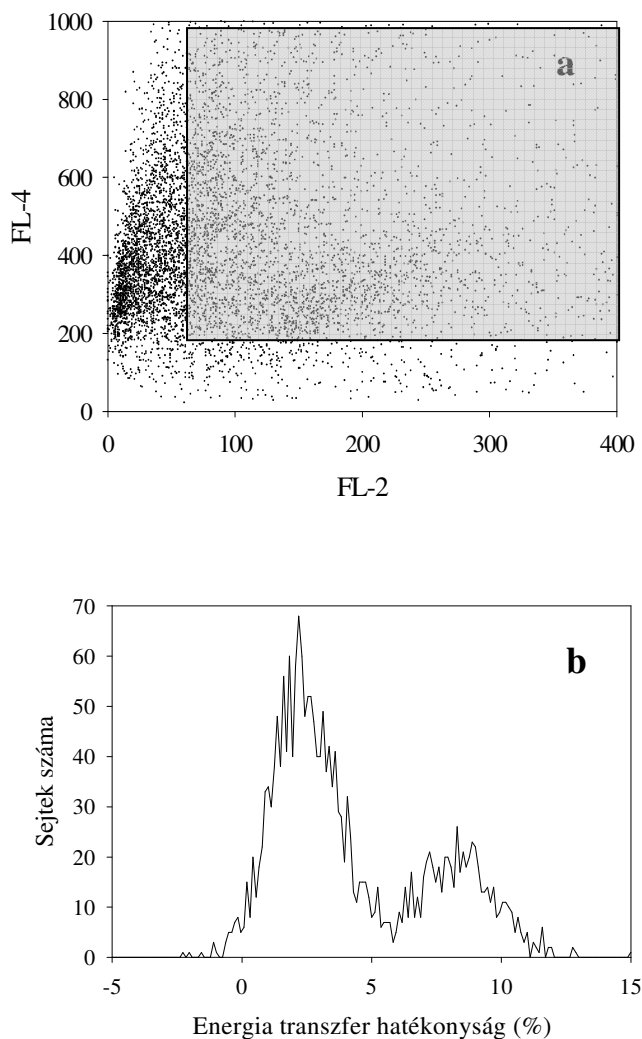
### 5.3.2 Endogén TCR kifejeződés, mint “kontamináció” kimutatása T sejtek felszínén

#### *scTCR:CD3. $\zeta$ kiméra receptor retrovírusos transzdukcióját követően*

Előfordulhat, hogy a biológiai minták olyan sejtpopulációkat tartalmaznak, amelyeken a vizsgált fehérjék különböző mértékben asszociálódnak egymással. Bár az ilyen sejtpopulációk elkülönítése rendkívül fontos lenne, a hagyományos FCET módszerben elterjedt festék-párok (mint a fluoreszcein és rodamin) használata ezt jelentősen megnehezítette. Ugyanis – különösen alacsony receptor expresszió esetén - az energia

transzfer eloszlásának nagy szórása miatt bonyolult az alpopulációk megkülönböztetése. Az általunk kifejlesztett új FCET módszert alkalmazva sokkal pontosabban megkülönböztethetők az eltérő energia transzfer hatékonyságot mutató sejt populációk.

Primer humán T sejteken egyszálú kiméra T sejt receptor (scTCR:CD3.ζ) vírusos transzdukcióját követően a bevitt kiméra TCR és endogén CD3 molekula között végzett FCET mérések azt mutatták, hogy a kívülről bevitt kiméra TCR molekulák membrán topológiája eltér a teljes láncú, módosítatlan TCR láncokétól. Az így módosított T sejtek nagy része a scTCR:CD3.ζ láncot fejezte ki (vagyis a sejtek Vα12 és Vβ1 antigénre is pozitívak voltak), azonban a sejtek egy kis alpopulációja, amely az endogén TCR láncot expresszálta (vagyis a sejtek csak a Vβ1 antigénre voltak pozitívak), a várt FRET értéket számottevő mértékben befolyásolta. Ebben a különleges esetben az energia transzfer hisztogram eloszlása két csúccsal volt jellemezhető a korábban tapasztalt egymódusú eloszlással szemben. Amint a 7. ábrán látható, a Cy5 festékkel megjelölt CD3 ellenes molekula és a Cy3 festékkel jelzett TCR Vβ1 lánc ellenes antitest között meghatározott energia transzfer hatékonyság hisztogramja két élesen elváló csúccsal rendelkezik. Az elkülönülő csúcsokhoz tartozó középtérték megközelítőleg 2 és 8 %: az alacsony FRET értékű csúcs képviseli azokat a sejteket, melyek az *exogén* scTCR:CD3.ζ láncot fejezik ki, míg az *endogén* TCRβ-t kifejező sejtek alkotják a magas energia transzfer értékű csúcsot.

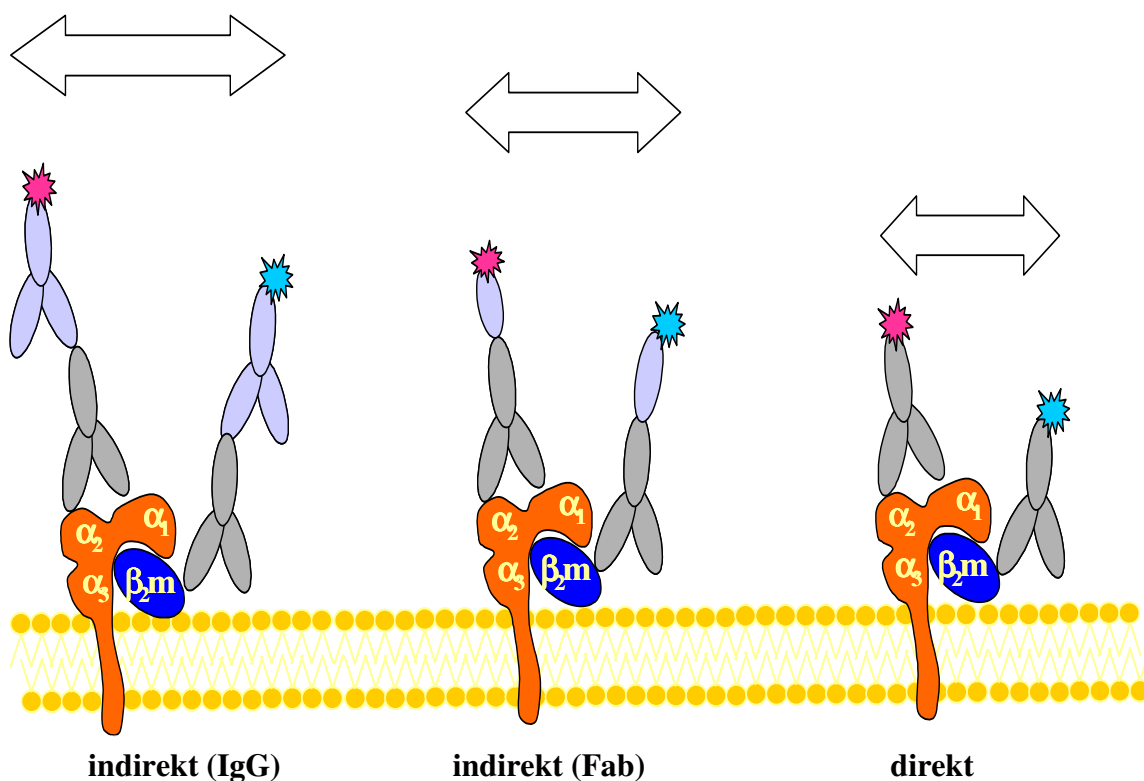


**7. ábra:** A megnövelt érzékenységű új módszer lehetővé teszi olyan sejtpopulációk megkülönböztetését, melyek az energia transzfer hatékonyságukban különböznek. Humán T limfocitákon scTCR:CD3 $\zeta$  kiméra receptor retrovírusos géntranszdukcióját végezték. Az energia transzfert a Cy3-mal jelzett TCR:CD3 $\zeta$  kiméra molekulák és a Cy5-tel jelölt endogén CD3 molekulák között mértük. A scTCR:CD3 $\zeta$  kiméra receptort jelöletlen TCR-V $\beta$ 1 antitesttel, majd Cy3-mal konjugált GAMiG poliklonális antitesttel, míg a CD3 molekulát Cy5-tel jelzett OKT3 monoklonális antitesttel jelöltük. Az FL2 (V $\beta$ 1 + Cy3-GAMiG) és FL4 (Cy5-OKT3) bivariáns hisztogramon a magasabb fluoreszcencia intenzitással rendelkező sejteket kikapuzva (a) két módusú FRET hatékonyság eloszlást kaptunk (b).

