

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Immunfehérjék sejtfelszíni mintázatának jellemzésére
alkalmazható mintaelőkészítési eljárások fejlesztése
transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz**

Kormos József

Témavezető: Dr. Jenei Attila



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1 Interleukin-2 és interleukin-15 receptorok.....	7
2.2 I és II osztályú fő humán leukocita antigén (HLA I, HLA II).....	9
2.3 A Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) sejtvonala	11
2.4 Fehérje mintázatok leírására alkalmazott technikák	12
2.4.1 Konvencionális optikai mikroszkóp	12
2.4.2 Fluoreszcencia mikroszkóp	13
2.4.3 Konfokális mikroszkópia	14
2.4.4 Szuperfeloldású optikai mikroszkópia	15
2.4.4.1 Sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (STORM) és Fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia (PALM)	16
2.4.4.2 Stimulált emissziós kioltás (STED) mikroszkópia.....	18
2.4.5 Förster féle rezonancia energia transzfer (FRET)	20
2.4.6 Elektronmikroszkópia	22
2.4.6.1 Transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)	24
2.4.6.1.1 A transzmissziós elektronmikroszkópos minta előkészítés.....	26
3. Célkitűzések.....	28
4. Anyagok és módszerek	29
4.1 A vizsgálatokhoz alkalmazott sejtvonalaak tenyésztése	29
4.2 Az IL-2R α és IL-15R α sejt felszíni receptorok mintázatának vizsgálata új szoftver (és a PCF, illetve PCCF függvények) segítségével	29
4.3 Sejt felszíni molekulák mintázatának vizsgálata az új protokoll segítségével	30
5. Eredmények	32
5.1 Transzmissziós elektronmikroszkópos minták előkészítésének továbbfejlesztése sejt felszíni fehérjék eloszlásának vizsgálatára	32
5.1.1 Transzmissziós elektronmikroszkópos minták előkészítésének protokollja	36
5.1.1.1 TEM rostély (grid) előkészítése (kollódium hártakészítés).....	36
5.1.1.2 Arany gyöngy konjugálása specifikus antitesttel (Konjugáló Kit).....	37
5.1.1.3 A konjugáláshoz használt elsődleges antitestek	38
5.1.1.4 Sejtjelölés elsődleges antitesttel konjugált immunogolddal	38
5.1.1.5 Kritikuspontra szárítás	39
5.1.1.6 Szénhártya vákuumpárologtatás	40
5.1.1.7 Kollódiumhártya kioldás	40
5.1.1.8 Minta kémiai vékonyítása.....	41
5.1.1.9 Transzmisszió elektronmikroszkópos mérések	41

5.1.1.10	Immunogold aranyömbök pozíciójának meghatározása a ClickOnGold program segítségével.....	41
5.1.1.11	Pontmintázatok kiértékelése, a párkorrelációs (PCF) és párkeresztkorrelációs függvény (PCCF).....	43
5.1.1.12	A fehérjemintázatok kiértékelése, feltérképezése (a párkorrelációs függvény meghatározása) a Gold szoftver segítségével.....	47
5.2	IL-2R α és IL-15R α sejtfelszíni fehérjék proximitás viszonyainak vizsgálata Kit 225 FT7.10 T-limfocita sejtvonalon.....	49
5.3	Sejtfelszíni fehérjék proximi tásvizonyainak megváltozásának vizsgálata HLA DQ fehérjének megjelenésével, Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) sejtvonalon transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével	52
6.	Megbeszélés	56
7.	Összefoglalás	62
8.	Summary	63
9.	Irodalomjegyzék.....	64
10.	Tárgyszavak	70
11.	Köszönetnyilvánítás	71
12.	Függelék.....	72

Rövidítések jegyzéke

APC	Antigén prezentáló sejt (Antigen Presenting Cell)
BLS	Csupasz limfocita szindróma (Bare Lymphocyte Syndrome)
CPD	Kritikusponton szárítás (Critical Pointing Drying)
CTL	Citotoxikus T-sejtek (Cytotoxic T Cell)
CSR	Teljes térbeli véletlenszerűség (Complete Spatial Randomness)
FBS	Magzati borjú szérum (Fetal bovine serum)
FRET	Förster-típusú rezonancia energiatranszfer (Förster Resonance Energy Transfer)
HLA	Humán leukocita antigén (Human Leukocyte Antigen)
IL-2	Interleukin-2 (Interleukin-2)
IL-15	Interleukin-15 (Interleukin-15)
NK	Természetes ölősejt (Natural Killer cell)
PALM	Fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia (Photoactivated Localization Microscopy)
PCCF	Párkeresztkorrelációs függvény (Partial Cross-Correlation Function)
PCF	Párkorrelációs függvény (Pair Correlation Function)
SEM	Pásztázó elektronmikroszkópia (Scanning Electron Microscope)
SNOM	Közeltér optikai mikroszkóp (Scanning Near-field Optical Microscope)
STED	Stimulált emisszió kioltású mikroszkópia (Stimulated Emission Depletion)
STORM	Sztokasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)
TCR	T-sejt receptor (T-Cell Receptor)
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkópia (Transmission Electron Microscopy)
TIRF	Teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia mikroszkópia (Total Internal Reflection Fluorescence)

1. Bevezetés

A sejtfelszíni fehérjék által kialakított mintázatok kutatása már régóta vizsgált terület a biológiai tudományokban. Ennek oka, hogy számos kutatás eredményeképpen összefüggésbe lehet hozni a fehérjeklasztereket és tulajdonságaikat több sejtfunkcióval.

Többek között az adaptív immunválasz első lépése a T-sejt-receptorokat (TCR) kifejező T-sejtek és az antigénprezentáló sejtek (APC) által kifejezett, peptiddel telített Humán Leukocita Antigén (HLA) kölcsönhatása. Az azonban nem részletében tisztázott, hogy ez pontosan hogyan vezet a TCR aktiválásához. A legújabb eredmények azt sugallják, hogy az egyik kulcsfontosságú esemény a nagy, receptor típusú tirozín-foszfatáz CD45 kizárása a T-sejt/APC kölcsönhatás helyein kialakult szoros kontaktusokból. Annak teljes megértéséhez, hogy a szoros kontaktus kialakulása miként vezet a jelátvitelhez az aktiválódás mechanizmusának lépéseit kell vizsgálni. Nehéz szerkezeti betekintést nyerni ezeknek a fehérjéknek a dimenzióiba krisztallográfiai módszerekkel, és a sejtfelszínen lévő konformációik sem ismertek.

A múltban számos optikai képalkotó technikát fejlesztettek ki a sejtfelszíni fehérjemintázatok ~~sejtfelszínen történő~~ elemzésére [1]. A T-sejt receptorkomplex elemeinek klaszterizációja fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban és az antigénfelismerésben [2]. A TCR alapvető funkciója, hogy a humán leukocita antigén (pHLA) peptidjeit megfelelő intracelluláris jelekké alakítsa át a kapcsolódó differenciálódási klaszter 3 (CD3) komplexen keresztül. A TCR-CD3 komplex membránban való térbeli szerveződése a jelátvitel kulcsfontosságú szabályozó elemének tekinthető, ami felveti a kérdést, hogy a receptorok klaszterbe rendeződése hogyan befolyásolja a TCR aktiválását [2, 3]. A molekuláris képalkotás azt mutatja, hogy a jelátvitel akkor indul meg, amikor az egyes receptorok a megfelelő ligandok bekötődésére klaszterizálódnak, és ez egy időfüggő folyamat, amely hosszabb kötődési idejű ligandumokat igényel. Egy modell azt mutatja, hogy a receptorok klaszteresedése kinetikai ellenőrző funkciót tölt be, lehetővé téve a hosszabb kötődési idejű ligandumok számára, hogy aránytalanul nagyobb jelátviteli teljesítményt érjenek el. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a receptorok térbeli átrendeződése fontos szerepet játszik a ligandumok megkülönböztetésében a T-sejtes jelátvitelben [4].

A munkánk első részében az vizsgáltuk, hogy hogyan tudnánk minél pontosabb leírást adni a sejtfelszíni molekulák eloszlására hagyományos transzmissziós elektronmikroszkópia felhasználásával, illetve a módszer alkalmazása releváns biológiai

rendszeren, egy pontosabb leíróstatisztika, úgynevezett másodrendű függvények használata, a pár-, és a keresztpárkorrelációs függvény (PCF, PCCF) alkalmazásával a molekulaeloszlás leírására.

Elsőként az új függvények alkalmazásához szükséges, a munkacsoportunk által kifejlesztett szoftver kifejlesztése és alkalmazása volt az interleukin-2 és -15 citokinek receptorain (IL-2R, IL-15R) Kit 225 FT7.10 humán T limfóma sejteken. Az IL-2 és IL-15 kulcsfontosságú résztvevői a T-sejtek aktivitásának és működésének. Ezek a citokinek biológiai aktivitásukat a jelátviteli β és γ_c alegységeken osztozó receptorkomplexeken keresztül fejtik ki, így sok esetben hasonló sejtválaszokat indukálnak [5]. Ugyanakkor meglehetősen eltérő és ellentétes hozzájárulást is mutathatnak a T-sejt által közvetített immunitáshoz. A legtöbb javasolt mechanizmus, amely az IL-2 és IL-15 jelátvitel eltéréseinek hátterében állhat, a két citokin receptorának egyedi, citokin specifikus α -láncán alapul [5, 6]. Ezért az IL-2R α és az IL-15R α sejtfelszíni szerveződésének és kölcsönhatásainak vizsgálata hozzájárulhat a két citokin funkciójának megértéséhez.

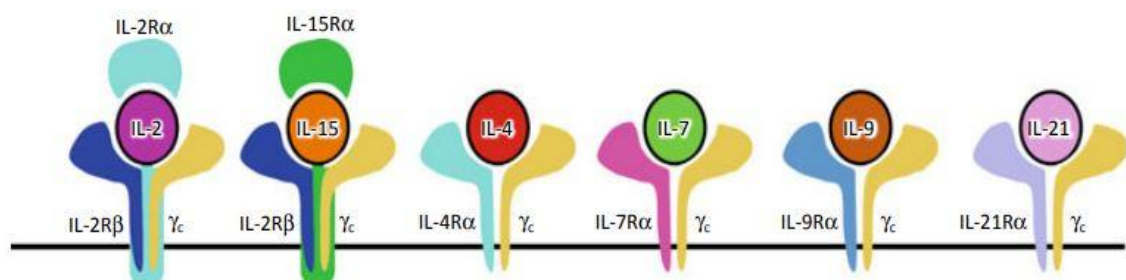
Másodsorban vizsgálni kívántuk, hogy egy új sejtfelszíni molekula megjelenése milyen hatással van a környező fehérjék eloszlására. Az általunk kifejlesztett protokollt alkalmaztuk Bare Lymphocyte Syndrome (BLS), illetve a transzfektált BLS sejtvonalakon. A BLS egy ritka recesszív genetikai mutáció, amely sejtek felszínén nem fejeződik ki a HLA II fehérje. A BLS sejtvonalon végzett transzfekció után az újonnan megjelent HLA II fehérjék megváltoztatták bizonyos más molekulák eloszlását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Interleukin-2 és interleukin-15 receptorok

A citokinek olyan kiválasztott fehérjék, amelyek kölcsönhatásba lépnek a sejtfelszíni receptorokkal, hogy szabályozzák például az immunsejtek működésének gyakorlatilag minden aspektusát, ideértve a differenciálódást, a sejtszétválást, a migrációt és a túlélést. Továbbá irányítják mind a veleszületett, mind az adaptív immunválaszt [7-9].

A citokinek és receptoraik I-es (vérképzőszervi) vagy II-es (interferon) típusba sorolhatók. Az I. típusú citokinek a közös receptor-alegységek alapján tovább csoportosíthatók a közös γ (γ_c), illetve a gp130 citokincsaládokba. A dolgozatom témájául szolgáló IL-2 és IL-15 receptorok a γ_c családba tartozó citokinek. A γ_c citokincsalád hat rövid láncú citokint foglal magában: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 és IL-21 (ld. 1. ábra).



1. ábra A γ_c citokincsalád tagjai és receptoraik

Ezek a citokinek különböző receptorkomplexeken keresztül adnak szignált, amelyek mindegyike tartalmazza a γ_c -láncot. Az IL-2 és IL-15 receptorok felépítésben egy további közös alegység is részt vesz (IL-2/15R β). Fontos szerepet játszanak több immunsejt-alcsoport fejlődésében, növekedésében és fenntartásában [10, 11].

Az IL-2 és IL-15 befolyásolja a veleszületett és adaptív immunitásban. Bár az IL-2 és IL-15 receptor komplexek hasonló jelátviteli kaszkádokat aktiválnak, ezek a receptor komplexek eltérő funkcionális aktivitást eredményeznek a limfocitákban. Míg az IL-2 növeli a szabályozó T-sejtek és a CD4+ segéd T-sejtek számát, az IL-15 a központi memória T-sejtek és NK-sejtek fejlődését támogatja. A legújabb adatok bizonyítékot szolgáltatottak arra vonatkozóan, hogy az IL-2 és az IL-15 különbözik abban a képességében, hogy aktiválja a T- és NK-sejteket, hogy ellenálljon az immunszuppresszió különböző formáinak. Ennek a két citokinnek az immunsejtekben betöltött eltérő szerepe kritikus a rák terápiás kezelésében is [12].

Az IL-2 és IL-15 receptorai egyaránt heterotrimerek, a közös γ_c (más néven IL-2R γ vagy CD132) kívül osztoznak a β alegységen is (IL-2/15R β , CD122) [13]. Az IL-2 és IL-15 harmadik és az adott receptorra jellemző receptor alegysége az IL-2R α , illetve az IL-15R α . A γ_c citokincsalád együttesen befolyásolja az immunsejtek fejlődését, sejtosztódását, differenciálódását és túlélését [6, 14-16]. Kezdetben az adaptív immunrendszert befolyásoló limfocita növekedési faktorként fedezték fel, de világossá vált, hogy ezek a citokinek a veleszületett immunválaszban is részt vesznek. Mind az IL-2, mind az IL-15 kritikus szabályozói a veleszületett limfoid sejteknek [17, 18]. Az IL-2 elősegíti a kórokozók neutrofilek általi eliminációját, az IL-15 pedig a CD8 α^+ intraepiteliális limfociták differenciálódását közvetíti, a T-sejt segítségével [19]. Az IL-2 és IL-15 számos hasonló funkciót közvetít az immunmodulációban, a közös receptorkomponensek és a JAK/STAT jelátviteli útvonal közös következményeként. Ezek a funkciók magukban foglalják a CD4 $^+$ és CD8 $^+$ T-sejtek osztódásának és aktiválásának elősegítését, a T helper sejtek differenciálódásának indukálását és az aktivált B-sejtek immunglobin szintézisének fokozását. Ezenkívül ez a két citokin döntő szerepet játszik az NK-sejtek tartós fenntartásában is fokozva az NK-sejtek és a CD8 $^+$ T-sejtek citolitikus aktivitását. Az IL-2/15R β és γ_c korlátozott mértékben fejeződik ki limfohematopoietikus sejteken, beleértve a T és NK-sejteket, monocitákat és neutrofileket [20, 21]. Mindazonáltal a humán fibroblasztokról is megállapították, hogy funkcionális IL-2/15R β -t és IL-2R α -t is kifejeznek, de ennek a következményei továbbra sem tisztázottak [22]. Kimutatták, hogy a γ_c kifejeződést az IFN γ és az IL-2 fokozza a monocitákban, míg a TGF- β 1 gátolja [23].

Korábbi eredmények kimutatták, hogy az IL-2 és IL-15 receptorok erős asszociációt mutatnak egymással, illetve az I-CAM1 és HLA molekula minkét osztályával Förster-típusú rezonancia energiatranszfer (FRET) segítségével. Összehasonlították egészséges donorokból és kolorektális karcinómában szenvedő betegekből származó CD4 $^+$ T-sejtekkel. Az IL-2 és IL-15 receptorok a HLA molekulákkal való asszociációja azonban szignifikánsan csökkent a nyirokcsomó sejtekben a kontrollokhoz képest. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezek a mintázatok fiziológiai/kóros állapotok indikátorai lehetnek [6].

2.2 I és II osztályú fő humán leukocita antigén (HLA I, HLA II)

A HLA által kódolt molekulák saját vagy idegen peptideket kötnek meg, és ezeket a sejtfelszínen jelenítik meg, hogy a T-limfocitákon (T-sejt-receptorok – TCR) vagy a természetes ölő (NK) sejteken lévő receptorok felismerjék. Ezek a ligand/receptor kölcsönhatások szabályozzák a T-sejtek és NK-sejtek fejlődését, valamint a T-memória és effektorsejtek aktiválását. Az ilyen sejtek olyan immunológiai folyamatokban vesznek részt, amelyek szabályozzák a különféle kórokozókkal szembeni védekezést, a rákkal szembeni rezisztenciát és fogékonyságot, valamint az autoimmunitást [24-26].

A celluláris immunválasz feladata, hogy különbséget tegyen a gazda genomja által kódolt molekulák és a fertőzésekből vagy sejt szabályozási zavarokból származó molekulák között.

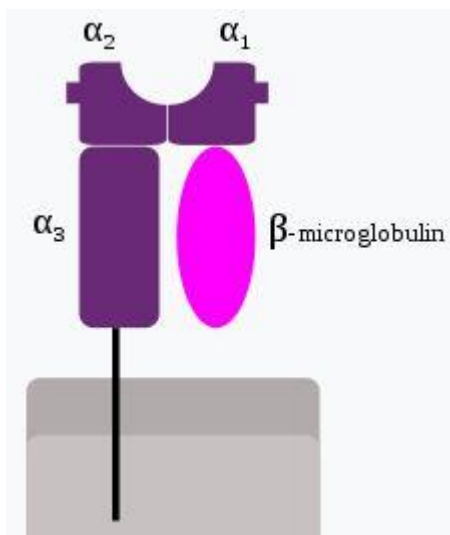
Szinte minden sejt típus képes valamilyen módon antigéneket prezentálni, melyek különféle szövettípusokban találhatók meg. A dedikált antigénprezentáló sejtek, beleértve a makrofágokat, B-sejteket és dendritikus sejteket, idegen antigéneket mutatnak be a segítő T-sejteknek, míg a vírussal fertőzött sejtek (vagy rákos sejtek) a sejt belsejéből származó antigéneket mutathatják be a citotoxikus T-sejteknek. A HLA fehérjecsalád mellett az antigénprezentáció más speciális jelátviteli molekulákra is támaszkodik, mind az APC-k, mind a T-sejtek felszínén.

A HLA I molekulák megkötik azokat a peptideket, amelyek főként a citoszolikus fehérjék proteoszóma általi lebontásából származnak. Az HLA I peptid komplex ezután az endoplazmatikus retikulumon keresztül beépül a sejt külső plazmamembránjába. Az epitóp peptid az I. osztályú HLA molekula extracelluláris részeihez kötődik. Így az I. osztályú HLA funkciója az intracelluláris fehérjékből származó peptidfragmentumok megjelenítése a citotoxikus T-sejtek (CTL) számára. Az I. osztályú HLA azonban képes exogén fehérjékből előállított peptideket is bemutatni a keresztprezentációnak nevezett folyamatban.

Egy normál sejt a normál celluláris fehérjeforgalomból származó peptideket jeleníti meg az I. osztályú HLA-n, és a CTL-ek nem aktiválódnak válaszul ezekre a központi és perifériás tolerancia mechanizmusok miatt. Amikor egy sejt idegen fehérjét fejez ki, például vírusfertőzés után, az I. osztályú HLA egy része ezeket a peptideket jeleníti meg a sejtfelszínen. Következésképpen az HLA I peptid komplexre specifikus CTL-ek felismerik és elpusztítják a prezentáló sejteket.

Alternatív megoldásként maga az I. osztályú HLA szolgálhat az NK-sejtek gátló ligandumaként. Az I. felszíni osztályú HLA normál szintjének csökkenése, amely mechanizmust egyes vírusok és bizonyos daganatok alkalmaznak a CTL válaszok elkerülésére, aktiválja az NK-sejtek pusztulását [27].

A HLA I fehérjék heterodimerek, amelyek két polipeptidláncból, az α -láncból és



2. ábra A HLA I molekula vázlatos szerkezete.

Három α -doménből és egy β_2 -mikroglobulinból (β_2m) áll. A peptidkötő zseb az α_1 és α_2 domének között található.

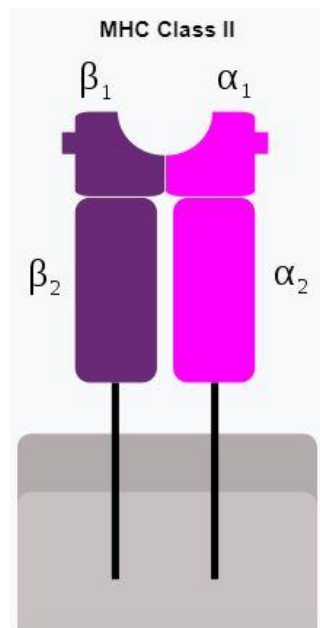
a β_2 -mikroglobulinból (β_2m) állnak, lásd 2. ábra.

A két lánc nem kovalensen kapcsolódik a β_2m és az α_3 domén kölcsönhatásával. Az α lánc polimorf és a HLA I gén kódolja, míg a β_2m alegység nem polimorf, és a β_2 -mikroglobulin gén kódolja. Az α_3 domén a plazmamembránon átívelő, és kölcsönhatásba lép a T-sejtek CD8-koreceptorával. Az α_3 -CD8 kölcsönhatás tartja a helyén az HLA I molekulát, míg a citotoxikus T-sejt felszínén lévő T sejt receptor (TCR) megköti az α_1 - α_2 heterodimer ligandumát, és ellenőrzi a kapcsolt peptid antigenitását. Az α_1 és α_2 domének összehajlanak és egy zsebet képeznek a peptidek megkötéséhez. Az

HLA I molekulák túlnyomórészt 8-10 aminosav

hosszúságú peptideket kötnek meg, de megfigyelték ennél hosszabb peptidek kötődését is.

Az HLA I fehérjékhez hasonlóan a HLA II fehérjék is heterodimerek, de ebben az esetben két transzmembrán peptidből, egy α és β láncból állnak, mindkettőt a HLA gén kódolja (3. ábra). Az α_1 , α_2 stb. aljelölés a HLA fehérjén belüli különálló doménekre



3. ábra A HLA II vázlatos szerkezete.

A molekula két α -doménből és két β -doménből áll. A peptidkötő zseb az α_1 és β_1 domének között található.

utal; minden domént általában a génen belül más-más exon kódol, és néhány génnek további doménjei vannak, amelyek vezető szekvenciákat, transzmembrán szekvenciákat stb. kódolnak. Ezek a molekulák extracelluláris régiókkal, valamint transzmembrán szekvenciával és citoplazmatikus farokkal is rendelkeznek. A láncok α_1 és β_1 régiói egyesülve egy membrán-disztális peptidkötő domént alkotnak, míg az α_2 és β_2 régiók, a láncok fennmaradó extracelluláris részei egy membrán-proximális immunglobulin-szerű domént alkotnak. A peptidkötő zseb két α -hélix és β -lemezből áll (3. ábra).

Az HLA II molekulák által bemutatott peptidek hosszabbak, általában 15 és 24 aminosav hosszúságúak.

2.3 A Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) sejtvonal

A Bare Lymphocyte Syndrome (vagy csupasz limfocita szindróma) egy ritka örökletes immunhiány, amelyet a sejtfelszíni HLA II expresszió hiánya jellemez. Miután a HLA II molekulák központi szerepet töltenek be a CD4⁺T-sejtek fejlődésében és aktiválásában, ezért az ebben a szindrómában szenvedő betegek immunrendszere súlyosan károsodott [28]. Az érintett gének az RFXANK, RFX5, RFXAP és a CIITA, amelyek specifikusak és elengedhetetlenek az HLA II gének kifejeződéséhez. Az első három gén a heterotrimer RFX alegységeit kódolja, amely az összes HLA II promóterhez kötődik. A CIITA egy nem DNS-kötő koaktivátor, amely az HLA II kifejeződésének fő szabályozója. Az RFX és a CIITA tanulmányozása nagyban hozzájárult az HLA II géneket szabályozó molekuláris mechanizmusok megértéséhez, ezért például a BLS sejtvonal a génexpresszió szabályozásának modellje [29].

2.4 Fehérje mintázatok leírására alkalmazott technikák

A mikroszkópai technikák, amelyek alkalmasak a sejtfelszíni fehérjék vizualizációjára, és így például a mintázatuknak vagy a lehetséges klaszterizációjuknak jellemzésére többféle technika áll rendelkezésünkre. Alapvetően négy nagy csoportra oszthatjuk: optikai mikroszkópos, transzmissziós elektron mikroszkópos (TEM), atomerő vagy pásztázószondás mikroszkópos (AFM) és egy negyedik, a Förster-féle energiatranszfer (FRET) technikára. A FRET esetében az energiaátadás nem sugárzásos energiaátmenettel történik, de a vizsgálat mégis lézerpásztázó mikroszkóppal és áramlási citométerrel végezzük. Az utóbbi évek nagymértékű fejlesztéseinek köszönhetően, a fénymikroszkópai technikák újabb két nagy csoportra oszthatjuk: hagyományos és szuperfeloldású fénymikroszkópia.

