

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

---

**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 SEJTBOLÓGIAI INTÉZET  
DEBRECEN, 2002**

## I. BEVEZETÉS

A fehérje-fehérje kölcsönhatások a legtöbb biológiai folyamatban kulcsszerepet töltenek be a makromolekulás szerkezetek és enzim-komplexek kialakulásától kezdve egészen a jelátviteli folyamatok szabályozásáig. 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 interakciók 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 erőségének a küszöbértékét határozza meg.

Ahhoz, hogy a membrán fehérjék, mint például a CD45 szerepét meghatározzuk, a funkcionális vizsgálatok mellett a molekula sejt felszíni topográfiájának, más lehetséges molekulákkal 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.

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 technika alkalmazásával a receptorok topográfiája azok *in vivo* membrán-környezetében vizsgálható, azonban a felhasználásának nagymértékben határt szab az, hogy a vizsgált fehérje viszonylag nagy számú kifejeződését igényli.

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

A CD45 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. A CD4

---

illetve CD8 koreceptorokhoz kapcsolódó p56<sup>lck</sup> kináz és a TCR $\zeta$  illetve a CD3 $\epsilon$  láncán található ITAM-ek (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) foszforilálásán keresztül a TCR jelátviteli kaszkádot indítja el.

A CD45 molekulák extracelluláris része az alternatív hasításnak (*RNS splicing*) köszönhetően 8 különböző izoformaként fejeződik ki a T sejtek felszínén, melyek közül számottevő mértékben 5 található meg T sejteken. 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. 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. Annak a molekuláris magyarázata azonban, hogy az egyes CD45 izoformák miként hatnak a TCR jelátvitelre, mindeddig tisztázatlan.

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.

### ***Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer elmélete és alkalmazhatósága***

A Förster típusú rezonancia energia transzfer során egy gerjesztett állapotú donor festékmolekula egy közeli akceptor festékmolekulának adja át az energiáját sugárzásmentes dipólus kölcsönhatáson keresztül.

Az egyik legfontosabb, az energia transzfer határfokát befolyásoló tényező, a donor és akceptor molekulák távolsága ( $R$ ): az energia transzfer hatékonysága a donor és akceptor távolságára rendkívül érzékeny és meredeken változik 1-10 nm távolságon belül, így mintegy „spektroszkópiás vonalzóként” használható és molekuláris asszociációk becsülhetők meg a segítségével.

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-hatékonysággal fluoreszkálnak. Az utóbbi folyamat a szenitizált emisszió.

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. Bár a FCET módszer nagy érzékenységgel és statisztikával használható a molekulák laterális elrendeződésének vizsgálatára, sejtes rendszereken való alkalmazása még nem hódított teret két fő okból:

- 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 lézerral felszerelt műszer vagy bonyolult kiértékelés, a donor kioltás nem használható a FRET hatékonyság sejtenkénti meghatározására.
- A FRET méréseknek mind a pontosságát, mind a reprodukálhatóságát veszélyezteti, ha a fluoreszcens próbával megjelölt fehérje expressziós szintje alacsony. Ilyen esetekben az autofluoreszcencia részesedése igen jelentős lehet a teljes fluoreszcencia jelhez képest.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során elsődleges célunk az volt, hogy a CD45 fehérje tirozin foszfatáz különböző izoformáinak szerepét a TCR jelátvitel feltehetően eltérő szabályozásában megismerjük. 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 CD45RABC izoformák között a fenti heteroasszociációt tekintve?
- Megfigyelhető-e a CD45 molekulák dimerizációja, és ez hogyan változik az egyes izoformák esetében?
- 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 sejtfelszíni molekulák (mint például a CD45 izoformák transzfektált HPB-ALL T sejteken) esetében nem szolgáltat megbízható eredményt a receptorok asszociációjáról. Ezért célul tűztük ki egy új, érzékenyebb módszer kidolgozását, ahol a magas autofluoreszcenciát sejtenként lehet korrigálni.
- Meg kívántuk vizsgálni, hogy ugyanazon intramolekuláris távolság esetében hogyan változik az energia transzfer hatékonyság értéke, ha az epitópokat különböző direkt illetve indirekt módszerekkel jelöljük meg.

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### *Sejtek*

Kísérleteinkhez CD45 negatív HPB-ALL sejtek CD45R0, RBC és RABC izoformák stabil transzfekciójával nyert sejt vonalakat, EBV transzformált JY humán B-limfoblaszt sejteket használtunk. Egészséges donorokból PBL-eket (peripheral blood lymphocytes) izoláltunk és egyláncú (sc) TCR:CD3 kiméra gén konstrukciót vittünk be retrovírusos transzdukcióval.