## **5.4 Az immunfluoreszcens jelölés geometriája befolyásolja a FRET hatékonyságot**

A FRET módszer alkalmazását gyakran akadályozza a donor-akceptor párként használható fluoreszcensen jelzett monoklonális antitestek hiánya. A probléma megoldását másodlagos antitestek vagy azok Fab fragmentumainak használata jelentheti. Az indirekt immunfluoreszcens jelölés esetében az antitest-komplexek megváltozott geometriája a direkt jelölésnél megfigyelt energia transzfer hatékonyságot jelentősen befolyásolja. Modell rendszerként JY sejtek MHC I molekuláinak két epitópját (nehéz lánc és  $\beta$ 2-mikroglobulin) választottuk, melyek távolságviszonyait az intézetünkben végzett korábbi FRET vizsgálatokkal már jól karakterizálták (Gáspár, R. J. és *mtsai*, 2001). Ennek a molekulán belüli (intramolekuláris) energia transzfernek a segítségével kívántuk vizsgálni, milyen hatása van az indirekt jelölésnek a mért energia transzfer hatékonyságra. Ennek érdekében számos jelölési elrendezést teszteltünk a módosított FCET módszer segítségével.

Immunfluoreszcens jelöléseink stratégiája a 8. ábrán látható. A különböző jelölési protokollokkal meghatározott FCET hisztogramok pontos elkülönítéséhez feltétlenül szükség volt vörösben emittáló fluoreszcens festékek alkalmazására. A hagyományos fluoreszcein-rodamin donor-akceptor pár használata, a magas autofluoreszcencia miatt nem tett volna lehetővé ilyen mértékű felbontást.

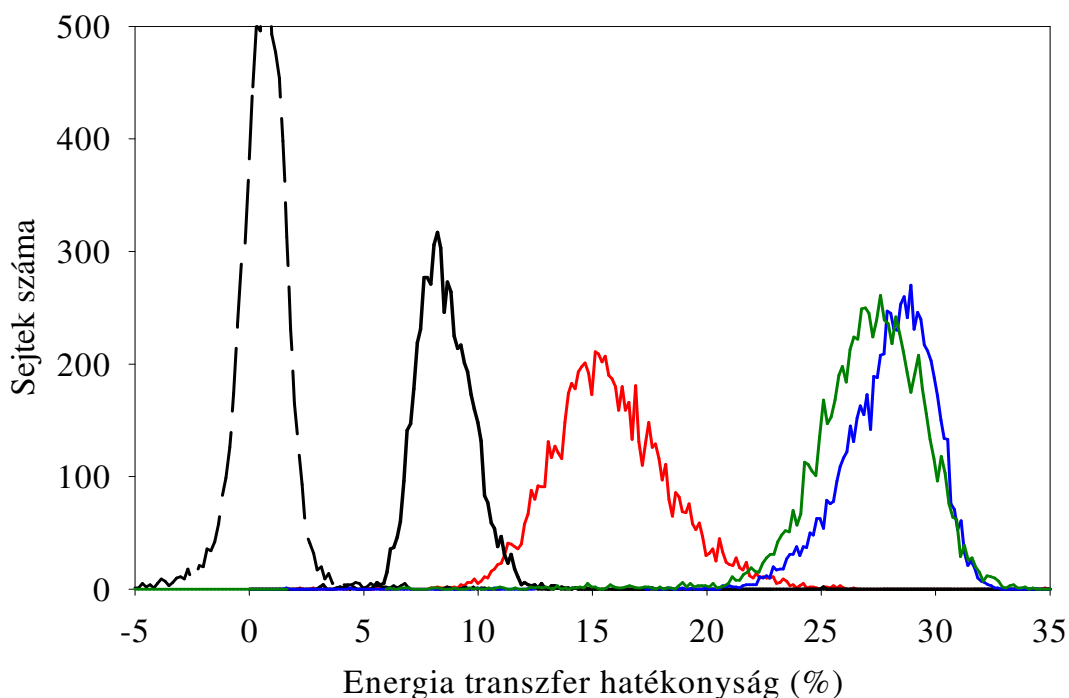


**8. ábra: Donor és akceptor molekulák jelölése eltérő módszerekkel.** A MHC I molekulák nehéz (az ábrán narancssárgával jelölve) és könnyű láncát ( $\beta_2m$ , az ábrán kékkel jelölve) jelöltük közvetlenül fluoreszcensen jelzett elsődleges antitesttel (az ábrán szürkével jelölve), illetve indirekt módszerrel, amikor jelöletlen elsődleges antitestet (az ábrán szürkével jelölve) majd fluoreszcensen jelzett GAMiGg Fab fragmentumát, vagy teljes RAMiGg molekulákat alkalmaztunk (az ábrán mindkettő világoskékkel jelölve). Vizsgálataink során fluoreszcensen konjugált elsődleges antitestekkel (Cy3-L368 + Cy5-W6/32), Fab fragmentumokkal (Cy3-L368 Fab + Cy5-W6/32 Fab) vagy jelöletlen primer antitesttel való jelölést követően fluoreszcensen konjugált poliklonális Fab fragmentumokkal (L368 + Cy3-GAMiGg Fab és W6/32 + Cy5-GAMiGg Fab) illetve jelöletlen primer antitestet követően fluoreszcens poliklonális teljes IgG-vel (L368 + Cy3-RAMiGg1 és W6/32 + Cy5-RAMiGg2a) jelöltük a sejteket. Az indirekt jelölések esetében több mint egy poliklonális antitest képes egyetlen elsődleges antitestre felkötődni. Az egyszerűség kedvéért azonban az ábrán csak egy másodlagos antitestet tüntettünk fel.

Azzal, hogy a MHC I molekula nehéz és könnyű láncát ( $\beta_2m$ ) W6/32 illetve L368 monoklonális antitestekkel direkt és indirekt módszerrel megjelöltük, az alkalmazott antitest komplexek méretét, így a donor és akceptor festékek távolságát jelentős mértékben

változtattuk. A másodlagos jelölések esetén a fluoreszcensen jelzett másodlagos antitestek vagy Fab fragmentumok koncentrációját úgy állítottuk be, hogy a donor-akceptor arány a direkt jelöléshez hasonlóan 1 körüli legyen. Így biztosak lehettünk abban, hogy az energia transzfer értékére a donor-akceptor arány nem volt hatással, vagyis azt elsősorban a festékmolekulák közötti távolság befolyásolta.

A donor és akceptor molekulák közötti távolság változásai jelentősen hatottak az energia transzfer értékekre, mint az a 9. ábrán látható.



**9. ábra:** A MHC I molekulák direkt és indirekt módszerekkel megjelölt nehéz és könnyű láncai között mért energia transzfer hatékonyságok eloszlása. A molekulákat direkt módon jelöltük teljes antitestekkel (kék görbe) vagy Fab fragmentumokkal (zöld görbe); indirekt módszerrel konjugátlan monoklonális antitesttel történő jelölés után fluoreszcensen jelzett poliklonális Fab fragmentumokkal (vörös görbe) vagy fluoreszcensen jelzett poliklonális teljes antitesttel (fekete görbe). A szaggatott vonalú görbe olyan sejtek FRET eloszlását mutatja, ahol a sejteket csak donorral (Cy3) konjugált elsődleges antitesttel jelöltük, így energia transzfer nem játszódott le.

A fluoreszcensen jelölt elsődleges antitestekkel vagy azok Fab fragmentumaival való jelölésnél mért energia transzfer hatékonyságokhoz képest (28-30 % körül, *kék* és *zöld* görbe) az epitópokat Cy3 illetve Cy5 festékekkel konjugált másodlagos Fab fragmentumokkal jelölve a FRET hatékonyság nagymértékű csökkenését (15 %, *vörös* görbe) tapasztaltuk. Amikor a sejtek jelöléséhez poliklonális teljes IgG-t használtunk a másodlagos Fab fragmentumok helyett, az energia transzfer további csökkenését figyelhettük meg (~ 8 %, *fekete* görbe). Az energia transzfer hatékonyság eloszlásának csúcsa annál inkább a nulla felé tolódott, minél nagyobb méretű antitest-komplexumot alkalmaztunk az epitópok megjelöléséhez.

Amint a II. táblázatban látható, ha a donor indirekt jelzésére Fab fragmentumot használunk, miközben az akceptort direkt módon jelöljük, az energia transzfer értéke a direkt és indirekt jelölésnél tapasztalt értékek közé esik (24 %). Érdekes módon a mindkét oldalon alkalmazott teljes másodlagos antitestes jelölés esetében megfigyelt FRET hatékonysághoz képest nem tapasztaltunk változást, ha az egyik oldalon direkt módszerrel jelöltük az epitópot (~ 9 %). A JY sejteken a hagyományos FCET módszerrel (ahol az autofluoreszcenciát konstans háttér levonásával korrigáltuk) mért adatok gyakorlatilag nem különböztek a továbbfejlesztett FCET módszerrel meghatározott értékektől (ahol az autofluoreszcenciát sejtenként korrigáltuk), mivel a JY sejten kifejeződő igen nagy számú MHC I molekula (körülbelül 1 millió molekula sejtenként) kitűnő jel-zaj arányt biztosított.