2.4.1 Konvencionális optikai mikroszkóp

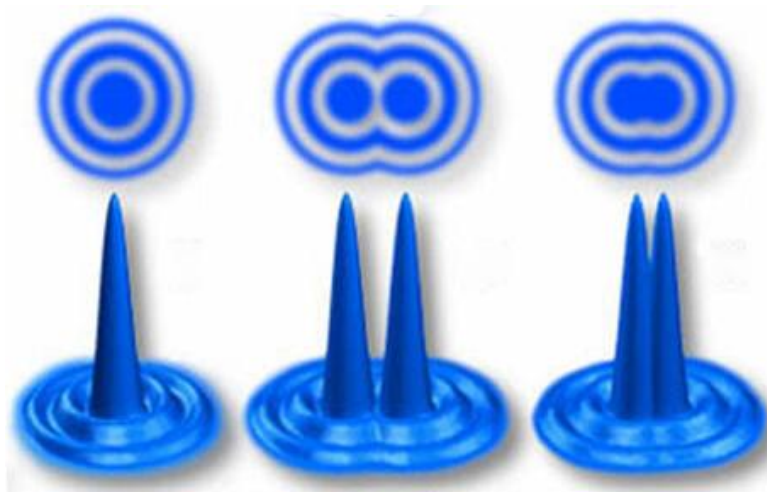
A konvencionális optikai mikroszkóp felbontásának (azaz a két pontszerűnek tekinthető objektum között lévő minimális távolság, ahol a két pont elkülöníthető) határát az Abbe-elv értelmében a diffrakcióból eredő korlát okozza. Eszerint a képalkotás feltétele, hogy a mintán elhajlott fény 1. rendű maximumán kívül, legalább a 2. rendűt is detektáljuk. Matematikai leírás a következő:

$$d = 0,5 \cdot \frac{\lambda}{n \cdot \sin \omega},$$

ahol d paraméter a legkisebb feloldható távolság, λ a megvilágító fény hullámhossza, az ω pedig az objektív félnyílásszöge.

A probléma egy másik megközelítése a Rayleigh-féle kritérium, miszerint két pont képe akkor különíthető el, ha az egyik pont diffrakciós képének centrális maximuma egybeesik

a másik pont elsőrendű minimumával. A jobb megértés érdekében, a vizuális magyarázat a 4. ábrán látható [30]. A baloldali panelen az önálló pontszerű tárgy Airy korongja látható, ami egy pontszerű fényforrás leképezésénél a központi korong, ami körül sötét és filágos körvonalak vesznek körül, amik kifelé haladva egyre halványodnak. Az



4. ábra Airy korongok.

Pontszerű (a megvilágító fényforrás hullámhosszával összemérhető) tárgy diffrakciós képe (felül) és intenzitáseloszlása (alul)

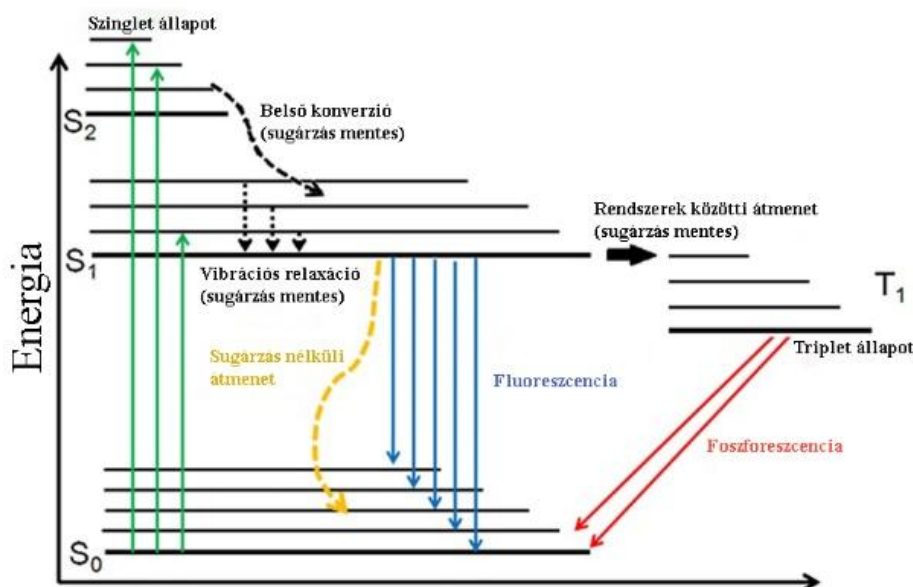
effektus a fény hullámtermészetének köszönhető fénylehajlással magyarázható. A középső panel két, még éppen megkülönböztethető pontszerű tárgy, míg a jobboldali panel már fel nem oldható két pontszerű tárgy esetén mutatja az Airy

korongokat, illetve a diffrakciós fény intenzitáseloszlását. Ebből adódóan a fénymikroszkópok felbontása erősen korlátozott, ami függ a megvilágító fény hullámhosszától és az optika tulajdonságaitól, elősorban az objektív numerikus apertúrájától; ennek megfelelően a fénymikroszkóp esetében egy 500 nm hullámhosszúságú fluoreszcens fény detektálását feltételezve a legkisebb feloldható távolság megközelítőleg minimum ~ 250 nm laterálisan és 500 nm az axiálisan.

2.4.2 Fluoreszcencia mikroszkóp

A biológiai minták esetében mára már főképp fluoreszcens jelölés alkalmaznak. Előnye, hogy a mintában vizsgálandó fehérjéket szelektíven tudjuk jelölni, így alkalmasan kiválasztott festékmolekulák használatával, a különböző fehérjéket különböző hullámhosszúságú fénnel (általában lézerrel) tudjuk gerjeszteni és a festékre vagy festékekre jellemző emissziós hullámhosszúságú fluoreszcens fotont detektálni. A technika előnye, hogy a gerjesztő és emittált foton hullámhossza az adott festékre jellemző és festékenként eltérő lehet. A gerjesztő foton hullámhossza rövidebb, mint a fluorofór által kibocsájtott fluoreszcens fotonok hullámhossza, így alul levágó, felül levágó, és sávszűrők alkalmazásával könnyedén elkülöníthető a gerjesztési fény az emittált fluoreszcens fénytől dikroikus tükör segítségével, illetve több típusú festék

alkalmazása esetén, a különböző fluorofórok illetve fehérjék is elkülöníthetők. A festékmolekula lehetséges energiaviszonyai jól szemléltethetők a Jablonski diagram segítségével, ami a 5. ábrán látható [31].



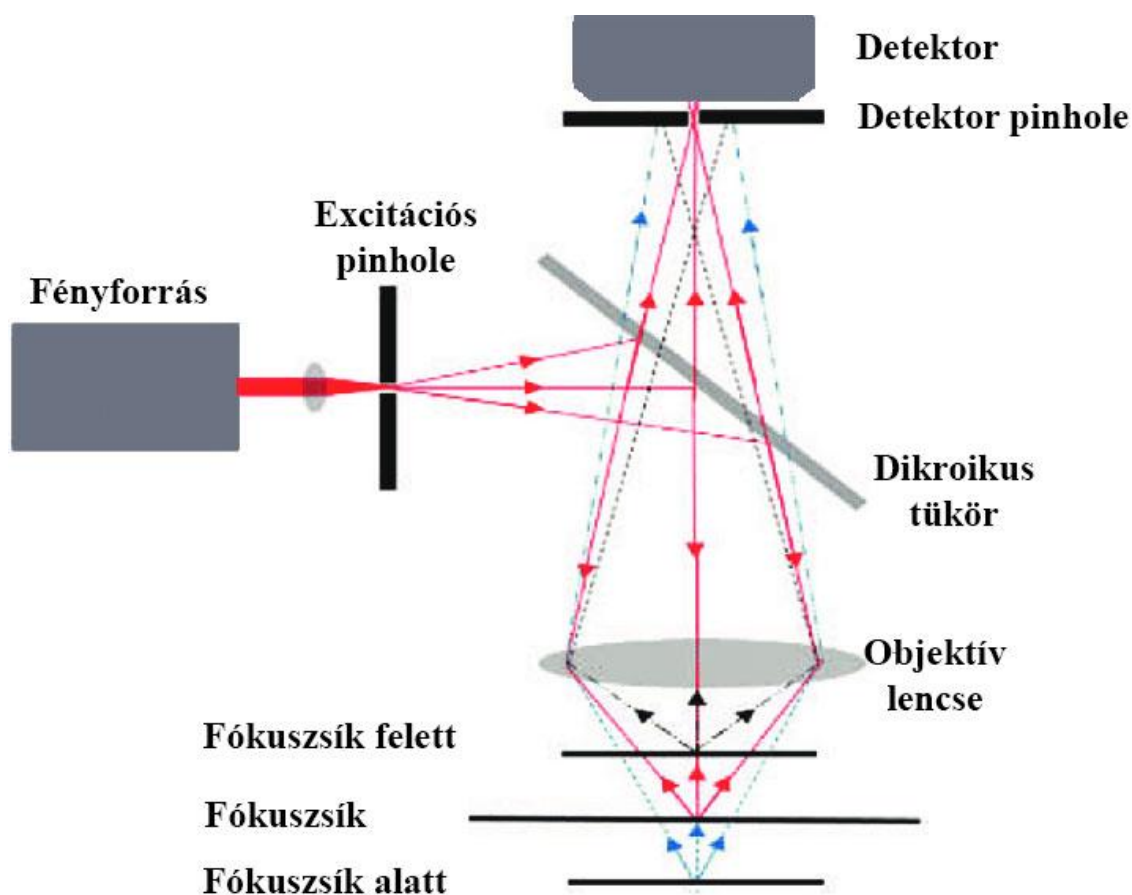
5. ábra A fluoreszcens molekula lehetséges átmeneteit leíró Jablonski diagram

A lehetséges átmenetek a következők. A gerjesztés után a molekula valamelyik szinglet állapotba kerül (S1 vagy S2) azon belül is valamelyik vibrációs szintre, amiből kitűnik, hogy a gerjesztési hullámhossz nem diszkrét, amiről legerjesztődik az adott szinglet állapot alapszintjére. Abban az esetben, ha a gerjesztés alatt nem az S1 állapotba gerjesztődött a molekula, úgy az belső konverzióval S1 szinglet állapot alapszintjére kerül. Ezután három lehetséges folyamat játszódhat le, foton kibocsátás nélküli átmenet, fluoreszcencia és foszforeszcencia. A fluoreszcencia esetén a molekula legerjesztődik az S0 alapállapot valamelyik vibrációs szintjére sugárzásos átmenettel, ami fénykibocsátással jár. A különböző S0 vibrációs energiaszinteknek köszönhetően az emissziós spektrum nem vonalas, hanem összetett szerkezetű. A foszforeszcencia esetében a molekula S1 alapállapotáról sugárzás nélküli átmenettel triplet állapotba kerül. Ennek a valószínűsége lényegesen kisebb, mint a fluoreszcenciáé, és innen gerjesztődik le az S0 állapot valamelyik vibrációs szintjére. Ez a folyamat a fluoreszcenciához hasonlóan szintén sugárzásos átmenettel zajlik le, amit foszforeszcenciának nevezünk.

Ahogy a fenti Jablonski diagramból is látható, az abszorbeált és az emittált fotonok energiái és így a hullámhosszai között különbség van. Ezt a különbséget kihasználva egyik nagy előnye, hogy megfelelő emissziós szűrők segítségével kizárhatjuk a gerjesztési fényt a detektált képből, így csak a molekulát jelölő fluorofór festék által emittált fény detektálható.

2.4.3 Konfokális mikroszkópia

A fluoreszcencia mikroszkópia egyik speciális esete a konfokális fluoreszcencia mikroszkópia. A legnagyobb előnye, hogy a képet csak egy meghatározott síkból származó sugarakból képezi le. Ebből adódóan képes az optikai szeletelésre, illetve a 3D rekonstrukcióra.



6. ábra A konfokális mikroszkóp sematikus felépítése

Az ábrán láthatjuk a konfokális fluoreszcencia mikroszkóp elvi felépítését [32]. Csak úgy, mint a konvencionális fluoreszcencia mikroszkóp esetében a mintát itt is teljes keresztmetszetében megvilágítjuk, illetve gerjesztjük, de a hagyományos fluoreszcencia mikroszkóppal szemben, a leglényegesebb különbség, hogy a konfokális fluoreszcencia mikroszkóp tartalmaz egy kis átmérőjű apertúrát vagy lyukdiafragmát (angolul pinhole). Ahogy az ábrán is látható a detektor diafragma csak egy adott síkból érkező nyalábot enged át, tehát mind a fókusz sík feletti és alatti rétegekből érkező fotonokat kizárja a képalkotásból.

Ahogy a 6. ábrán is látható, a detektor elé helyezett apró pontszerű rés (pinhole) alkalmazásával a minta különböző síkjaiból érkező fénysugarakból, csak egy adott síkból származó fény detektálható, mivel a rés a többit kizárja.

Előnye a hagyományos fluoreszcencia mikroszkóphoz képest, a fókusz síkon kívüli fény kiküszöböléséből adódóan élesebb a kép, nagyobb az effektív feloldás, a Z-tengelyi pásztázásnak köszönhetően lehetséges a 3D rekonstrukció. A konfokális mikroszkóp elvi felépítése a 6. ábrán látható.

2.4.4 Superfeloldású optikai mikroszkópia

A fénymikroszkópia másik nagy csoportja a fentebb említett superfeloldású optikai mikroszkópia. Ezen mikroszkópos technikák kiküszöbölik a diffrakcióból származó feloldási korlátot. A témában egyik legnagyobb tudományos áttörés William Moerner,

Eric Betzig, és Stefan Hell neveihez fűződik, akik 2014-ben megosztva nyerték el a kémiai Nobel-díjat a különböző szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkóp technikák kifejlesztéséért. A legelterjedtebb szuperfelbontású mikroszkópia változatai a következők:

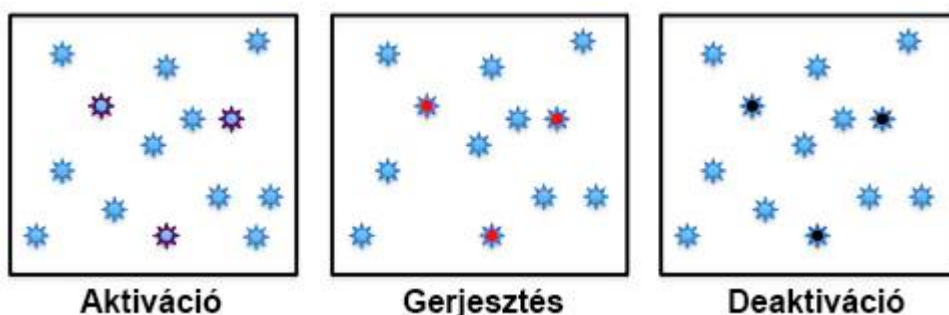
- Stimulált emisszió kioltású mikroszkópia (Stimulated Emission Depletion, STED),
- sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkóp (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy STORM) és fotoaktivációs lokalizációs mikroszkóp (Photoactivated Localization Microscopy PALM),
- teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia mikroszkópia (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy TIRF),
- strukturált megvilágítású mikroszkópia (Structured Illumination Microscopy, SIM).

2.4.4.1 Sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (STORM) és Fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia (PALM)

A hagyományos optikai mikroszkóp feloldási korlátjának feloldásának egy másik megközelítése, hogy a jelölendő molekulák, illetve a jelölő fluorofórok legközelebbi szomszédjainak távolsága bőven az Abbé korláton belül (200 nm) is elhelyezkedhetnek. Az egyik lehetséges megoldás az Abbé korlát feloldására, ha időben szétválasztjuk az egyedi molekulák emissziós fényének detektálását, azaz ha a festékmolekulák legerjesztődése nem egyidejű. A lokalizációs mikroszkópiában fotokémiai hatásokat használunk ki arra, hogy egyidőben a jelölő molekulák csak kis hányada gerjesztődjön és így emittáljon, azaz detektálhatóvá váljon. Így a molekulák diffrakciós foltjainak átfedése miatti a pontszerű források „összeolvadása” elkülönülnek egymástól. Tehát a lokalizációs mikroszkópiák kulcsa a fluorofór molekulák időbeli „ki-be kapcsolgatása”, melyeknek együttes gyűjtőnevük az Egymolekula Lokalizációs Mikroszkópia (SMLM) [33]. Ennek megvalósítási módja szerint különböztetjük meg a fotoaktivációs lokalizációs (PALM) és a sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópiát (STORM).

A PALM mikroszkópiában fluoreszcens fehérjét használunk fluoreszcens festékként, mint például foto-aktiválható zöld fluoreszcens fehérje (Photoactivatable green fluorescent protein, PaGFP). Ez a fehérje alapállapotban nem képes a fluoreszcenciára, de egy gyenge 400 nm-es megvilágítás hatására, a konformációváltozás következtében fluoreszcens festék molekulák gerjesztett állapotba hozhatóak. A gyenge

megvilágításnak köszönhetően viszont csak egy kis hányada hozható gerjesztett állapotba a festékmolekuláknak, amelyek közti távolság nagy valószínűséggel a diffrakciós határon kívül esik, ami a 7. ábra bal oldali paneljén látható. Ezt egy 488 nm-es folyamatos üzemben működő „kiolvasó” lézerrel gerjesztjük, így a detektorrendszer össze tudja gyűjteni a már gerjeszthető molekulákból származó jelet (7. ábra középső panelja), melyet követően ismételten deaktivált állapotba kerül a festékmolekula. Idővel az összes molekula deaktivált alaphelyzetbe kerül (7. ábra jobboldali panelja). A gerjesztett molekulák detektálása és relaxációja után a 400 nm lézer újbóli használatával újra aktiváljuk a festékmolekulákat, és a körfolyamat megismételhető [34].



7. ábra PALM körfolyamat

Az aktiváció hatására a molekulák egy része gerjeszthető állapotba hozzuk (bal oldali panel), a már gerjeszthető molekulákat gerjesztve fluoreszcens jel detektálható (középső panel). Ezt követi a deaktiváció ami visszaállítja az aktiváció előtti állapotot (jobboldali panel).

Ez az aktiválás egy sztochasztikus folyamat, ami ritkán játszódik le, így a háromlépcsős (aktiválás, gerjesztés, detektálás) körfolyamat folyamatos ismétléseivel alkotjuk meg a képet, ahol már az összes molekula elkülönítve láthatóvá válik. A PALM eljárás előnye a nagy felbontásán túlmenően, hogy a jelölés nagyon specifikus. A módszer alkalmas élő sejtek vizsgálatára, illetve a jelölhető molekulák transzlációjának (diffúziójának) nyomon követésére. Azonban e fehérjék kis hatásfokkal emittálnak, és így a jel intenzitása kisebb.

Megmutatható, hogy a lokalizáció pontossága a következő képlettel közelíthető:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + a^2 / 12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2},$$

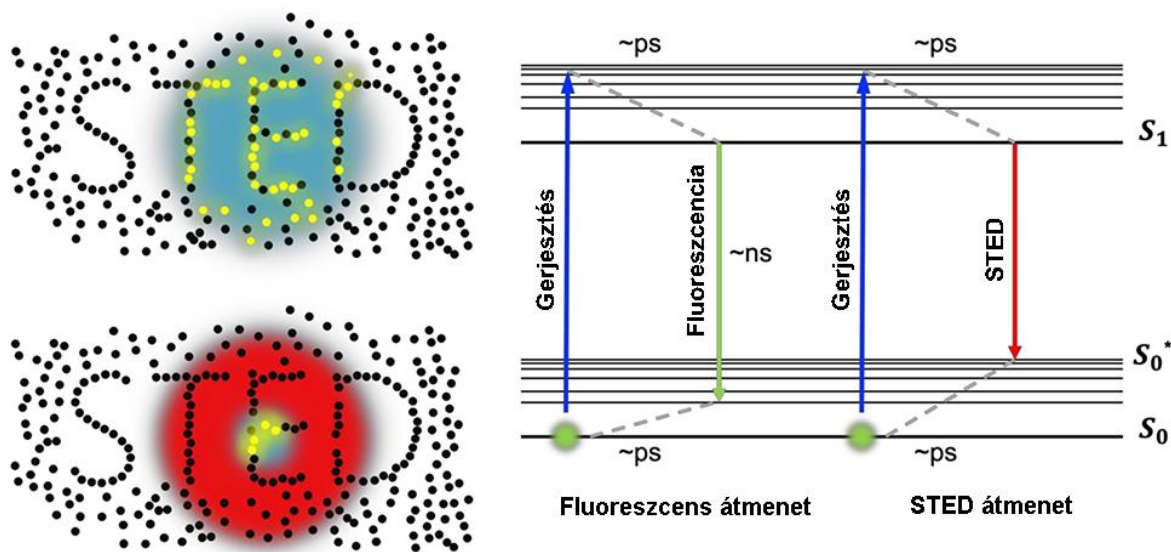
ahol az s elhajlási görbe standard deviációját a „point spread function” (PSF) függvényt Gauss-eloszlással közelítjük, a a CCD detektor pixelmérete, N a detektált fotonok száma, és b a zaj. Az elméleti laterális felbontóképesség megközelítően 20 nm, míg az axiális 50-100 nm.

A STORM mikroszkópia hasonló elven működik, mint a PALM mikroszkópia. Azonban ebben a módszerben fluorofórokat alkalmaznak (pl. Alexa festékeket) a fluoreszcens fehérjék helyett. Ezek fényesebbek, mint a fotoaktivált fehérje molekulák, azaz nagyobb a detektálás határfoka, ezáltal növelik a lokalizáció pontosságát, ahogy az előzően bemutatott képletből látszik, a pontosság arányos az N nagyságával [35]. A technika egyik hátránya, hogy szükségessé teszi, hogy a célmolekulák optimális jelölési arányának beállítását. Hasonlóan a PALM mikroszkópiához, a STORM mikroszkópiánál sem gerjesztődik minden molekula egyidőben. Ezt itt a festékmolekulák „villogásával” érjük el. E villogás dinamikájának időbeni kontrollálására van szükség. Ezt egy speciális pufferfolyadék segítségével érik el, amelynek kettős a szerepe. Egyrészt megköti az oxigént, amely csökkenti a nagy lézerintenzitás következtében előforduló kifakulást (photobleachelést vagy kiégést), amely akkor fordul elő, amikor a fluorofór végleg elveszíti fluoreszkáló képességét a gerjesztő fény által kiváltott kémiai károsodás és kovalens módosulás miatt, másrészt a triplet állapoton keresztül biztosítja, hogy elegendő ideig legyen „sötét” a festék. Hátránya, hogy sok esetben a minta tárolására alkalmazott küvetát légmentesen le kell zárni. A berendezés laterális, és axiális felbontóképessége hasonló a STORM mikroszkópiához.

2.4.4.2 Stimulált emissziós kioltás (STED) mikroszkópia

A STED mikroszkóp berendezést először 1994-ben Stefan W. Hell és Jan Wichmann fejlesztette ki, majd 1999-ben Hell és Thomas Klar valósította meg [36, 37]. A mikroszkóp a diffrakciókorlátot úgy kerüli meg, hogy leszűkítjük a spontán fluoreszcenciával legerjesztődő tartományt. A gerjesztő folt külső régiójában lévő fluorofórokat egy második lézerrel, az STED-lézerrel indukált emisszióra készítjük, amelyek ezek után nem képesek spontán módon emittálni. Ahogy fentebb látható volt, a spontán fluoreszcencia esetben a festék az S_1 alapállapotából, az S_0 valamilyen

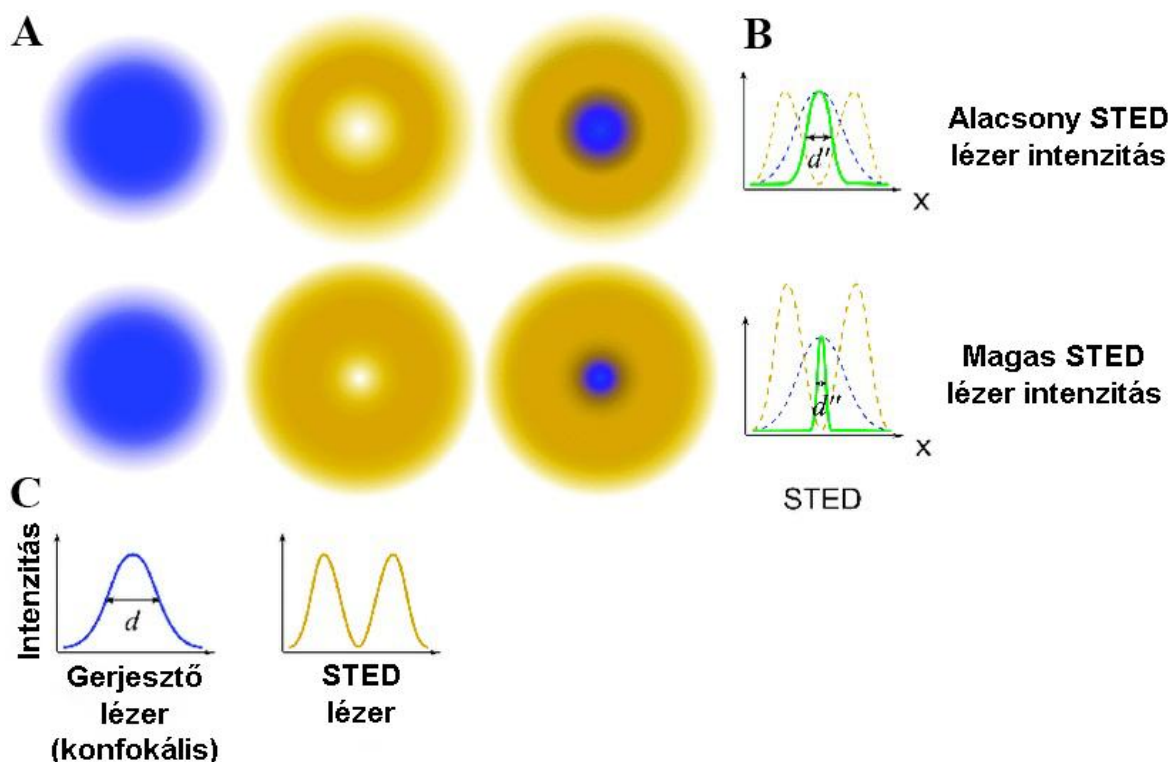
magasabb vibrációs állapotába gerjesztődik le, amiből sugárzás mentes átmenettel gerjesztődik le S_0 alapállapotába. Ezzel szemben, a stimulált kioltás esetében, a kioltó STED lézer az S_1 alapállapotában lévő festékmolekulákat a spontán emisszióhoz képest (a STED lézer alkalmas hullámhosszának kiválasztásával), az S_0 állapot magasabb vibrációs fokára kényszeríti. Így a stimulált fluorofór által kisugárzott energiája/hullámhossza, a spontán emisszióhoz képest a spektrum vörös oldalára tolódnak. STED mikroszkópia Jablonski diagramja az 8. ábrán látható [38].