#### *Antitestek és azok jelölése fluoreszkáló festékekkel*

antigén	antitest	izotípus
MHC I nehéz lánc	W6/32	IgG2a
MHC I $\beta$ 2-mikroglobulin	L368	IgG1
CD45	pánCD45	IgG2a
TCR $\beta$ lánc	TCR V $\beta$ 1	IgG1
CD3	UCHT1	IgG1
CD3	OKT3	IgG2a
CD3	MEM57	IgG2a
CD4	MEM115	IgG2a
CD8	MEM31	IgG2a

Az indirekt jelölésekhez Cy3- és Cy5-jelölt, affinitás kromatográfiával tisztított nyúlban termeltetett egér ellenes  $\gamma$ 2a láncra specifikus IgG2a és nyúlban termeltetett egér ellenes  $\gamma$ 1 láncra specifikus IgG1 antitesteket, illetve kecskében termeltetett egér ellenes antitestek (könnyű és nehéz lánc specifikus) Fab fragmentumait használtuk.

Az antitestek Fab fragmentumait egy már korábban ismertett módszer szerint állítottuk elő. Az IgG-k papain emésztését követően a reakciót jódatetammiddal állítottuk le, majd Sephadex G-100 oszlopon választottuk el az Fab és Fc fragmentumokat tartalmazó frakciókat. Az Fab fragmentumokat protein A oszlopon szeparáltuk az Fc résztől.

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. Az antitesthez nem

kötődött festéket gél-szűrővel 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.

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

A sejteket hideg PBS-ben (pH 7.4) mostuk, majd kb. 1 millió sejtet szuszpendáltunk fel 1% BSA tartalmú PBS-ben. A sejteket ezután jégen, sötétben jelöltük a megfelelő fluorofór-konjugált monoklonális antitestek vagy azok Fab fragmentumainak telítő koncentrációjával.

Indirekt jelölés esetén a sejteket jelöletlen monoklonális antitestekkel inkubáltuk, majd hideg PBS-ben való mosás után Cy3- vagy Cy5-konjugált poliklonális nyúlban termeltetett egér ellenes antitesttel (IgG 1 vagy  $\gamma$ 2a láncra specifikus) végeztünk jelölést. Másodlagos Fab fragmentumokkal való jelöléskor az alábbi jelölési szekvenciát alkalmaztuk: (1) jelöletlen W6/32 antitest; (2) Cy3-jelölt GAMiG Fab fragmentumok; (3) jelöletlen GAMiG Fab fragmentumok (célja a W6/32 antitesten megmaradt szabad másodlagos antitest kötőhelyek blokkolása), (4) jelöletlen L368 mAb, (5) Cy5-konjugált GAMiG Fab fragmentumok.

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

A fluoreszcenciával és rodaminnal jelzett antitestek közötti energia transzfer mérésekhez FACScan (Becton Dickinson) áramlási citométert használtunk. Röviden, a donor fluoreszcenciát egy argon ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, és a donor fluoreszcenciáját  $530\pm 30$  nm-en 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. Ezek közül három esetén 488 nm-es gerjesztés mellett az emissziót  $530\pm 15$  nm-en,  $585\pm 21$  nm-en and 670 nm felett detektáltuk, míg a negyedik fluoreszcencia jelet 635 nm-en gerjesztettük és  $661\pm 8$  nm-en detektáltuk. A donor és akceptor jelölt antitestek átlagos távolságát

jellemző energia transzfer hatékonyságot sejtenként számoltuk ki a négy detektált fluoreszcencia paraméterből.

***Immunprecipitáció és immunoblotting***

A stimulált sejteket lizáló pufferrel kezeltük, a sejtmagokat és a sejttörmeléket centrifugálással távolítottuk el. A teljes sejt-lizátum immunoblot analíziséhez a mintákat Laemli pufferben főztük. A TCR $\zeta$  immunprecipitációhoz a mintákat protein G-Sepharose Bead-del forgattuk. Az így előtisztított lizátumokat inkubáltuk az immunprecipitáló antitesttel. Az immun-komplexek kinyeréséhez G-Sepharose Bead-eket használtunk. A CD4 immunprecipitációhoz a sejteket CD4 antitesttel fedtük. Az *in vitro* kináz esszé során az immun-komplexeket kináz pufferben mostuk. A kináz reakció elindítását kináz pufferrel (dithiotreitol, ATP and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP) végeztük, majd a reakciót Laemli pufferrel és forralással állítottuk le. Az immunoblottok és autoradiográfok kiértékelését LAS-1000 CCD kamera és AIDA képelemző szoftver segítségével végeztük.