<b>Donor</b>	<b>Akceptor</b>	<b>FRET (%) <math>\pm</math> SD</b>
Cy3-W6/32	Cy5-L368	29.4 $\pm$ 1.9
Cy3-L368	Cy5-W6/32	30.5 $\pm$ 1.3
Cy3-W6/32 Fab	Cy5-L368 Fab	29.8 $\pm$ 5.2
Cy3-L368 Fab	Cy5-W6/32 Fab	27.1 $\pm$ 2.1
W6/32 + Cy3-GAMIgG Fab*	Cy5-L368	24.5 $\pm$ 0.4
L368 + Cy3-GAMIgG Fab	Cy5-W6/32	23.4 $\pm$ 1.6
W6/32 + Cy3-GAMIgG Fab	L368 + Cy5-GAMIgG Fab	19.9 $\pm$ 4.7
L368 + Cy3-GAMIgG Fab	W6/32 + Cy5-GAMIgG Fab	13.3 $\pm$ 3.5
W6/32 + Cy3-RAMIgG2a	L368 + Cy5-RAMIgG1	10.8 $\pm$ 2.8
L368 + Cy3-RAMIgG1	W6/32 + Cy5-RAMIgG2a	8.9 $\pm$ 2.5
W6/32 + Cy3-RAMIgG2a	Cy5-L368	8.1 $\pm$ 1.6
L368 + Cy3-RAMIgG1	Cy5-W6/32	9.6 $\pm$ 0.5

**II. táblázat** *Különböző protokollokkal megjelölt intramolekuláris epitópok közötti energia transzfer hatékonyságok áramlási citometriás mérése.* Az energia transzfer értékeit 10,000 sejt energia transzfer hisztogramjának középpértékeiből számítottuk, a közepes szórás (SD) értékeit öt független mérésből határoztuk meg. A W6/32 az MHC I molekula nehéz lánc ellenes, míg az L368 a  $\beta$ 2-mikroglobulin ellenes monoklonális antitestek.

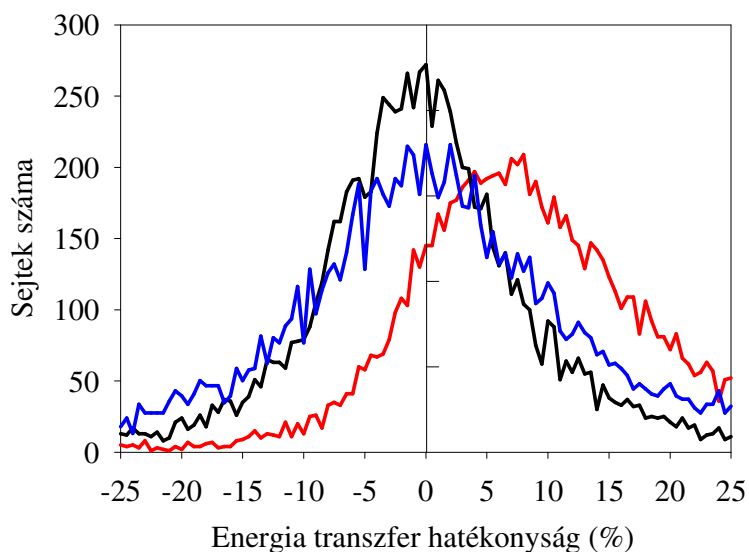
\*W6/32+Cy3-GAMIgG Fab az indirekt jelölésnek felel meg, ahol elsődleges antitesttel (W6/32), majd másodlagos antitesttel (Cy3-GAMIgG Fab) jelöltünk. Részletesebb leírás az *Anyagok és módszerek* fejezetben. A másodlagos jelölés során a fluoreszcens másodlagos antitestek vagy Fab fragmentumok koncentrációit úgy állítottuk be, hogy a donor-akceptor arány mindig 1 körüli értéket ( $0.86 \pm 0.26$ ) vegyen fel, ugyanúgy, mint a közvetlenül jelölt elsődleges antitestek esetében. Így az energia transzfer értékeket a donor-akceptor arány nem befolyásolta. Ezt a módszert azoknál az antitest kombinációknál alkalmaztuk, ahol biztosak lehettünk abban, hogy minden antigénhez legalább egy fluoreszcens IgG vagy Fab kötődött.

Az MHC I molekula nehéz és könnyű lánc közötti intramolekuláris energia transzfer mérésekkel kimutattuk, hogy az alkalmazott antitest komplexek méretének növelése a FRET hatékonyság csökkenését eredményezi, ugyanis amikor az alkalmazott antitest vagy Fab komplex nagyobb, a donor és akceptor molekulák közötti valós távolság megnő. Ez magyarázza az energia transzfer csökkenését, amikor fluoreszcens elsődleges antitestek helyett a donor és akceptor molekulát is másodlagos Fab fragmentumokkal jelöljük, és a FRET hatékonyság további csökkenését a másodlagos teljes antitestek használatakor. Az alkalmazott fluorofór mérete is hatással lehet az energia transzfer értékére. PE (phycoerythrin) és APC (allophycocyanin) festékekkel konjugált antitesteket használva az energia transzfer hatékonyság alacsonyabb, mint Cy3 és Cy5 pár esetén (Batard, P. és *mtsai*, 2002). Pfeiffer és *mtsai* (Pfeiffer A és *mtsai*, 2001) szintén alacsonyabb FRET értékeket mértek PE (phycoerythrin) és Cy5 donor-akceptor párt alkalmazva. Fluoreszcens másodlagos antitesttel jelölt fehérjét használva akceptorként, a donor-akceptor fluorofórok távolsága mellett az akceptor molekulák koncentrációja is megnő, mivel – egyetlen akceptor jelzett primer antitesttel ellentétben, több akceptor jelzett másodlagos antitest kötődhet. Ahhoz, hogy ezt a lehetőséget kizárjuk, a másodlagos teljes antitesteket és Fab fragmentumokat olyan koncentrációban alkalmaztuk, hogy a donor és az akceptor koncentrációkat állandó értéken tartjuk. Ezt a módszert csak azokban az antitest kombinációkban használtuk, ahol biztosak lehettünk abban, hogy minden epitóphoz átlagosan legalább egy antitest kötődik – kizárva így az üres epitópok zavaró hatását a FRET hatékonyság számításában. Ezekben az esetekben az energia transzfer hatékonyságot a donor-akceptor arány nem befolyásolja, sokkal inkább a fluorofórok relatív orientációja és azok távolsága. Bár elég nehéz molekula modellek és számítások nélkül előre megbecsülni az energia transzfer értékét, eredményeink rámutatnak arra, hogy a különböző jelölési módszerek alkalmazásával nyert FRET értékek nem hasonlíthatók közvetlenül össze.

## **5.5 Különböző CD45 izoformák asszociációinak vizsgálata HPB-ALL**

### **T sejteken**

Bár a CD45 molekulák homoasszociációját még nem sikerült direkt módszerekkel kimutatni, jelenlegi ismereteink szerint a CD45 feltételezett homodimerizációja a tirozin foszfatáz működésének egyik lehetséges, valószínűleg a foszfatáz működés gátlásán keresztül ható szabályozó mechanizmusa. Ennek fényében alapvető annak vizsgálata, hogy kimutatható-e a CD45 molekulák együttállása HPB-ALL T sejtek membránjában, illetve, hogy a CD45 homoasszociáció mértéke függ-e a molekula izoformájától. Mivel a rendelkezésünkre álló humán CD45 izoformákkal transzfectált HPB ALL T sejt vonalak a CD45R0, CD45RBC és CD45RABC izoformákat nagyon alacsony számban fejezték ki sejt felszínükön, a homoasszociáció vizsgálatához a módosított FCET módszer feltétlenül szükséges volt (ld. 5.3.1 fejezet). A CD45 izoformák homoasszociációjának vizsgálatához azokat Cy3- és Cy5-konjugált CD45 Fab fragmentumok 1:1 arányú keverékével jelöltük meg. A 10. ábra a négy független kísérlet egyike során meghatározott FRET hatékonyságok eloszlását reprezentálja. A három különböző izoformát megvizsgálva csupán a CD45R0 estében tapasztaltunk homoasszociációra utaló magas energia transzfer hatékonyságot (négy független mérés során meghatározott FRET középérték  $\pm$  a középérték szórása (SD) =  $11.0 \pm 4.4$ ), szemben a CD45RBC ( $E = 1.2 \pm 0.4$ ) illetve CD45RABC izoformával ( $E = 1.8 \pm 1.4$ ), ahol homoasszociációt nem sikerült kimutatni.