8. ábra A STED mikroszkópia Jablonski diagramja

Az ábrán látható, hogy a stimulált emisszióból emittált fény hullámhossza nagyobb, mint a spontán fluoreszcencia átmenettel emittált fény hullámhossza, így szűrők beiktatásával azok elkülöníthetők. Az ábra bal oldala jól szemlélteti a különbséget a hagyományos konfokális lézer gerjesztés, és a STED kioltás hatására keletkező fluoreszcencia jel PSF szélessége. A nagymértékben korlátozott felületű, de nagy intenzitású, a kioltásra képes STED lézert egy jól definiált profil létrehozásával érhető el a konfokális mikroszkóp fókuszisikban.

A leggyakrabban alkalmazott módszer, hogy fókuszpontban egy közel nulla intenzitású középpont körül szimmetrikus nagy intenzitású profilt hozzunk létre (8. ábra jobb alsó korong középpontja körül). Ez egy fánkyszerű alak mely lehetővé teszi, hogy a fókuszponton kívül körkörös szimmetrikus nagy intenzitású kioltási régiót kapjunk. Ennek megvalósításához az kell, hogy a bejövő STED lézer destruktívan interferáljon a fókuszpontban, azaz maximális gyengítés legyen. Ezt egy úgynevezett fázis-maszkkal érik el, melynek eredményének a kétdimenziós vetülete a 9. ábrán látható [39].



9. ábra A STED mikroszkópia elve.

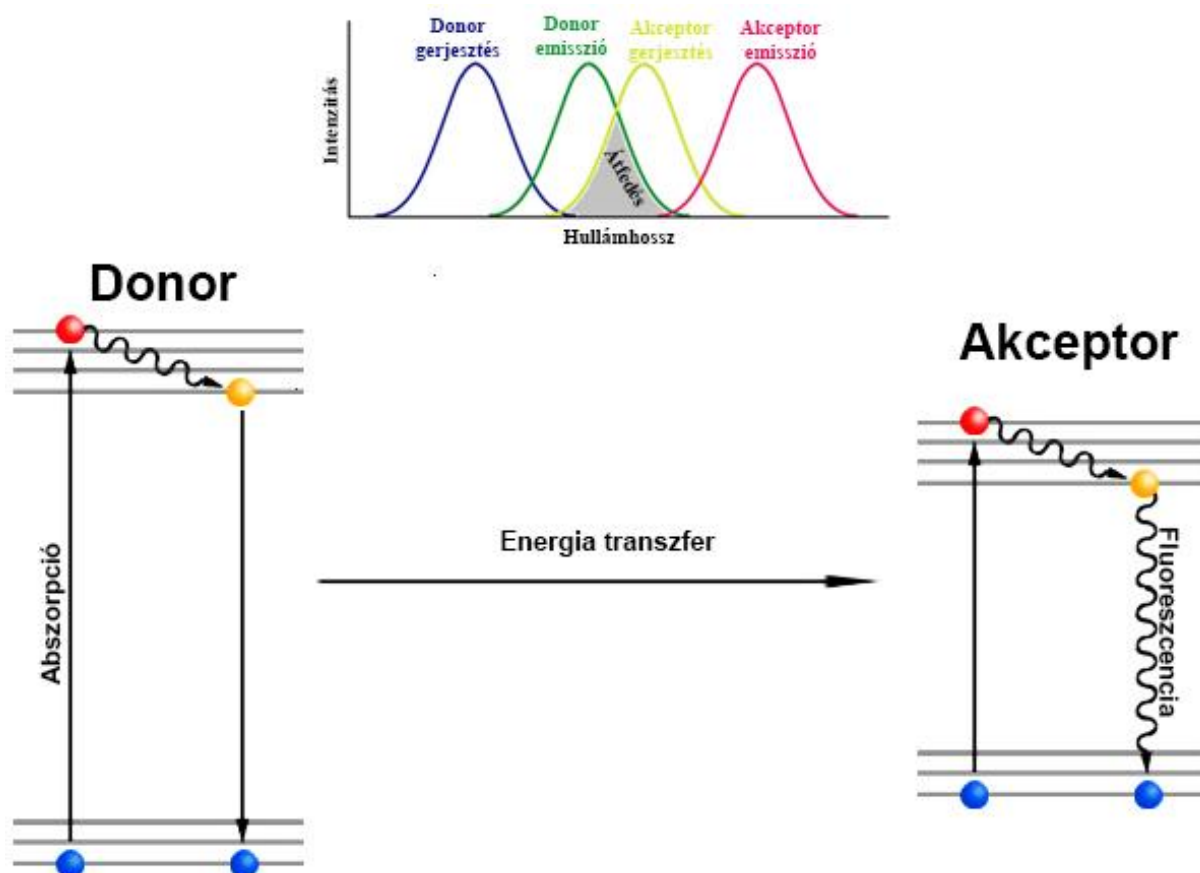
Az ábra (A) panelén látható a konfokális gerjesztés (kék), mellette a tiszta STED kioltó fánkprofilú lézer (sárga) illetve a két lézer együttes kombinációja x - y síkbeli metszete, a két sor közötti különbség, hogy az alsó esetben nagyobb intenzitású a STED lézer. Ez másrészt a STED mikroszkópia hátránya is egyben, ugyanis az intenzitás növelésével nő a minta károsodásának valószínűsége, ezért így nem növelhető a felbontás nagysága minden határon túl. A (B) panelen láthatjuk, hogy nagyobb STED intenzitás esetében kisebb detektált terület. A (C) panelen a gerjesztési és a STED lézer intenzitásprofilja látható.

2.4.5 Förster féle rezonancia energia transzfer (FRET)

Egy másik nagyérzékenységű közvetett fluoreszcencia módszer a molekuláris méretű asszociációk vizsgálatára, a Förster-féle rezonancia energia transzfer (FRET). A módszer pontos leírását Theodor Förster adta meg a 20-as években, Jean Perrin munkásságát alapul véve, aki először figyelte meg a jelenséget, és közelítő leírást adott [40, 41]. Ezt pontosította később Theodor Förster [42, 43].

A FRET alapja, hogy a két megfelelően kiválasztott fluoreszcens donor és akceptor molekula közötti távolság kisebb mint 10 nm, akkor sugárzásmentes átmenet során, dipól-dipól kölcsönhatás révén energiaátadás jöhet létre a donor fluorofór és az akceptor között. A FRET egyszerűsített sematikus Jablonski diagramját a 10. ábra mutatja [44]. Az elve, hogy a donor molekula emissziós spektruma átfedésben van az akceptor molekula abszorpciós spektrumával, ahogy az 10. ábra felső részén látható. A donor molekula gerjesztődése és az S_1 állapot alapszintjére való relaxálódása után sugárzás átmenet nélküli energiaátadással gerjeszti az akceptor molekulát. Az akceptor molekula

S1 alapállapotába történő relaxációja után fluoreszcencia sugárzásos átmenettel gerjesztődik le az S0 alapállapotába (10. ábra).



10. ábra Förster energiatranszfer Jablonski diagramja

Az ábra felső részén látható a donor és az akceptor molekulák gerjesztési és emissziós spektrumai, illetve a donor emissziós és az akceptor gerjesztési spektrumainak az átfedése (szürke terület). Alatta a FRET folyamat Jablonski diagramja, ahol a gerjesztett donor energiája sugárzás nélküli átmenet során gerjeszti az akceptort.

Az energiatranszfer hatásfokát a következő képlettel tudjuk leírni:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Az energiatranszfer 2 fontos feltétele a mérhető donor kvantumhatásfokon, illetve a megfelelő abszorpciós és emissziós spektrumokon kívül, hogy a donor és akceptor molekulák dipólus orientációi minél jobban megegyezzenek és a köztük lévő távolság nem haladhatja meg a 10 nanométert. Ez az utóbbi feltétel egyben az előnye és a hátránya is a FRET mikroszkópiának. Előnye, hogy a megfigyelt fehérjék közelségi (proximitás) viszonyai, nanométeres (1-10 nm) tartományon belül is feltérképezhető, hátránya, hogy nagyobb mint 10 nm-es távolságokon nem mérhető a FRET.

2.4.6 Elektronmikroszkópia

A már fentebb említett Abbe féle feloldási korlátot leíró képletből látszik, a feloldás javításának egyik lehetséges módja, hogy csökkentjük a leképezéshez használt elektromágneses sugárzás hullámhosszát. Ezt a hagyományos fénymikroszkópiához használt, a látható fény hullámhossz tartományában eső hullámhossztartományban természetesen nem lehet a végletekig csökkenteni, maximum az ultraibolya tartományig, ha van megfelelő lencserendszer.

Egy lehetséges megoldás a fentebb tárgyalt szuperfeloldású optikai mikroszkópia módszereken kívül, ha az elektromágneses hullámok helyett az először 1924-ben Louis de Broglie által leírt anyaghullámot használunk a leképezésre. Az anyaghullám elmélet kimondja, hogy egy $\mathbf{p}$ impulzussal rendelkező részecske hullámtermészettel bír. A Louis de Broglie által leírt formula a következő:

$$|\vec{p}| = p = \frac{h}{\lambda},$$

ahol p a $|\mathbf{p}|$ impulzusvektor abszolútértéke, h a Planck állandó

($h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s} = 0,658 \text{ eV} \cdot \text{fs}$), λ pedig a hullámhossz. Ez az effektus a makroszkópikus mérettartományokban elhanyagolható, hiszen itt a hullámhossz a 10^{-34} m nagyságrendbe esik. Viszont mikroszkópikus részecskék esetében, (pl. elektron, proton, atom stb.) már számottevő. Az anyagnak ezt a hullámtermészetét felhasználva, pl. az elektronnyaláb alkalmazható a mikroszkópiában. Az első kísérleti berendezés Ernst Ruska német fizikus mutatta be 1931-ben, és 1933-ban építette meg a fénymikroszkóp felbontását meghaladó elektronmikroszkópot, amiért Ruska 1986-ban kapott Nobel díjat Gerd Binnig-el és Heinrich Rohrer-el megosztva. Működési elvük alapján, az elektronmikroszkópok két nagy csoportba esnek:

- pásztázó elektronmikroszkópok
- transzmissziós elektronmikroszkópok.

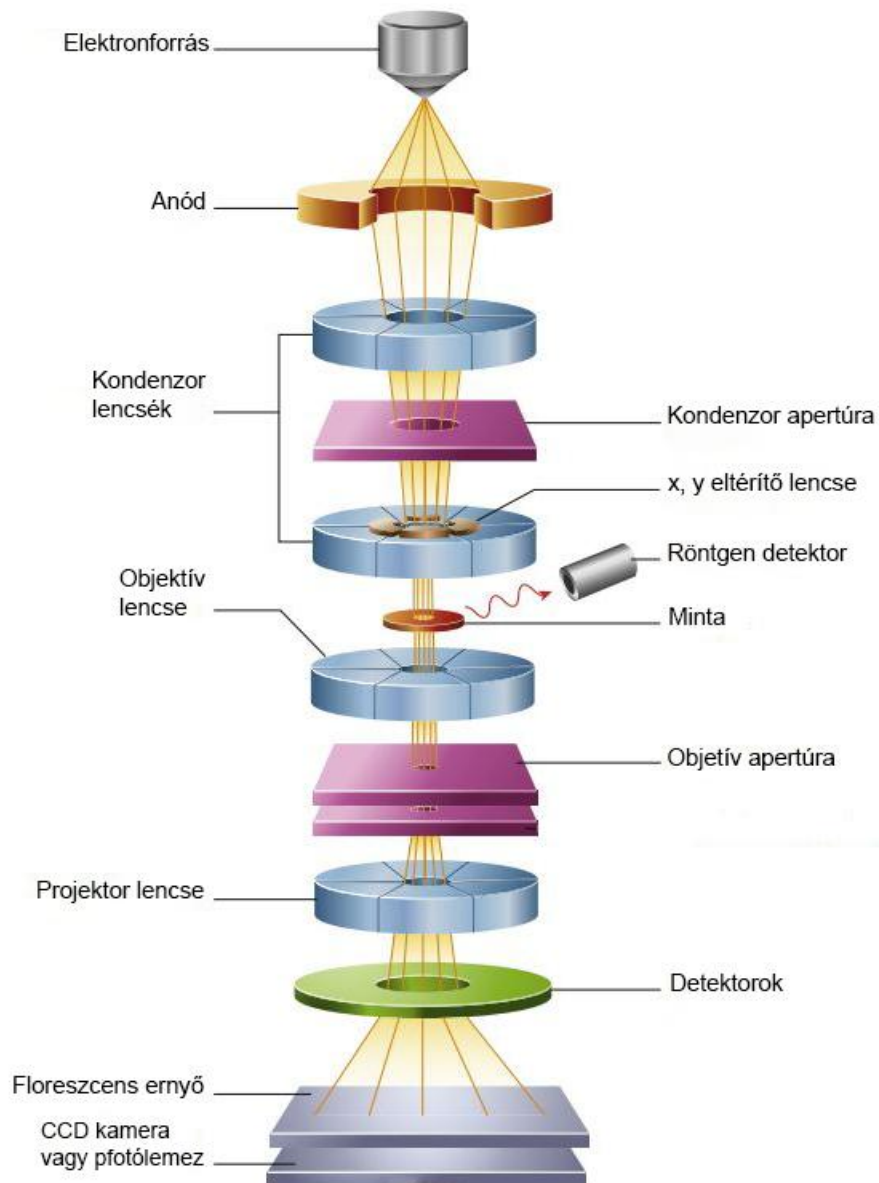
Mind a két típusú elektronmikroszkóp működési elvében közös az, hogy az elektront egy elektronforrás állítja elő, amely főbb típusai az izzó katódok (pl. wolfrám katód és a lantán-hexaborid (LaB_6) katód), valamint a téremissziós katódok. Az izzó katód esetében egy vékony wolframszálla feszültséget kapcsolva izzásba hozzuk, aminek a hatására a wolframról termikus emisszió révén elektronok lépnek ki. A lantán-hexaborid katód a wolframhoz hasonlóan termikus katód, de az elektronok kilépési munkája jóval alacsonyabb, így elektronhozama kb. ~ 10 -szerese, és élettartama ~ 10 -15-szöröse. A

wolfram katódos elektronforrások vákuumigénye jellemzően $\sim 10^{-3}$ Pa, a lantán-hexaborid katódé pedig $\sim 10^{-5}$ Pa. A téremissziós elektronágyú (Field Emission Gun – FEG) működése a kvantummechanikai alagúteffektuson alapul, azaz elektronok fűtés nélküli fémből, rendkívül nagy elektromos térerősség ($\sim 10^9$ V/m) hatására lépnek ki. Az elektronok, a nanométeres nagyságrendű görbületi sugarú tűhegyes emitterre (például volfrám) kapcsolt nagyfeszültségnek köszönhetően, kvantummechanikai alagúteffektussal leírható folyamat során lépnek ki. A téremissziós katód elektron emissziója magasabb, mint a termikus katódoké, viszont a vákuumigénye 10^{-6} Pa, ami megnehezíti a használatát.

További közös tulajdonsága mind a pásztázó, mind a transzmissziós elektronmikroszkópnak, hogy egyrészt az elektronforrás miatt másrészt az elektronnyaláb kialakítására nagy vákuum szükséges. Ezt több lépcsőben valósítják meg, az első lépés általában egy rotációs vákuumpumpa, ami az atmoszferikus nyomásról elővákuumot állít elő, a végvákuuma $\sim 10^2$ Pa és olajdiffúziós vákuumpumát alkalmaznak $\sim 10^{-1}$ Pa. A második lépésben pedig „iongetter” vákuumpumpával állítják elő az üzemi végvákuumot $\sim 10^{-3}$ - 10^{-4} Pa.

2.4.6.1 Transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

A transzmissziós elektronmikroszkóp működési elve nagymértékű hasonlóságot mutat a hagyományos transzmissziós fénymikroszkóphoz. Természetesen itt nem optikai lencsákat használnak, hanem elektromágneses lencsákat, amelyekkel az elektronnyalábot tudják irányítani. Elvi felépítése a 11. ábrán látható [45].



11. ábra A pásztázó elektronmikroszkóp felépítése

Az elektronforrásból származó elektronokat a forráshoz (Wehnelt henger) képest pozitív potenciálú anód gyorsítja. Az elektronnyalábot mágneses lencsék segítségével fókuszáljuk a minta felületére, majd különböző detektorok, illetve a fluoreszcens ernyő segítségével detektáljuk.

Az elektronforrás állítja elő az elektronokat, amit elektromágneses lencsék és apertúrák segítségével módosítja és vetíti azt a mintára. Az elektronok a mintán követő áthaladás után elektromágneses lencsék és apertúrák segítségével vetítjük az elektronnyalábot egy fluoreszcens

ernyőre, ami az elektronok abszorpciója után zöld színben fluoreszkál. A hagyományos TEM képalkotásánál a legfontosabb elektron-minta kölcsönhatás, ami az elektronok a minta atomjain történő szóródása. Ez a legfontosabb a kölcsönhatás, ami a kontrasztot biztosítja. Minél nagyobb az atom rendszáma, annál nagyobb az elektronok szóródása. A biológiai mintát azonban általában könnyű elemek alkotják, így azt kontrasztosítani (festeni) kell, általában nehézelemek sóival.

A TEM elméleti felbontóképessége $\sim 0,1$ nm, ami erősen függ a minta minőségétől, illetve a vastagságától. A gyakorlatban a minimálisan legkisebb feloldható távolság néhány nanométer nagyságrendű. A TEM elvi felbontásának határát az elektromágneses lencsék minősége, az lencsehibák mértéke határozza meg. A két legfontosabb ezekből a gömbi és a színi hiba.

A teljesség igénye nélkül az aberráció arányos [47, 48]:

$$\frac{1}{2} \cdot C_{df} \cdot \lambda^2 \cdot q^2 + \frac{1}{4} \cdot C_s \cdot \lambda^4 \cdot q^4 + \frac{1}{6} \cdot C_5 \cdot \lambda^6 \cdot q^6 + \frac{1}{8} \cdot C_7 \cdot \lambda^8 \cdot q^8 + \dots \cdot E_t \cdot E_s$$

ahol:

C_{df} : a defókuszáltsághoz tartozó együttható

C_s : a szférikus abberáció együtthatója

C_c : a kromatikus abberáció együtthatója

$C_5, C_7, \dots$: a magasabb rendű abberációk együtthatói

λ : az elektronnyalábhoz tartozó de Broglie hullámhossz

q : reciprok szórási vektor.

Látható, hogy ennek a mértéke főként az összeg első két tagból adódik.

Léteznek már szuperfeloldású elektronmikroszkópok (HREM), melyeknél korrigálva vannak a lencsék abberációi, legfőképpen a szférikus abberáció. Ezeknél a készülékeknél elérhető a 0,1 nm-es elméleti feloldóképesség is.

2.4.6.1.1 A transzmissziós elektronmikroszkópos minta előkészítés

A transzmisszió elektronmikroszkópos mintával támasztott követelmények, hogy az elektron áthatoló képessége kicsit, így a minta megengedett maximális vastagsága erősen korlátozott, ami a legfőbb nehézséget támasztja a biológiai minták előkészítése során. A másik jelentős, a mintával szemben támasztott követelmény, hogy a biológiai minták transzmissziós elektronmikroszkóp képének kontrasztja kicsi, azaz az elektronok kis mértékben szóródnak a mintán, melyek a kontrasztot szolgáltatják a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken.

Ezek alapján a mintával támasztott legfontosabb követelmények a következők:

- a minta nem tartalmazhat folyadékot, vagy fagyasztott állapotban (Cryo-TEM) kell vizsgálni,
- a minta maximális vastagsága nem haladhatja meg a ~ 100 nm-t,
- jó kontrasztot kell rendelkeznie (biológiai minták festése nehéz elemekkel),
- jó elektromos és hővezetőnek kell lennie,
- a minta morfológiai változásának elkerülése a mintaelőkészítés során,
- a minta laterális mérete maximum $\sim 1-2$ mm.

A biológiai minta vastagágára, folyadékmentességére és a morfológiai változások elkerülésére vonatkozó feltételeket teljesíti a konvencionális gyantába ágyazás és az azt követő ultravékonszeletelési technika, ami a legelterjedtebb.

Tehát a biológiai minták kontrasztosítása szükséges, mivel ezek általában könnyű elemeket tartalmaznak (szén, nitrogén, oxigén stb.). Ezen könnyű elemek elektron szórási képessége meglehetősen alacsony, azaz csak igen kismértékben téríti el az elektronnyalábot, azaz a minta kontrasztja a transzmissziós elektronmikroszkóp felvételeken nagyon csekély, így nem azonosíthatóak a minta mikrostruktúrái. Ezt kiküszöbölendő a mintát „festjük”, általában nehézelemek sóival (ozmium-tetroxid, uranil-acetát, ólom-citrát, stb.), ugyanis ezen elemek a nagy rendszámuknak köszönhetően sokkal jobban eltérítik az elektronnyalábot (nagyobb a hatáskeresztmetszetük az elektronra nézve), mint a mintát tartalmazó kis rendszámú elemek. Két különböző festési eljárást alkalmazunk az elektronmikroszkópiában a biológiai mintákon, a pozitív és a negatív festést. Az első esetben a vizsgálandó struktúrákat festjük, kontrasztosítjuk, a második esetben a vizsgált területen kívüli részeket.

Az általunk alkalmazott immunogold jelölési eljárás nem sorolható egyik kategóriába sem.

Itt specifikus antitestekkel konjugált kolloidális méretű aranygömböket használunk, melyekkel a minta fehérjéihez specifikusan tudnak kötődni. Az arany atom nagy rendszámának köszönhetően, jól detektálható transzmissziós elektronmikroszkóppal. Különböző méretű immunogold aranygömböket alkalmazva, amik a méretüktől függően különböző antitestekkel lettek konjugálva, egyidejűleg több típusú fehérje is vizsgálható, ugyanazon mintán (többszörös jelölés).

3. Célkitűzések

A sejtfelszíni fehérjék által kialakított eloszlásának mintázatai fontos szerepet töltenek be többek között a jelátviteli folyamatokban, a sejtek differenciálódásukban vagy az immunrendszeri folyamatokban.

A sejtfelszíni receptorok homo- és hetero-asszociációinak jelenlétének jelentősége miatt az alábbi kérdésekre kívántuk választ adni:

- Vizsgálni kívántam, az IL-2 és IL-15 receptor molekulák sejtfelszíni mintázatát, melyet intézetünkben korábban is vizsgálták immunogold jelölt minták TEM felvételének segítségével. Viszont csak korlátozott statisztikai leírás volt elérhető az alkalmazott statisztikai függvények hiányának köszönhetően.
Vizsgálni kívántam, mekkorák és milyen számosságúak ezek a mintázatban kialakult klaszterek, melyeket a korábbi statisztikai függvények nem voltak képesek meghatározni. Ennek érdekében egy általunk korábban nem alkalmazott PCF (párkorrelációs függvény) illetve PCCF (pár-keresztkorrelációs függvény), illetve a egy új kiértékelő szoftver (GOLD) segítségével.
- Céлом volt, hogy immunogolddal jelölt minták transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatához egy új minta-preparálási eljárás kifejlesztése, ami a sejtfelszíni antigén-mintázatok pontosabb leírását teszi lehetővé. Az új minta-előkészítési protokoll segítségével, választ találni, hogy a JY sejtvonal felszínén kifejeződő HLA I illetve HLA II molekulák mintázatában esetlegesen milyen csoportosulások találhatók nanométeres skálától egészen a mikrométeres mérettartományokig.
- Szerettem volna megvizsgálni, hogy a módszerek alkalmasak e annak vizsgálatára, hogy hogyan befolyásolhatja a különböző sejtfelszíni molekulák homo- és hetero-asszociációját, ha egy addig a sejtfelszínen nem kifejeződő molekula jelenik meg. A BLS sejteken nem expresszáldó HLA II fehérje, a transzfekciót követő megjelenése, befolyásolja-e a HLA I és HLA II proteinek proximitás viszonyait.