#### IV. EREDMÉNYEK

##### *FCET mérések sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciója*

Ahhoz, hogy a FCET módszer alacsony jel/zaj aránnyal rendelkező rendszereken is alkalmazható legyen, vörösben emittáló Cy3 és Cy5 festékeket használtunk donor-akceptor párként. Ezen kívül a módszert egy olyan matematikai összefüggéssel egészítettük ki, amely lehetővé tette az autofluoreszcencia sejtenkénti korrekcióját. Két biológiai rendszert használtunk a módszer tesztelésére:

1. A CD45R0 izoforma expressziója túl alacsony volt ( a jel:autofluoreszcencia arány 1:1) transzfektált HPB-ALL T sejtvonalon ahhoz, hogy a hagyományos FCET módszerrel pontosan meghatározzuk a molekulák homodimerizációjának mértékét. Az autofluoreszcencia sejtenkénti korrekciója az energia transzfer hisztogram sokkal megbízhatóbb meghatározását tette lehetővé: a továbbfejlesztett módszer a hisztogram pozitív tartományokba való eltolódását, és alacsonyabb szórását eredményezte.
2. 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 módszer használata ezt jelentősen megnehezítette az energia transzfer eloszlásának nagy szórása miatt. Az általunk kifejlesztett új FCET módszert alkalmazva sokkal pontosabban megkülönböztethetők az eltérő energia transzfer hatékonyságot mutató sejtpopulációk.

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 (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).

---

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

Az MHC I molekula nehéz és könnyű láncának ( $\beta_2m$ ) W6/32 illetve L368 monoklonális antitestekkel való direkt és indirekt jelölésével, az alkalmazott antitest komplexek méretét, így a donor és akceptor festékek távolságát jelentős mértékben változtattuk. A fluoreszkáló molekulák közötti távolság változásai jelentősen hatottak az energia transzfer értékekre. A fluoreszcensen jelölt elsődleges antitestekkel vagy azok Fab fragmentumaival való jelölésnél mért energia transzfer hatékonyságokhoz képest (28-30 % körül) a kötőhelyeket Cy3 illetve Cy5 festékekkel konjugált másodlagos Fab fragmentumokkal jelölve a FRET hatékonyság nagymértékű csökkenését (15 %) tapasztaltuk. Amikor a sejtek jelöléséhez poliklonális teljes IgG-t használtunk a másodlagos Fab fragmentumok helyett, az energia transzfer további csökkenését figyelhettük meg (~ 8 %). Abban az esetben, amikor a donor indirekt jelzésére Fab fragmentumot használtunk, miközben az akceptort direkt módon jelöltük, az energia transzfer értéke a direkt és indirekt jelölésnél tapasztalt értékek közé esett (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 %).

***Különböző CD45 izoformák asszociációs mintázata HPB-ALL sejteken***

Áramlási citometriás energia transzfer méréseink a CD45R0 izoformák szoros kölcsönhatását mutatták ki a CD4 és CD8 ko-receptorokkal, míg a CD45RBC és CD45RABC izoformák esetében hasonló asszociációt nem találtunk. A CD45R0-CD4/CD8 asszociációra vonatkozó energia transzfer hatékonyság 7.2-12.2 % értékeket mutatott, ami arra utal, hogy a CD45R0 molekulák egy része 10 nm távolságon belül helyezkedik el a CD4/CD8 molekulák egy részéhez képest.

A különböző CD45 izoformák homoasszociációját FCET mérésekkel végeztük úgy, hogy a sejteket Cy3- és Cy5-CD45 Fab fragmentumok 1:1 arányú keverékével jelöltük. A három CD45 izoformát megvizsgálva csak a CD45R0 izoformák alkottak homoasszociátumokat: átlagosan  $11.0 \pm 4.4$  % FRET hatékonyságot mutatva, ellenben a CD45RBC<sup>+</sup> és CD45RABC<sup>+</sup> szubklónokkal, ahol ez az érték  $1.2 \pm 0.4$  % és  $1.8 \pm 1.4$  % volt.

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

A CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> kináz aktivitás átlagosan kétszer magasabb volt a CD45R0<sup>+</sup> szubklónban a CD45RBC<sup>+</sup> szubklónhoz képest. Az alap fehérje tirozin foszforiláció szintje szintén a CD45R0<sup>+</sup> sejtekben volt magasabb.

A TCR- $\zeta$  lánc immunprecipitációja, majd a foszfortirozin immunblottolása kimutatta, hogy a CD3-CD4 keresztkötése 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.

## V. 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 érzékenyséű 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 sémákon. 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) A CD45R0<sup>+</sup> T sejtek megemelkedett CD4-asszociált p56<sup>lck</sup> alap kináz aktivitását és a TCR jelátvitel megnövelt aktivitású foszforilációs eseményeit sikerült kimutatni, ami

## Összefoglalás

---

összhangban áll a receptor mintázat megfigyelt eltéréseivel. Megfigyeléseink nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a CD45R0 homoasszociációja gátolja a CD45 PTPáz aktivitását, azonban a jelen kísérleti 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.

## **VI. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSA**

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, 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.

**VII. AZ ÉRTEKEZÉSBEN 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:**

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 )