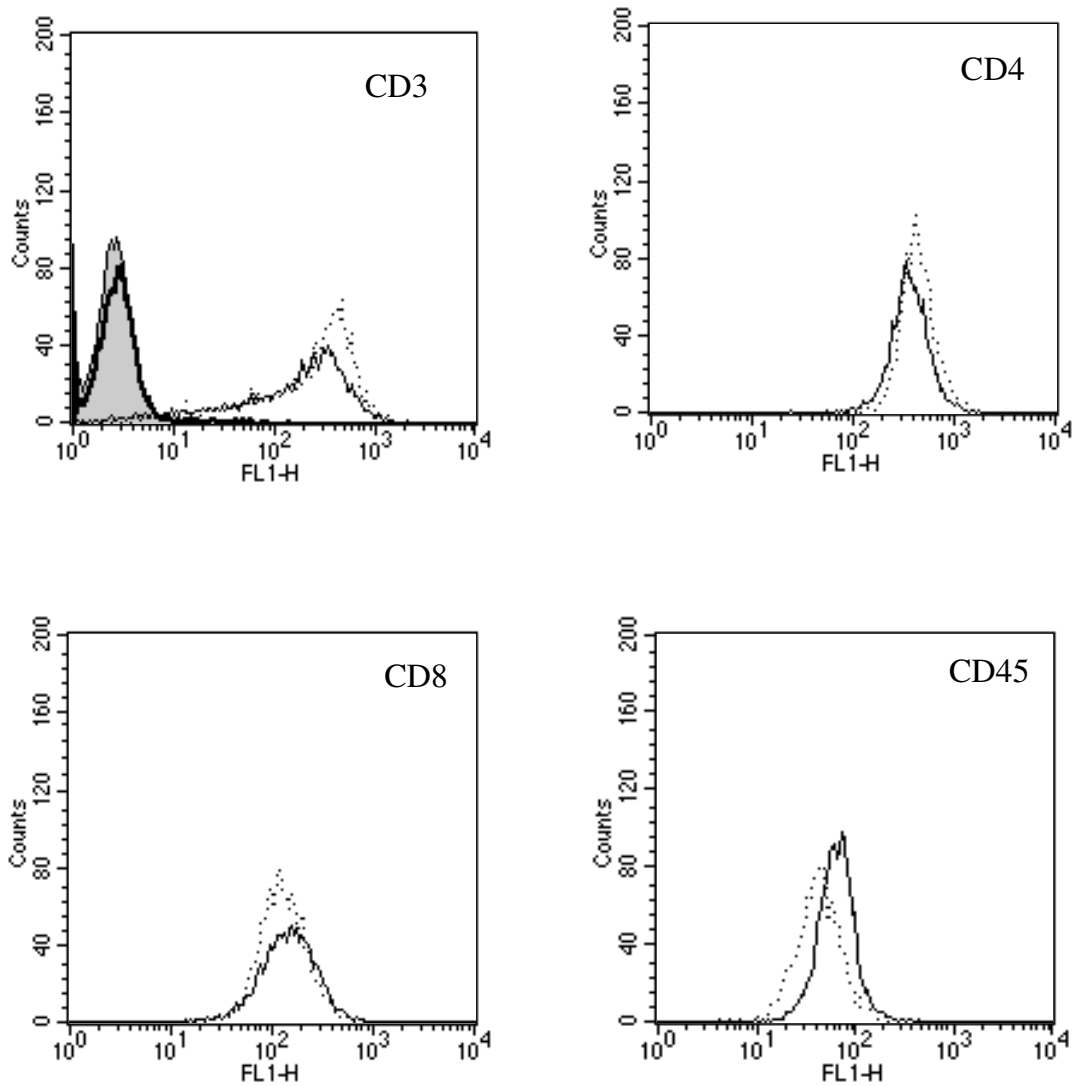


**10. ábra: CD45 izoformák homoasszociációinak vizsgálata.** A CD45 molekulákat CD45.2 antitest Cy3 és Cy5 festékekkel konjugált Fab fragmentumainak 1:1 arányú keverékével jelöltük. A FRET hatékonyság eloszlás hisztogramjai négy független mérés egyikét mutatják be CD45R0 (vörös görbe), CD45RBC (kék görbe) és CD45RABC (fekete görbe) izoformák esetén.

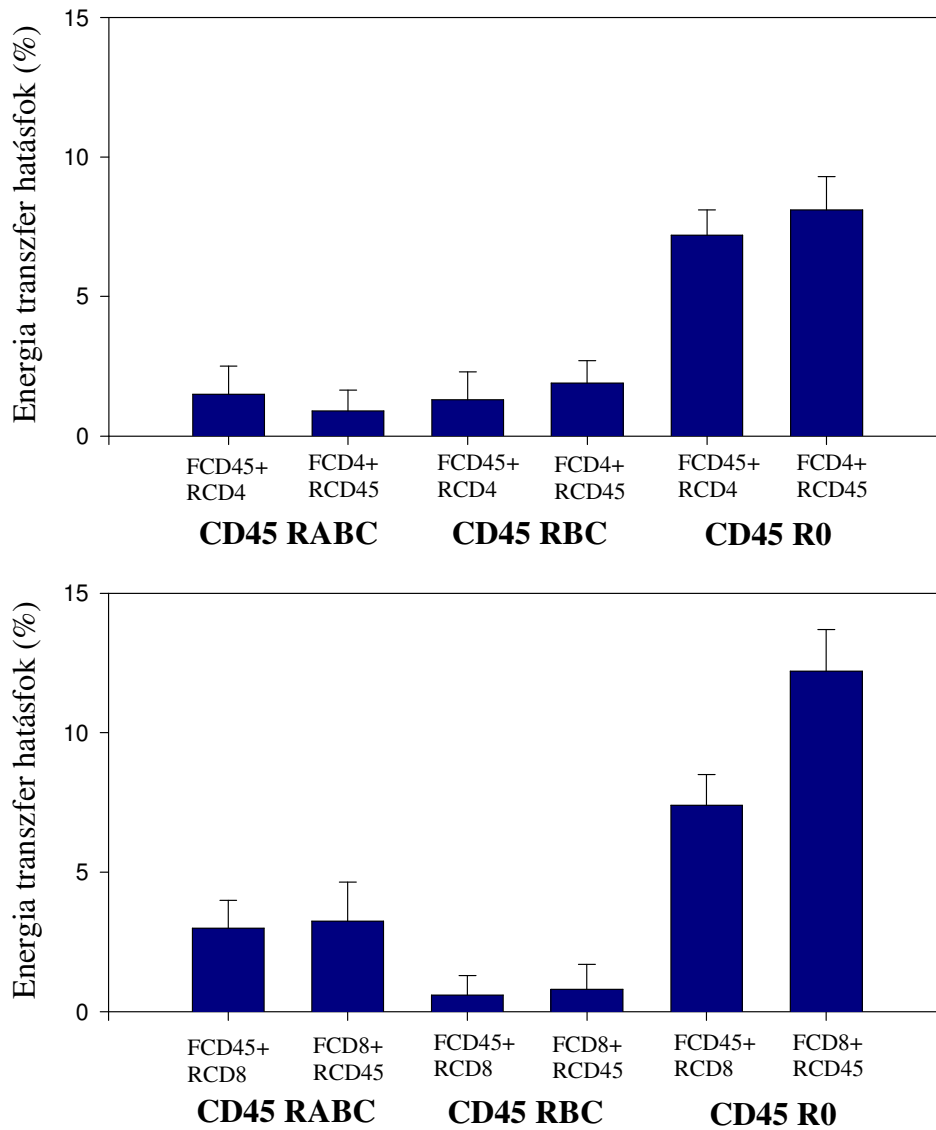
A CD45 tirozin foszfatáz T sejt jelátvitelt szabályozó szerepét elsősorban abban látják, hogy a  $p59^{fyn}$  és  $p56^{lck}$  tirozin kinázokat defoszforilálva aktiválja azokat. Ezen kinázok szorosan kapcsolódnak a CD4 illetve CD8 molekulák citoplazmatikus doménjeihez, így velük együtt vesznek részt a sejtaktivációt kiváltó jelátviteli mechanizmusokban. A CD45 tirozin foszfatáz tehát valószínűleg fizikailag is közel kerül a CD4 és CD8 ko-receptorokhoz a tirozin kinázok aktiválásakor. Kísérleteinkben áramlási citometriás energia transzfer módszer segítségével vizsgáltuk, hogy kimutatható-e az egyes izoformák és a CD4/CD8 koreceptorok közvetlen molekuláris közelsége.

A heteroasszociáció vizsgálatához a receptorokat fluoreszcinnel illetve rodaminnal konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük. Mivel a donor illetve akceptor molekulák aránya befolyásolhatja az energia transzfer hatékonyság értékét, ezért az egyes asszociációs párok tagjait egyszer donor majd akceptor antitesttel is megjelöltük. Bár az egyes antigének expressziója a különböző T sejt klónokon összemérhetőnek bizonyult (11. ábra), az energia

transzfer hatékonyság mindkét irányban történő mérése szükséges volt. Mint azt a 12. ábra mutatja, az energia transzfer mérések szerint csak a CD45 R0 izoforma esetében tapasztalható szoros asszociáció a CD4 és CD8 molekulákkal, míg a CD45 RBC és RABC izoformák esetében kölcsönhatást nem sikerült kimutatni.