4. Anyagok és módszerek

4.1 A vizsgálatokhoz alkalmazott sejtvonalak tenyésztése

Kit 225 FT7.10 sejtvonal:

A Kit 225 FT7.10 (Kyoto University) sejteket teljes IL-15R α -val transzfektáltuk, amely N-terminális FLAG címkével rendelkezik. Mindkét sejtvonalat 10% „fetal bovine serum”-mal (FBS-sel), penicillinnel és sztreptomocinnal kiegészített RPMI 1640 táptalajban tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. 48 óránként 500 pM humán rekombináns IL-2-t is adtunk a táptalajhoz. Az FT7.10 sejtek tápközege 800 μ g/ml G418-at (GIBCO) tartalmazott, hogy elnyomja a vad típusú sejtek növekedését.

JY és BLS-1 limfóma sejtvonalak:

A JY (ATCC, Manassas, VA, USA) és a BLS-1 humán B-limfóma sejtvonalakat (Prof. Mark Exley ajándéka, Harvard Medical School, Boston, USA) szubkonfluenciáig szaporítottuk, háromszori passzálassal hetenként RPMI 1640 táptalajban, amely 10% FBS-t, 2 mM l-glutamint és 50 μ g/ml gentamicint tartalmazott, 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában.

4.2 Az IL-2R α és IL-15R α sejtfelszíni receptorok mintázatának vizsgálata új szoftver (és a PCF, illetve PCCF függvények) segítségével

Az IL-2 és IL-15 receptorok mintázatának vizsgálata az új mintaelőkészítési eljárást megelőzően végeztük, a korábban alkalmazott mintapreparálási protokoll alkalmazásával Kit 225 FT7.10 sejtvonalon. Ebben az esetben receptorokat indirekt módon jelöltük, az IL-2R esetében az elsődleges antitest egér hibridóma felülúszójából tisztított anti-IL-2R α 7G7/B6 (IG2a) antitestből előállított Fab fragment volt, illetve az IL-15 esetében az elsődleges antitest egér hibridóma felülúszójából tisztított anti-IL-15R α 7A424 (IgG) egész antitest volt. A kolokalizációs vizsgálatoknál a másodlagos jelölők 15 és 30 nm-es aranygyögyökhöz kötött poliklonális antiegyes antitestek voltak. (Az Aurogamig G15, anti-egér IgG nehéz és könnyű lánc ellenes poliklonális antitestekkel volt telítve, az Aurogamig G30 pedig anti-egér IgG Fc része ellenes poliklonális antitestekkel, Amersham Pharmacia). A szekvenciális jelölésnél a sejtek IL2 receptorát először anti-IL-2R α 7G7/B6 (IG2a) antitestből előállított Fab fragmenttel jelöltük, majd mosás után Aurogamig G15-el. Ezután ismételt mosás következett, majd az Aurogamig G15 aranygyögyöket beborító poliklonális antitestek nem használt kötőhelyeit blokkoltuk feleslegben adott nem specifikus (a sejtek sejtfelszíni fehérjéihez

nem kötődő) Fab fragmentekkel. A következő lépésben az IL-15 receptor jelöltük anti-IL-15R α 7A424 (IgG) egész antitesttel, majd mosás után Aurogamig G 30-al. Az újabb PBS-es mosás után, a mintákat 1%-os formaldehid/PBS oldatban fixáltuk 30 percig, majd 2%-os glutáraldehidet tartalmazó nátrium-kakodilát pufferben (0,1 M, pH: 7,2) egy éjszakán keresztül.

A TEM mérésekhez a fixált sejteket formval műanyaggal bevont TEM mintahordozó rézhálóra vittük, amit egyszerű szabad levegőn való szárítás követett, majd ezeken a mintákon végeztük el TEM vizsgálatokat. A felvételek feldolgozását a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett GOLD szoftverrel végeztük. A PCF illetve a PCCF függvényeket a GOLD programmal határoztuk meg. Mindkét szoftvert a későbbiekben részletezem az Eredmények fejezetben.

4.3 Sejtfelszíni molekulák mintázatának vizsgálata az új protokoll segítségével

Mivel munkám meghatározó részét egy új transzmisszió elektronmikroszkópos mérésekre kifejlesztett speciális protokoll kifejlesztése jelentette immunogolddal jelölt minták sejtfelszíni fehérjéinek analízise céljából, így a részletezett minta-előkészítési eljárás az Eredmények fejezetben írtam le lépésről lépésre.

Itt csak egy rövid felsorolás erejéig szeretném ismertetni magát a minta-előkészítést:

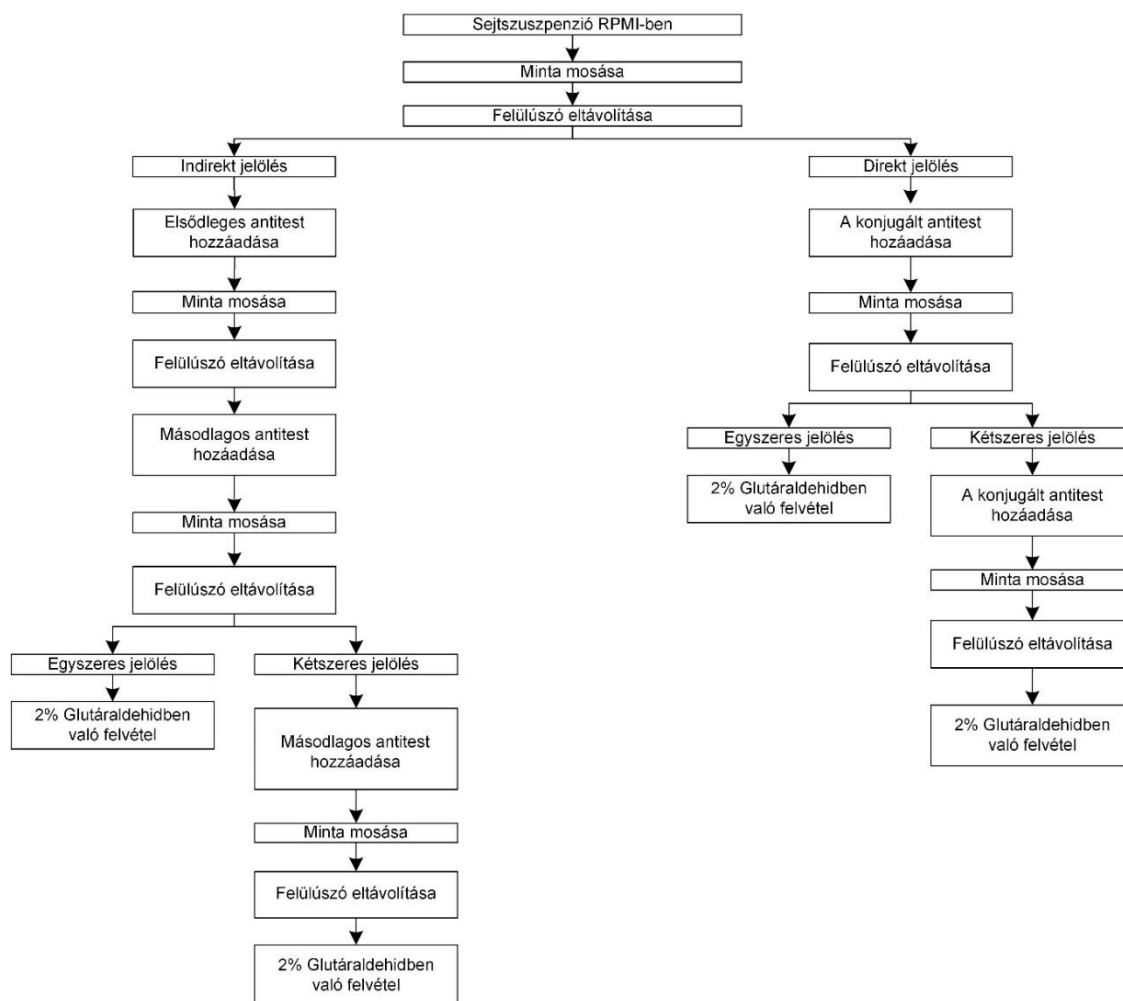
- I. TEM rostély (grid) előkészítése (kollódium hártvakészítés), a minta átmeneti rögzítése céljából.
- II. Arany gyöngy konjugálása specifikus antitesttel, Konjugáló Kit segítségével, képes voltam a saját elsődleges antitestünket, a kolloidális méretű immunogold aranygömbökhöz kötni.
- III. Sejtjelölés elsődleges antitesttel konjugált immunogolddal
- IV. Kritikusponton szárítás
- V. Szénhártya vákuumpárologtatása
- VI. Kollódiumhártya kioldása
- VII. A minta kémiai vékonyítása
- VIII. A transzmissziós elektronmikroszkópos mérések
- IX. Immunogold aranygömbök pozíciójának meghatározása a ClickOnGold program segítségével

- X. Pontmintázatok kiértékelése, a párkorrelációs (PCF) és párkeresztkorrelációs függvény (PCCF) meghatározása a GOLD szoftver segítségével
- XI. A fehérjemintázatok kiértékelése, feltérképezése a párkorrelációs és párkeresztkorrelációs függvények segítségével

5. Eredmények

5.1 Transzmissziós elektronmikroszkópos minták előkészítésének továbbfejlesztése sejtfelszíni fehérjék eloszlásának vizsgálatára

Kísérleteink során a legfontosabb célul azt tűztük ki, hogy minél pontosabb statisztikával tudjuk leírni a sejtfelszíni fehérjék eloszlásának korrelációját, illetve keresztkorrelációját. Matematikailag ezt akkor lehet elérni, ha az adott mintában minél több az „esemény”, ami esetünkben az, hogy minél több legyen az immunogold aranygömbök száma az egyedi TEM felvételeken. Ezt úgy érhetjük el, hogy vagy a jelölőmolekulák felületi sűrűségét vagy a vizsgálható terület nagyságát növeljük. Az első esetben viszonylag korlátozottak a lehetőségeink. A sejtfelszíni fehérjék aranygömbbel való jelölésnél viszont problémát jelenthet az, hogy a minta mosásánál (centrifugálásánál) viszonylag könnyű a gömbök leoldásának esélye. Így az egyik leghatásosabb módszer ennek az esélyének a csökkentésére, ha a mosások számát csökkentjük, az indirekt jelölés helyett a direkt jelölést alkalmazzuk. Ennek egyik módja, amit az Anyagok és módszerekben is említettünk, hogy a kereskedelmi forgalomba kaphatóak úgynevezett immunogold konjugáló Kit-ek. Ebben az esetben a jelölést megelőzően, a specifikus elsődleges antitestekkel konjugálhatunk különböző méretű kolloidális méretű aranygömböket, amivel csökkenthetők a mosások száma a jelölés alatt. A különböző jelölések sematikus összefoglalója az 12. ábrán láthatóak.



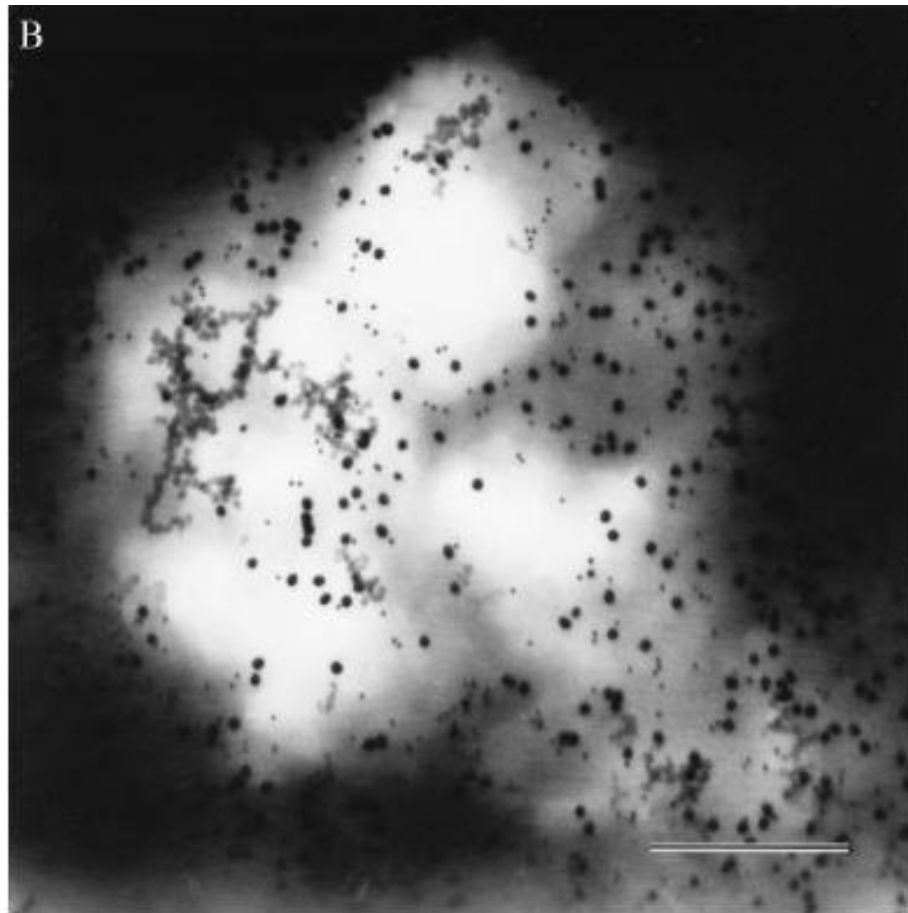
12. ábra A különböző immunogold jelölések sematikus lépései

Összehasonlítva a konvencionális és a konjugált antitesttel való jelölést, látható, hogy az utóbbit alkalmazva, csökkenthetjük a mosások számát, így a lemosódott aranyöbök mennyiségét.

Az előkészített TEM mintáknak számos feltételnek kell megfelelni. Az egyik legfontosabb feltétel a minta vastagságára vonatkozik, azaz nem haladhatja meg a 80-100 nm-es értéket. Általános esetben, a biológiai mintát epoxi gyantába ágyazzuk, aztán ultramikrotómmal ultravékony metszeteket készítünk, azaz felszeleteljük. Esetünkben ez a módszer nem alkalmazható, ugyanis a vizsgált előzetesen immunogolddal jelölt minták felületét szeretnénk vizsgálni, így a szeletelés után a jelölt lipid kettősréteg nem alkotna egybefüggő felületet, azaz nem teljesülne a minta lehető legnagyobb felületén végzett vizsgálatának kívánalma.

Munkacsoportunkban a már korábban alkalmazott minta-előkészítésének alapja az volt, hogy a sejtszuspenzióban immunogolddal jelölt minta felszálló koncentrációjú etanollal való kezelés után, a TEM mintahordozó felületére kicseppentve szabadlevegőn lettek kiszárítva. Így a sejt egy vékony körvonalán keletkezett vékony sáv már vizsgálható vastagságú volt a transzmissziós elektronmikroszkóp számára. Egy a korábban

alkalmazott mintaelőkészítési eljárással preparált minta TEM felvételét a 13. ábrán láthatjuk [56]. Ebben az esetben a HLA I molekulák 15 nm-es és a HLA II molekulák 30 nm-es immunogold aranygyöngyökkel lettek jelölve.



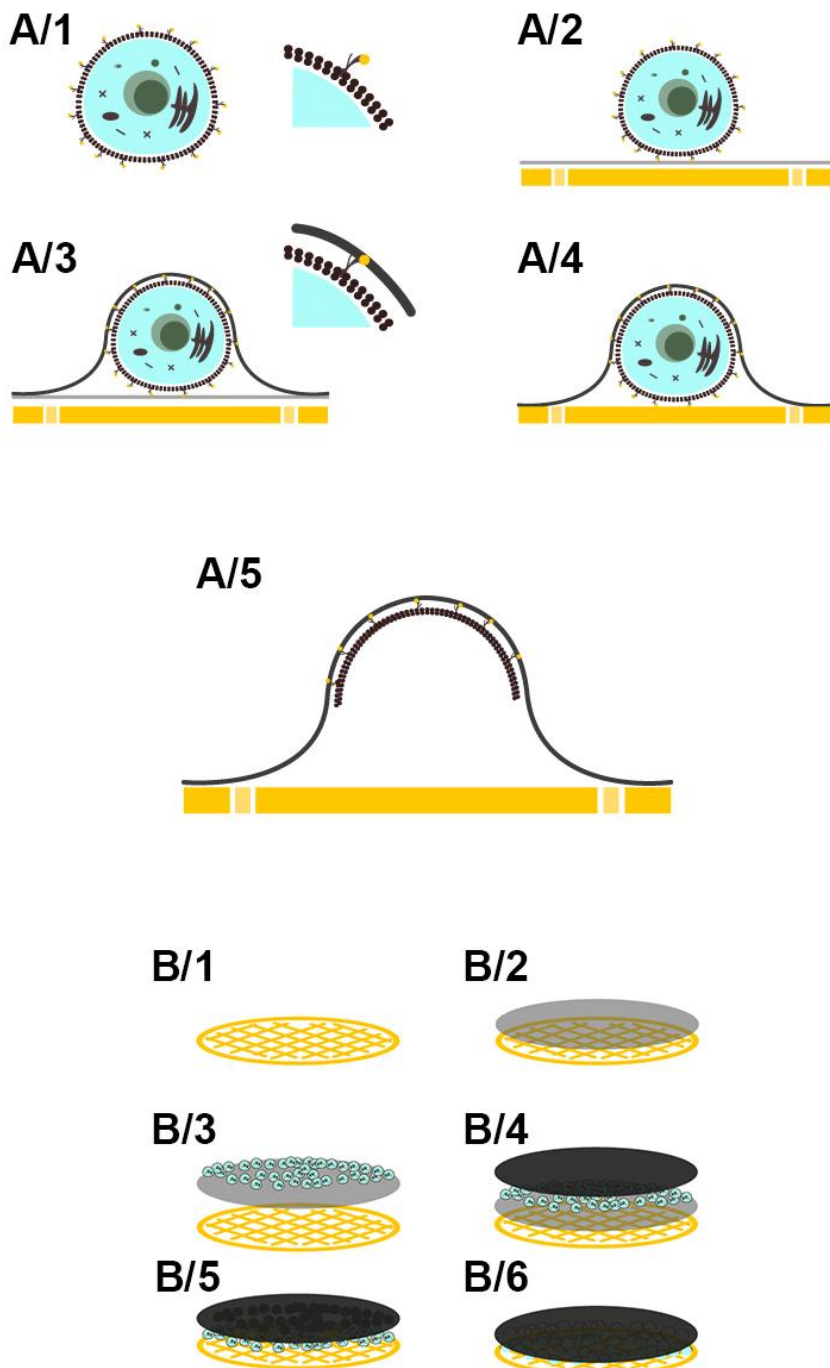
13. ábra Egy jellemző, a korábban alkalmazott minta-előkészítési protokoll TEM felvétele

Az ábrán egy korábban készített TEM felvétel látható [56]. JY-sejt HLA I és HLA II molekulája 15 és 30 nm-es immunogold aranygyömbökkel lettek jelölve. A jelölést először 30 nm-es aranygyöngyökkel végezték HLA II, majd 15 nm-es immunogolddal az HLA I molekula ellen. A méretskála 500 nm.

A sejt közepén található sejtalkotók a TEM vizsgálatok számára túl vastagok. Így az egyik hátránya módszernek, hogy kicsi a TEM-el vizsgálható terület. Másik hátránya, hogy a minta kiszáradása után a vetületi képen nem csak egy kettőslipidrétegen található aranygyömböket láthatjuk, hanem a két réteg összeszáradása után keletkezett két kettőslipidréteget. Ezért nem a sejtfelszíni immunogold aranygyömbök eloszlását láthatjuk, hanem a két felszín egymásra vetített képét. Másik probléma, hogy a szabadlevegőn való szárítás után megváltozik a sejt morfológiája és így változhat a fehérje eloszlás a sejt felületén.

Ennek elkerülése érdekében egy komplex minta-előkészítési eljárást fejlesztettem ki, ami egyfajta szendvicsszerkezetet képez. A minta vékonyítására kémiai maratást

alkalmaztam 100 g/l-es koncentrációjú nátriumhidroxid vizes oldatával, a szárításhoz pedig a kritikusponton szárítás módszerét választottam. A legnagyobb kihívást azt jelentette, hogy fizikailag hogyan rögzítjük a sejteket a hordozófelületre a kezelések alatt. Ezt reprezentálja a 20. ábra [46]:



14. ábra Az újonnan kifejlesztett minta-előkészítési protokoll

Az ábrán különböző méretskálákon láthatjuk a minta-előkészítési protokollt. Az (A/1)-től (A/5)-ig paneleken, a protokollt a sejtszinten láthatjuk, míg a (B/1)-től (B/6)-ig, a mintahordozó méretének skáláján.

A 14. ábra (A/1)-es panelen az egyedi sejtet láthatjuk az immunogold jelölést követően. Ezután az (A/2)-es panelen bemutatott, az előzetesen kollódiummal bevont és a

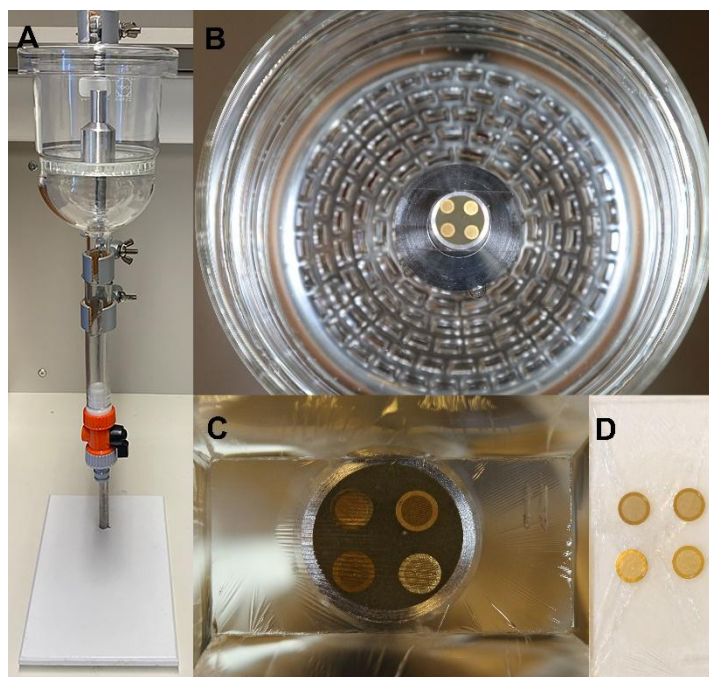
kollódium hártya felületét poly-L lizinnel kezelt arany mintatartó rácsra (gridre) kihelyezett sejteket láthatjuk. Az **(A/3)**-as ábra a mintát reprezentálja a párszor 10 nanométeres szénhártyával való bevonás után látható. A protokoll következő lépése az ábra **(A/4)**-es paneljén látható, ami a mintatartó és a sejt között elhelyezkedő kollódium hártya kioldása után látható állapotot mutatja. A szénhártya segítségével a sejtek mechanikai stabilitása biztosítva van, illetve a szénhártyának köszönhetően, a mintának nagyobb stabilitást eredményez az elektronnyalábbal szemben is. A kollódium hártya kioldása a következő lépés elvégzéséhez szükséges, ami maga a minta vékonyítása. A vékonyítás első lépéseként, egy 100 g/l-es koncentrációjú nátriumhidroxid vizes oldatával vízdíszítéssé tettem a sejtalkotókat, amit egy többször elvégzett desztillált vizes mosás követett. A végeredmény az **(A/5)**-ös illetve a **(B/6)**-os paneleken látható. Az eltérő számozás abból adódik, hogy míg az **(A)** panel első része a jelölt sejtet ábrázolja, ami nem jeleníthető meg a **(B)** panelen, illetve a **(B)** panel első két ábrája a mintatartó rácsra előkészítését mutatja, ami pedig az **(A)** panel sejt szinten való bemutatásánál nem jeleníthető meg. Így az **(A/2)→(B/3)** az **(A/3)→(B/4)** az **(A/4)→(B/5)** és a **(A/5)→(B/6)**-nak feleltethető meg.

A szénhártyának köszönhetően az immunogold jelölő aranygömbök rögzítve vannak, illetve elegendő stabilitást eredményez, hogy a konvencionálisan biológiai mintákhoz alkalmazott 80-100 kV-os TEM gyorsítósebesség helyett, akár 200 kV-os gyorsítófeszültséget is képes elviselni.