**11. ábra:** Az antigén molekulák expressziója a CD45R0<sup>+</sup> és CD45RBC<sup>+</sup> sejtvonalakon. A CD45R0<sup>+</sup> (folytonos vonal) illetve a CD45RBC<sup>+</sup> (pontozott vonal) HPB-ALL sejteket FITC-konjugált CD3, CD4, CD8 és CD45 ellenes monoklonális antitestekkel jelöltük és áramlási citometriás módszerrel mértük. A sátrózott terület a CD3 ablakban az izotípus kontroll mAb jelölés hisztogramját mutatja.

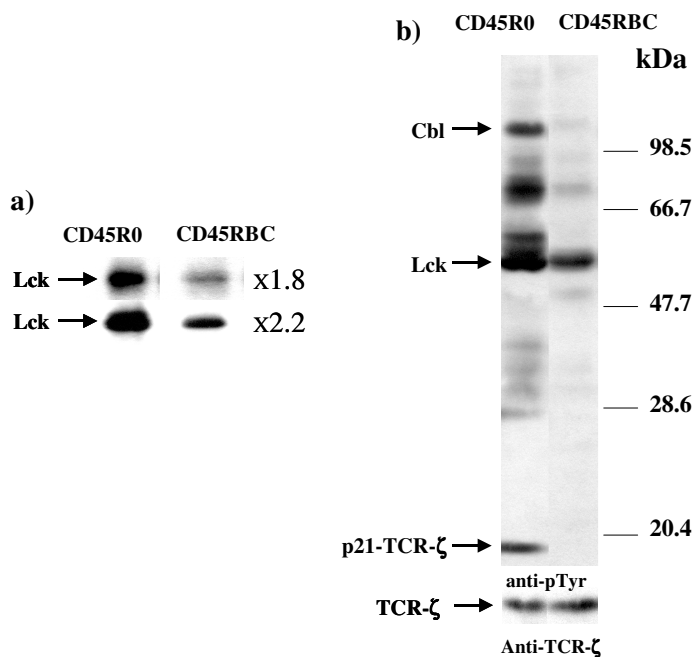


**12. ábra: Különböző CD45 izoformák asszociációja a CD4 és CD8 molekulákkal.** Az oszlopdiagramok hat független kísérletből meghatározott FRET hatékonyság középértékeit ( $\pm$  SD) mutatják. Az egyes molekulákat donorként fluoreszcein (F), illetve akceptorként rodamin (R) festékekkel kovalensen konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük.

## **5.6 A TCR-on keresztüli jelátvitel vizsgálata**

A CD45R0 fent ismertetett homodimerizációja, illetve a CD4 és CD8 molekulákkal alkotott heteroasszociációja felveti azt a kérdést, hogy vajon a CD45R0 molekulák alapvetően pozitív hatást gyakorolnak-e a jelátvitelre a TCR-CD4/CD8 komplexen keresztül, vagy a homodimerizáció által a CD45 tirozin foszfatáz aktivitás esetleges gátlása érvényesül inkább, ami a TCR jelátvitelre negatív szabályozó hatással van. Ahhoz, hogy ezekre a kérdésekre választ kapjunk, a TCR jelátvitel erősségét hasonlítottuk össze olyan CD45RBC<sup>+</sup> és CD45R0<sup>+</sup> szubklónokban, melyekben a p56<sup>lck</sup>, CD3, CD45, CD4 és CD8 expresszió szintje összemérhető volt.

Feltételeztük, hogy a CD45R0 és a CD4 közötti szoros kölcsönhatás eredményeképpen, a kialakuló CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> kinázok sokkal aktívabbak a CD45R0<sup>+</sup>, mint a CD45RBC<sup>+</sup> szubklónokban, mivel a CD45 csak közel kerülve képes defoszforilálni a p56<sup>lck</sup> kinázon a gátló pTyr-505-öt. Ezt a lehetőséget *in vitro* kináz méréssel vizsgáltuk sejtfelszínről származó CD4 immun-komplexekben, ahol a p56<sup>lck</sup> aktivitást autofoszforilációval állapítottuk meg. Kísérleteink szerint a CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> kináz aktivitás átlagosan kétszer nagyobb volt a CD45R0<sup>+</sup>, mint a CD45RBC<sup>+</sup> klónokban (13a. ábra). Ezzel a megállapítással összhangban áll az, hogy az alap fehérje tirozin foszforiláció szintje egyenletesen magasabb volt a CD45R0<sup>+</sup>, mint a CD45RBC<sup>+</sup> szubklónban (13b. ábra).



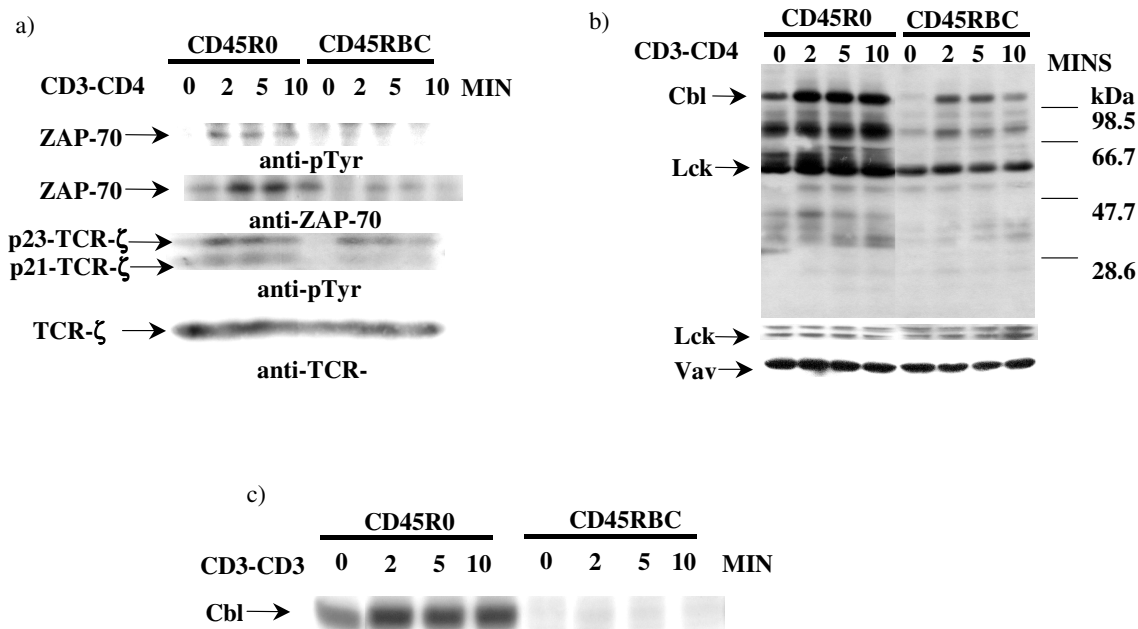
**13. ábra:** *CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> kináz aktivitás és fehérje tirozin foszforiláció alapállapotban. a)* p56<sup>lck</sup> kináz autofoszforilációs mérés CD4 immun-komplexekben. Az ábra két független kísérlet eredményeit mutatja, a számok a p56<sup>lck</sup> kináz arányai a CD45R0<sup>+</sup> és CD45RBC<sup>+</sup> HPB-ALL szubklónokban. **b)** Teljes sejt-lizátum immunblotját végeztük el foszfortirozinra (felső panel), és kontrollként a TCR-ζ láncre (alsó panel).

Áramlási citometriás analízissel kimutattuk, hogy a CD45R0 sejt felszíni expressziója kismértékben mindig magasabb volt, mint a CD45RBC izoformáé. Amikor a CD45R0<sup>+</sup> sejteket úgy szortíroztuk, hogy pontosan a CD45RBC<sup>+</sup> szubklónéval megegyező CD45 expressziójú sejteket kapjunk, pár nap után a sejt kultúrában ugyanúgy némileg megnövekedett a CD45R0<sup>+</sup> expressziója. Ahhoz, hogy bizonyítsuk, hogy a foszforiláció megfigyelt eltéréseit nem a CD45 expresszió csekély különbségei okozták, a két szubklónon ugyanazon a napon végeztünk FACS szortírozást. Így két teljesen megegyező CD45 expressziójú szubklónt nyertünk, amiken rögtön megismételtük a foszforilációs méréseket. Mivel a foszforilációban korábban kimutatott különbségek most is megfigyelhetőek voltak, arra a következtetésre jutottunk, hogy a két izoforma expressziójának kismértékű különbségei nem okozhatták a CD45R0<sup>+</sup> sejtek CD45RBC<sup>+</sup> sejtekhez képest megemelkedett alap fehérje-foszforilációját.

A jelátviteli mérésekkel azt szeretnénk volna demonstrálni, hogy a CD45R0<sup>+</sup> sejtekben *in vitro* kimutatott CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> készlet funkcionálisan nagyobb aktivitású volt, azaz hatékonyabban emelte a TCR jelátvitel intenzitását. Korábban kimutatták, hogy CD3-CD4 kereszt kötése nagymértékben erősíti a HPB-ALL sejtekben mérhető fehérje tirozin foszforilációt a CD3-CD3 kereszt kötéssel szemben (Shiroo, M. és *mtsai*, 1992). A TCR- $\zeta$  lánc immunprecipitációja, majd azt követően a foszfortirozin immunblottolása kimutatta, hogy a CD3-CD4 kereszt kötése során a TCR- $\zeta$  p21 és p23 foszfoizomerjei nagyobb mértékben képződtek a CD45R0<sup>+</sup>, mint CD45RBC<sup>+</sup> sejtekben. A ZAP-70 nagyobb mértékben kapcsolódott a TCR- $\zeta$  lánchoz és a kináz tirozin foszforilációja is megemelkedett a CD45R0<sup>+</sup> sejtekben (14a. ábra). Teljes sejt-lizátumok foszfortirozin immunblottja kimutatta, hogy a CD3-CD4 kereszt kötés egyéb fehérjék tirozin foszforilációs szintjét is nagyobb mértékben emelte a CD45R0<sup>+</sup> szubklónokban a CD45RBC<sup>+</sup> sejtekhez képest, ami a korábbi megfigyelésekkel könnyen egyeztethető (14b. ábra). Ezeket a kísérleteket megismételtük olyan sejteken is, amelyeket frissen szortíroztunk az azonos CD45 expresszió érdekében, és az eredményeink hasonlóak voltak. Mindezek mellett a CD3-CD4 által indukált megemelkedett fehérje tirozin foszforilációt két másik CD45R0<sup>+</sup> szubklónban is megfigyeltük, amelyek CD3, CD4, CD8 és CD45 expressziója összemérhető volt (itt be nem mutatott adatok). A p56<sup>lck</sup>-ével megegyező pozícióban megjelenő foszforilált fehérje esetében mind az alap és a kiváltható tirozin foszforiláció szintje is magasabb volt a CD45R0<sup>+</sup>, mint a CD45RBC<sup>+</sup> sejtekben (14b. ábra középső panel). A kontrollként használt Vav szintjéhez normalizálva (14b. ábra alsó panel), a p56<sup>lck</sup> szintje a két szubklónban összemérhetőnek bizonyult.

A CD3-CD4 kereszt kötésével szemben az önmagában kötött CD3 a fehérje tirozin foszforiláció igen kis mértékű emelkedését váltotta ki mind a CD45R0<sup>+</sup> mind a CD45RBC<sup>+</sup> sejtekben (be nem mutatott adatok). A c-Cbl fehérje foszforilációját ennek ellenére megemelte a CD3 egyedüli lekötése, mint azt a 14c. ábra szemlélteti. Míg a c-Cbl megnövelt

foszforilációja könnyen kimutatható a CD45R0<sup>+</sup> sejtekben, a CD45RBC<sup>+</sup> szubklón esetében sem alap, sem kiváltható foszforilációt nem tapasztaltunk.



**14. ábra:** CD3-CD4 és CD3-CD3 keresztkötéssel kiváltott foszforilációs események összehasonlítása CD45R0<sup>+</sup> és CD45RBC<sup>+</sup> HPB-ALL sejtvonalakban. a) A sejteket a feltüntetett ideig stimuláltuk a CD3-CD4 keresztkötésével, amit a TCR-ζ immunprecipitációja és a foszfortirozin blotolása követett; a blotot ezután a ZAP-70 és TCR-ζ molekulák elleni antitestekkel újrajelöltük. b) A sejtek CD3-CD4 keresztkötéses stimulációja után a teljes sejt lizátumok foszfortirozin (felső panel), p56<sup>lck</sup> (középső panel) és kontrollként Vav (alsó panel) immun-blotját készítettük el. c) a sejteket keresztkötezt CD3-mal stimuláltuk, majd a teljes sejt lizátumok foszfortirozin immun-blotját készítettük el.

Kísérleteink legfontosabb eredménye az, hogy a CD45R0 esetében igen, míg a CD45RBC és CD45RABC esetében nem tudtunk kimutatni heteroasszociációt a CD4 és CD8 molekulákkal HPB-ALL T sejtek felszínén, illetve, hogy a CD45R0 molekulák homoasszociátumainak jelenlétét mutattuk ki. Ezek az asszociációk összhangban állnak azokkal a megfigyelésekkel, amelyek a CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> alap kináz aktivitásának megemelkedését illetve a TCR jelátvitel foszforilációs folyamatainak megnövekedett

intenzitását írják le. Megfigyeléseink elsőként számolnak be a CD45R0 által alkotott homoasszociátumok létezéséről, először mutatják ki a CD45R0-CD4/CD8 asszociációt a nem invazív FRET technikát alkalmazva, elkerülve ezzel detergenset, illetve antitest indukálta co-capping (együtt-sapkásodás) használatát. A fő probléma a co-capping vizsgálatokkal az, hogy a „cap” (sapka) molekuláris összetétele nem feltétlenül a molekulák alapállapotú asszociációit tükrözi. Ezen kívül számos sejtfelszíni molekula és a CD45 asszociációját vizsgálták már detergens kezeléssel nyert sejtlizátumok co-immunprecipitációjával. A CD45 egy erősen glikozilált molekula, így igen nagy annak a valószínűsége, hogy az immunprecipitációs eljárás során nem specifikus kölcsönhatások alakulnak ki. A FRET módszerrel kimutatott eredményeink mindemellett összhangban állnak korábbi CD4 és CD45 co-capping vizsgálatokkal (Leitenberg, D. és *mtsai*, 1996), illetve primer nyugvó CD4<sup>+</sup> sejtek detergens lizátumainak CD4 és CD45 co-precipitációjával (Bonnard, M. és *mtsai*, 1997), ugyanakkor a CD45R0 és a TCR mások által leírt asszociációjával nem (Leitenberg, D. és *mtsai*, 1999). Érdekes módon egy korábbi FRET vizsgálattal szintén kimutatták a CD45 és CD8 illetve CD4 asszociációját, de csak 72-96 órás TCR stimulálást követően (Mittler, R. S. és *mtsai*, 1991). Bár specifikus CD45 izoformákat nem karakterizáltak ebben a kísérletben, azonban az ismert, hogy a CD45R0 expressziója más izoformákkal ellentétben markánsan megnő aktivált T sejtek felszínén (Akbar, A. N. és *mtsai*, 1988), így igen valószínű, hogy a megfigyelt CD4/CD8-CD45 asszociációkban elsősorban a CD45R0 izoforma vett részt. A HPB-ALL sejtek felszínén megfigyelt CD45R0 homoasszociátumok, illetve CD4-CD45R0 és CD8-CD45R0 heterodimerek létezése felveti annak a kérdését, hogy vajon a CD4 és/vagy a CD8 kompetálnak-e a CD45R0 molekulával - csökkentve ezzel a CD45R0 homoasszociátumok számát. A CD4 és a CD8 expressziója is magas ezeken a sejteken, azonban az még nem ismert, hogy a homoasszociáció csökkenhet-e ha nő a CD4 és CD8 expresszió. Az is lehetséges, hogy az a CD45R0, amely asszociál a CD4 és/vagy CD8 molekulával, már eleve

homodimert alkot. Ez a lehetőség még nyitott, további vizsgálatokat igényel. Megfigyeléseink nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a CD45R0 homoasszociációja gátolja a CD45 PTPáz aktivitását (Majeti, R. és *mtsai*, 2000), de a jelen kísérletei összefüggésben a CD45R0 domináns hatása a CD4/CD8 molekulákkal alkotott asszociáción keresztül az volt, hogy felerősítette a TCR jelátvitelt azáltal, hogy a CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> kináz molekuláknak egy aktívabb készletét hozta létre.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja az volt, hogy lehetséges magyarázatot keressünk a különböző CD45 izoformák szerepére a TCR jelátvitel szabályozási folyamataiban CD45R0<sup>+</sup>, CD45RBC<sup>+</sup> és CD45RABC<sup>+</sup> HPB-ALL T sejtek felszínén kialakított receptor kölcsönhatások és jelátviteli mechanizmusok vizsgálatával. Munkánkhoz az áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FCET) módszer továbbfejlesztését is célul tűztük ki, mivel a módszer klasszikus változata alacsony receptor expressziójú rendszereken nem volt használható. Vizsgálataink eredményei a következők:

- (1) A vörös tartományban emittáló Cy3 és Cy5 fluoreszkáló festékek alkalmazásával jelentős mértékben csökkent az autofluoreszcencia mértéke a korábban alkalmazott fluorescein-rodamin FRET festék párhoz képest. Egy negyedik független fluoreszcencia paraméter detektálása lehetővé tette, hogy új matematikai algoritmus kifejlesztésével az autofluoreszcencia sejtenkénti korrekcióját végezzük el, ami a FCET módszer megbízhatóságát és pontosságát nagymértékben növelte.
- (2) Az új, megnövekedett érzékenységű FCET módszerrel sikerült olyan sejtpopulációkat megkülönböztetni egymástól, amelyek csak felszínükön vizsgált molekulák között mért FRET hatékonyság tekintetében tértek el egymástól.
- (3) Az új FCET módszer alkalmazhatóságának határát is vizsgáltuk különböző immunfluoreszcens jelölési sémákra. MHC-I molekulák nehéz és könnyű láncait különböző direkt illetve indirekt módszerekkel jelezve azt találtuk, hogy az epitópok között detektálható energia transzfer hatékonyságot az alkalmazott antitest komplexum mérete jelentős mértékben befolyásolja. Míg a legmagasabb FRET értékeket mindkét epitóp direkt jelzése eredményezte, addig másodlagos antitestek használatával a mérhető transzfer hatékonyság nagymértékben lecsökkent.