5.1.1 Transzmissziós elektronmikroszkópos minták előkészítésének protokollja

5.1.1.1 TEM rostély (grid) előkészítése (kollódium hártyakészítés)

A megfelelő mintapreparálás az egyik első lépése a mintahordozó elkészítése. Ennek jó mechanikai szilárdságúnak kell lennie, és könnyen (a minta sérülését elkerülve) kezelhetőnek és szállíthatónak kell lennie. Ehhez egy egyedi módszert fejlesztettünk ki, ami egy szendvicsszerkezet. Az alapja üveglemez, amin a TEM grid helyezkedik el, és ezt vonjuk be kollódiummal. A 15. ábrán láthatóak a grid mintahordozó kollódiumhártyával való bevonásának főbb lépései. Az eljárás röviden, hogy egy üveglapra helyezett mintahordozókat egy Büchner tölcsérbe helyezünk, amit elárasztunk desztillált vízzel. A víz felületére cseppentett amid-acetátban feloldott kollódium szétterül a vízfelületen. Az oldószer elpárolgása után egy egybefüggő párszor 10 nm vastagságú hártyát kapunk, ami a víz leeresztése után, ráfeszül a felületre [46].



15. ábra A mintahordozó kollódiummal való bevonásának lépései.

Az **(A)** panelen a Brüchner tölcsér látható. A **(B)** panelen felülnézetből láthatjuk a vízzel ellepett üveglemezt, rajta a TEM gridekkel. A **(B)** és **(C)** panelen a felületre ráfeszült kollódium hártya látható, majd a **(D)** panelen a már megszárított, kollódiummal bevont grideket mutatjuk be az üveglemezen.

5.1.1.2 Arany gyöngy konjugálása specifikus antitesttel (Konjugáló Kit)

Az immunogold jelölés hagyományosan indirekt jelölés, azaz először specifikus elsődleges antitesttel jelölünk, aztán specifikus másodlagos antitesttel, jelen esetben specifikus másodlagos antitesttel konjugált aranygömbökkel. Ennek hátránya, ami immunogold jelölés esetében fokozottan káros lehet, hogy több mosási fázist kell alkalmaznunk. Direkt jelölés esetében a jelölést követően elegendő 1-2 mosás. A mosás technikailag, hogy a centrifugálással leüleptített sejtekről leöntjük a folyadékot, így a nem kötődött antitesteket eltávolítjuk. A centrifugálás viszont fokozottan hátrányos az immunogold aranygömbök relatív nagy tömege miatt, így hatványozottan nagyobb a valószínűsége, hogy a már kötődött antitesteket is eltávolítjuk a mintáról.

A direkt jelölést megelőzően konjugálnunk kell az aranygömböket a saját, általunk használt elsődleges specifikus antitesttel. Ehhez az Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság) által forgalmazott konjugáló Kit-et használtuk.

A konjugáció a következő lépéseket tartalmazza, ami elérhető az Abcam weboldalán PDF formátumban (<https://www.abcam.com/en-gb/products/conjugation-kits/gold-conjugation-kit-10-nm-20-od-ab201808#tab=support>).

Röviden a következő:

1. Hagyjuk az összes reagenst szobahőmérsékletre felmelegedni.
2. Hígítsuk fel törzsantitestet a Kit-ben mellékelt antitest-hígítóval 0,25 mg/ml-re.
3. Adjuk hozzá a reakciópuffert és óvatosan szuszpendáljuk össze. A különböző kisserelésekhez ajánlott hígított antitest és reakció puffer mennyiségét a 1. táblázat tartalmazza:

Kisserelés:	3x2500 ng	10x2500 ng	1x25 µg
Hígított antitest	12µl	12 µl	120 µl
Reakció puffer	42 µl	42 µl	420 µl

1. táblázat A konjugációhoz szükséges antitest és reakció puffer mennyiségek.

4. Adjuk hozzá az antitest/puffer oldatot az aranyömbökhöz. Finoman szuszpendáljuk össze. Hagyjuk a reakciót 15 percig állni szobahőmérsékleten.
5. A 15 perces inkubációs idő leteltével, adjuk hozzá a reakciót leállító, kioltó oldatot, a 2. táblázat szerint:

Kisserelés:	3x2500 ng	10x2500 ng	1x25 µg
Kioltó	5 µl	5 µl	50 µl

2. táblázat A reakció leállításához szükséges kioltó oldat mennyiségek.

6. 15 perc inkubációs idő elteltével, megkapjuk a konjugált immunogold antitestet.

5.1.1.3 A konjugáláshoz használt elsődleges antitestek

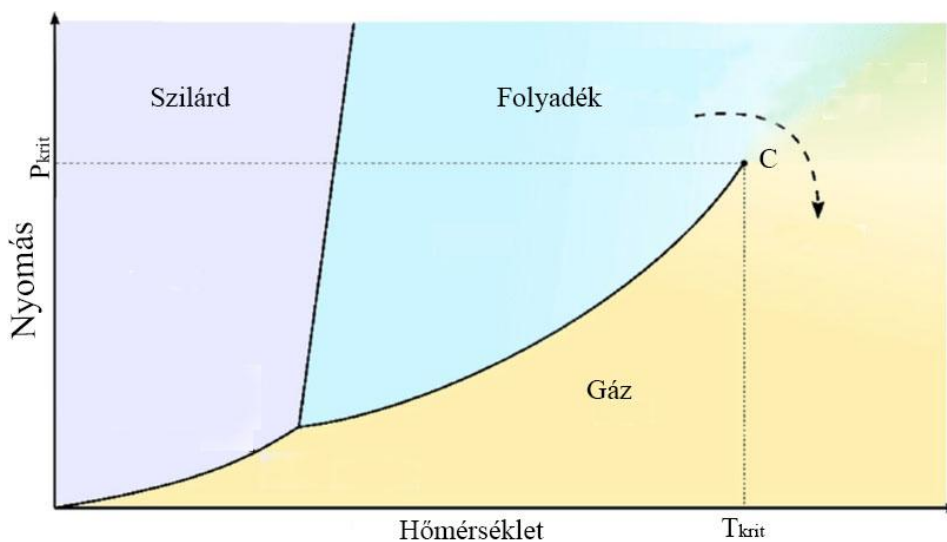
A JY, BLS és transzfektált t-BLS sejtvonalon végzett sejtfelszíni molekula-eloszlási kísérleteinket a humán HLA I illetve HLA II molekulákra korlátozódtak. A kolloidális méretű aranyömbök konjugálására HLA I esetében egér eredetű anti-HLA w6/32 (IgG2a, Abcam) és HLA II esetében egér eredetű Anti-HLA-DQ (IgG2b, Abcam) specifikus elsődleges antitestekkel végeztük.

5.1.1.4 Sejtjelölés elsődleges antitesttel konjugált immunogolddal

Az előző pontban leírtak szerint elkészített, az elsődleges antitesttel konjugált kolloid aranyömböbvel jelöljük a sejteket. Ehhez 106 db sejtet centrifugával mostuk PBS-el kétszer (10 perc, 200g, 4°C). A mosást követően a sejteket jelöltük 15 µl konjugált antitesttel jégén, 40 perc inkubációs idő elteltével, ismét 2-szer mostuk a mintákat PBS-el (10 perc, 200g, 4°C). Ezt követően a felülúszót eltávolítva a felülúszót (pelletet) 100 µl 2%-os glutáraldehid oldatban felsuszpendáltuk.

5.1.1.5 Kritikusponton szárítás

A TEM mintáknak, ahogyan azt az Irodalmi áttekintés című fejezetben említettük, folyadékmentesnek kell lenniük. A közvetlen levegőn történő szárítás a felületi feszültségerőkből adódó káros hatásaik miatt a minta alakjának jelentős torzulását okozhatja. Az egyik általam is választott technika ennek elkerülésére a kritikusponton szárítás. Itt az anyagban lévő folyadékot kritikus pontra hozzuk (anyagra jellemző hőmérséklet és nyomás), ahol eltűnnek a fáziskülönbségek és elkerülhető a minta károsodása. A biológiai mintákban jelenlévő folyadék főleg víz, amit le kell cserélnünk, mivel a víz kritikus pontja 374,15 °C és 22,12 MPa. Ezt az igen magas hőmérsékletet viszont a biológiai minták nem képesek elviselni. Ezért első lépésben a mintában lévő folyadékot (vizet) kell lecserélnünk például széndioxidra, melynek kritikus pontja 31,5°C és 7,38 MPa amit már képes a minta elviselni. Így általunk választott mintaszárítási eljárás a kritikusponton történő szárítás, amit (CPD), (Baltec CPD 030) készüléken végeztem. Tehát a mintában lévő folyadékot (CO₂) szuperkritikus gőzfázisba hozzuk (13. ábrán látható C pont felett), ahol a folyadék és gáz fáziskülönbsége eltűnik, azaz nem károsodik a minta. Ezután a mintát állandó hőmérsékleten tartva, a nyomás fokozatos csökkentésével atmoszférikus nyomásra hozunk [49], lásd 16. ábra [50].



16. ábra A CO₂ fázisdiagramja.

Az ábrán láthatjuk a széndioxid fázisait a nyomás és hőmérséklet függvényében. A kritikus ponton szárításnál a folyadékfázis visszük a kritikus hőmérséklet felé, majd a hőmérsékletet fűtéssel kritikus pont felett tartva csökkentjük a nyomást az atmoszférikus nyomásig.

Tehát a szárítás első lépéseként a sejtsuszpenzióban lévő folyadékot (PBS) úgynevezett felszálló etanol koncentráció sorral lecseréljük 100%-os alkoholra, ugyanis az alkohol jól elegyedik a későbbiekben a folyékony széndioxiddal. Aztán kritikusponton

szárító nyomásálló kamrájában elárasztjuk alkohollal. Többszöri öblítéssel az alkoholt lecseréljük széndioxidra, ami ekkor még folyadékfázisban van, a kritikus hőmérsékletre való melegítés során, ami a széndioxid esetében 31.5°C és 7,38 MPa, a széndioxid kritikus gőzfázisba kerül. Ezután a nyomást állandó hőmérsékleten lecsökkentjük légköri nyomásra, amihez hőközlés szükséges az adiabatikus tágulás, illetve a széndioxid kicsapódásának elkerülése érdekében. Így eltávolíthatjuk a mintában lévő folyadékot, a minta károsodása nélkül.

5.1.1.6 Szénhártya vákuumpárologatás

A minta-előkészítése a kritikuspontra szárítása után a következő lépése egy ultravékony (10-20 nm) szénhártya vákuum-párologatása a minta felületére, a minta mechanikai ellenállóságának növelése érdekében. Ezért vákuumban (5×10^{-2} Pa) szén párolgatunk el a minta felett, amit a szén, nagy elektromos árammal történő (50-100 Amper) hevítésével érjük el. Az elpárolgatott szén a gravitáció hatására leülepedik a minta felületére, és egybefüggő réteget képez. Az alkalmazott áram nagyságával, és a párolgatási idő hosszával szabályozható a képződő szénréteg vastagsága.

5.1.1.7 Kollódiumhártya kioldás

A következő lépés a minta vékonyítása előtt, hogy amid-acetát segítségével kioldjuk a minta és az aranyrostély között elhelyezkedő kollódiumhártyát, ami ideiglenes hordozófelületként szolgált, de ennek a szerepét átvette a minta felületére párolgatott szénhártya. Több lehetséges grid hártya is elérhető, amelyek közül azért választottuk a kollódiumot, mert az acetone, illetve amid-acetát segítségével feloldható. A mintákat petricsészébe helyezett amid-acetáttal felitatott szűrőpapírra helyezve, a kollódium hártya feloldódik. A használt amid-acetátot pipettával leszívom, és friss amid-acetát hozzáadásával mostam ki a maradék oldott kollódiumot. Ezt a mosást 3-szor megismétltem. [46].

5.1.1.8 Minta kémiai vékonyítása

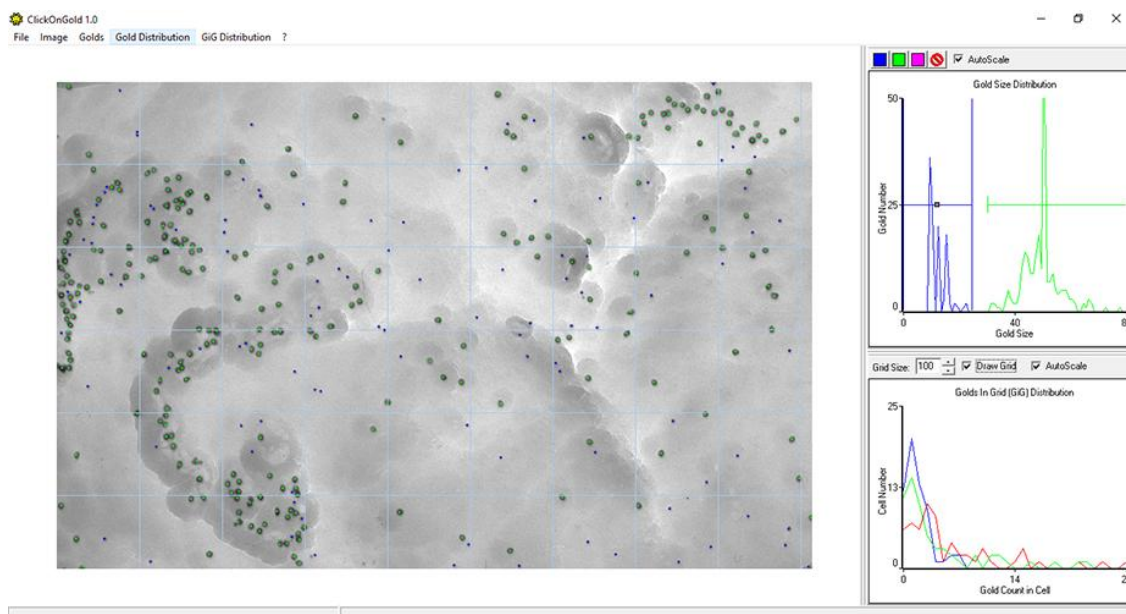
A mintákat 100 g/l koncentrációjú nátriumhidroxid vizes oldatával felitatott szűrőpapírra helyezve, a sejtalkotók vízzel oldhatóvá válnak. A mintákat ezután petricsészébe helyezett, desztillált vízzel felitatott szűrőpapírra helyezve, és a desztillált vizet pipettával többször lecserélve, kimossuk a sejtalkotókat a mintából. Ezután szabadlevegőn szárítjuk a mintát, de a szénhártyának köszönhetően, nem kell tartani az immunogold aranygömbök pozícióinak megváltozásától.

5.1.1.9 Transzmisszió elektronmikroszkópos mérések

A transzmissziós elektronmikroszkópos méréseket Jeol 2000FX-II (Jeol Ltd., Japán) típusú elektronmikroszkóppal végeztem. A mintaelőkészítésnek köszönhetően, a biológiai mintáknál nem az általában alkalmazott 80-120 kV-os gyorsítófeszültség használata mellett, hanem a maximális 200 kV-os gyorsítófeszültségen végeztem, aminek segítségével vastagabb minta is vizsgálható, mint az optimális 80-100 nm, illetve az aranygömbök kontrasztja is jobb lehetett. A TEM felvételeket törölhető, és újra felhasználható „image plate”-kre fényképeztük, és Ditabis® (Pforzheim, Németország) „imaging scanner”-rel hívtuk elő, ami lényegesen jobb minőségű képet szolgáltat, mint a hagyományos fotólemez, és nagy előnye, hogy a TEM felvételeket közvetlenül digitális formátumban kapjuk meg.

5.1.1.10 Immunogold aranygömbök pozíciójának meghatározása a ClickOnGold program segítségével

A későbbi kiértékelés érdekében, elsőként meg kell határozni az immunogold aranygömbök pozícióját a TEM felvételekről, a digitális képhez rögzített Descartes koordinátarendszerben. Ehhez a munkacsoportunkban Szentesi Gergely által készített ClickOnGold nevű szoftvert használtuk [51]. A szoftver segítségével *.txt szöveges fájl formátumban kapjuk meg a gömbök (x,y) koordinátáját. A program ezenkívül alkalmas az aranygömbök vetületeinek, a korongok területének meghatározására is, aminek a segítségével képesek vagyunk a kétszeres jelölés esetében, azaz amikor különböző fehérjéket jelölünk, a rájuk specifikusan kötődő antitestekkel konjugált, különböző méretű immunogold aranygömbökkel, különbséget tenni a különböző immunogold részecskék méretei között. A ClickOnGold kezelői felületét az 17. ábrán láthatjuk.



17. ábra A ClickOnGold kezelőfelülete

Baloldalon látható a TEM felvétel és rajta a különböző méretű aranygömbökhöz tartozó különböző színű jelölőkkel. A jobb felső sarokban a különböző méretű aranygömbökhöz tartozó kapuzás. A jobbsó sarokban az egyik (kék), a másik méretű (zöld), illetve az összesített (piros) immunogold eloszlása látható.

Az ábra bal oldalán a két különböző színű (kék és zöld) megjelölt 10 és 20 nm-es immunogold arannyal jelölt HLA I és HLA II fehérjék TEM felevétele látható, a JY sejtvonal. A 14. ábra jobboldal felső sarkában a program által végzett az aranygömbök méret szerinti osztályozása (különböző színekkel ábrázolva) látható, ami tetszőlegesen beállítható. Az aranygömbök mérete az x tengelyen és az adott méretű gömbök száma az y tengelyen láthatóak. A 17. ábra jobboldal alsó sarkában az aranygömbök eloszlása látható. Tetszőleges méretű hálót helyezve a képre, a program leszámolja az egyes cellákban található foltok számát. Ezzel összehasonlítható a véletlenszerű ponteloszlásból adódó Poisson eloszlás eltérése, és megállapítható, hogy a minta területén lévő fehérjék eloszlása eltér e a véletlenszerű pontmintázattól. Ezzel a módszerrel, csak a klaszterizáció meglétét vagy nem meglétéről kaphatunk információt. Ettől egy kifinomultabb módszert használtunk, ahol másodrendű függvényekkel végeztem a pontmintázat statisztikai jellemzését, amit a következőkben részletezünk.

5.1.1.11 Pontmintázatok kiértékelése, a párkorrelációs (PCF) és párkeresztkorrelációs függvény (PCCF)

A Célkitűzések fejezet végén említettem, szerettünk volna egy a pontmintázatok elemzéséhez egy hatékonyabb függvény alkalmazását a sejtfelszíni fehérjék mintázatának jobb leírása érdekében, a PCF és PCCF függvényekkel. Ez egy sokkal pontosabb analízis tesz lehetősége, mint a korábban alkalmazott, a Poisson függvénnyel való összehasonlítás, ugyanis ez utóbbi csak azt tudja megállapítani, hogy az adott ponteloszlás véletlenszerű-e vagy sem. A másodfokú ponteloszlás leíró függvények ugyanakkor információt tudnak szolgáltatni az esetlegesen meglévő klaszterek tulajdonságairól is. A másodfokú kifejezés arra utal, hogy a függvénynek két független változója van, ami esetünkben nem más, mint a TEM felvételeken az előző fejezetben leírtak szerint a foltok (x,y) Descartes féle koordinátája. Az általunk alkalmazott függvény az úgynevezett párkorrelációs és párkeresztkorrelációs függvény (PCF, PCCF), ami a Ripley-féle párkorrelációs függvényből eredeztethető. A függvények numerikus közelítő alakjai a következők [52-54].

A PCF függvény:

$$K_j(r', r'') = \frac{1}{N \cdot \lambda_j^2} \sum_{i=0}^N \sum_{\substack{x,y \in X_{i,j} \\ x \neq y}} \frac{I[r_1 \leq d(i, j) \leq r_2]}{\gamma[d(i, j)]}$$

és a PCCF függvény:

$$K_j(r', r'') = \frac{1}{N \cdot \lambda_1 \cdot \lambda_2} \sum_{i=0}^N \sum_{\substack{x \in X_{1,i} \\ x \in X_{2,i}}} \frac{I[r_1 \leq d(i, j) \leq r_2]}{\gamma[d(i, j)]},$$

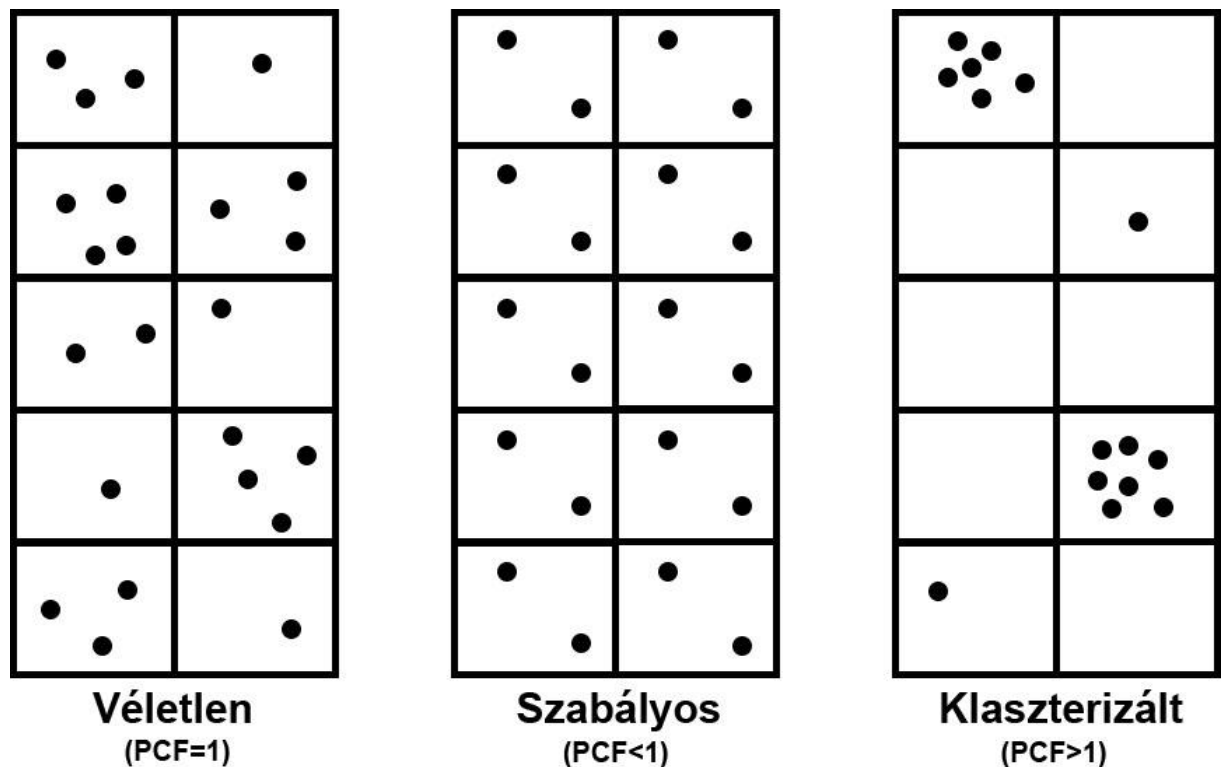
A γ szélkorrekciós függvény, egy téglalap alakú kép esetében

$$\gamma(r) = a \cdot b - \frac{2}{\pi} \cdot (a + b) \cdot r + \frac{1}{\pi} \cdot r^2$$

ahol N az adott felvételen jelenlévő foltok száma, λ a globális vagy átlagos felületi pontsűrűség, azaz a képen jelen lévő foltok számának és a kép területének aránya (N/A), az a és b pedig a kép geometriai méretei, egy téglalap alakú kép esetén. Az I indikátorfüggvény, aminek az értéke 1 ha a kapcsos zárójelben megadott feltétel teljesül, egyéb esetben 0. Az összefüggések szemléletes leírása a következő: Rögzítjük az egyik folt középpontját, és leszámoljuk hány darab folt esik bele egy az előzőekben rögzített pont körüli r_1 és egy r_2 sugarú sávban. Ezt megismételjük minden pontra és összegezzük

az értékeket. A γ függvényre azért van szükség, mert ha az r_1 és r_2 körök által meghatározott sáv valamilyen mértékben kívül esik a képből, akkor ez a sáv természetes módon kevesebb pontot fog tartalmazni, amit korrigálnunk kell.

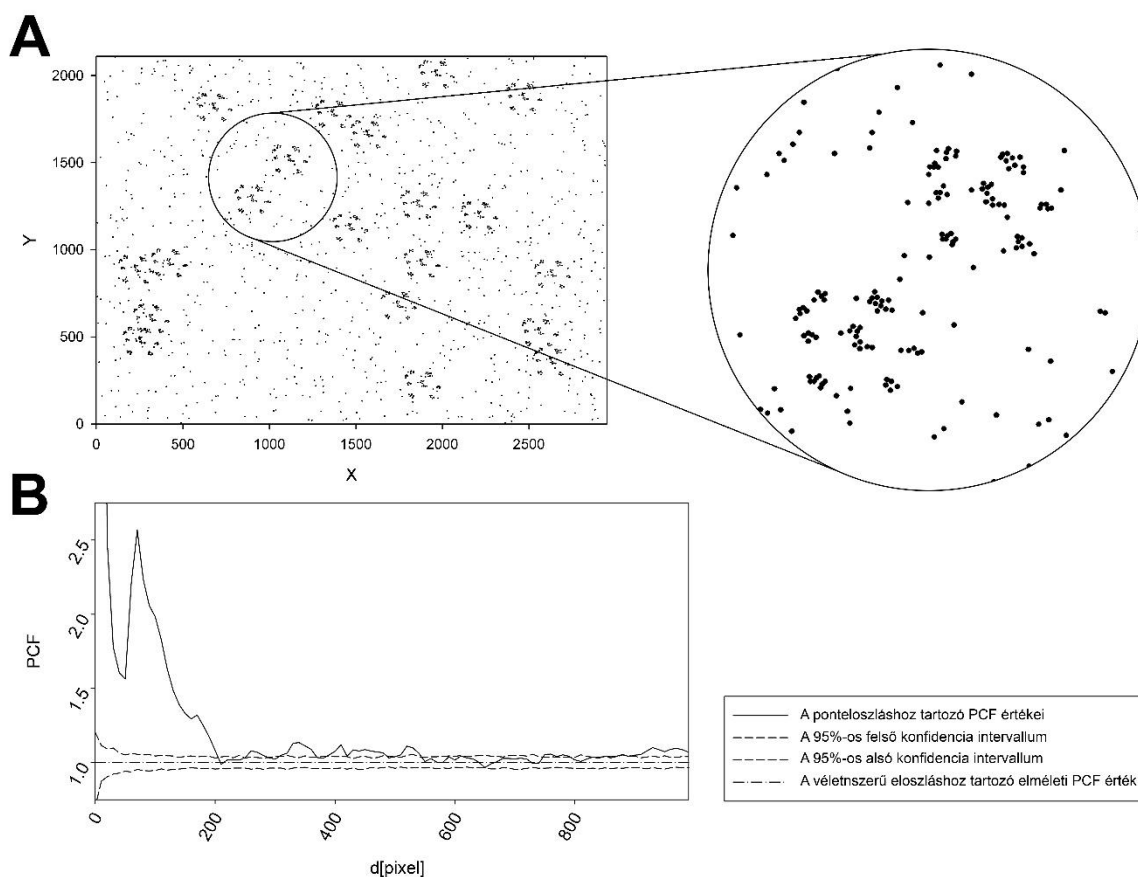
A párkorrelációs függvény egyik legnagyobb előnye a ponteloszlás részletes jellemzésén túl, a könnyű értelmezés. Alapvetően 3 típusú ponteloszlást tudunk megkülönböztetni, a véletlent, a szabályost, illetve a klaszterizáltat. A három típushoz a PCF függvény rendre egyenlő 1-el, kisebb 1-nél, illetve nagyobb 1-nél, amit a 18. ábrán mutatok be.



18. ábra A ponteloszlások típusai, és a hozzá tartozó PCF

A ponteloszlások három típusát különböztethetjük meg, a véletlen eloszlást, aminek az elméleti PCF értéke 1, a szabályos vagy szegregált eloszlást, melynél a PCF értéke 1-nél kisebb, illetve a klaszterizált eloszlást, melynél a PCF értéke 1-nél nagyobb.

A párkorrelációs függvény jobb megértése érdekében készítettem, egy mesterséges, szimulált képet, különböző méretű és számú klasztereket tartalmaz és elkészítettem az ebből a pontmintázathoz tartozó párkorrelációs függvényét, amit a 19. ábrán látható.



19. ábra Mesterséges, klaszterizált kép PCF függvénye

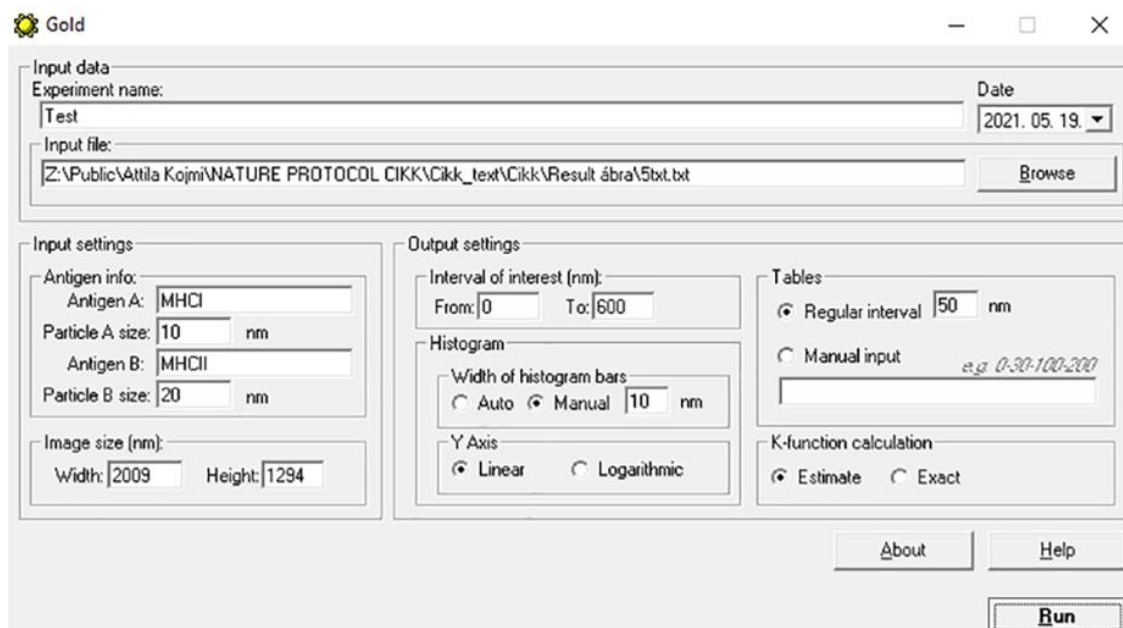
Az (A) panelen a klasztereket tartalmazó képet, illetve az (A) panel bal oldalán egy felnagyított részletét láthatunk. Alatta a (B) panelen a PCF grafikont. Az x tengelyen a PCF értékek, míg az y tengelyen a pixelben mért távolságok lettek feltüntetve. Maga a PCF értékek a távolság függvényében a folyamatos vonal mutatja, a szaggatott vonalak az alsó, illetve a felső 95%-os konfidencia intervallumok lettek feltüntetve. Az egy pontvonal az elméleti randomeloszláshoz tartozó ($PCF=1$) értéket mutatja.

A korábban említett grafikon, a (B) panelen látható grafikon, aminek az értelmezése, a következő: Abban az esetben, ha a PCF görbe az alsó és a felső 95%-os konfidencia intervallumon belül található, akkor a hozzá tartozó távolságokkal megegyező méretű klaszterek nincsenek jelen. Abban az esetben, a PCF érték a felső 95%-os konfidencia intervallum felé esik, az a klaszterek jelenlétére utal, és a csúcs magassága arányos az adott méretű klaszterek mennyiségével. Ha pedig a 95%-os konfidencia intervallum alatt van a PCF érték, akkor a hozzá tartozó távolsággal megegyező méretű szabályos eloszlásra utal. A grafikonon látható, hogy körülbelül 5 db

csúcs található, azaz 5 különböző méretű klasztert tudunk megkülönböztetni. A legkisebb méretű klaszterek (kb. 10-20 pixel) legnagyobb számosságúak, azaz itt a legnagyobb PCF függvény értéke. A következő, körülbelül 100 pixel méretű klasztert jelző csúcs már kisebb, így annak számossága is kisebb. Láthatunk még körülbelül 250, 350, 500 és 900 pixelén is található a 95%-os konfidencia intervallumot meghaladó PCF értékek is, de a csúcsokból látható, hogy ezek számossága kicsi. A PCF függvény 1000 pixel értékig szimuláltuk le, ugyanis az elméleti határ, ahol még értelmezhetőek a PCF értékek, az a kép legkisebb dimenziójának kb. fele, jelen esetben ez 1000 pixel. A szimuláció megvalósítását a következő pontban részletezzük.

5.1.1.12 A fehérjemintázatok kiértékelése, feltérképezése (a párkorrelációs függvény meghatározása) a Gold szoftver segítségével

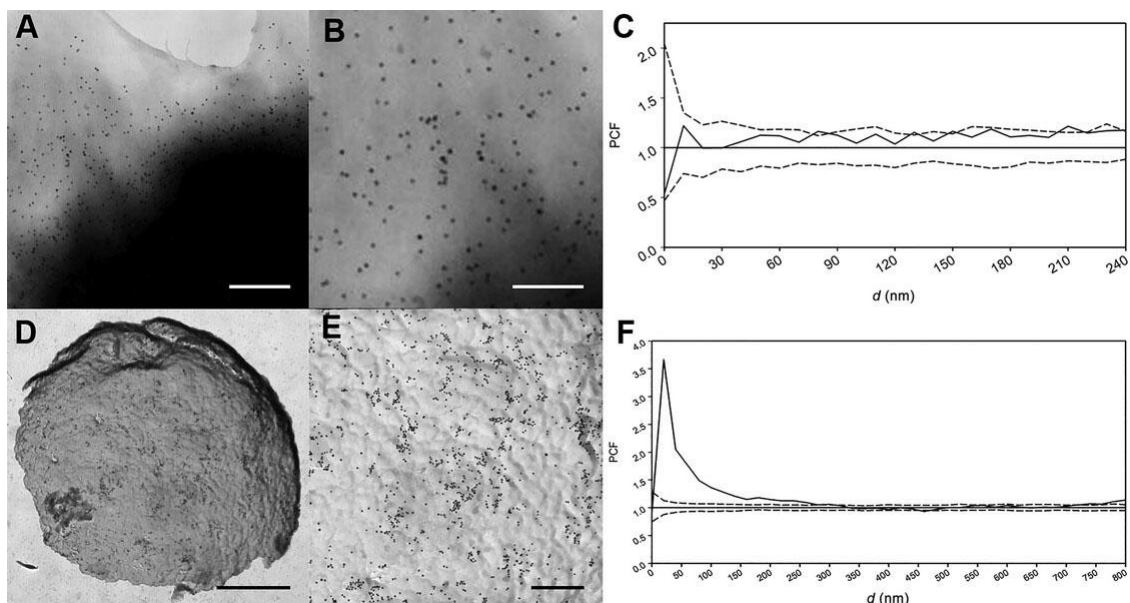
A PCF és PCCF függvény meghatározását a Cseh Tudományos Akadémia Molekuláris Genetikai Intézete által korábban kifejlesztett Gold programmal végeztük. A szoftver könnyen alkalmazható immunogold jelölt minták PCF és PCCF függvényeinek meghatározására [54, 55]. A program kezelőfelületét a 20. ábra mutatja.



20. ábra A Gold program felület.

Az „Input file”-nál megadhatjuk a ClickOnGold szoftver által létrehozott TXT file, ami tartalmazza az aranygömbök helyzetét. Az „Input settings”-nél megadhatjuk a különböző aranygömbök méreteit és az általuk jelölt antigéneket neveit, illetve a kép méretét adjuk meg nm egységben. Az „Output settings”-nél meg kell határozzuk a kívánni vizsgált PCF teljes szélességét illetve az intervallumok szélességét.

A kezelőfelület lényegesebb részei a következők: A jobb oldali panelen megadhatjuk a vizsgált fehérje nevét, illetve a jelölésére használt aranygömbök méretét, alatta a kép méretét nm egységben. A középső panelen a numerikusan kalkulált PCF, duplajelölés esetében PCCF függvény intervallumát és a felbontását adhatjuk meg, azaz mekkora maximum értékig számolhatjuk ki a PCF függvényt, illetve milyen sűrűn, azaz mekkorák legyenek az r_i és r_{i+1} értékek különbségei. Ezen kívül a szoftver Monte Carlo módszerrel határozza meg, az egyes intervallumokhoz tartozó PCF és PCCF függvények értékéhez tartozó 95%-os konfidencia intervallumokat. Azaz, ha a képből számított függvényértékek az intervallumon belüliek, akkor az adott eloszlás 95%-os valószínűséggel random eloszlású, ha nagyobb, akkor klaszterizált, ha kisebb, akkor szegregált vagy uniform eloszlású.



21. ábra Az új és a régi protokoll eredményeinek összehasonlítása

Az (A) illetve a (B) TEM felvételek, egy a korábban vizsgált, Kv1.3/FLAG ioncsatornák lehetséges klaszterek, illetve mintázatának vizsgálata látható 10 nm átmérőjű immunogold jelölés segítségével CTLL-2 sejtvonalon, a méretskála 400 nm. A (B) panelen egy az (A) panelen látható kép egy jellemző területéről készült kinagyított képet láthatunk, a méretskála 200 nm. A (C) panelen, fentebb említett képhez tartozó PCF függvénnyel történő statisztikai kiértékelése. A 95%-os szignifikancia szinthez tartozó alsó és felső értékek szaggatott vonallal láthatóak, azaz, ha ebben az intervallumban található a TEM felvételhez tartozó empirikus PCF érték, akkor nem mutatható ki szignifikánsan a klaszterek jelenléte a sejtfelszínen, a méretskála 1500 nm. A (D) panelen az új mintaelőkészítési eljárással készített TEM felvétel látható. Itt HLA I molekulát jelöltük 10 nm-es immunogold kolloidális aranygömbbel, JY sejtvonalon. Ez a felvétel kellően kis nagyítással készült és így az egész sejt látható. Ahogy a felső felvételen, egy már kiértékelhető nagyítást láthatunk az (E) panelen, a méretskála 400 nm. Az (F) panelen az (E) panelen látható immunogold jelölt felvételhez tartozó PCF függvény látható.

Amint láthatjuk, hogy míg a korábbi technikával készített felvételen a sejt csak egy külső keskeny körvonala átlátható a transzmissziós elektronmikroszkóp számára ((A) panel), addig az új technikával, az egész sejt egyik lipid kettősrétege teljesen átvilágíthatóvá válik a TEM számára ((B) panel). Ami a sejtfelszíni fehérjék eloszlásának statisztikai pontosságának leírását illeti, a két különböző PCF függvényt kell megvizsgálunk. Miután a két nyers TEM felvételekből (21. ábra (A) és (D) panel) kivágtam a lehető legnagyobb vizsgálható tartományt (21. ábra (B) és (E) panel), meghatároztam azok területét. A korábbi eljárással elkészített minta esetében a kiértékelhető kép mérete 883 nm x 896 nm, míg az új protokoll esetében ez 2883 nm x 2918 nm adódott. Azaz az új eljárással kapott vizsgálható terület kép mérete több mint a 10-szerese a korábbihoz eljárással elérhető képest.

Két nagyon lényeges különbséget vehetünk észre a két minta PCF függvényei között (21. ábra C és F panel). Egyrészt, hogy a x tengelyen lévő maximális intervallum az új mintaelőkészítési eljárás alkalmazásával a korábbihoz képest több mint a 3-szor nagyobb intervallummal rendelkezik, másrészt a konfidencia intervallumok lényegesen

kisebbség az új technikával előkészített mintáról készített grafikonon, ennek oka, hogy az új protokollal készített felvétel mérete lényegesen nagyobb, így megnövekedett az elemek (foltok) száma.

A konfidencia intervallum $n > 30$ esetben (itt jó közelítéssel normáloszlással közelíthetünk, ellenkező esetben, ha $n < 30$ a Student's féle t-eloszlást kell alkalmaznunk):

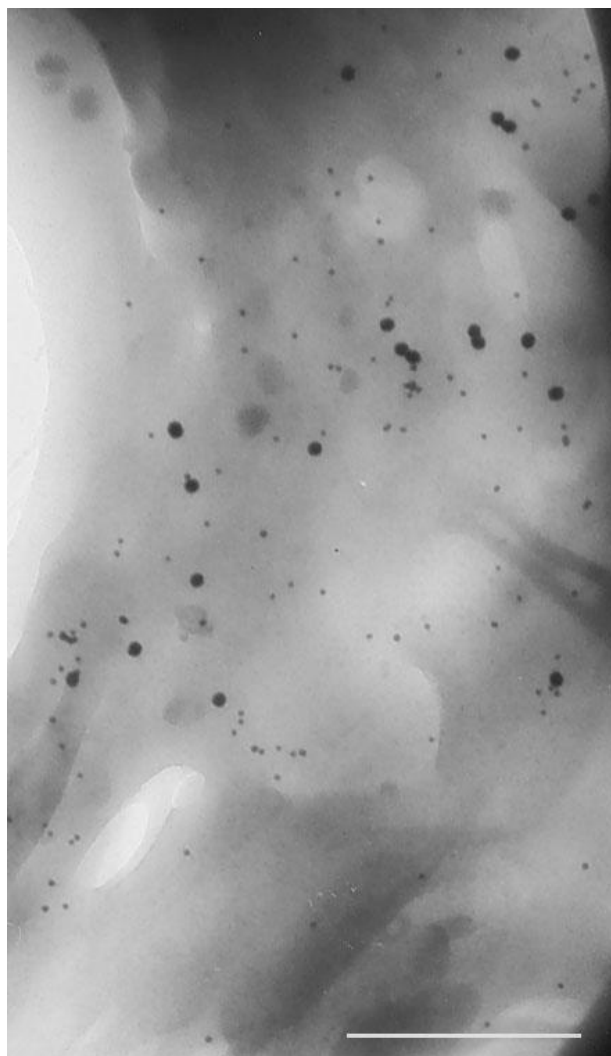
$$C_i = \bar{x} \pm z_c \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

ahol C_i a konfidencia intervallum nagysága. Az $\bar{x}$ a minta átlaga, jelen esetben az adott intervallumokhoz tartozó PCF függvény átlaga. z_c a konfidenciaszinthez tartozó érték, amit a standard normáloszlás táblázatából ismerhetők, ami 95%-os esetben 1.96, σ a minta szórása, azaz az adott intervallumokhoz tartozó PCF értékek szórása. A vizsgálható terület nagysága lényegesen befolyásolja a leírásra használt statisztika pontosságát, mivel az adott mintán vizsgált terület nagysága egyenesen arányos a vizsgálható pontok számosságával, ebben a jelölésben az n -el.

5.2 IL-2R α és IL-15R α sejtfelszíni fehérjék proximitás viszonyainak vizsgálata Kit 225 FT7.10 T-limfocita sejtvonalon

Az IL-2 és az IL-15 sok esetben hasonló sejtválaszokat vált ki, de ellentétes hatásuk is van a T-limfociták életére és halálára. A jelátviteli utak eltérésének már a plazmamembránon kell bekövetkeznie, ahol a citokinek kölcsönhatásba lépnek receptoraikkal. Ezért kulcsfontosságú a receptorok szerveződésének molekuláris részleteinek megértése [6]. Modellrendszerként az IL-2R α és IL-15R α sejtfelszíni szerveződését és közös lokalizációját Kit225 FT7.10 humán T-limfóma sejtekben vizsgáltuk TEM segítségével. A rögzített képeket képfeldolgozó alkalmazásunkkal meghatároztam az immunogold részecskék reprezentáló foltok középpontjainak a koordinátáit, majd a Gold nevű szoftver meghatározza a különböző intervallumokhoz tartozó PCF értékeket, majd Monte Carlo szimulációval a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumok értékét, amit több ugyanolyan paraméterekkel (képméret, és pontok száma) rendelkező random eloszlásból meghatározott PCF értékekből határozott meg a Gold szoftver. A kérdéses fehérjéket különböző méretű (15, 30 nm) immunogold aranygömbökkel jelöltük.

A sejteket elsődleges anti-IL-2R α 7G7/B6 és elsődleges anti-IL-15R α 7A424, valamint aranygyönggyökkel konjugált (IL2: 15 nm és IL15: 30 nm) kecskében termelt anti-egér IgG másodlagos antitestekkel jelöltük. Példaként egy jellemző, véletlenszerűen kiválasztott tipikus TEM-kép látható az 22. ábrán.

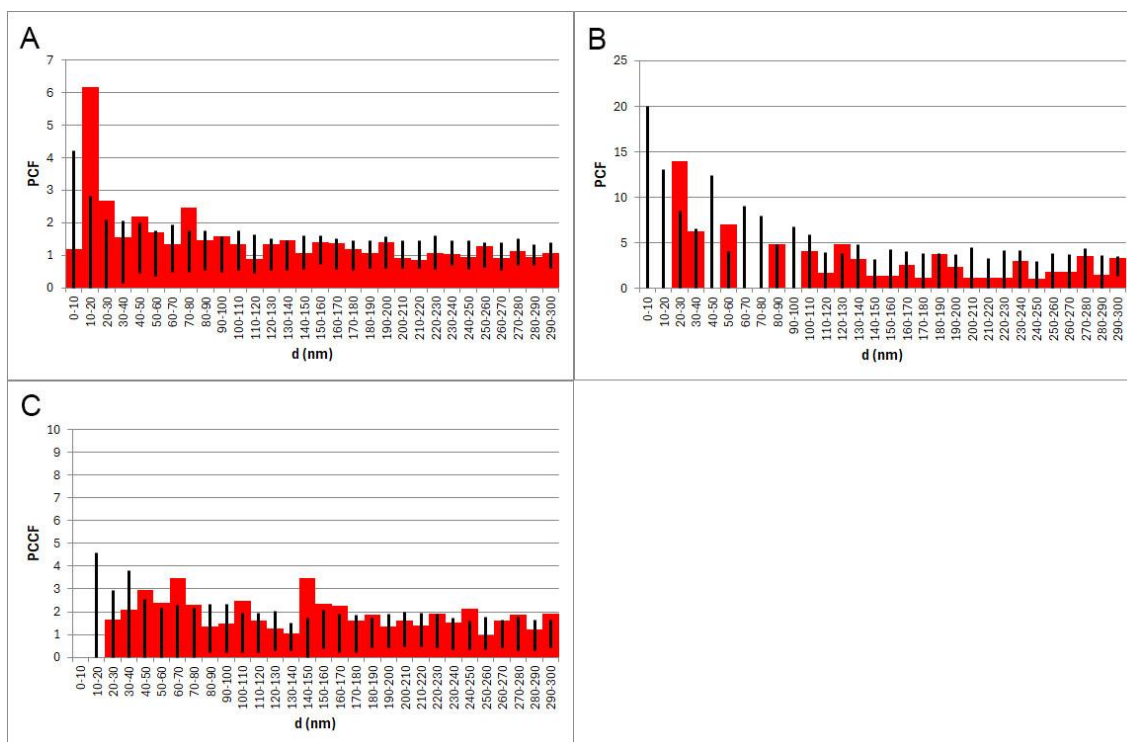


22. ábra Az IL-2 és IL-15 receptorok kettős jelölése

Az IL-2 és IL-15 receptorokat indirekt módon aranygyönggyökkel (IL-2: 15 nm-es (kis fekete pontok) és IL-15: 30 nm-es immunogold aranygömbökkel, nagy fekete pontok) jelöltük. A sejteket anti-IL-2R α primer 7G7/B6 és anti-IL-15R α primer 7A424, valamint aranygyönggyökkel konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos antitestekkel jelöltük. A TEM-kép a Kísérleti részben leírtak szerint készült (a méretskála: 500 nm).

Bár az IL-2R α és az IL-15R α klaszterizációja néhány 100 nanométeres skálán konfokális mikroszkóppal és Közelimezős Pásztázó Optikai Mikroszkóppal (SNOM) is megfigyelték [57, 58], de a klaszterek eloszlásának közvetlen elemzése mindeddig hiányzott. Az immunogold jelölés segítségével, viszont közvetlenül is meg tudtuk figyelni az IL-2R α és IL-15R α doménjeit. Ezen a hierarchikus szinten az IL-15R α és az IL-2R α csoportosulását is megfigyeltük az FT7.10 sejtek plazmamembránjában. TEM-

méréseim megerősítették az IL-2R α -t és IL-15R α -t tartalmazó membrándomének együttes lokalizációját. A homo- és hetero-asszociációit igazoló PCF és PCCF értékei az 23. ábrán láthatjuk [51].



23. ábra Az IL-2 és IL-15 fehérjék sejtfelszíni proximitás viszonyait jellemző PCF és PCCF értékei.

Az oszlopok jelölik a PCF értékeit, a függőleges fekete vonalak a 95%-os konfidencia intervallumot. Az (A) és (B) panelen láthatjuk rendre az IL-2 és IL-15 receptorok eloszlásához tartozó PCF értékeket. A (C) panelen a IL-2 és IL-15 receptorok párkeresztkorrelációs (PCCF) függvénye látható.

Az 23. ábrán láthatjuk a PCF és PCCF értékeket (szürke oszlopok), illetve a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumokat

Az (A) panelen az IL-2 (15 nm-es aranyrészecskék) klasztereződése jól látható a 10-20 nm-es, 40-50 nm-es és 70-80 nm-es intervallumokban, azaz a PCF függvények ebben az intervallumokban szignifikánsan meghaladják a random eloszláshoz tartozó 1-es értéket. A (B) panelen az IL-15 receptorok (30 nm-es aranyrészecskék) klasztereződése 20-30 nm-es és 60-70 nm-es, illetve 140-170 nm-es intervallumba tehető. A (C) panelen az IL-2 és IL-15 receptorok kolokalizációja. A két receptor kolokalizációját figyelhetjük meg a 20-30 nm-es, 120-130 nm-es, illetve 150-160 nm-es intervallumokban.

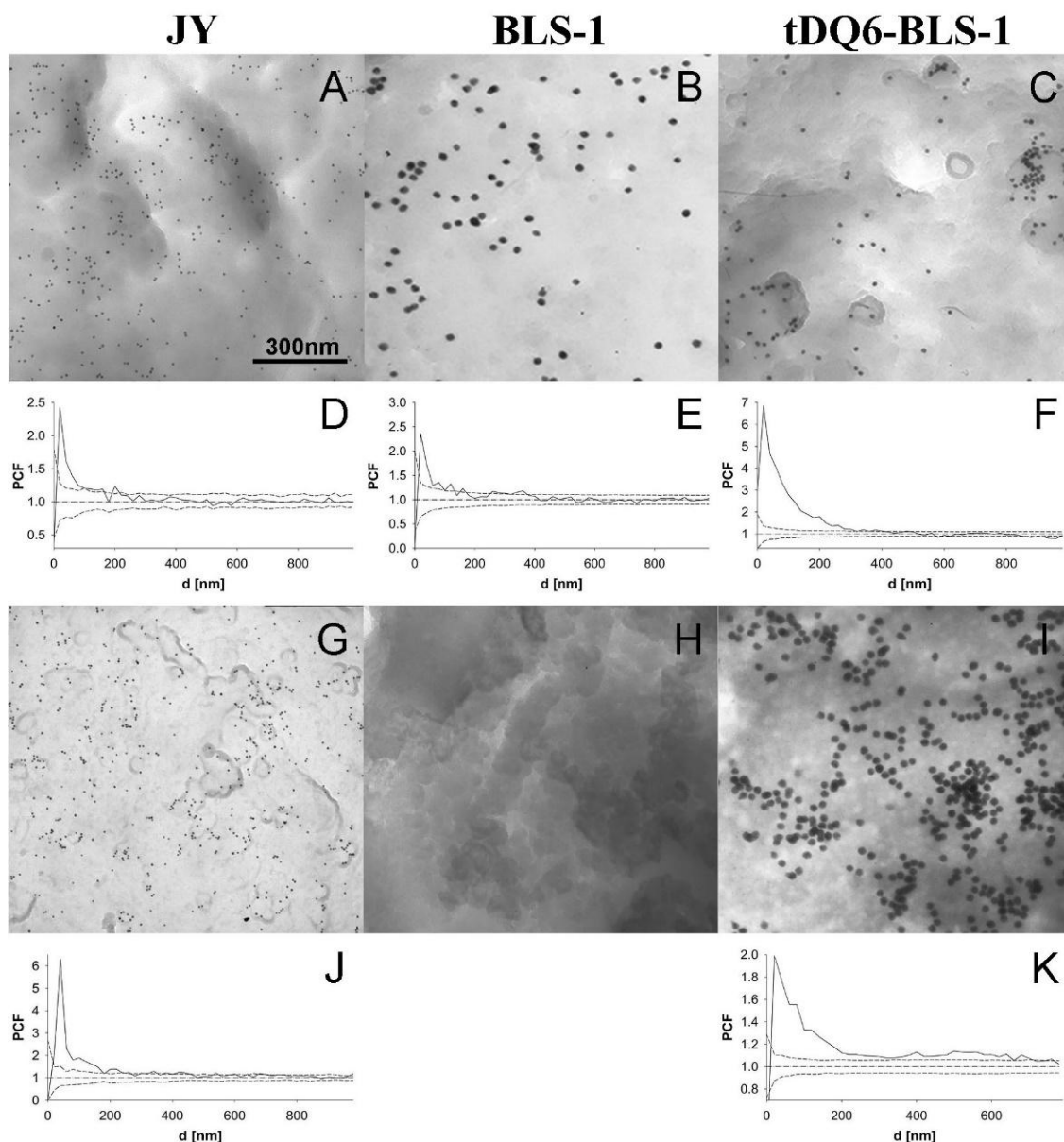
5.3 Sejtfelszíni fehérjék proximi tásvizszoynainak megváltozásának vizsgálata HLA DQ fehérjének megjelenésével, Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) sejtvonalon transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével

Kísérleteink annak a hipotézisnek a tesztelésére irányulnak, hogy a HLA I és II sejtfelszíni kifejeződése (és így homo- és hetero-asszociációja) befolyásolhatja-e egymás eloszlását nanométeres, illetve több tíz nanométeres skálán.

Ebből a célból három sejtvonalat elemeztünk: a BLS-1 sejtvonalat, amely nem fejez ki HLA II fehérjéket, de endogén I. osztályú fehérjéket igen; a tDQ6-BLS-1 sejtvonal, amely transzfektált HLA DQ (II osztályú) és endogén HLA I osztályú molekulákat is kifejez; és a JY sejtvonal, amely endogén módon fejez ki mind az I, mind a II osztályú molekulákat megfelelő szinten. Vizsgáltuk a HLA I osztályú, HLA II osztályú sejtfelszíni molekulák homo- és hetero-asszociációit.

Mivel a korábbi FRET vizsgálatok eredményei a HLA fehérjék megváltozott sejtfelszíni eloszlási mintázatára utaltak [59], célul tűztük ki a HLA I és HLA II molekulák membrán topológiájának vizsgálatát szubmikrométeres skálán TEM segítségével. A különböző fehérjék mintázatának vizsgálatához, immunogolddal jelölt mintán végeztünk TEM vizsgálatot, amely információt nyújt a pár 100 nm-es és egy mikrométeres skála közötti molekulamintázatokról.

Itt közvetlenül mértük a HLA I és HLA II klaszterek eloszlását ezen a hierarchikus szinten a három különböző sejtvonal (JY, tDQ6-BLS-1, BLS-1) plazmamembránjában immunogold jelölés segítségével. Mind a HLA I, mind a HLA II molekulákat különböző méretű, 10, 20 vagy 30 nm-es aranygyöngyökkel konjugált antitestekkel jelöltük. Az arany nanorészecskék eloszlását TEM-mikroszkópos felvételeken az 24. ábra **(A)** **(B)** **(C)** **(G)** **(H)** **(I)** paneljein láthatjuk [59].



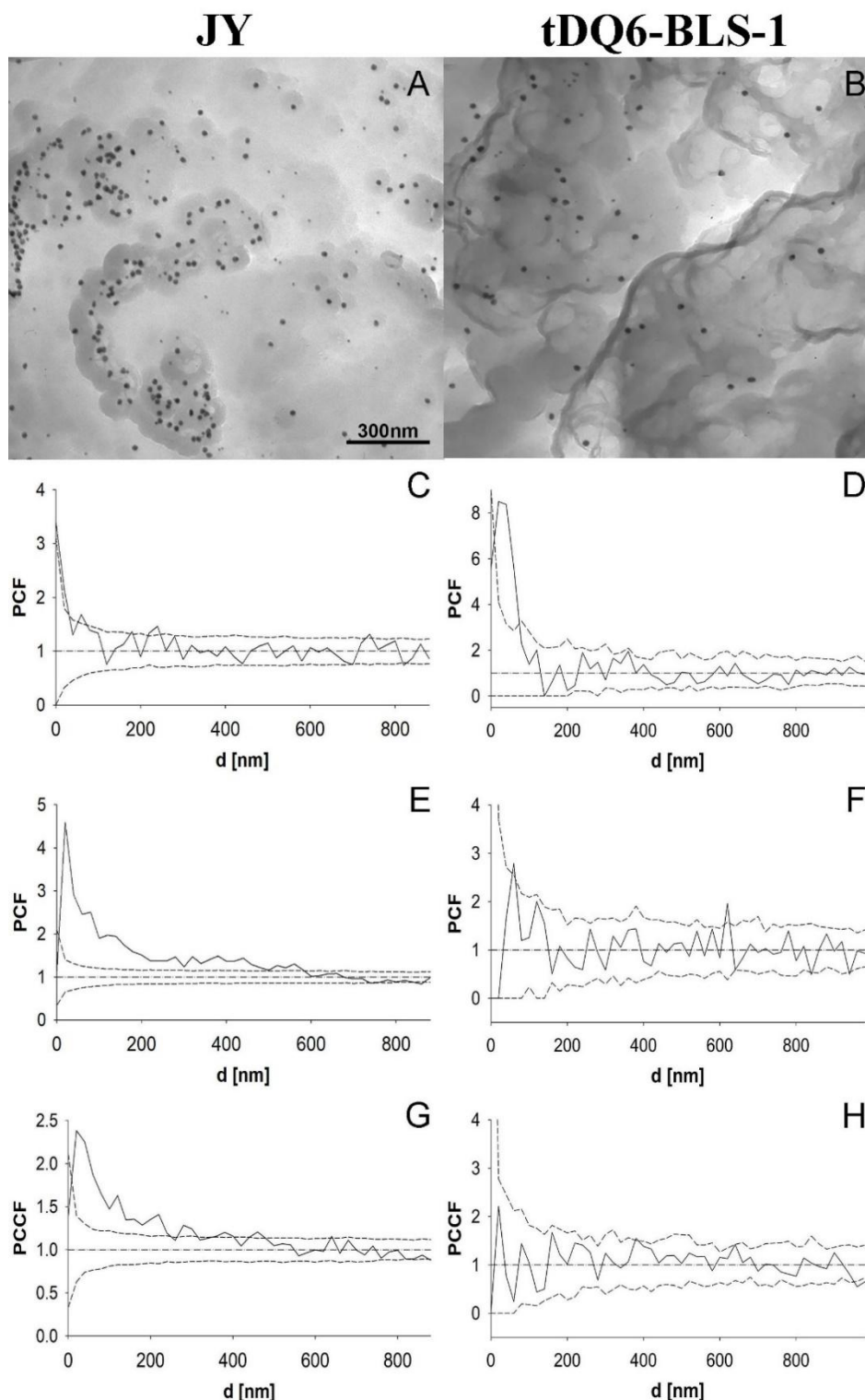
24. ábra HLA I és II sejtfelszíni eloszlásának immun-elektronmikroszkópos vizsgálata JY, BLS-1 és tDQ6-BLS-1 sejteken.

A transzfektált tDQ6-BLS-1 és nem transzfektált BLS-1 sejtek HLA I és HLA II molekuláit anti-HLA I (W6/36) és anti-HLA II (anti-HLA-DQ) primer monoklonális antitestekkel konjugált 10, 20, ill. 30 nm átmérőjű kolloid arany nanorészecskékkel jelöltük. A méretskála 300 nm, minden TEM felvételen. (A) HLA I-et 10 nm-es immunogolddal a JY, (B) HLA I-et 30 nm-es immunogolddal a BLS-1 és (C) HLA I-et 20 nm-es immunogolddal a tDQ6-BLS-1 sejtvonalakon jelöltük. A TEM felvételekhez rendelhető párkorrelációs függvények (PCF-ek) a következők: (D) HLA I a JY sejteken, (E) HLA I a BLS-1 sejteken és (F) HLA I a tDQ6-BLS-1 sejteken. (G) a HLA II-t 10 nm-es immunogolddal a JY, (I) HLA II-t 30 nm-es immunogolddal a tDQ6-BLS-1 sejteken jelöltük. A negatív kontrollként, az (H) panelen a HLA II molekulát jelöltük (30 nm-es immunogolddal) BLS-1 sejteken. A megfelelő PCF-ek a (J) HLA II a JY sejteken és a (K) a HLA II a tDQ6-BLS-1 sejteken.

Az arany részecskék sejtfelszíni eloszlását az általunk korábban kifejlesztett „ClickOnGold” szoftverrel elemeztük [51]. A megfelelő PCF-eket a 24. ábra (D) (E) (F) (J) (K) paneljein láthatjuk. A PCF elemzése azt mutatja, hogy a JY sejtek esetében a HLA I molekulák eloszlása a 10-20 nm-es és a 200 nm-es távolságtartományban jelentősen

eltér a véletlenszerű eloszlástól feltételezve meghatározott értékektől (24. ábra **(D)** panel). A HLA II molekulák szintén nem véletlenszerű eloszlást mutattak a JY sejteken, a 10–20, 30–150 és 190–210 nm-es tartományban (24. ábra, **(E)** panel). A BLS-1 sejtekben a HLA I molekulák nem véletlenszerű eloszlást mutattak a 10-20 nm-es, 30-120 nm-es, és kis mértékben a 210-350 nm-es távolságtartományban a PCF függvény szerint (24. ábra, **(E)** panel). A BLS-1 sejtek nem fejeznek ki HLA II molekulákat a sejtfelszínen (24. ábra, **(H)** panel, negatív kontroll), így itt PCF analízist nem végeztünk. A tDQ6-BLS-1 sejtekben a HLA I molekulák kifejeződése nem véletlenszerű eloszlást mutatott a 10-210 nm-es tartományban (24. ábra, **(F)** panel), és az újonnan szintetizált HLA II (HLA-DQ) molekulák megjelentek a sejtfelszínen, klasztereket képezve, a 10-200 nm és 400-600 nm tartományban (24. ábra, **(K)** panel). A *de novo* szintetizált HLA-DQ molekulák egyértelműen nem véletlenszerű jellemzőket mutattak ezen a hierarchikus szinten.

Azt is meg akartuk vizsgálni, hogy a HLA I és HLA II sejtfelszíni molekulák klasztereket alkotnak-e egymás körül, azaz kimutatható valamely féle keresztkorreláció ezen molekulák között a sejtfelszínen. Ezért dupla immunogolddal jelöltük JY és tDQ6-BLS-1 sejteket 10, illetve 20 nm-es aranygömbökhöz konjugált HLA I és HLA II molekulák elleni antitestek felhasználásával. Eredményeinket 25. ábrán láthatjuk.



25. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételek dupla immunogolddal jelölt HLA I és HLA II molekulákról

A JY és tDQ6-BLS-1 sejtvonalakon a HLA I és II molekulákat 10 és 20 nm-es aranygyöngyökkel konjugált anti-HLA I és anti-HLA II antitestekkel jelöltük. A jelölési eljárás hasonló volt az egyszeres jelöléshez. **(A)** HLA I 10 nm-es és HLA II 20 nm-es aranygyöngyökkel jelölt minta TEM-mikroszkópos felvételei JY sejteken. A méretskála 300 nm, ami érvényes a **(B)** panelre is. **(B)** HLA I 10 nm-es és HLA II 20 nm-es aranygyöngyökkel jelölt minta TEM-mikroszkópos felvételei tDQ6-BLS-1 sejteken. A megfelelő párkorrelációs függvények (PCF-ek) a következők: **(C)** HLA I JY sejteken, **(D)** HLA I tDQ6-BLS-1 sejteken, **(E)** HLA II JY sejteken, és **(F)** HLA II tDQ6-BLS-1 sejteken. A pár-korrelációs függvény (PCCF) a HLA I és a HLA II korrelációs függvényét jelzi. A **(G)** panelen látható a HLA I és HLA II PCCF-je a JY sejteken, a **(H)** panelen HLA I és HLA II PCCF-je a tDQ6-BLS-1 sejteken.

Az 25. ábra **(A)** és **(B)** paneljén a JY és a tDQ6-BLS-1 sejtek TEM felvételei láthatóak dupla jelölés után. A tDQ6-BLS-1 sejtekről készült TEM felvételek kiértékelése után kaptuk meg az eloszlások párkorrelációs függvényeit a HLA I (25. ábra, **(D)** panel) és a HLA II molekulák (25. ábra, **(F)** panel) esetében, illetve a pár-keresztkorrelációs függvényeket (PCCF) (25. ábra, **(H)** panel). JY sejteken a HLA I molekulák PCF-je a 200 nm-es tartományban mutatott lehetséges klasztereket (25. ábra, **(C)** panel), a HLA II molekulák PCF-je pedig a 20 és 200, valamint a 300 és 380 nm közötti tartományban lévő HLA II klasztereket (25. ábra, **(E)** panel). A HLA I és HLA II molekulák PCCF-je enyhe asszociációt mutatott a HLA I és HLA II molekulák között körülbelül 25, 75 és 175 nm-en (25. ábra, **(G)** panel). Megjegyzendő, hogy a csúcsok egy része alig haladja meg a 95%-os szignifikancia szintet, ezért ezeket az eredmények értelmezését óvatosan kell kezelni. A tDQ6-BLS-1 sejteken a HLA I molekulák PCF-je a 20-60 nm-es tartomány körüli lehetséges klasztereket mutatta (25. ábra, **(D)** panel), a HLA II molekulák PCF-je pedig körülbelül 60 és 600 nm-es HLA II klasztereket (25. ábra, **(F)** panel). A JY sejtekkel ellentétben a tDQ6-BLS-1 sejtek HLA I és HLA II molekuláinak PCCF-je nem mutatott mérhető eltéréseket a véletlenszerűhöz képest a HLA I és HLA II molekulák között (25. ábra, **(F)** panel), ami arra utal, hogy ezekben a sejtekben, a *de novo* szintetizált HLA DQ molekulák nem keverednek HLA I klaszterekkel.

6. Megbeszélés

Az, hogy a sejtfelszíni membránfehérjék különböző szinteken szerveződnek térben és időben, már régóta ismert és széleskörben kutatott téma.

A legelterjedtebbek, a sejtfelszíni fehérjestruktúrák vizsgálatára a különböző mikroszkópos vizsgálati módszerek, amik főként optikai, és azon belül is fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálatok. A hagyományos fluoreszcencia mikroszkópiának nagy előnye a könnyű hozzáférhetőség, illetve a viszonylagos egyszerűsége.

Az egyszerűsége ellenére az egyik legnagyobb hátránya a hagyományos fénymikroszkópoknak a maximális felbontási vagy diffrakciós korlát, ami az Abbe törvény szerint, arányos a leképező fény hullámhosszával. Így az elérhető minimálisan feloldható távolság körülbelül 200 nm.

Az utóbbi időkben azonban nagy előrelépés volt a szuperfeloldású optikai mikroszkópok fejlesztésében, melyek képesek kikerülni a hagyományos mikroszkópok feloldási határát jelentő diffrakciós korlátot. A teljesség igénye nélkül ilyen a (SNOM), Stimulált emissziós kioltás mikroszkópia (STED), a Sztochasztikus optikai

rekonstrukciós mikroszkóp (STORM) és Fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópiát (PALM) és a Teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópia (TIRF). Ezekkel az eljárásokkal már megközelíthető a 50-100 nm-es laterális feloldóképesség, de vagy nehezen hozzáférhetőek a készülékek, vagy speciális követelményeknek kell megfelelniük, például a mintáknak vagy az alkalmazható speciális festékeknek igényelnek.

Munkacsoportunkban korábban is széleskörben kutatott téma volt a sejtfelszíni fehérjék vizsgálata különböző módszerekkel (FRET, SNOM, TEM). Az alkalmazott technikák közül azonban csak az immunogolddal jelölt sejtfelszíni molekulák TEM mérései voltak alkalmasak a pár nanométerestől a pár mikrométeres méretű lehetséges mintázatok jellemzésére.

Azonban a korábban alkalmazott TEM minta-előkészítési eljárás számos hiányosságot mutatott. A legnagyobb jelentőséggel bírók a következők voltak:

- I. A kiértékelés menete nehézkes volt és nem volt elérhető az automatizálása.
- II. A fehérjemintázatot jellemző statisztika (Poisson eloszlással való összehasonlítás) hiányossága, ami csak az esetlegesen jelenlévő klaszterek meglétét tudta igazolni, de annak méretéről és számosságairól nem adott információt.
- III. Az immunogold jelölés a TEM mintahordozóra preparál sejtek minkét oldalát érintette. Mivel a TEM vetületi képet készít, így a felvételeken a sejtek minkét oldalán lévő immunogold gömbök voltak láthatóak, így a kiértékelés során csak a különböző rétegek kontrasztjainak különbözőségével lehetett megkülönböztetni a különböző rétegeket, ami nagyban megnehezíti a kiértékelés menetét.
- IV. Az előzőekben alkalmazott minta-előkészítésben a vizsgált sejtek jelentős része a transzmissziós elektronmikroszkóp számára átláthatatlanok voltak, mivel a minta maximális vastagsága 100 nm az immunsejtek sejtek átlagos 10 μ m-es méretéhez képest. Így a sejtek csak egy vékony körvonaláról kaphatunk információkat, mivel a többit a sejtalkotók leárnyékolják, ami által erősen korlátozott a kapott eredmények statisztikai pontossága.

Az így a felmerülő problémák kiküszöbölésére a következő megoldásokat alkalmaztunk:

- I. Kifejlesztettünk, egy az immunogold jelölők detektálására alkalmas szoftvert, ami képes detektálni, és elmenteni a TEM felvételeken sötét foltként reprezentálódott aranygömbök középpontjainak koordinátáit egy .TXT file-ba, a későbbi kiértékelés számára.
- II. Egy a pontmintázatokat jelentősen részletesebb jellemzését lehetővé tevő függvényeket alkalmaztunk (PCF, PCCF). A PCF függvény a homo-asszociáció

a PCCF függvény a hetero-asszociáció leírását teszi lehetővé a két különböző molekula különböző méretű aranygömbökkel való jelölésével érhető el. A korábbiakhoz képest ezek a függvények nem csak a lehetséges nem véletlenszerű mintázatok jelenlétét képes kimutatni, de az esetlegesen kialakult klaszterek méretéről és számosságáról is információt tud szolgáltatni.

- III. Az új minta-előkészítésnek köszönhetően a sejteknek csak egy lipid kettős rétegen lévő immunogold aranygömbök detektálhatók, így elkerültük a kétoldali jelölés lehetőségét és az abból adódó problémákat.
- IV. Mivel az új eljárással az egész sejtet átláthatóvá tettük a transzmissziós elektronmikroszkóp számára, sokszorosán megnöveltük a vizsgálható terület nagyságát, amivel jelentősen növeltük a mintázat leírásának statisztikai pontosságát.

Munkacsoportunkban előzőleg már immunogold technikával vizsgált felvételeken [51] alkalmaztam az új általunk kifejlesztett szoftvert és a PCF illetve PCCF függvényeket, a sejtfelszínen jelenlévő IL-2 és IL-15 receptorok klasztereinek jellemzéséhez, mivel a korábbi kutatások csak a klaszterek jelenlétét tudta kimutatni.

Az eredményeim szerint az IL-2 receptorok a 10-20 nm-es, 40-50 nm-es és 70-80 nm-es intervallumokban, az IL-15 receptorok pedig a 20-30 nm-es és 50-60 nm-es intervallumban klasztereket alkotnak a kapott PCF értékek szerint. Megvizsgáltam az IL-2 és IL-15 receptorok keresztkorrelációit is a PCCF segítségével, azaz jelen van e valamilyen korreláció a két sejtfelszíni fehérje között. A kapott eredményeim szerint az IL-2 és IL-15 receptorok keresztkorrelációját mutatta 40-80 nm-es, illetve 140-170 nm-es intervallumokban. Eredményeimet összefoglalva, megállapítottam, hogy az IL-2 és IL-15 sejtfelszíni receptorok eloszlása vélhetően nem véletlenszerű, illetve, hogy a két receptor keresztkorrelációt mutat egymással a sejtfelszínen.

Az eredményeim összhangban vannak a korábban kapott eredményekkel, viszont ebben az esetben képes voltam meghatározni a talált klaszterek méreteit és mennyiségeit.

Az új TEM módszer kidolgozása során csatlakoztam a munkacsoportunkban folytatott kutatáshoz, ahol azt vizsgálták, hogy a sejtfelszínen egy addig nem kifejeződő fehérje megjelenése milyen hatással van a hozzá kapcsolódó egyéb sejtfelszíni fehérjék eloszlására. Ezekhez a vizsgálatokhoz a Bare lymphocyte syndrome (BLS) sejt vonalat választottuk (BLS-1), amit egy ritka örökletes immunhiányban szenvedő betegből izoláltak. A BLS sejt vonal genetikai mutációjának eredményeként a HLA II fehérje egyáltalán nem fejeződik ki a sejt felszínen. A HLA II molekulák központi szerepet

töltenek be a CD4⁺ T-sejtek fejlődésében és aktiválásában, ezért a mutáció jelenlétében az immunrendszer súlyosan károsodik. Az érintett gének az RFXANK, RFX5, RFXAP-t és a CIITA-t, amelyek specifikusak és elengedhetetlenek az HLA II gének expressziójához. Az első három az RFX alegységei, egy trimer komplex, amely az összes HLA II promóterhez kötődik. A CIITA egy nem DNS-kötő koaktivátor, amely az HLA II kifejeződésének fő szabályzója. Az RFX és a CIITA tanulmányozása nagyban hozzájárult az HLA II géneket szabályozó molekuláris mechanizmusok megértéséhez, és ezt a rendszert a génexpresszió szabályozásának modelljévé tette [29].

A BLS-1 sejteket DQA1*0102/pCIneo és DQB1*0602/pCIneo vektorokkal transzfektáltuk. A transzfekció hatására az HLA II molekula kifejeződött a sejtfelszínen. Kíváncsiak voltunk, hogy az újonnan megjelent molekula milyen hatással van a többi környező fehérjék sejtfelszíni eloszlására, illetve kíváncsiak voltunk arra is, hogy egy harmadik, kontroll sejtvonalhoz (JY) képest különbségeket tudunk-e kimutatni. Ezért immunogolddal konjugált specifikus antitestekkel jelöltük az HLA I, HLA II molekulákat a BLS, a transzfektált-BLS és a JY sejtvonalakon, kettős jelöléssel. A fentebb részletezett új protokoll alkalmazásával, transzmissziós elektronmikroszkópos mintákat készítettünk. A TEM felvételeket megvizsgálva az különböző molekulák sejtfelszíni mintázatát a PCF és PCCF függvények segítségével analizáltuk, és arra a következtetésre jutottunk, hogy az újonnan kifejeződő (HLA II) DQ molekulák a transzfektált tDQ6-BLS-1 sejtvonalon magas korrelációt mutattak, azaz saját magukkal asszociálva klaszterekben fejeződnek ki, ugyanakkor az HLA I molekulákkal azok klasztereivel nem keveredtek. Ez a viselkedés nem volt megfigyelhető JY sejtvonalon, ahol HLA I klaszterek, HLA II klaszterek illetve HLA I és HLA II molekulákat tartalmazó klaszterek is megfigyelhetők voltak [59]. Ez arra utalhat, hogy a vegyes klaszterek létrejöttéhez hosszabb idő kell, akár heteknek is el kell telni.

A munkacsoportunk előzőleg vizsgálta ezt a biológiai modellrendszert a JY, BLS-1, illetve transzfektált tDQ6-BLS-1 sejtvonalon konfokális mikroszkópiai és áramlási citometriai módszerekkel, Förster féle energiatranszfereket meghatározva a sejtfelszíni HLA I, HLA II molekulákon kívül az ICAM-1 molekulák eloszlását is. Ezek és a TEM vizsgálatok eredményeit egybevetve felállítottunk egy lehetséges modellt ezen fehérjék sejtfelszíni szerveződésére.

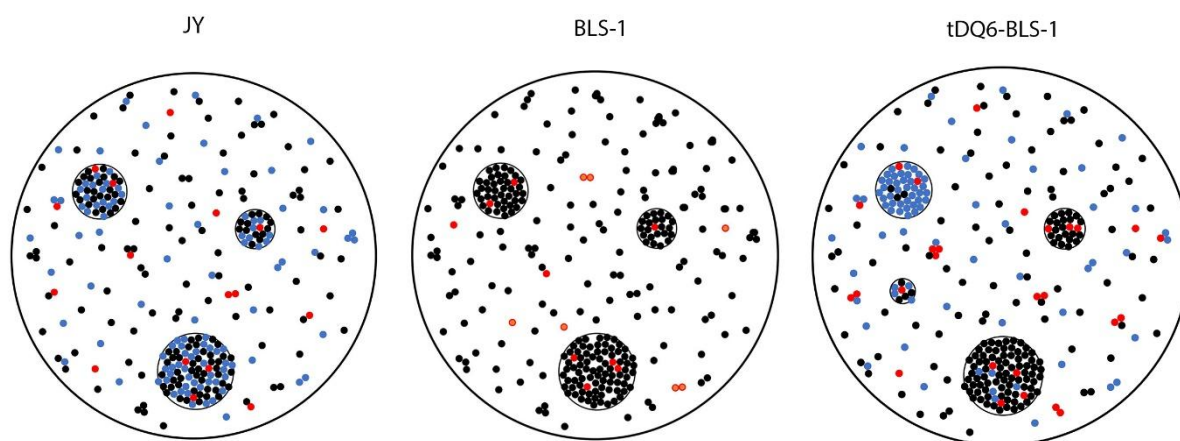
A JY sejtek esetében a HLA I és II osztályú molekulák olyan klasztereket alkotnak, amelyeken belül az ICAM-1 molekulák is megtalálhatók. A FRET mérhető

ezen molekulák között a klasztereken belül és a klasztereken kívül, jelezve a homo- és hetero-asszociáció jelenlétét ezen molekulák között.

A tDQB6-BLS-1 sejtek esetében a HLA I és II osztályú molekulák külön klasztereket alkotnak. A FRET kísérletekből homoasszociáció figyelhető meg a FRET távolságokhoz képest nagyobb nagyságrendbe eső klasztereken belülről és kívülről is, de ugyanez elmondható a hetero-asszociációkra is, tehát a mind a klaszterekben mind a klasztereken kívül is megfigyelhetők a FRET értékek. Valószínűleg hosszabb időbe telik, amíg a független HLA I és II osztályú klaszterek összekeverednek, esetleg hetekig eltarthatnak.

A BLS-1 sejtek csak HLA I osztályú klaszterekkel rendelkeznek, és az ICAM-1 molekulák a klasztereken belül és a klasztereken kívül is megtalálhatók.

A különböző módszerekkel kapott eredményekből egy lehetséges modell 26. ábrán látható.



26. ábra A sejt felszíni fehérjék lehetséges eloszlása JY, BLS-1 és tDQ6-BLS-1 sejteken

A sejt felszíni fehérjék eloszlása FRET és elektronmikroszkópos mérések alapján. A HLA I (fekete pontok), HLA II (kék pontok) és ICAM-1 (piros pontok) sejt felszíni molekulák. (A BLS-1 sejteknek nincs HLA II molekulája a sejt felszínen).

A kapott adatok alapján azt találtuk, hogy ezeknek a molekuláknak az asszociációs mintázata a tDQ6-BLS-1 sejteken eltér a szülő BLS-1 sejtektől, és összehasonlítható volt a JY sejtekével. Bár a FRET vizsgálatok asszociációt mutattak a transzfektált sejt vonalon a különböző molekulák, de nem volt képes a pontosabb jellemzésére. A TEM felvételek segítségével, a fehérjemintázat analízise kimutatta, hogy mind a HLA I és II osztályú molekulák magasabb hierarchikus szinteken alkottak klasztereket a tDQ6-BLS-1 sejteken, hasonlóan a JY sejteken megfigyeltekhez; a JY sejtekkel ellentétben azonban, a *de novo* szintetizált HLA DQ molekulák nem keveredtek a HLA I klaszterekkel. Azaz úgy tűnik, hogy a transzfekció után megjelenő HLA II molekulák klaszterekben jelennek

meg a sejtfelszínen a HLA I molekuláktól függetlenül ellentétben a kontroll JY sejtvonallal képest. A vizsgálatokat közvetlenül a transzfekciót követően végeztem, így felmerült a kérdés, hogy többszörös passzálást követően mutatnak-e változást az eredmények, azaz van-e kimutatható kinetikája a HLA I és HLA II molekulák klasztereinek a lehetséges keveredésének, ami érdekes kérdés lehet a továbbiakban.

7. Összefoglalás

1. Az általam kifejlesztett kiértékelő szoftver segítségével és egy fejlettebb függvény alkalmazásával feltérképeztem az Interleukin-2 (IL-2R α) és az Interleukin-15 (IL-15R α) sejtfelszíni molekulák homo- és hetero-asszociációit KIT 225 FT7.10 sejtvonalon. Immunogold jelölési technikát alkalmazva transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) segítségével vizualizáltam.

Arra a következtetésre jutottam, hogy a sejtfelszínen kifejeződő IL-2R α és IL-15R α mintázatának eloszlása szignifikánsan eltér a véletlenszerűtől, ami vizsgált receptorok homo- és hetero-asszociációira utal. A korábbi eredményeket kiegészítve, az eddig nem vizsgált mérettartományokat is tanulmányozni tudtam, illetve a lehetséges klaszterek méreteit és számosságát is meg tudtam becsülni.

2. Az első kísérleteinkben számos probléma merült fel a TEM minta-előkészítési eljárásban, főként a vizsgálandó terület nagyságának korlátozottsága. Így a mintázat leírása pontatlan volt. Ennek érdekében egy új TEM minta-előkészítési protokollt fejlesztettem ki, amely kiküszöbölte a korábbi hiányosságokat.

Az új eljárás segítségével megvizsgáltam a humán JY sejtvonalon kifejeződő HLA I és II típusú sejtfelszíni fehérjék mintázatát. Vizsgálataim eredményeképpen következtetéseket vonhattam le, hogy a vizsgált receptorok több különböző méretű klaszterekben rendeződve jelennek meg a sejtfelszínen.

3. Az új TEM minta-előkészítési protokollt alkalmazva, bekapcsolódtam a munkacsoportunkban már zajló vizsgálatokba, melynek célja volt, hogy a Bare Lymphocyte Syndrome (BLS-1) és ezen sejtvonal transzfekcióját követően (tDQ6-BLS-1), az addig rajta nem kifejeződő HLA II megjelenése hogyan befolyásolja a korábban is kifejeződő HLA I eloszlását, illetve milyenek az egymáshoz képesti proximitás viszonyai. A mérési eredményeinket összehasonlítottam a JY sejtvonalon kapott eredményekkel, ahol minkét molekula jelen volt. Eredményeim szerint, egyrészt az HLA I és HLA II molekulák hasonló mintázatot mutattak a JY és a tDQ6-BLS-1 sejtvonalakon, ugyanakkor a JY sejteken az HLA I és HLA II klaszterek részben keverednek, addig a tDQ6-BLS-1 sejtvonalon ezek a szegregálódnak. Elképzelhető, hogy a transzfektált tDQ6-BLS-1 sejteken a már meglévő HLA I molekulákat, illetve a *de novo* szintetizáló DQ molekulákat is tartalmazó vegyes klaszterek létrejöttéhez hosszabb idő (akár hetek) szükséges.

8. Summary

1. Using our recently developed evaluation software and a new procedure describing the pattern of cell surface receptors (planar dot pattern), we investigated the hetero-associations between Interleukin-2 (IL-2R α) and Interleukin-15 (IL-15R α) molecules expressed on the cell surface of the KFT7 cell line. The molecules were visualized using transmission electron microscopy (TEM) using the immunogold labeling technique.

After evaluating several TEM images, we concluded that the distribution of the pattern of IL-2R α and IL15R α molecules expressed on the cell surface significantly deviates from the random distribution, which indicates homo- and hetero-associations of the examined receptors.

2. In our first experiments, several problems arose in the TEM sample preparation procedure, mainly the limitation of the size of the area to be examined and thus the inaccuracy of the pattern description. To this end, we developed a new TEM sample preparation protocol that eliminated the previous shortcomings.

Using the new procedure, we examined the pattern of the HLA type I and II cell surface proteins expressed on the human JY cell line. As a result of our study, we could draw conclusions that the examined receptors are displayed on the cell surface in clusters of several different sizes.

3. Using the new TEM sample preparation protocol developed by us, we joined the studies already underway in our working group, the aim of which was to determine the distribution HLA II and HLA I and its proximity relationships on Bare Lymphocyte Syndrome (BLS-1) cells and on its transformed version (tDQ6-BLS-1) cells. We compared our results obtained on BLS-1 cells and tDQ6-BLS-1 cells with that obtained on the JY cell line, where both molecules were present. According to our results, on the one hand, HLA I and HLA II molecules showed a similar association pattern at nanometer scales on both JY and tDQ6-BLS-1 cell lines, but while the HLA I and HLA II clusters are partially mixed at ten or hundred nanometer scale on JY cells on the tDQ6-BLS-1 cell line the HLA I and HLA II clusters were segregated. It is conceivable that the formation of mixed clusters containing both pre-existing HLA I molecules and de novo synthesized DQ molecules (HLA II) on transfected tDQ6-BLS-1 cells requires a longer time (up to weeks).

9. Irodalomjegyzék

1. Junghans, V., A.M. Santos, Y. Lui, S.J. Davis, and P. Jönsson, *Dimensions and Interactions of Large T-Cell Surface Proteins*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2215.
2. Paeon, S.V., T. Tabarin, Y. Yamamoto, Y. Ma, P.R. Nicovich, J.S. Bridgeman, A. Cohnen, C. Benzing, Y. Gao, M.D. Crowther, K. Tungatt, G. Dolton, A.K. Sewell, D.A. Price, O. Acuto, R.G. Parton, J.J. Gooding, J. Rossy, J. Rossjohn, and K. Gaus, *Functional role of T-cell receptor nanoclusters in signal initiation and antigen discrimination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(37): p. E5454-63.
3. Goyette, J., D.J. Nieves, Y. Ma, and K. Gaus, *How does T cell receptor clustering impact on signal transduction?* J Cell Sci, 2019. **132**(4).
4. Taylor, M.J., K. Husain, Z.J. Gartner, S. Mayor, and R.D. Vale, *A DNA-Based T Cell Receptor Reveals a Role for Receptor Clustering in Ligand Discrimination*. Cell, 2017. **169**(1): p. 108-119.e20.
5. Waldmann, T.A., S. Dubois, and Y. Tagaya, *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 105-10.
6. Bodnár, A., E. Nizsalóczki, G. Mocsár, N. Szalóki, T.A. Waldmann, S. Damjanovich, and G. Vámosi, *A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions*. Immunol Lett, 2008. **116**(2): p. 117-25.
7. Wang, X., P. Lupardus, S.L. LaPorte, and K.C. Garcia, *Structural Biology of Shared Cytokine Receptors*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**(Volume 27, 2009): p. 29-60.
8. Stroud, R.M. and J.A. Wells, *Mechanistic Diversity of Cytokine Receptor Signaling Across Cell Membranes*. Science's STKE, 2004. **2004**(231): p. re7-re7.
9. Spangler, J.B., I. Moraga, J.L. Mendoza, and K.C. Garcia, *Insights into Cytokine–Receptor Interactions from Cytokine Engineering*. Annual Review of Immunology, 2015. **33**(Volume 33, 2015): p. 139-167.
10. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(7): p. 480-490.

11. Overwijk, W.W. and K.S. Schluns, *Functions of γ C cytokines in immune homeostasis: Current and potential clinical applications*. Clinical Immunology, 2009. **132**(2): p. 153-165.
12. Yang, Y. and A. Lundqvist, *Immunomodulatory Effects of IL-2 and IL-15; Implications for Cancer Immunotherapy*. Cancers, 2020. **12**(12): p. 3586.
13. Waldmann, T.A., *The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(3): p. 219-27.
14. Cai, M., X. Huang, X. Huang, D. Ju, Y.Z. Zhu, and L. Ye, *Research progress of interleukin-15 in cancer immunotherapy*. Front Pharmacol, 2023. **14**: p. 1184703.
15. Sivori, S., D. Pende, L. Quatrini, G. Pietra, M. Della Chiesa, P. Vacca, N. Tumino, F. Moretta, M.C. Mingari, F. Locatelli, and L. Moretta, *NK cells and ILCs in tumor immunotherapy*. Mol Aspects Med, 2021. **80**: p. 100870.
16. Propper, D.J. and F.R. Balkwill, *Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2022. **19**(4): p. 237-253.
17. Robinette, M.L., J.K. Bando, W. Song, T.K. Ulland, S. Gilfillan, and M. Colonna, *IL-15 sustains IL-7R-independent ILC2 and ILC3 development*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14601.
18. Roediger, B., R. Kyle, S.S. Tay, A.J. Mitchell, H.A. Bolton, T.V. Guy, S.Y. Tan, E. Forbes-Blom, P.L. Tong, Y. Köller, E. Shklovskaya, M. Iwashima, K.D. McCoy, G. Le Gros, B. Fazekas de St Groth, and W. Weninger, *IL-2 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function during pulmonary inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(6): p. 1653-1663.e7.
19. Klose, C.S., K. Blatz, Y. d'Hargues, P.P. Hernandez, M. Kofoed-Nielsen, J.F. Ripka, K. Ebert, S.J. Arnold, A. Diefenbach, E. Palmer, and Y. Tanriver, *The transcription factor T-bet is induced by IL-15 and thymic agonist selection and controls CD8 α (+) intraepithelial lymphocyte development*. Immunity, 2014. **41**(2): p. 230-43.
20. Liao, W., J.X. Lin, and W.J. Leonard, *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 13-25.
21. Cao, X., C.A. Kozak, Y.J. Liu, M. Noguchi, E. O'Connell, and W.J. Leonard, *Characterization of cDNAs encoding the murine interleukin 2 receptor (IL-2R) gamma chain: chromosomal mapping and tissue specificity of IL-2R gamma chain expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8464-8.

22. Gruss, H.J., C. Scott, B.J. Rollins, M.A. Brach, and F. Herrmann, *Human fibroblasts express functional IL-2 receptors formed by the IL-2R alpha- and beta-chain subunits: association of IL-2 binding with secretion of the monocyte chemoattractant protein-1*. J Immunol, 1996. **157**(2): p. 851-7.
23. Sowell, R.T., J.W. Goldufsky, M. Rogozinska, Z. Quiles, Y. Cao, E.F. Castillo, A. Finnegan, and A.L. Marzo, *IL-15 Complexes Induce Migration of Resting Memory CD8 T Cells into Mucosal Tissues*. J Immunol, 2017. **199**(7): p. 2536-2546.
24. Mangalam, A.K., V. Taneja, and C.S. David, *HLA class II molecules influence susceptibility versus protection in inflammatory diseases by determining the cytokine profile*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 513-8.
25. Dendrou, C.A., J. Petersen, J. Rossjohn, and L. Fugger, *HLA variation and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(5): p. 325-339.
26. Jiang, J., K. Natarajan, and D.H. Margulies, *MHC Molecules, T cell Receptors, Natural Killer Cell Receptors, and Viral Immuno-evasins—Key Elements of Adaptive and Innate Immunity*, in *Structural Immunology*, T. Jin and Q. Yin, Editors. 2019, Springer Singapore: Singapore. p. 21-62.
27. Hansen, T.H. and M. Bouvier, *MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 503-13.
28. Waldburger, J.M., K. Masternak, A. Muhlethaler-Mottet, J. Villard, M. Peretti, S. Landmann, and W. Reith, *Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC class II expression*. Immunol Rev, 2000. **178**: p. 148-65.
29. Reith, W. and B. Mach, *The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 331-73.
30. Buchser, W., M. Collins, T. Garyantes, R. Guha, S. Haney, V. Lemmon, Z. Li, and J. Trask, *Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging*. 2023.
31. Schweizer, T., H. Kubach, and T. Koch, *Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems*. Automotive and Engine Technology, 2021. **6**: p. 1-13.
32. Wang, J., M. Yang, L. Yang, Y. Zhang, J. Yuan, Q. Liu, X. Hou, and L. Fu, *A Confocal Endoscope for Cellular Imaging*. Engineering, 2015. **1**: p. 351.

33. Lelek, M., M.T. Gyparaki, G. Beliu, F. Schueder, J. Griffié, S. Manley, R. Jungmann, M. Sauer, M. Lakadamyali, and C. Zimmer, *Single-molecule localization microscopy*. Nature Reviews Methods Primers, 2021. **1**(1): p. 39.
34. Annibale, P., *Investigating the Impact of Single Molecule Fluorescence Dynamics on Photo Activated Localization Microscopy Experiments*. EPFL.
35. Betzig, E., G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess, *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645.
36. Hell, S.W. and J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Opt Lett, 1994. **19**(11): p. 780-2.
37. Klar, T.A. and S.W. Hell, *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy*. Opt Lett, 1999. **24**(14): p. 954-6.
38. Jeong, S., J. Widengren, and J.-C. Lee *Fluorescent Probes for STED Optical Nanoscopy*. Nanomaterials, 2022. **12**, DOI: 10.3390/nano12010021.
39. Tam, J. and D. Merino, *Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods*. Journal of Neurochemistry, 2015. **135**(4): p. 643-658.
40. Perrin, F., *Théorie quantique des transferts d'activation entre molécules de même espèce. Cas des solutions fluorescentes*. Ann. Phys., 1932. **10**(17): p. 283-314.
41. Perrin, F., *La fluorescence des solutions*. Ann. Phys., 1929. **10**(12): p. 169-275.
42. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
43. Forster, T., *Energiewanderung und Fluoreszenz*. Naturwissenschaften, 1946. **33**(6): p. 166-175.
44. Hussain, S.A., *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*. Energy, 2009. **132**.
45. Inkson, B.J., *2 - Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization*, in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, G. Hübschen, et al., Editors. 2016, Woodhead Publishing. p. 17-43.

46. Kormos, J., L. Daróczy, J. Szöllösi, L. Mátyus, and A. Jenei, *Novel Transmission Electron Microscopic Method to Quantify Protein Clustering on the Cell Surface*. Current Protocols, 2024. **4**(5): p. e1045.
47. Egerton, R.F. and M. Watanabe, *Spatial resolution in transmission electron microscopy*. Micron, 2022. **160**: p. 103304.
48. Zaluzec, N.J., *The influence of Cs/Cc correction in analytical imaging and spectroscopy in scanning and transmission electron microscopy*. Ultramicroscopy, 2015. **151**: p. 240-249.
49. ANDERSON, T.F., *TECHNIQUES FOR THE PRESERVATION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE IN PREPARING SPECIMENS FOR THE ELECTRON MICROSCOPE**. Transactions of the New York Academy of Sciences, 1951. **13**(4 Series II): p. 130-134.
50. Gan, Y. and J. Gan, *Advances in Manufacturing Composite Carbon Nanofiber-Based Aerogels*. Journal of Composites Science, 2020. **4**: p. 73.
51. Jenei, A., J. Kormos, G. Szentesi, A.J. Veres, S. Varga, A. Bodnár, S. Damjanovich, and L. Mátyus, *Non-random distribution of interleukin receptors on the cell surface*. Chemphyschem, 2009. **10**(9-10): p. 1577-85.
52. Ripley, B.D., *Statistical inference for spatial processes*. 1988: Cambridge university press.
53. Ripley, B.D., *Spatial statistics*. 2005: John Wiley & Sons.
54. Pastorek, L., M. Sobol, and P. Hozák, *Colocalization coefficients evaluating the distribution of molecular targets in microscopy methods based on pointed patterns*. Histochem Cell Biol, 2016. **146**(4): p. 391-406.
55. Philimonenko, A.A., J. Janáček, and P. Hozák, *Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments*. J Struct Biol, 2000. **132**(3): p. 201-10.
56. Jenei, A., S. Varga, L. Bene, L. Mátyus, A. Bodnár, Z. Bacsó, C. Pieri, R. Gáspár, T. Farkas, and S. Damjanovich, *HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(14): p. 7269-7274.
57. Vámosi, G., A. Bodnár, G. Vereb, A. Jenei, C.K. Goldman, J. Langowski, K. Tóth, L. Mátyus, J. Szöllösi, T.A. Waldmann, and S. Damjanovich, *IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11082-7.

58. Vereb, G., J. Matkó, G. Vámosi, S.M. Ibrahim, E. Magyar, S. Varga, J. Szöllősi, A. Jenei, R. Gáspár, T.A. Waldmann, and S. Damjanovich, *Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(11): p. 6013-6018.
59. Kormos, J., A.J. Veres, L. Imre, L. Mátyus, S. Benkő, J. Szöllősi, and A. Jenei, *HLA DQ protein changes the cell surface distribution pattern of HLA proteins as monitored by Förster resonance energy transfer and high-resolution electron microscopy*. Cytometry Part A, 2023. **103**(12): p. 978-991.
60. Panyi, G., M. Bagdány, A. Bodnár, G. Vámosi, G. Szentesi, A. Jenei, L. Mátyus, S. Varga, T.A. Waldmann, R. Gáspár, and S. Damjanovich, *Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(5): p. 2592-2597.

10. Tárgyszavak

Tárgyszavak:

Sejtfelszíni fehérjemintázat
Immunogold jelölés
Transzmissziós elektronmikroszkópia
Párkorrelációs függvény
Párkeresztkorrelációs függvény
Interleukin-2 Interleukin-15
Csupasz limfocita szindróma

Keywords:

Cell surface protein pattern
Immunogold labeling
Transmission electron microscopy
Pair correlation function
Partial cross-correlation function
Interleukin-2 Interleukin-15
Bare Lymphocyte Syndrome

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Jenei Attilának, hogy témavezetőként, mint személyes, mint gyakorlati és elméleti tanácsaival és segítségével folyamatosan támogatta és segítette munkámat, valamint doktori értekezésem elkészítését.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet korábbi illetve jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak és Prof. Dr. Panyi Györgynek, hogy lehetőséget adott arra, hogy az intézetben dolgozhattam.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, a publikációk és a doktori értekezésem elkészítésében nyújtott segítségért.

Köszönet illeti Dr. Daróczi Lajost a nélkülözhetetlen szakmai támogatásért, kifejezetten a munkám technikai részletekében nyújtott hatalmas segítségért.

Köszönettel tartozom az Szilárdtest Fizika Tanszéknek, hogy lehetőséget biztosítottak a transzmissziós elektronmikroszkópos méréseim elvégzéséhez.

Természetesen hálával tartozom családomnak és barátaimnak a szeretetért, támogatásért, amit munkám során kaptam.

12. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/578/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kormos József
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kormos, J.**, Daróczy, L., Szöllősi, J., Mátyus, L., Jenei, A.: Novel transmission electron microscopic method to quantify protein clustering on the cell surface.
Curr. Protoc. 4 (5), 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cpz1.1045>
IF: 2.2
2. **Kormos, J.**, Veres, A. J., Imre, L., Mátyus, L., Benkő, S., Szöllősi, J., Jenei, A.: HLA DQ protein changes the cell surface distribution pattern of HLA proteins as monitored by Förster resonance energy transfer and high-resolution electron microscopy.
Cytom. Part A. 103 (12), 978-991, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.24787>
IF: 2.5
3. Jenei, A., **Kormos, J.**, Szentesi, G., Veres, A. J., Varga, S., Dóczy-Bodnár, A., Damjanovich, S., Mátyus, L.: Non-Random Distribution of Interleukin Receptors on the Cell Surface.
Chemphyschem. 10 (9-10), 1577-1585, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200900242>
IF: 3.453

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,153

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,153

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.11.07.