- (4) A továbbfejlesztett FCET módszerrel elsőként mutattuk ki, hogy HPB-ALL T sejtek felszínén csak a CD45R0 izoformák alkotnak homoasszociátumokat, a nagyobb izoformák, mint a CD45RBC és CD45RABC nem. A CD45R0 izoformák esetében további szoros molekuláris kölcsönhatást találtunk a CD4/CD8 ko-receptorokkal. A CD45RBC és CD45RABC esetén hasonló együttállást nem találtunk.
- (5) Sikertült kimutatni a CD45R0<sup>+</sup> T sejtek megemelkedett CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> alap kináz aktivitását, és a TCR jelátvitel megnövelt aktivitású foszforilációs eseményeit, ami jól egyezik a receptor mintázat eltéréseivel.

## **7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG**

Eredményeink hozzájárulnak a TCR által közvetített jelátviteli folyamatok jobb megértéséhez, mivel egy fontos szabályozó molekula, a CD45 tirozin foszfatáz által kialakított izoforma specifikus fehérje komplexumok jelenléte és a TCR jelátvitel hatékonysága közötti szoros összefüggést hangsúlyozzák. A CD45 molekulák homodimerizációjának élő sejteken történő kimutatása az első ilyen direkt bizonyíték a korábban csak feltételezett kölcsönhatásra, és valószínűleg magyarázatot nyújt a CD45 tirozin foszfatáz és ezáltal további jelátviteli lépések negatív szabályozására.

Az áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer módszerének továbbfejlesztésével a membrán makromolekuláinak kölcsönhatásai olyan rendszerekben is vizsgálhatóvá váltak, ahol azt a molekulák alacsony számú expressziója eddig megakadályozta. A módszer sokkal szélesebb körben történő elterjedését szolgálja az is, hogy a kifejlesztéséhez egy klinikai rutinban használt, könnyen kezelhető áramlási citométert használtunk.

## **8. IRODALOMJEGYZÉK**

- Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* (1988) **140**:2171-2178.
- Alberti S, Bucci C, Fornaro M, Robotti A, Stella M. Immunofluorescence analysis in flow cytometry: better selection of antibody-labeled cells after fluorescence overcompensation in the red channel. *J Histochem Cytochem* (1991) **39**:701-706.
- Alberti S, Parks DR, Herzenberg LA. A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry. *Cytometry* (1987) **8**:114-119.
- Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Sem Immunol* (2000) **12**:349-359.
- Ashwell JD, D'Oro U. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunol Today* (1999) **20**:412-416.
- Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* (1979) **27**:36-43.
- Baker M, Gamble J, Tooze R, Higgins D, Yang FT, O'Brien PC, Coleman N, Pingel S, Turner M, Alexander DR. Development of T-leukaemias in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mutant lck mice. *EMBO J* (2000) **19**:4644-4654.
- Bastiaens PI, Jovin TM. Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**:8407-8412.
- Bastiaens PI, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *EMBO J* (1996) **15**:4246-4253.
- Batard P, Szöllösi J, Luescher I, Cerottini JC, MacDonald R, Romeo P. Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: advantages and limitations. *Cytometry* (2002) **48**:97-105.
- Beisker W, Dolbeare F, Gray JW. An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometry* (1987) **8**:235-239.
- Biffen M, McMichael-Phillips D, Larson T, Venkitaraman A, Alexander D. The CD45 tyrosine phosphatase regulates specific pools of antigen receptor-associated p59fyn and CD4-associated p56lck tyrosine in human T-cells. *EMBO J* (1994) **13**:1920-1929.
- Bilwes AM, den Hertog J, Hunter T, Noel JP. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* (1996) **382**:555-559.
- Bonnard M, Maroun CR, Julius M. Physical association of CD4 and CD45 in primary, resting CD4+ T cells. *Cell Immunol* (1997) **175**:1-11.

- Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* (1996) **183**:1707-1718.
- Chan AC, Desai DM, Weiss A. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* (1994) **12**:555-92.
- Corsetti J.P., Sotirchos S.V., Cox C., Cowles J.W., Leary J.F., Blumberg N. Correction of cellular autofluorescence in flow cytometry by mathematical modeling of cellular fluorescence. *Cytometry* (1988) **9**:539-547.
- D'Oro U, Ashwell JD. Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* (1999) **162**:1879-1883.
- Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A. Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell* (1993) **73**:541-554.
- Frearson JA, Alexander DR. Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol Today* (1996) **17**:385-391.
- Fuchs HJ, McDowell J, Shellito JE. Use of allophycocyanin allows quantitative description by flow cytometry of alveolar macrophage surface antigens present in low numbers of cells. *Am Rev Respir Dis* (1988) **138**:1124-1128.
- Gáspár RJ, Bagossi P, Bene L, Matkó J, Szöllösi J, Tözsér J, Fésüs L, Waldmann TA, Damjanovich S. Clustering of class I HLA oligomers with CD8 and TCR: three-dimensional models based on fluorescence resonance energy transfer and crystallographic data. *J Immunol* (2001) **166**:5078-5086.
- Hallden G, Skold CM, Eklund A, Forslid J, Hed J. Quenching of intracellular autofluorescence in alveolar macrophages permits analysis of fluorochrome labelled surface antigens by flow cytofluorometry. *J Immunol Methods* (1991) **142**:207-214.
- Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Sharrow SO, Johnson P, Trowbridge IS, Hodes RJ. Expression of variable exon A-, B-, and C-specific CD45 determinants on peripheral and thymic T cell populations. *J Immunol* (1992) **148**:19-28.
- Hederer RA, Guntermann C, Miller N, Nagy P, Szöllösi J, Damjanovich S, Hale G, Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase regulates Campath-1H (CD52)-induced TCR-dependent signal transduction in human T cells. *Int Immunol* (2000) **12**:505-516.
- Hurley TR, Hyman R, Sefton BM. Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases. *Mol Cell Biol* (1993) **13**:1651-1656.
- Jenei A, Varga S, Bene L, Mátyus L, Bodnár A, Bacsó Z, Pieri C, Gáspár RJ, Farkas T, Damjanovich S. HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) **94**:7269-7274.

- Jiang G, den Hertog J, Su J, Noel J, Sap J, Hunter T. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- $\alpha$ . *Nature* (1999) **401**:606-610.
- Kenworthy AK. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods: Comp Meth Enzymol* (2001) **24**:289-296.
- Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A, Timms E, Pfeffer K, Ohashi PS, Thomas ML, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* (1993) **74**:143-156.
- Kosk-Kosicka D, Bzdega T, Wawrzynow A. Fluorescence energy transfer studies of purified erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Ca<sup>2+</sup>-regulated activation by oligomerization. *J Biol Chem* (1989) **264**:19495-19499.
- Lefrancois L, Goodman T. Developmental sequence of T200 antigen modifications in murine T cells. *J Immunol* (1987) **139**:3718-3724.
- Leitenberg D, Boutin Y, Lu DD, Bottomly K. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* (1999) **10**:701-711.
- Leitenberg D, Novak TJ, Farber D, Smith BR, Bottomly K. The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J Exp Med* (1996) **183**:249-259.
- Loken MR, Keij JF, Kelley KA. Comparison of helium-neon and dye lasers for the excitation of allophycocyanin. *Cytometry* (1987) **8**:96-100.
- Majeti R, Bilwes AM, Noel JP, Hunter T, Weiss A. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* (1998) **279**:88-91.
- Majeti R, Xu Z, Parslow TG, Olson JL, Daikh DI, Killeen N, Weiss A. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* (2000) **103**:1059-1070.
- Malley A, Stewart CC, Stewart SJ, Waldbeser L, Bradley LM, Shiigi SM. Flow cytometric analysis of I-J expression on murine bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol* (1988) **43**:557-565.
- McFarland ED, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, Shaw A, Thomas ML. Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) **90**:1402-1406.
- McKenney DW, Onodera H, Gorman L, Mimura T, Rothstein DM. Distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase differentially regulate interleukin 2 secretion and activation signal pathways involving Vav in T cells. *J Biol Chem* (1995) **270**:24949-24954.

- Mittler RS, Rankin BM, Kiener PA. Physical associations between CD45 and CD4 or CD8 occur as late activation events in antigen receptor-stimulated human T cells. *J Immunol* (1991) **147**:3434-3440.
- Ng T, Squire A, Hansra G, Bornancin F, Prevostel C, Hanby A, Harris W, Barnes D, Schmidt S, Mellor H, Bastiaens PI, Parker PJ. Imaging protein kinase Calpha activation in cells. *Science* (1999) **283**:2085-2089.
- Novak TJ, Farber D, Leitenberg D, Hong SC, Johnson P, Bottomly K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* (1994) **1**:109-119.
- Ostergaard HL, Shackelford DA, Hurley TR, Johnson P, Hyman R, Sefton BM, Trowbridge IS. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**:8959-8963.
- Pfeiffer A, Böttcher A, Orsó E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnár A, Spreitzer I, Liebisch G, Dronbik W, Klaus G, Horn M, Holmer S, Hartung S, Multhoff G, Schütz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schütt C, Rothe G, Szöllösi J, Damjanovich S, Schmitz G. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* (2001) **31**:3153-3164.
- Pingel S, Baker M, Turner M, Holmes N, Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase regulates CD3-induced signal transduction and T cell development in recombina-se-deficient mice: restoration of pre-TCR function by active p56(lck). *Eur J Immunol* (1999) **29**:2376-2384.
- Ralph SJ, Thomas ML, Morton CC, Trowbridge IS. Structural variants of human T200 glycoprotein (leukocyte-common antigen). *EMBO J* (1987) **6**:1251-1257.
- Roederer M, Murphy RF. Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts. *Cytometry* (1986) **7**:558-565.
- Rogers PR, Pilapil S, Hayakawa K, Romain PL, Parker DC. CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. *J Immunol* (1992) **148**:4054-4065.
- Sanders ME, Makgoba MW, Shaw S. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* (1988) **9**:195-199.
- Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A, Pinnau R, Bertovich M.J., Nash G.S. Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (1991) **101**:1020-1030.
- Seavitt JR, White LS, Murphy KM, Loh DY, Perlmutter RM, Thomas ML. Expression of the p56(Lck) Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development. *Mol Cell Biol* (1999) **19**:4200-4208.
- Seveus L, Vaisala M, Hemmila I, Kojola H, Roomans GM, Soini E. Use of fluorescent europium chelates as labels in microscopy allows glutaraldehyde fixation and permanent mounting and leads to reduced autofluorescence and good long-term stability. *Microsc Res Tech* (1994) **28**:149-154.

- Shiroo M, Goff L, Biffen M, Shivnan E, Alexander D. CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx. *EMBO J* (1992) **11**:4887-4897.
- Sieh M, Bolen JB, Weiss A. CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *EMBO J* (1993) **12**:315-321.
- Steinkamp JA, Stewart CC. Dual-laser, differential fluorescence correction method for reducing cellular background autofluorescence. *Cytometry* (1986) **7**:566-574.
- Stone JD, Conroy LA, Byth KF, Hederer RA, Howlett S, Takemoto Y, Holmes N, Alexander DR. Aberrant TCR-mediated signaling in CD45-null thymocytes involves dysfunctional regulation of Lck, Fyn, TCR-zeta, and ZAP-70. *J Immunol* (1997) **158**:5773-5782.
- Streuli M, Hall LR, Saga Y, Schlossman SF, Saito H. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med* (1987) **166**:1548-1566.
- Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* (1978) **47**:819-846.
- Szöllösi J, Damjanovich S, Balázs M, Nagy P, Trón L, Fulwyler MJ, Brodsky FM. Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. *J Immunol* (1989) **143**:208-213.
- Szöllösi J, Damjanovich S, Mátyus L. Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry* (1998) **34**:159-179.
- Szöllösi J, Horejsi V, Bene L, Angelisova P, Damjanovich S. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol* (1996) **157**:2939-2946.
- Szöllösi J, Mátyus L, Trón L, Balázs M, Ember I, Fulwyler MJ, Damjanovich S. Flow cytometric measurements of fluorescence energy transfer using single laser excitation. *Cytometry* (1987) **8**:120-128.
- Szöllösi J, Damjanovich S, Goldman C, Fulwyler M, Aszalós A, Goldstein G, Rao P, Talle M, Waldmann T. Flow cytometric resonance energy transfer measurements support the association of a 95-kDa peptide termed T27 with the 55-kDa Tac peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**:7246-7250.
- Takeda A, Wu J, Maizel A. Evidence for monomeric and dimeric forms of CD45 associated with a 30-kDa phosphorylated protein. *J Biol Chem* (1992) **267**:16651-16659.
- Thomas M, Brown E. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol Today* (1999) **20**:406-411.
- Trón L, Szöllösi J, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys J* (1984) **45**:939-946.

- van-Oers N, Killeen N, Weiss A. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* (1996) **183**:1053-1062.
- Willemsen R.A., Weijtens M.E., Ronteltap C., Eshlar Z., Gratama J.W., Chames P., Bolhuis R.L. Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Gene Ther* (2000) **7**:1369-1377.
- Wouters F.S., Bastiaens P.I., Wirtz K.W., Jovin T.M. FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *EMBO J* (1998) **17**:7179-7189.

## 9. KÖZLEMÉNYEK

### Az értekezéshez felhasznált közlemények

1. **Sebestyén Z.**, Nagy P., Horváth G., Vámosi G., Debets R., Gratama J.W., Alexander D.R., Szöllősi J.: Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* 2002, 48:124-35. **IF: 2,557**
2. Dornan S., **Sebestyén Z.**, Gamble J., Nagy P., Bodnár A., Alldridge L., Doe S., Holmes N., Goff L.K., Beverley P., Szöllősi J., Alexander D.R.: Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56<sup>lck</sup> tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 1912-1918. **IF: 7,368**

### Egyéb közlemények és absztraktok

1. Nagy P., Vereb G., **Sebestyén Z.**, Horváth G., Lockett S.J., Damjanovich S., Park J.W., Jovin T.M., Szöllősi J.: Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J. Cell Scien.* 2002 (*közlésre elfogadva*). **IF: 5,996**
2. Szöllősi J., Nagy P., **Sebestyén Z.**, Damjanovich S., Park J.W., Mátyus L.: Application of fluorescence resonance energy transfer for mapping biological membranes. *Rev. Mol. Biotech.* 2002, 82: 251-266
3. Szöllősi J., **Sebestyén Z.**, Nagy P.: Molecular superstructures in biological membranes (Molecular and Cellular Biology: from plant to human, pp:184-194, EMBO lecture course, 2000, Debrecen )
4. **Sebestyén, Z.**, Krekk, Z., Nagy, P., Vereb, G., Balogh, L., Barok, M., Bárdos, H., Damjanovich, S., Szöllősi, J.: Heteroassociations of erbB molecules on breast tumor cell lines. *Cytometry* 2001, 46: 212 (absztrakt)

5. Szöllősi, J., **Sebestyén, Z.**, Krekk, Z., Nagy, P.: The role of HER-2 oncogene in the metastasis of breast tumors. *Cytometry* 2001, 46: 212 (absztrakt)
6. Szöllősi, J., Vereb, G., **Sebestyén, Z.**, Nagy, P.: Molecular mapping of cell surface: technology and applications. *Cytometry* 2001, 46: 326 (absztrakt)
7. Nagy, P., Vereb, G., **Sebestyén, Z.**, Park, W.J., Szöllősi, J.: Receptor clustering and signal transduction by erbB2 receptor tyrosin kinase. *Clin. Lab.* 2001, 47: 639 (absztrakt)

### **Poszterek és előadások**

- II. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest 2000: Heteroassociation of erbB molecules on breast tumor cell lines (poszter)
- XXV. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg 2000: Heteroassociations of erbB molecules on breast tumor cell lines (poszter és előadás)
- IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen 2001: Különböző CD45 izoformák és a TCR komplex asszociációja T sejteken (poszter)
- III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest 2002: How to circumvent the low signal-to-noise ratio in flow cytometric energy transfer measurements (poszter)
- XXVII. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg 2002: Circumvention of low signal-to-noise ratio in flow cytometric energy transfer measurements (poszter)
- ISAC Conference, San Diego 2002: Improving flow cytometric energy transfer measurements on a commercial flow cytometer using cell-by-cell autofluorescence correction (poszter)

**10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ**  
**KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI**