

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

IL-2 és -15 receptorok kölcsönhatásainak vizsgálata humán T limfóma sejteken

Mocsár Gábor

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezésben gyakran előforduló rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Membránmodellek, membránfehérjék laterális organizációja	6
2.2 Interleukin-2 és -15 receptorok	12
2.3 Az I. és II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekulák.....	14
2.4 c-Jun és c-Fos transzkripció faktorok	16
2.5 Förster rezonancia energiatranszfer (FRET)	18
2.6 Szuperfeloldású STED mikroszkópia	20
2.7 Fehérjeklaszterek vizsgálata fluoreszcenciás képelemzési módszerekkel	21
2.8 Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)	23
2.9 Fluoreszcencia Keresztkorrelációs Spektroszkópia (FCCS).....	26
2.10 A multiple- τ algoritmus.....	28
2.11 FPGA - programozható logikai kapumátrix	30
3. Célkitűzések	31
4. Metodikák.....	32
4.1 Sejtenyésztés, antitestek fluoreszcens jelölése, immunfluoreszcens jelölés	32
4.2 Géncsendesítés RNS interferenciával	33
4.3 Plazmidok, plazmidok transzfekciója	33
4.4 Konfokális mikroszkópia, FRET mérése konfokális mikroszkóppal	34
4.5 Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiai mérések.....	36
4.6 Mérések szuperfeloldású (STED) mikroszkóppal	38
4.7 Digitális képfeldolgozás	39
4.7.1 Fehérjeklaszterek méretének meghatározása STED képekből.....	39
4.7.2 Pearson-féle kolokalizáció meghatározása konfokális és STED képekből.....	40
4.7.3 Molekuláris frakciók kiszámolása.....	41
5.4.9 Statisztikai elemzés	42
5. Eredmények	43
5.1 MHC I géncsendesítés hatásának a vizsgálata az IL-2/15 citokin receptorokra	43
5.1.1 Korrelációs mérések optimalizálása, alkalmazása	43
5.1.2 IL-2/15R α alegységek és MHC I glikoproteinek sejtfelszíni részecskeszámai	46

5.1.3	IL-2/15R α alegységek és MHC I aggregációs állapotának becslése a molekuláris fényességek analízisével	49
5.1.4	IL-2R α , IL-15R α alegységek és MHC I mobilitásának változása MHC I géncsendesítés hatására.....	53
5.1.5	Sejtfelszíni fehérjemintázatok vizsgálata szuperfeloldású mikroszkóppal	57
5.1.6	Fehérjeklaszterek méretének a meghatározása FWHM mérésével	59
5.1.7	Fehérjeklaszterek méretének meghatározása térbeli autokorrelációs függvénnyel	60
5.1.8	Fehérjeklaszterek méretének meghatározása képszegmentációs módszerrel	61
5.1.9	Fehérjeklaszterek méret szerinti betöltöttségének a vizsgálata	62
5.1.10	Molekulafrakciók meghatározása.....	63
5.1.11	Párkölsönhatások jellemzése Pearson-korrelációs koefficienssel	64
5.1.12	Asszociált hányadok és Pearson-féle korrelációs koefficiensek meghatározása	66
5.1.13	MHC I, IL-2/15R α alegységek lipid tutajokban való lokalizációja	68
5.1.14	IL-2R β - IL-2R α kölcsönhatás vizsgálata akceptor fotoelhaványításos FRET méréssel	70
5.2	Az AP-1 komplex vizsgálata	71
5.2.1	c-Fos és c-Jun heterodimerizációjának vizsgálata FRET segítségével	71
5.2.2	c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok DNS-kötődésének vizsgálata FCCS-el	73
5.3	FPGA korrelátor validálása	75
6.	Megbeszélés	77
6.1	MHC I géncsendesítés hatásának a vizsgálata az IL-2/15 citokin receptorokra	77
6.2	Az AP-1 komplex vizsgálata	81
6.3	FPGA korrelátor validálása	82
7.	Összefoglalás.....	84
8.	Summary	85
9.	Irodalomjegyzék.....	86
9.1	Hivatkozott közlemények jegyzéke	86
9.2	Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények.....	96
10.	Tárgyszavak	98
11.	Keywords	98
12.	Köszönetnyilvánítás	99
13.	Függelék.....	100

Az értekezésben gyakran előforduló rövidítések jegyzéke (angol - magyar)

β 2m	β 2 microglobulin, β 2 mikroglobulin
DRM	detergent resistant membrane fraction, detergens-rezisztens membrán frakció
EGFP	enhanced green fluorescent protein, fokozott kifejeződésű zöld fluoreszcens fehérje
FCCS	fluorescence cross-correlation spectroscopy, fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia
FCS	fluorescence correlation spectroscopy, fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia
FPGA	field-programmable gate array, programozható logikai kapumátrix
FRET	Förster resonance energy transfer, Förster típusú rezonancia energiatranszfer
FWHM	full width at half maximum, félértékszélesség
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, Hank kiegyensúlyozott sóoldat
IL-15R	interleukin 15 receptor, interleukin-15 receptor
IL-2R	interleukin 2 receptor, interleukin-2 receptor
JAK	Janus kinase, Janus arcú kináz
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogén aktiválta protein kináz
MHC I	major histocompatibility complex I, I. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekula
MHC II	major histocompatibility complex II, II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekula
mRFP	monomeric red fluorescent protein, monomer-piros fluoreszcens fehérje
PSF	point spread function, fényességeloszlási függvény
STAT	signal transducer and activator of transcription, jelátviteli és transzkripciót aktiváló fehérje
STED	stimulated emission depletion, stimulált emisszió depléción

1. Bevezetés

A membránfehérjék laterális organizációjának heterogenitására, ennek a jelátvitelben játszott szabályozó szerepére számos tanulmány mutatott rá. A nem-véletlenszerű membrántopológia kialakítása több intra/extracelluláris vagy membránban ható kölcsönhatás együttes következménye. Az így kialakult struktúrák életideje és nagysága változatos értékeket mutat. Dolgozatom fő témája speciális összetételű membránkompartimentben feldúsuló, egymással szoros közelségben levő membránfehérjék dinamikájának vizsgálata.

Bemutatom az MHC I molekulák szabályozó szerepét az IL-2/15 citokin receptorok és MHC I molekulák klaszterizációjában és mobilitásában humán T sejtvonalon. Kísérleteinket modern biofizikai mérőmódszerek segítségével végeztük, a molekuláris kölcsönhatások változásának kimutatásához fehérjemobilitásokat és klaszterméreteket határoztunk meg. Az MHC I expressziós szintjét ezekben a kísérletekben siRNS-sel szabályoztuk.

A bemutatott adatok rávilágítanak arra, hogy a membránfehérjék klaszterizációjának és mobilitásának modellezésénél a közvetlen molekuláris környezet szerepét figyelembe kell venni. Eredményeink igazolják, hogy az MHC I géncsendesítése hatással lehet funkcionálisan össze nem illőnek gondolt receptorok membránbeli dinamikájára is.

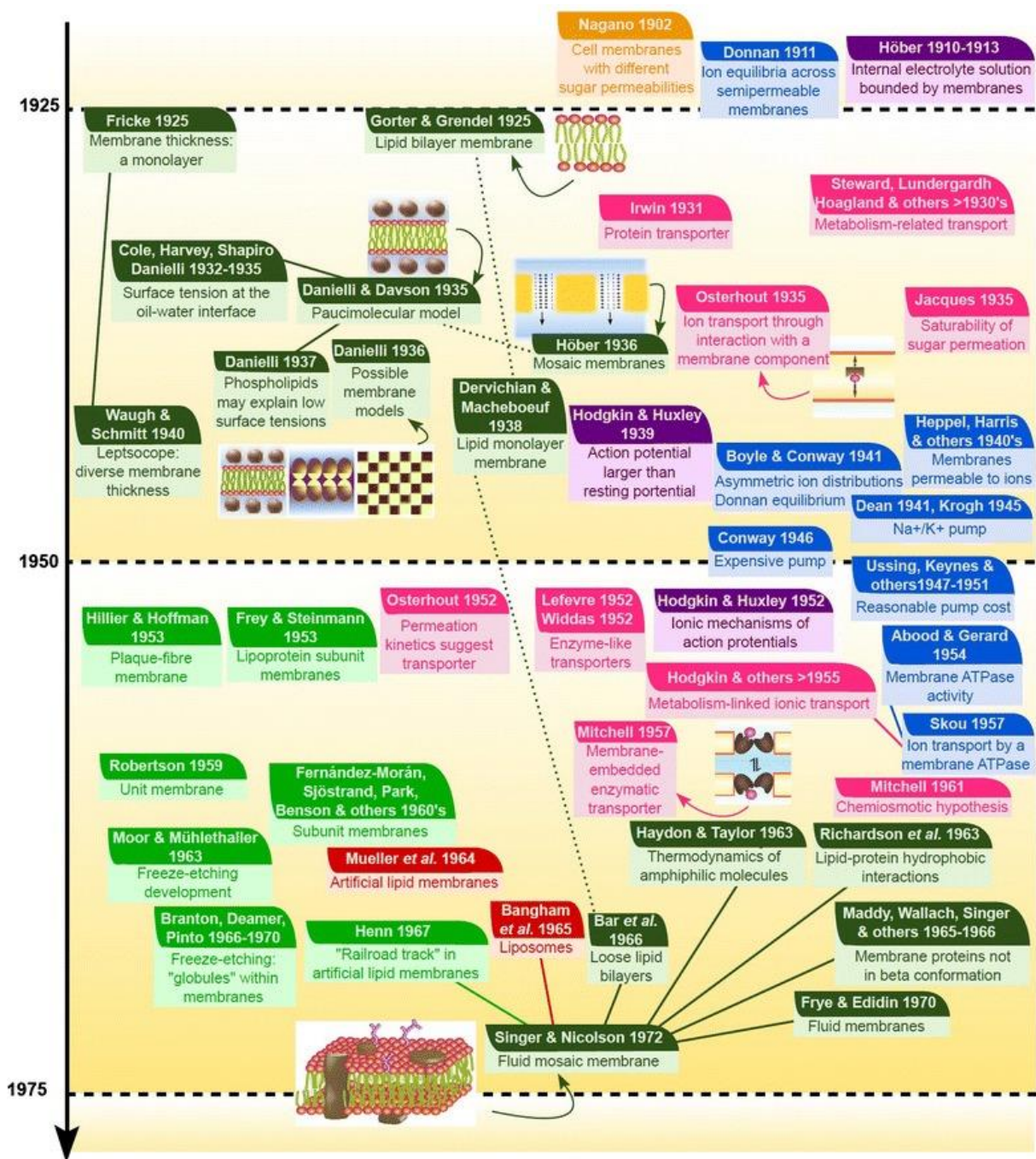
A transzmembrán jelátviteli folyamatok, így az IL-2 és IL-15 működésének végpontja gyakran a géntranszkripció szabályozása. Dolgozatom további részében a c-Jun és a c-Fos heterodimer transzkripciós faktorok konformációját és dinamikus sajátosságait fogom bemutatni. Munkámban méhnyakrák sejtvonalon vizsgáltam a c-Jun és a c-Fos dimerizációját, mobilitását, és a dimer konformációját FRET és FCCS segítségével.

Dolgozatom utolsó részében egy újraprogramozható mérőeszköz biofizikai mérésekben való lehetséges alkalmazását mutatom be. Az eszköz segítségével meghatározható a molekulakomplexekben levő fehérjék asszociált hányada és mobilitása, lehetővé téve pontosabb biofizikai modellek felállítását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Membránmodellek, membránfehérjék laterális organizációja

A sejtek membránjának fő feladata a sejt saját folyamatainak elválasztása a külső környezettől, illetve az azzal való szabályozott anyagtranszport és kommunikáció fenntartása. A sejtet a környezetétől elválasztó hártya felfedezése a 18 században, a fénymikroszkóp kifejlesztése és növényi sejtek vizsgálata közben történt. A legkorábbi vizsgálatokban vörösvértestek ozmotikus tulajdonságait tanulmányozták. A vörösvértestek alakját a vizes közeg befolyásolni tudta, kimutatták ozmotikus duzzadásukat és zsugorodásukat is. Későbbi vizsgálatok kimutatták az ionok szelektív átjárhatóságát a membrán extra- és intracelluláris oldala között. Megfigyelték, hogy a sejtek vizes közegben gömb alakot vesznek fel, és - ismerve az olajok és zsírok hasonló viselkedését - úgy gondolták, hogy a sejtmembrán is folyékony állapotú zsírokból állhat. Ezen elképzelés szerint a sejtmembránon minden olyan molekula képes átjutni, amely zsírokból oldódik. A sejtmembrán vastagságának becslésére elsőként Franklin, később Lord Rayleigh kísérletei szolgáltatottak adatokat. Rayleigh megfigyelte, hogy 0,81 mg olívaolaj a vízfürdő felszínén 84 cm átmérőjű kör területén terül szét. Az olaj sűrűségére 0,9 g/mL értéket feltételezve az olívaolaj monolayer vastagságára 16,3 Å értéket kapott, ezen távolság volt az első kísérletes becslése egy monolayer vastagságának. A korai membránmodellek főként a membránok szelektív átjárhatóságának magyarázatát tűzték ki célul, majd a lipid kettősréteg felfedezése után fokozatosan fejlődtek ki összetettebb elméletek is, lásd 1. ábra [1]. A 30-as évektől kezdve évtizedekig Davson és Danielli [2] elképzelése volt az uralkodó elmélet, mely szerint a sejtmembránt mindkét oldalán befedik a fehérjék, melyeket a membránon elmozdulni képtelen alkotóként gondoltak el.

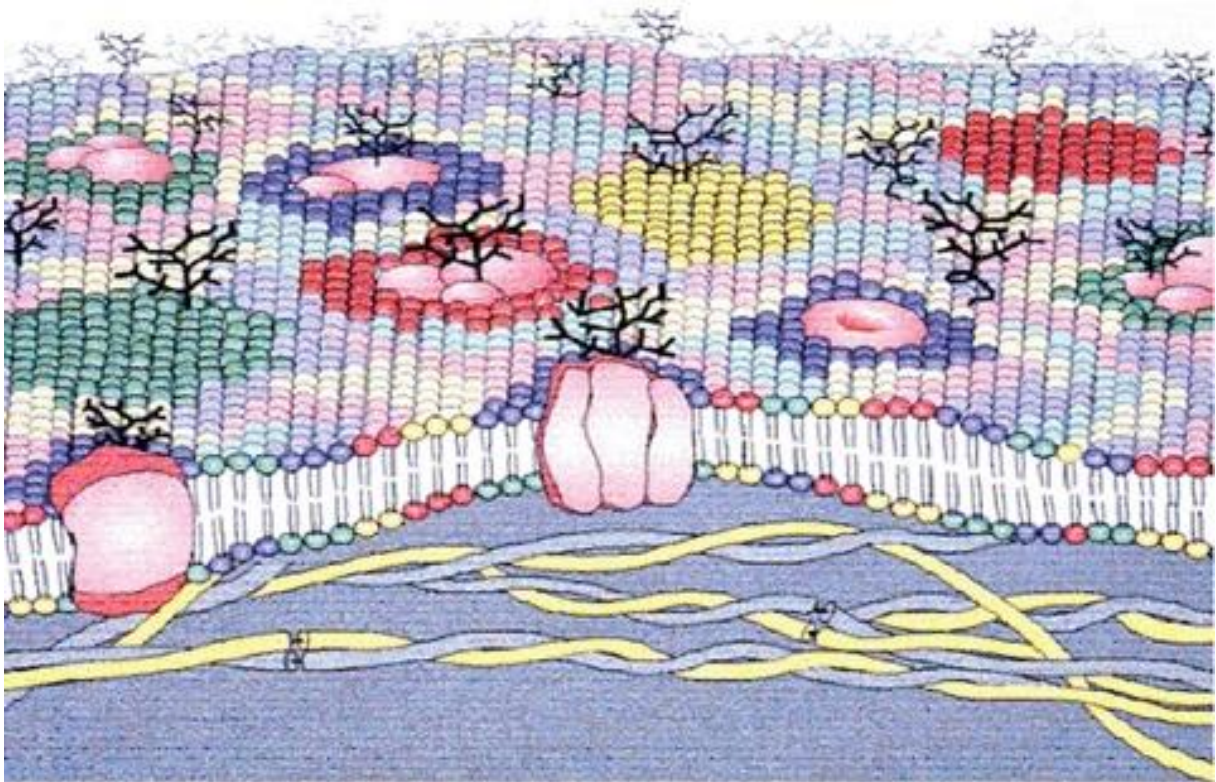


1. ábra: membránmodellek fejlődése 1925-1972 között [1]

Az ábrán a fontosabb felfedezések és elképzelések idővonala látható a megnevezett időszakban. Narancsszínben az ozmotikus tanulmányok láthatóak; piros: mesterséges membránokkal kapcsolatos felfedezések; lila: elektrofiziológia; sötétzöld: főbb membránmodellek; rózsaszín: membrántranszport elméletek; világoskék: ion-eloszlás vizsgálata; világoszöld: elektronmikroszkópos vizsgálatok.

A technológiai fejlődés révén egyre több fehérjéről bizonyosodott be, hogy a membránban jelentős rotációs és laterális elmozdulásra képesek, így az 1972-ben posztulált,

Singer-ről és Nicolson-ról elnevezett „folyékony mozaik” membránmodell (SN modell) vált elfogadottá [3, 4]. A modell sematikus rajza az 2. ábrán látható [5].

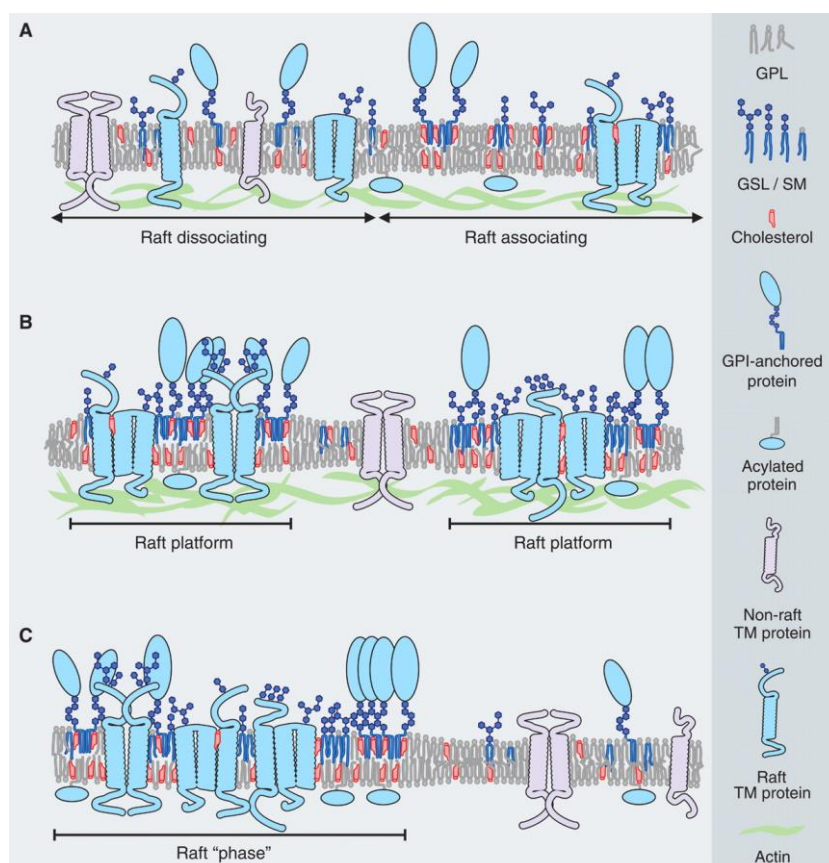


2. ábra: A Singer és Nicolson által leírt membránmodell [5]

Az ábrán a lipid kettősréteg és az aszimmetrikus/mozaikos lipid és fehérjeeloszlás sematikus ábrázolása látható.

A modell szerint a lipid kettősrétegben a hidrofíl feji csoportok a vizes fázis felé, az intracelluláris és extracelluláris tér felé fordulnak, a zsírsavláncok pedig egymás felé orientálódnak. A modell szerint a membránfehérjéket két csoportba osztályozhatjuk, integráns és perifériás osztályokba. Az integráns membránfehérjék hidrofíl részei az extra- és intracelluláris térben helyezkednek el, s hathatnak kölcsön a nekik megfelelő molekulákkal. Hidrofób részük a lipid kettősréteg síkjában helyezkedik el. Ezen típusú membránfehérjék csak a membránszerkezetet károsító kémiai módszerekkel távolíthatók el a membránból. A perifériás membránfehérjék a membrán hidrofíl részeihez kötődnek, de nem alkotnak összefüggő réteget, s a membránszerkezet megbontása nélkül is eltávolíthatók. A modell szerint a lipidek és fehérjék a membránban mozaikos elrendezést mutathatnak, a lipid kettősrétegben szabadon mozoghatnak.

Az utóbbi évtizedekben számos megfigyelés mutatott rá, hogy a SN modellt szükséges kiegészíteni [6]. 1997-ben Simons és Ikonen enyhe detergens kezelésnek ellenálló, ún. detergens-rezisztens membrán frakciókat talált (DRM) [7]. Ez alapján terjedt el az ún. lipid tutaj hipotézis. A lipid tutajok speciális összetételű membrándomének, főként koleszterinből, szfingomielinből, glikoszfingolipidekből (GSL) és GPI-horgonyzott fehérjékből felépülő dinamikus struktúrák [8, 9], lásd alább 3. ábra.



3. ábra: Lipid tutajok hierarchikus szerveződése [10]

A lipid tutajok dinamikusan szerveződött struktúrák, tipikusan koleszterinből, szfingomielinből, glikoszfingolipidekből és GPI- horgonyzott fehérjékből állnak. Méretüket és dinamikájukat változatos eloszlás jellemzi, a molekuláris nagyságtól a membrán mikrodomén szintig. [10]

Az azóta eltelt évtizedekben több olyan membránbeli komponenst azonosítottak, melyek a detergens-rezisztens doménekben találhatóak, vagy azokban feldúsulnak. Több jelátvitelben résztvevő molekula/receptor esetében feltárták a lipid tutajok jelátvitelt moduláló vagy éppen szegregáló szerepét [11-16], így a lipid tutajok mind strukturális, mind funkcionális fehérjeplatformként jellemezhetőek [6, 10]. Nagyságuk változatos eloszlást mutat (10-500 nm).

Az irodalomban a lipid tutajok létezéséről, méretéről és életidejéről számos egymásnak részben ellentmondó közlemény található [9, 17, 18], így valószínűsíthető, hogy a modern biofizikai mérőmódszerek fejlődésével a modellt tovább pontosítják [19-22].

A membránfehérjék szabad elmozdulását nemcsak a viszkozus környezet gátolhatja. Kusumi és munkatársai megfigyelték, hogy a 40 nm átmérőjű aranygömbökkel megjelölt E-cadherin receptor trajektóriái egy időre kisebb térrészekbe korlátozódtak [23, 24]. Az azóta eltelt években más membránalkotókról, pl. foszfolipidekről is bebizonyosodott, hogy diffúziójuk korlátozott; a trajektóriák szemléltetése a 4. ábrán látható [25].

25- μ s resolution (62-ms observation; 2,500 points)



4. ábra: Foszfolipidek korlátozott diffúziója

A foszfolipidek korlátozott trajektóriáinak demonstrálása. Az analízis szerint a kompartmenteken belül (azonos szín) a lipidek szabadon mozoghattak, majd gyors átmenettel átléptek egy szomszédos doménbe. Az ábrán a doménekben való tartózkodási idő is fel van tüntetve [25].

A képszekvenciák analízise kimutatta az említett receptor és a lipidek citoszkeleton által gátolt diffúzióját. Ezen kísérletek hozzájárultak a „fences and pickets” (kerítések és karók) membránmodell kidolgozáshoz [26], melyben a kerítést az aktin membrán-szkeleton, a karók szerepét pedig az aktint kihorgonyozó transzmembrán fehérjék alkotják. A későbbi vizsgálatok számos más membránfehérjéről több módszerrel kimutatták a citoszkeletonhoz való asszociációt, illetve annak modulációs szerepét [27].

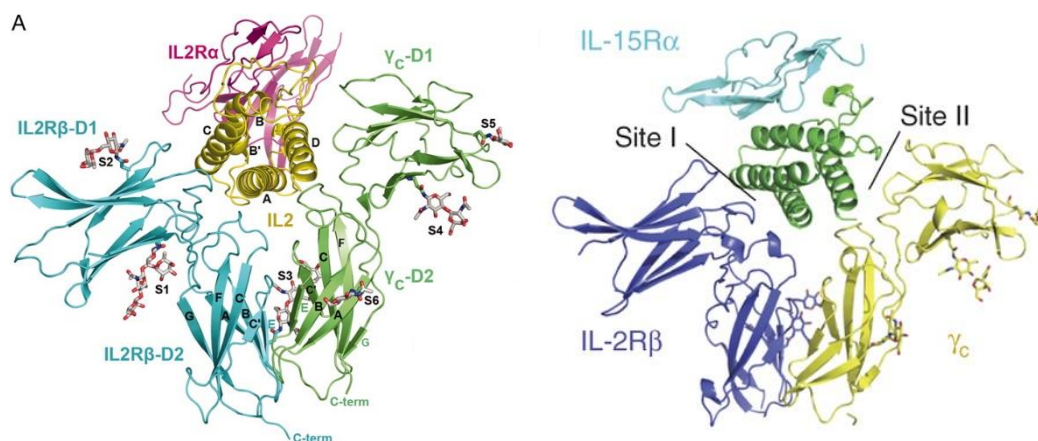
Összegezve az eddig leírtakat, az inhomogén sejtfelszíni fehérjeeloszlások több, alább felsorolt tényező együttes hatásával magyarázhatóak [6, 28-30]:

1. Membránban működő erők: lipid domén struktúra, viszkózus membránrégiók, fehérje-fehérje kölcsönhatások
2. Intracellulárisan ható tényezők: a citoszkeleton direkt vagy indirekt módon gátló hatása, vezikuláris transzport folyamatok általi akkumuláció, jelátviteli folyamatok által indukált klaszterizáció
3. Extracellulárisan ható tényezők: elektrosztatikus erők, keresztkötő ligandumok valamint az extracelluláris mátrix
4. Egyéb tényezők: pl. a membránpotenciál megváltozása, különféle perturbáló tényezők, amelyek akár a fehérjék konformációjának megváltoztatásán, akár az előző pontokban felsorolt tényezők módosításán keresztül fejthetik ki hatásukat.

A felsorolt tényezők nem egymástól függetlenül, hanem egymás hatását kiegészítve működnek, jelenlétük szükséges a fehérjék mobilitásának, eloszlásának, aggregációs állapotának szabályozásában.

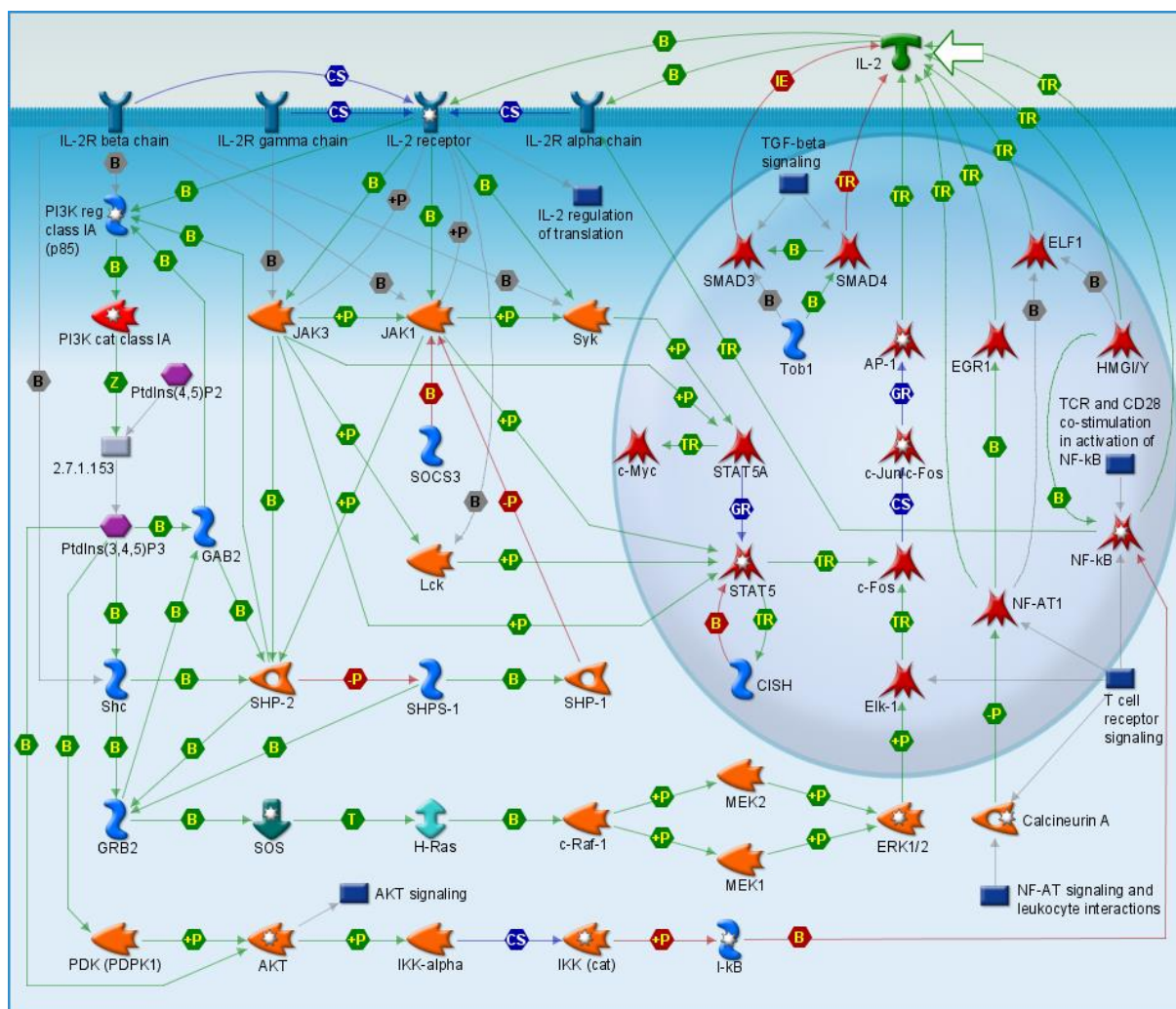
2.2. Interleukin-2 és -15 receptorok

IL-2 és IL-15 citokineknek fontos szerepük van az immunsejtek aktivációjában, túlélésében és sejthalálában [31, 32]. Receptor alegységeik, illetve az ezekből létrejövő különféle komplexek más-más affinitással képesek a citokinek megkötésére [31]. Receptoraik három alegységből állnak, melyekből kettőt, a β és γ_c alegységet a két citokin megosztva használ, de az α alegységek citokin specifikusak [33-36]. A receptor trimerek kristálystruktúrája az 5. ábrán látható [35, 37].



5. ábra: Az IL-2 és IL-15 citokinreceptorok kristályszerkezete [35, 37]

Az IL-15R α alegysége monomerként is képes az IL-15 citokin nagy affinitású kötésére ($K_d \sim 10^{-11}$ M) [38, 39], viszont az IL-2 csak alacsony affinitással ($K_d \sim 10^{-8}$ M) képes az IL-2R α -hoz kötődni. A citokinek a β és γ_c által alkotott heterodimerhez közepes ($K_d \sim 10^{-9}$ M), a trimerhez nagy affinitással ($K_d \sim 10^{-11}$ M) kötődhetnek [31]. A sejtmembránban a receptorok ligandjuk nélkül is összeszerelt formában találhatók [40], és lipid tutajokban dúsulnak fel. A két citokin receptor kolokalizálódik, és konformációjukra a kétféle α alegységet, valamint a közös β és γ_c alegységet magába foglaló heterotetramer szerkezet valószínűsíthető [41-43]. A β és γ_c alegységek több jelátviteli útvonalat indíthatnak el, pl. a JAK/STAT [32, 44-46], a PI3K/AKT (foszfatidilinozitol 3-kináz/protein kináz B) útvonalakat, illetve a RAS/MAPK (Ras fehérjecsald/mitogén-aktivált protein kináz) kaszkádot [47-49]. Az IL-2 receptorok által elindított jelút vonalakat a 6. ábrán tüntettem fel.



6. ábra: Az IL-2 citokin által elindított jelátviteli folyamatok

Forrás: <https://lsresearch.thomsonreuters.com>

A β alegységek a JAK1, míg a γ_c alegységek JAK3 kinázokkal képeznek komplexet. A ligandkötés után a receptor alegységek tirozin-foszforilációját követően a kinázok is foszforilálódnak, majd ezen specifikus komplexekhez kötődnek a fő jelátviteli molekulák: az Shc, a STAT3, valamint a STAT5a és b transzkripciós faktorok. Kötődésük után foszforilálódnak és dimerizálódnak, majd a sejtmagba transzlokálódva szabályozzák célgénjeik működését. Az IL-2 kötődését követően a receptor trimer gyorsan internalizálódik, a β és γ_c alegységek degradálódnak, viszont az α alegységek újra recirkulálódnak a sejtfelszínre. A receptor csak rövid ideig képes a jelátvitelben részt venni, így az immunválasz hatékonyságát az elérhető sejtfelszíni receptorok száma is szabályozza. A γ_c alegység további interleukin receptoroknak is alkotóeleme: IL-4 [50], IL-7 [51], IL-9 [52], IL-21 [53]).

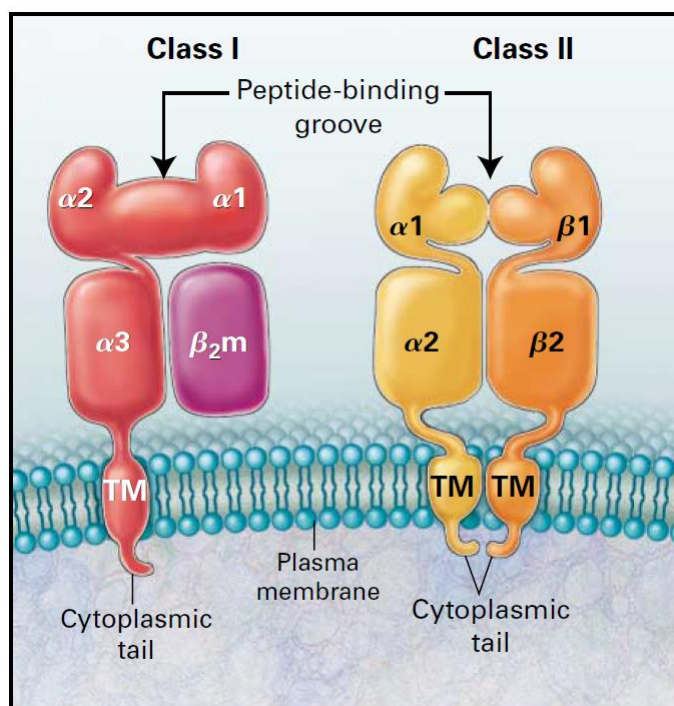
A közös jelátvivő láncoknak köszönhetően az IL-2 és IL-15 receptorok részben hasonló funkciókkal rendelkeznek, pl. segítik a $CD4^+$ T limfociták proliferációját, a $CD8^+$ effektor sejtek aktivációját, a T és NK sejtek citotoxicitását [31, 54]. Emellett ellentétes funkcióik is

vannak: az IL-15 elősegíti a CD8⁺ memória T sejtek túlélését, míg az IL-2 általi aktiváció a CD8⁺ sejtek ún. aktiváció indukálta sejthalálához járul hozzá [54, 55].

Az immunfolyamatoktól független betegség, a krónikus skizofrénia esetén a γc alegységek magasabb expressziós szintjét figyelték meg [56]. Más kutatási eredmények szerint a betegség rizikója inkább a társadalmi egyenlőtlenségekkel hozható összefüggésbe [57]. Az expressziós szintre vonatkozó megfigyelés jól példázza az immunfolyamatok kapcsoltságát más össze nem illőnek gondolható betegségekkel.

2.3. Az I. és II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekulák

Az immunfolyamatokban, legfőképpen az antigén prezentációban kulcsszerepet játszó glikoproteineknek, fő hisztokompatibilitási komplexnek két típusát, az első és második osztályú MHC glikoproteineket (MHC I és MHC II) különböztetjük meg [58]. Az MHC I glikoprotein heterodimer egy transzmembrán nehézláncból és egy perifériás könnyűláncból áll [59]. Az MHC I transzmembrán nehézlánc extracelluláris részének három doménje van: az antigén-peptid kötésért felelős α_1 és α_2 domén, illetve a könnyűlánchoz (β_2m) kapcsolódó α_3 domén. Az MHC II molekulák két hasonló méretű transzmembrán láncból állnak. Az antigén-peptid kötőhelyet az α_1 és β_1 domének alkotják, melyek az α_2 és β_2 doméneken keresztül kapcsolódnak a transzmembrán régiókhoz, lásd 7. ábra [60].



7. ábra: MHC I és II molekulák sematikus szerkezete [60]

A legtöbb, sejtmaggal rendelkező sejt felszínén kimutatták az MHC I jelenlétét. Az MHC II molekulák expressziója több sejttípuson indukálható, de normál körülmények között csak professzionális antigénprezentáló sejteken: B sejteken, makrofágokon és dendritikus sejteken található meg [61]. Klasszikus funkciójuk szerint az MHC I molekulák az általuk felismert endogén eredetű (pl. tumorantigének, vírusfehérjék) peptideket prezentálják a T sejt receptornak [62, 63]. A folyamat során az endocitózissal a sejtbe kerülő fehérjét a sejt a proteaszómában peptidekké bontja, majd az endoplazmás retikulumban az újonnan szintetizálódott MHC I könnyű és nehézláncokkal komplexet képező peptidet a sejt felszínén prezentálja. Az antigénprezentáló sejt peptid - MHC I komplexéhez a CD8⁺ T limfocita a T sejt receptor segítségével kapcsolódik, majd aktiválódik és szelektív immunválasz, citotoxikus funkció végrehajtására lesz alkalmas. Az MHC II molekulák exogén fehérjét prezentálnak a CD4⁺ T sejteknek. Az aktivált CD4⁺ sejtek funkciója a többi immunsejt (B sejtek, makrofágok, CD8⁺ T sejtek) folyamatainak, így az immunválasz szabályozása, elsősorban citokinek szekréciója révén.

A plazmamembránban az MHC I molekulák oligomereket képeznek [64], és lipid tutajokban dúsulnak fel [41, 42, 65-68]. Az MHC I glikoproteineknek többféle sejttípusban számos interakciós partnerét sikerült feltérképezni: az EGF receptort [69], a transzferin receptort [70], az interleukin-2/15 receptor alegységeit (IL-2R α : [71], IL-2R β és IL-2R γ : [72], IL-15R α : [42]), az inzulin receptort [73-75], a tetraspan molekulákat (CD53, CD81, CD82) [76, 77], az intracelluláris sejtadhéziós molekulákat (ICAM 1) [71]. Az MHC I glikoproteineknek más, az antigénprezentációtól független jelátviteli útvonalakra kifejtett moduláló szerepét is kimutatták: befolyásolni tudja az inzulin receptor jelátvitelét [74, 78]; az MHC I molekulák ligálása apoptózis indukciójához is hozzájárulhat [79, 80].

Az első kísérletes eredmények az MHC I és az IL-2 receptorok molekuláris közelségéről Förster rezonancia energiatranszfer méréseken alapultak. A kísérleteket előbb T sejt vonalon [81] majd perifériális T sejteken [82] is elvégezték. Fluoreszcencia visszatérési görbék analízisével (FRAP mérésekkel) kimutatták, hogy az IL-2R α mobilitása csökken az MHC I-ellenes antitesttel történő jelölés hatására, ami tovább valószínűsítette közvetlen molekuláris közelségüket [83]. Transzmissziós elektronmikroszkóppal készült képek segítségével T limfoma sejteken kimutatták az immunogold jelöléssel ellátott IL-2R α és MHC I közös klaszterezettségét [41].

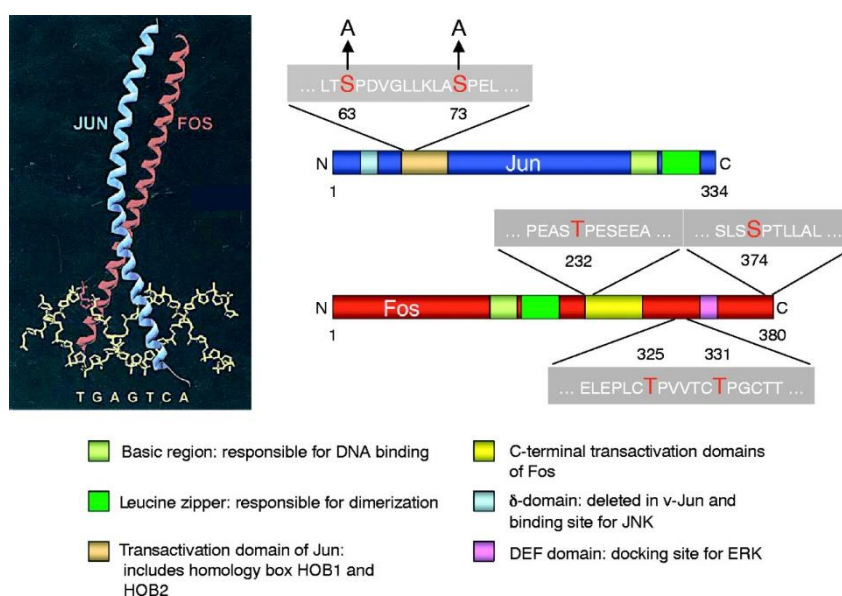
Genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az MHC gének polimorfizmusa szoros kapcsolatban van több betegség kialakulásával [84], például: szklerózis multiplex [85, 86], I.

típusú diabétesz (T1D) [87], szisztémás lupus erythematosus [88, 89], colitis ulcerosa (fekélyes vastagbélgyulladás) [90, 91], Crohn-betegség [84, 92]; rheumatoid arthritis [93, 94].

Így az MHC I molekuláknak többféle szabályozó funkciója látszik körvonalazódni, mely kiegészíti az antigénprezentációban betöltött szerepét [95, 96].

2.4. c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok

A sejtek génátírását szabályozó DNS-kötő fehérjéket transzkripciós faktoroknak nevezzük. Specifikus DNS promóter vagy enhanszer régiókhoz kötődve célgénjeik kifejeződését növelhetik vagy csökkenthetik, így működésük hatással lehet a sejtek különféle élettani folyamataira. A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok leucin cipzárral összekapcsolódó homo vagy heterodimerek, melyek az AP-1 (Activator protein 1) válaszadó elemeihez kötődnek. A heterodimer kristályszerkezetét 1995-ben határozták meg [97], a domén struktúrája a 8. ábrán látható.



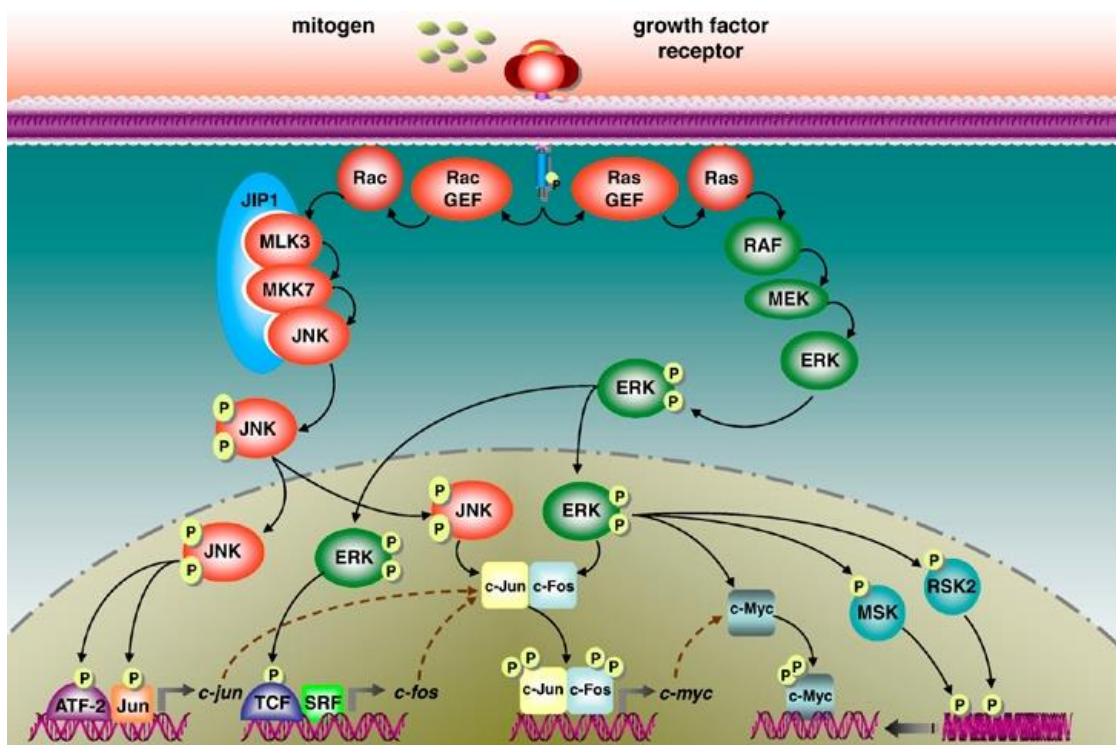
8. ábra: A c-Fos - c-Jun heterodimer szerkezete

A c-Jun és c-Fos fehérjék több, funkcionálisan jól elkülöníthető doménnal rendelkeznek: DNS-kötő, leucin cipzár, transzaktivációs, valamint kinázkötő doménnal [98].

A két fehérje bázikus α -helikális régiója a DNS-kötés során van der Waals kölcsönhatásokat és specifikus hidrogénkötéseket alakít ki. A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok több különböző doménból épülnek fel: DNS-kötő doménból, dimerizációs doménból, N-terminális és C-terminális transzaktivációs doménból, valamint kinázkötő doménból [99, 100]. A c-Fos–c-Jun dimer pontos térszerkezetéből csak a DNS-kötő és dimerizációs domén ismert, a

transzaktivációs funkcióval [101] is rendelkező C-terminális domén konformációjáról a krisztallográfiás vizsgálatok nem nyújtottak információt. A C-terminális végek hosszúsága aszimmetrikus, a teljes hosszúságú c-Fos C-terminális doménje a dimerizációs doméntól számítva 164 aminosavval hosszabb c-Jun fehérjéénél [102]. N. Baudendistel és munkatársai élő sejtekben kimutatták fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia segítségével, hogy a teljes hosszúságú Fos-EGFP és Jun-mRFP1 fluoreszcensen jelzett fehérjék a sejtmagban heterodimerizálnak és kötődnek a kromatinhoz [103]. Korábban nem volt ismert a heterodimer C-terminális részének térbeli konformációja, illetve a c-Fos C-terminális doménjének szerepe a DNS-kötődésben.

c-Fos-c-Jun dimer funkciója sejttípus függést mutat, egyes sejttípusokban pl. sejtproliferációt indukál, más sejttípusokban apoptózishoz járul hozzá. DNS-hez való kötődésükben számos különféle stimulus által elindított jelátviteli útvonal közrejátszhat: pl. a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, növekedési faktorok (TGF β , EGFR), neurotranszmitterek, UV sugárzás, onkofehérjék, mitogén aktiválta protein kináz-, ciklikus AMP vagy Ca²⁺-függő jelátviteli útvonalak [104-107]. Az IL-2 citokin által aktivált Jun-Fos komplexek jelátvitelének folyamatábrája a 3.2 fejezetben, a 6. ábrán látható. A Fos-Jun transzkripció faktorok a növekedési faktor receptorok aktivációját követően a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalon keresztül is kifejezhetik proliferáció indukáló hatásukat (9. ábra).



9 ábra: c-Jun és c-Fos transzkripció faktorok aktivációja a MAP kináz jelátviteli útvonalon keresztül [108]

Első lépésben a növekedési faktorok tirozin kináz aktivitással rendelkező receptoraikhoz kötődnek (pl. EGF receptor). A receptorok oldalláncai foszforilálódnak, majd adaptor fehérjéken keresztül a Ras fehérje aktiválódását a Raf/MEK/ERK jelátviteli útvonal inicializációja, majd a MEK (mitogén-aktivált protein kináz kináz) fehérjék foszforilálódása követi. A mitogén kötődést követően egy másik jelátviteli útvonal is lejátszódhat, a Rac (Rat sarcoma homolog) fehérjék aktiválódásán keresztül többlépcsős kaszkád eredményeképpen a Jun N-terminális kináz (JNK) stimulációja is bekövetkezhet. Az aktivált MEK foszforilálja a JNK-t, illetve az extracelluláris szignál-regulált kinázt (ERK). Az aktivált ERK és JNK kinázok a sejtmagban a c-Fos-c-Jun a transzkripció faktorok DNS-hez való kötődését/aktivációját idézik elő.

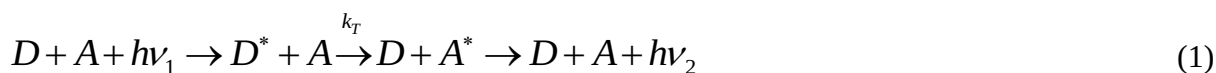
Számos patológiás esetben a c-Fos magas expressziós szintjét figyelték meg, pl. Tamoxifen rezisztens emlőtumorban [109], szájüregi rákban [110]; az overexpresszió szerepét valószínűsítették májrák karcinogenezisében [111]. Magas expressziós szintje befolyásolható például a pajzsmirigy hormon $\alpha 1$ magreceptorán keresztül [112]. Néhány sejttypusban a c-Fos magas expressziója apoptózis indukcióját eredményezi [113, 114].

A c-Jun-nak a sejtciklus szabályozásában van szerepe, a ciklin D transzkripció faktort aktiválja, az aktiváció hiányában a sejtciklus progressziója a G1 fázisban megrekedhet [115]. A c-Jun overexpressziója egyes tumor szupresszorok (p53, p21) expresszióját csökkenti, amely által felgyorsult sejtosztódás valósulhat meg [116].

A fenti irodalmi bevezetésben a dolgozatomban szereplő fehérjék főbb tulajdonságait foglaltam össze. A bevezetés további részében a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatához alkalmazott fluoreszcens metodikákat fogom bemutatni.

2.5. Förster rezonancia energiatranszfer (FRET)

A fehérjék asszociációinak, térszerkezetének feltérképezéséhez gyakran használt módszer a Förster rezonancia energiatranszfer mérése. A FRET sugárzás nélküli energiaátadás két, egymástól 1-10 nm távolságra elhelyezkedő fluoreszcens festék (donor és akceptor) között. A FRET további feltétele a donor emissziós és az akceptor abszorpció spektrumának átfedése és a két festék megfelelő relatív orientációja [117, 118]. A folyamat az alábbi egyenlettel írható fel:



D és A az akceptor és donor fluorofórok alapállapotát, * a gerjesztett állapotukat jelöli; k_T az energiatranszfer folyamat sebességi állandója; $h\nu_1$ és $h\nu_2$ a gerjesztő és az emittált fotonok energiáját jelöli.

A folyamat sebességi állandója több tényező függvénye:

$$k_T = \alpha J \kappa^2 R^{-6} \quad (2)$$

(α : arányossági tényező; κ^2 : orientációs faktor, dinamikus randomizált donor és akceptor irányítottságnál $\kappa^2=2/3$; J: a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedése; R: a donor és akceptor molekulák közötti távolság). A FRET E hatásfoka annak valószínűségét jelenti, hogy egy gerjesztett donor festék FRET révén kerül vissza az alapállapotba, ami megadható az alábbi képlettel:

$$E = \frac{k_T}{k_T + \sum_i k_i} \quad (3)$$

Az egyéb legerjesztődéssel járó folyamatok sebességi állandóit a k_i tényező jelöli. Mivel a FRET hatásfoka a donor-akceptor távolság negatív hatodik hatványának a függvénye, így gyakran és széleskörűen alkalmazott módszer a fehérjék molekuláris távolságának monitorozásához. Amennyiben a molekuláris közelségben elhelyezkedő donorok és akceptorok számának az aránya változik, úgy a donor molekulák FRET általi legerjesztődés gyakorisága is csökkenhet vagy nőhet, tehát a FRET változása akár a klaszterizációs viszonyok megváltozására is utalhat.

Az energia transzfer hatásfoka kifejezhető a donor - akceptor távolsággal:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (4)$$

R_0 az a donor - akceptor távolság, amelynél a transzfer hatásfoka 50%.

R_0 nagysága az alábbi képlettel kiszámolható [117, 119]:

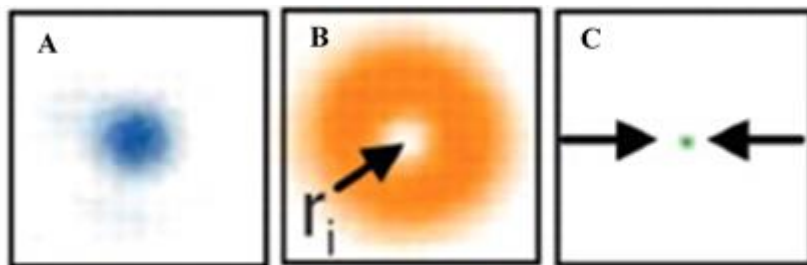
$$R_0^6 = \frac{9 \ln 10}{128 \pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 Q_D}{n^4} J \quad (5)$$

ahol Q_D a donor kvantumhatásfoka, n a közeg törésmutatója, N_A az Avogadro szám. Az utóbbi évtizedekben az E meghatározására számos módszert és protokollt dolgoztak ki különféle mérőeszközökre [118, 120]. A FRET hatásfok érzékeny távolságfüggése miatt molekuláris vonalzóként is használható [121]. A leggyakrabban használt fluorofórok közötti R_0 (Förster) távolság tipikusan 5 nm [122, 123], s a FRET hatásfoka a kétszeres R_0 donor-akceptor távolság

értéknél $\sim 1,5\%$, így a FRET nem jól alkalmazható néhány 10-100 nm-es távolságú molekuláris távolságok, együttállások vizsgálatához. A néhány 10 nm-es nagyságú sejtfelszíni fehérje-asszociátumokat a konvencionális fénymikroszkópos eszközökkel sem lehet feloldani, hiszen határt szab az Abbé-féle feloldási határ, ami ~ 200 nm. Az utóbbi évtizedben több olyan módszert is kifejlesztettek, amely képes meghaladni az említett feloldási határt, gyűjtőnéven ezeket szuperfeloldású mikroszkópiáknak nevezzük. A szuperfeloldású mikroszkópia alkalmazásával az Abbé-féle feloldási határnál kisebb struktúrákat is lehetővé vált láthatóvá tenni.

2.6. Szuperfeloldású STED mikroszkópia

Az utóbbi években számos szuperfeloldású módszert fejlesztettek ki: strukturált megvilágítást alkalmazó [124, 125] vagy a fluorofórok speciális tulajdonságait kihasználó eljárást (PALM [126], STORM [127], STED [128]). Dolgozatomban az MHC I molekulák és IL-2/15 receptorok klaszterméretét stimulated emission depletion (STED) mikroszkópiával határoztuk meg. A STED képalkotás menete a következő. A minta egy 200 nm átmérőjű térfogatelemét az adott fluoreszcens festéknek megfelelő hullámhosszúságú fókuszált lézernyalábbal gerjesztik (10. A ábra). 1-50 ps múlva a festék emissziós hullámhossznak megfelelő, ún. depléciós vagy STED lézerrel megvilágítva a térfogatelemet indukált emisszióval legerjesztik a festékmolekulák nagy részét (depléció). A STED lézernyaláb intenzitás profilja egy üres tórusz, így a középső ~ 5 -40nm-es sugarú tartományon kívül minden festékmolekulát legerjeszt, kizárva azokat a képalkotásból (10, B ábra). Így az effektív detektálási térfogat (*point spread function*) szélessége az eredeti érték töredékére csökkenthető (10 ábra C [128]).



10. ábra: STED mikroszkópok képalkotási módja [128]

STED mikroszkópokra az alábbi képlet szerint lehet a feloldási határt kiszámolni [128]:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}} \quad (6)$$

n a közeg törésmutatója, λ a festék hullámhossza, I a depléciós lézer intenzitása, az I_{sat} a festék szaturációs lézerintenzitásának a nagysága. Ezen képlet legfőképpen abban különbözik az Abbé-féle feloldási határtól, hogy a depléciós lézerintenzitás növelésével a feloldási határ elvileg végtelenül kicsinnyé tehető. Dolgozatomban kétcsatornás STED mikroszkóppal készítettünk szuperfeloldású képeket. A mikroszkóp részletes leírása a következő referenciákban: [129-131], valamint a kollaborációs intézetben készült PhD tézisekben részletesen megtalálhatóak [132, 133].

A kommerciális STED mikroszkópok a mintát pontról pontra pásztázzák végig, így a sejtekben lejátszódó molekuláris folyamatoknál hosszabb képfelvételi idő szükséges. Az utóbbi években 200 kép/sec sebességű STED mikroszkópot is kifejlesztettek [134-136], ám kereskedelmi forgalomban még nem terjedtek el.

2.7. Fehérjeklaszterek vizsgálata fluoreszcenciás képelemzési módszerekkel

A sejtfelszíni fehérjemintázatok kvantitatív elemzése nélkülözhetetlen a pontos és megbízható membránmodellek felállításához. A sejtfelszíni fehérjeklaszterek méreteit a fluoreszcenciás módszerek első alkalmazása óta számos képalkotó eszközzel valamint kiértékelő algoritmussal vizsgálták. A klaszterméret meghatározásának határt szab az alkalmazott optikai eszköz feloldása, de a szuperfeloldású mikroszkópia kifejlesztésével és elterjedésével a sejtfelszíni struktúrák méretének a bizonytalansága tovább fog csökkenni.

A klaszterméret meghatározó metodikákat megkülönböztethetjük aszerint, hogy a képekből klaszterméretet közvetlen eljárással becsülik meg, vagy közvetett módon, a képeken értelmezett függvények paraméterbecslésével teszik azt meg.

A közvetlen módszerek alkalmazásánál a klaszterek azonosítása kritikus lépés. Ez többféle módon történhet, pl. a lokális intenzitásmaximumok detektálása, az intenzitás térbeli eloszlásának analízise alapján vagy képszegmentációs eljárással [137]. Az utóbbi években számos képszegmentációs klaszterméret meghatározó algoritmust fejlesztettek ki. Az alkalmazott metodika alkalmazhatósága függ a fehérjeeloszlás inhomogenitásától, a lokális felületi fehérjesűrűségétől, a képek jel/zaj viszonyától és a képalkotó eljárástól is. A szegmentációs algoritmusok hátránya, hogy az általuk kapott klaszterméret-eloszlás

érzékenyen függ az identifikáció bemeneti paramétereitől, így eltérő bemeneti paraméterek mellett más-más klaszterméret-elosztást kapunk eredményül.

A közvetett módszerek közül a két leggyakrabban használt eljárás a Ripley-féle K és térbeli autokorrelációs függvények paraméterbecslése. A Ripley-féle K függvény meghatározása úgy történik, hogy a részecskék lokalizációját követően meg kell határozni az r sugarú környezetükbe eső részecskék számát. Ha a részecskeszámokat elosztjuk a részecskék felületi sűrűségével, úgy a Ripley-féle K függvényt kapjuk eredményül, a függvény értéke véletlenszerű részecskeeloszlásnál πr^2 -vel egyenlő. A K függvény 7. és 8. egyenletekkel értelmezett transzformáltjának véletlenszerű részecskeeloszlásnál a várható értéke nulla, így gyakran inkább az alábbi függvényt határozzák meg:

$$H(r) = L(r) - r \quad (7)$$

ahol:

$$L(r) = \sqrt{\frac{K(r)}{\pi}} \quad (8)$$

A H függvény értéke negatív előjelű a véletlennél ritkább, pozitív előjelű sűrűbb részecskeeloszlás esetén. Az átlagos klaszterméret becslését a H függvény maximumának a helye adja meg. A fenti eljárás jól használható a sejtfelszíni fehérjék klaszterizációjának jellemzésére, amennyiben a részecskék pozícióját a szuperfeloldású képekből meg lehet határozni.

A térbeli autokorrelációs függvény paraméterbecslése alkalmas módszer az átlagos klaszterméretet meghatározására fluoreszcens képeken is. A korrelációs függvényt az alábbi módon kell kiszámolni:

$$G(r) = \frac{\langle I(r') \times I(r' + r) \rangle}{\langle I(r') \rangle^2} - 1 \quad (9)$$

ahol $I(r)$ a fluoreszcencia intenzitás az r helyen, $\langle \rangle$ az átlagolást jelenti r' változóval. A korrelációs függvény térbeli lecsengésének alakjából lehet modellfüggvények illesztése révén az átlagos klaszterméretre következtetni [41, 138, 139].

Az eddigiekben két olyan biofizikai metodikát tárgyaltam, melyek segítségével molekuláris szintű interakciókat lehet vizsgálni. A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérések segítségével elsősorban a fluorofórok molekuláris távolságát, a fehérjék konformációját lehetséges monitorozni. A szuperfeloldású módszerekkel a sejtekben lejátszódó

folyamatoknak csak egy időpillanatát lehetséges rögzíteni, a sejtfelszíni fehérjeeloszlást nagy térbeli feloldással vizsgálni. A sejtekben lezajló folyamatok teljesebb megértéséhez szükségeszerű azok dinamikáját feltáró mérőmódszert is alkalmazni. Az egyik nagy időbeli feloldású mérőmódszer, amellyel molekuláris folyamatok dinamikája is monitorozható, a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia.

2.8. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia fluoreszcensen jelzett molekulák diffúzióját, koncentrációját, fotofizikai tulajdonságait jellemző paraméterek becslésére alkalmazható módszer élő sejtekben vagy oldatban [140-142]. A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia kifejlesztése óta (70-es évek közepe) [143, 144] az eljárást csaknem minden olyan eszközre kifejlesztették, amellyel a molekulák fluoreszcenciáját megfelelő időbeli feloldással detektálni lehet [145]. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiában a fluoreszcens jelek időbeli autokorrelációs függvényét kell meghatározni, az alábbi definíció szerint:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle \langle F(t) \rangle} - 1 \quad (10)$$

ahol $F(t)$ a t időpillanatban/mérési időintervallumban detektált fluoreszcencia intenzitás, a $\langle \rangle$ művelet az átlagérték képzést jelenti a mérés időtartamára.

Egykomponensű, 3D-ben szabadon diffundáló részecskék autokorrelációs függvénye az alábbi egyenlettel írható le [141]:

$$G(\tau) = \left(1 - T + Te^{-\tau/\tau_{tr}}\right) (N(1-T))^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_d}\right)^{-1/2} \quad (11)$$

ahol τ a „késleltetési” idő, T az egyensúlyi tripethányad, τ_{tr} a triplet állapot korrelációs ideje, τ_d a diffúziós idő (a részecskék által a fókuszterfogatban átlagosan eltöltött idő), N a detektálási térfogatban levő molekulák átlagos száma, S a forgási ellipszoid alakú fókuszterfogat axiális és laterális sugarának a hányadosa. A modell a fluorofórok fotofizikai tulajdonságait a tripethányad valamint a triplet állapot korrelációs ideje által veszi figyelembe. A modell által a mozgó molekulák diffúziós állandóját a diffúziós idő paraméterből lehet megbecsülni. A fenti képletből τ_d diffúziós idő (a fókuszterfogatban átlagosan eltöltött idő) nemlineáris illesztéssel történő meghatározása után az alábbi képlettel számolható ki:

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_d} \quad (12)$$

ahol a ω_{xy} a detektálási ellipszoid e^{-2} sugara (az a felület, amely mentén a gerjesztési és detektálási hatékonyság a középponthoz képest e^{-2} -szeresére csökken). Az egykomponensű 2D-ben szabadon diffundáló részecskék korrelációs függvénye a triplet átmenetet figyelembe vételével az alábbi alakú:

$$G(\tau) = \left(1 - T + T e^{-\tau/\tau_{tr}}\right) \left(N(1 - T)\right)^{-1} \left(1 + \tau/\tau_d\right)^{-1} \quad (13)$$

Amennyiben több, különböző diffúziós állandójú komponens van jelen, úgy az autokorrelációs függvényt a komponensek autokorrelációs függvényeinek a súlyozott összegeként kapjuk meg:

$$G(\tau) = \sum_i w_i^2 \times G_i(\tau) \quad (14)$$

A képletben a $G_i(\tau)$ kifejezés az i -edik komponens autokorrelációs függvényét jelöli, a komponensek w_i súlyfaktorainak a nagyságát az alábbi képlettel kell kiszámolni:

$$w_i = \frac{\kappa_i \sigma_i Q_i \langle C_i \rangle}{\sum_{k=1}^n \kappa_k \sigma_k Q_k \langle C_k \rangle} \quad (15)$$

Ahol n a komponensek számát, κ_i a komponens detektálási hatásfokát (emissziós spektruma és az alkalmazott optikai elemek függvénye), a σ_i a gerjesztési hatáskeresztmetszetet (abszorpciós spektrum, gerjesztés lézer hullámhossza és intenzitás), a Q_i a fluoreszcencia kvantumhatásfokát, $\langle C_i \rangle$ az i -edik komponens átlagos koncentrációját jelenti.

Amennyiben a komponensek spektrális tulajdonságai azonosak, csak a komponensek diffúziós állandói különböznek, úgy kétkomponensű 3D-ben diffundáló részecskék autokorrelációs függvénye az alábbi alakban írható fel:

$$G(\tau) = \left(1 - T + T e^{-\tau/\tau_{tr}}\right) \left(N(1 - T)\right)^{-1} \left(\rho_1 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{1,d}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{1,d}}\right)^{-1/2} + (1 - \rho_1) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{2,d}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{2,d}}\right)^{-1/2} \right) \quad (16)$$

A képletben a ρ_1 az első komponens relatív hányadát, a $\tau_{1,d}$ az első komponens (pl. szabad fluorofórok), a $\tau_{2,d}$ a második komponens (pl. makromolekulához kötött fluorofórok) diffúziós idejét jelöli. A komponensek diffúziós idejének az ismeretében azok diffúziós állandója meghatározható.

A fluorofórok által szolgáltatott fluoreszcens jel és a háttérzaj nagyságának arányától függően a becsült részecskeszámok eltérhetnek a ténylegestől. A becsült részecskeszám a háttérintenzitással az alábbi képlettel korrigálható [146]:

$$N_{kor} = N(1 - F_B / F_{tot})^2 \quad (17)$$

ahol F_B háttérintenzitás, F_{tot} az adott mérési szakaszban az átlagos fluoreszcencia intenzitás.

A fenti paraméterekből az átlagos molekuláris fényességet (F/N) is meg lehet becsülni. A molekuláris fényesség nagysága egyenlő egy diffundáló részecskétől időegység alatt detektált fotonok számával [147-149], mértékegysége: Hz . A 15. képletben, ez a κ_i , σ_i , Q_i szorzataként szerepel, az irodalomban ε karakterrel is gyakran jelölik [148, 150]. Az egyszerűség kedvéért F/N -nel jelölt átlagos molekuláris fényességet a háttérintenzitással, valamint a 17. egyenlet felhasználásával az alábbi képlet szerint lehet korrigálni:

$$(F_{tot} - F_B) / N_{kor} \quad (18)$$

Az F/N paraméter nagysága a diffundáló részecskék oligomerizációjáról adhat felvilágosítást, valamint annak a megváltozását jelezheti. Amennyiben a membránfehérjékhez kötött fluoreszcens marker (pl. fluoreszcens festékek konjugált antitest) és az oldatban diffundáló szabad fluoreszcens marker molekuláris fényességének hányadosát képezzük, úgy az együttmozgó részecskék számáról (membránfehérjék száma az aggregátumban) kaphatunk felvilágosítást.

Az ilyen módon számolt molekuláris klaszterizáció csak közelítése a tényleges klaszterizációnak, mivel mind a szabad jelzőfluorofórok, mind a membránban diffundáló részecskék fluoreszcenciáját számos tényező befolyásolhatja:

- A szabad antitestek 3D-ban diffundálnak, míg a membrán síkjában 2D-ben mozdulhatnak el, így a gerjesztési és detektálási profiljaik különböznek [148, 151]. Mivel a membrán a fókuszsíkban van, így a membránban mért F/N értékek nagyobbak.
- A membránt a fókuszsík minden mérésnél más-más nagyságú felülettel ($A = r\omega_{xy}^2$) metszheti, így a mért F/N értékek sejtenként vagy a sejt mozgása miatt is változhatnak.
- Az irreverzibilis fotoelhaványulás vagy az antitestek aggregációja esetén a fluoreszcens önkioltás a membránban a várható F/N nagyságát csökkentheti.
- Alacsony festék/antitest arány esetén, ha nem minden antitest van fluoreszcensen megjelölve, a membránban együttmozgó részecskék átlagos fluoreszcenciája kisebb, így az F/N analízissel a fehérjék dimerizációját alábecsülhetjük.

A felsorolt tényezők együttes hatásait és a sejtmembrán inhomogén fehérjeeloszlást is magában foglaló korrekciót feltehetően csak nehezen lehetne jól használni, így e korrekció kidolgozása nem témája a disszertációnak, a kidolgozásától eltekintettünk. Mindezen megfontolások ellenére a molekuláris fényesség használható becslést ad az együttmozgó fehérjék számáról és ennek változásáról.

2.9. Fluoreszcencia Keresztkorrelációs Spektroszkópia (FCCS)

A fluoreszcencia keresztkorrelációs mérésekkel különböző színű fluorofórokkal jelzett molekulák dinamikáját lehet vizsgálni. A módszer segítségével meg lehet becsülni a fókuszterefogatban vagy kétlézeres gerjesztés esetén az átfedő fókuszterefogatokban együtt diffundáló molekulakomplex hányadát, koncentrációját. A keresztkorrelációs függvény időbeli lecsengéséből az együttmozgó frakciók stabilitásáról, kölcsönhatásuk kinetikájáról is nyerhetünk információkat. Az FCCS gyakran alkalmazott eljárás a fehérje-fehérje párkölcsönhatások kimutatására és jellemzésére [152, 153]. Egyaránt alkalmazható élő sejtek membránjában diffundáló fehérjék közös diffúziójának a vizsgálatára (pl. MHC I – IL-2R α [42]), valamint transzkripció faktorok kölcsönhatásának és DNS-hez való kötődésének kimutatására [103, 154].

Két fluoreszcens csatorna jelének keresztkorrelációs függvénye az alábbi képlettel definiálható [155, 156]:

$$G_x(\tau) = \frac{\langle F_1(t) F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle} - 1 \quad (19)$$

A képletben a két csatornát az 1 és 2 alsó indexek jelölik, $F_i(t)$ a detektált fluoreszcencia intenzitás az i -edik csatornában (pl.: zöld vagy piros szín) a t mérési időpontban.

Ideális kondíciókat feltételezve (a csatornák között átvilágítás nincsen, a fókuszterefogatok átfedése tökéletes: nagyságuk és térbeli pozíciójuk megegyezik) a két csatorna közötti keresztkorrelációs függvény: ($G_x(\tau)$), valamint az csatornák autokorrelációs függvényei: ($G_1(\tau)$ és $G_2(\tau)$) az alábbi alakúak [156-158]:

$$G_1(\tau) = \frac{N_1 \text{Diff}_1(\tau) + N_{1,2} \text{Diff}_{1,2}(\tau)}{(N_1 + N_{1,2})^2} \quad (20)$$

$$G_2(\tau) = \frac{N_2 \text{Diff}_2(\tau) + N_{1,2} \text{Diff}_{1,2}(\tau)}{(N_2 + N_{1,2})^2} \quad (21)$$

$$G_x(\tau) = \frac{N_{1,2} \text{Diff}_{1,2}(\tau)}{(N_1 + N_{1,2})(N_2 + N_{1,2})} \quad (22)$$

A fenti képletekben az időfüggő, fluorofórok mobilitására jellemző tagok a $\text{Diff}_1(\tau)$, $\text{Diff}_2(\tau)$ és $\text{Diff}_{1,2}(\tau)$ függvények. Az első két függvény az 1. és 2. csatornában az 1. és 2. fluorofór autokorrelációs függvénye, a harmadik pedig a kétszínű komplexeket alkotó fluorofórok keresztkorrelációs függvényét jelöli. Az N_1 , N_2 és $N_{1,2}$ paraméterek a komplexeket nem alkotó és a komplexekben levő átlagos részecskeszámokat jelentik. Az alábbi képletben egy 3D-ben szabadon diffundáló részecske mobilitására jellemző korrelációs tagot jelöltem:

$$\text{Diff}(\tau) = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_d}\right)^{-1/2} \quad (23)$$

Belátható, hogy a mobilitására jellemző tag amplitúdója 1-gyel egyenlő, így a 20-22. egyenletek amplitúdói csak a részecskeszámok függvényei.

1:1 kötődési arányt feltételezve, a korrelációs függvények amplitúdójának ismeretében a komplexekben levő relatív részecskehányadot meg lehet becsülni:

$$C_1 = \frac{N_{1,2}}{N_1 + N_{1,2}} = \frac{G_x(0)}{G_2(0)} \quad (24)$$

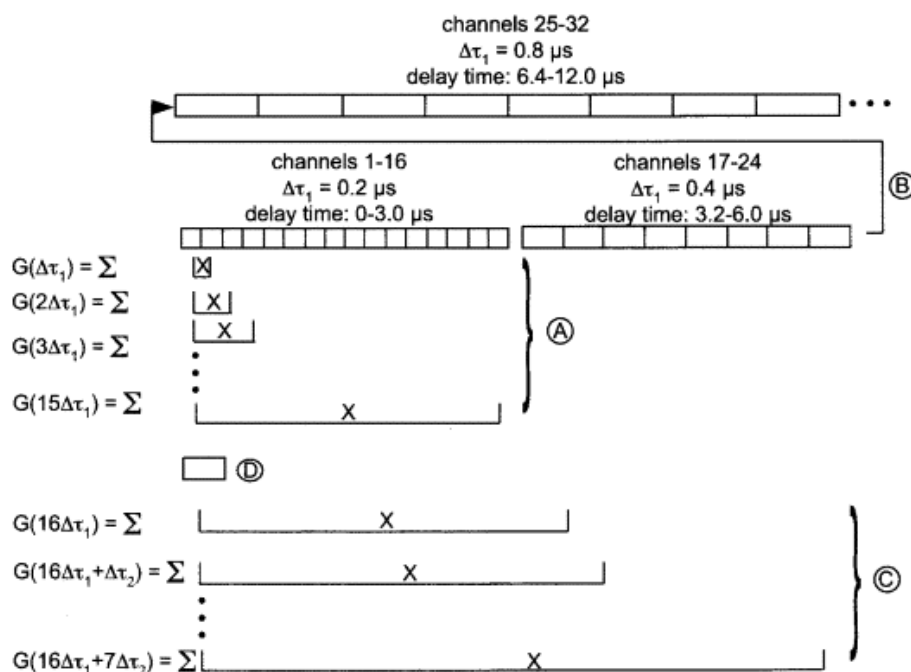
$$C_2 = \frac{N_{1,2}}{N_2 + N_{1,2}} = \frac{G_x(0)}{G_1(0)} \quad (25)$$

C_1 és C_2 a fluorofórok komplexben levő relatív hányadának a becslését jelenti. Az ilyen módon kiszámolt asszociált hányad több tényező hatása miatt is eltérhet a ténylegestől: a fluorofórok molekuláris fényessége megváltozhat a komplexbe való kötődés után; a fókuszterfogatok nagysága általában különböző, a fókuszterfogatok pozíciója nem feltétlenül esik egybe; a komplexekben több fluorofór is elhelyezkedhet [158, 159]. Így a korrelációs függvények amplitúdóiból számolt molekuláris asszociált hányadok csak hozzávetőleges közelítései a tényleges értékeknek.

A keresztkorrelációs függvényben (23. egyenlet) paraméterként szerepel a keresztkorrelációs diffúziós idő a (τ_d). Egykomponensű rendszer esetén ennek nagysága az együttmozgó komplexek stabilitásáról és mobilitásáról adhat információt. A 16. egyenlet analógiájára egy két komponensű rendszer keresztkorrelációs függvényeit is meg lehet adni, ez esetben súlytényezők (ρ_1 és $1-\rho_1$) és diffúziós idők ($\tau_{1,d}$ és $\tau_{2,d}$) ismeretében a komplexhez (pl. DNS-hez) való kötődés arányáról is kaphatunk felvilágosítást.

2.10. A multiple- τ algoritmus

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiai mérések során a jellemezni kívánt folyamatok feloldásához szükséges időbeli felbontással kell a fluoreszcencia intenzitást detektálni. Mivel a fotofizikai folyamatok korrelációs ideje tipikusan a $10^{-9} - 10^{-6}$ s tartományba, míg az élő sejtekben diffundáló részecskék diffúziós ideje $10^{-3} - 1$ s tartományban várható, így ha azonos beosztású pontokban határoznánk meg a korrelációs függvényeket, több nagyságrendnyi adatmennyiség tárolására, hozzáférhetőségére és módosítására lenne szükség. A multiple- τ algoritmus a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiában alkalmazott eljárás, segítségével kisebb adatmennyiség mellett a korrelációs függvények logaritmikusan ekvidisztáns késleltetési időpontokban számolhatóak ki [160, 161]. Az algoritmus szemléltetése az alábbi 11. ábrán látható.



11 ábra: Adatfolyam az egycsatornás multiple- τ korrelátorban [162]

A korrelátor struktúráját memória blokkok képezik, az intenzitások tárolása, későbbi időpontokban történő felhasználása a memóriablokkban való adatléptetéssel történik. Minden mintavételezési periódusban az első blokk első csatornája közvetlenül a detektortól kapja meg az intenzitás értékét, az adattárolás előtt a korábbi intenzitás értéket jobbra kell léptetni. Második bloktól kezdődően minden blokk első (új) intenzitás eleme az azt megelőző blokk utolsó két intenzitás elemének az összegeként áll elő. Az új intenzitás érték tárolása előtt a blokkbeli intenzitás elemek léptetéséről elemenként gondoskodni kell. Az alábbi képletnek megfelelően minden blokkon belül az intenzitások akkumulációját és korrelációját kell elvégezni:

$$\hat{g}(\tau_k) = \hat{g}(k \cdot \tau_{\min}) = \frac{1}{T-k} \sum_{i=k}^{T-1} \overbrace{I_i \cdot I_{i-k}}^{G_k} \bigg/ \left(\frac{1}{T} \sum_{i=0}^{T-1} I_i \right)^2 \quad (26)$$

a képletben az I_i és I_{i-k} az i -edik valamint a k mintavételezési egységgel korábbi intenzitásértéket jelöli; az intenzitások szorzatát a G_k , az intenzitásokat a blokkokhoz rendelt M memória egységekben kell akkumulálni. A T változó a blokkok végrehajtásának, az elvégzett akkumulációknak a számát jelöli. Mivel egy korrelátor blokk mindig a megelőző blokk két utolsó intenzitásának az összegét kapja új elemül, így a blokkok effektív mintavételezési ideje blokkonként kétszereződni, a végrehajtásuk frekvenciája feleződni fog. A kétszeres mintavételezési időnek köszönhetően a késleltetési idők τ_k logaritmikusan lesznek ekvidisztánsak.

Az irodalomban a fent leírt architektúrának több módosított változata is megtalálható, pl. blokkonként hány darab intenzitást tároló memóriaegység található (tipikusan 8), az utolsó hány darab intenzitást kell összegezni és továbbadni a következő blokknak (tipikusan 2). Ezen paraméterek, valamint az elérhető legkisebb mintavételezési idő szabja meg, hogy a korrelációs függvény mely késleltetési időtartományban és milyen időpontokban lesz meghatározva.

A fenti korrelátor elrendezést duplikálva kétsatornás multiple- τ korrelátort kapunk. Amennyiben ezen felül az intenzitások keresztszorzatát is akkumuláljuk, úgy a keresztkorrelációs függvényeket is kiszámolhatjuk.

Az eljárás szerint a korrelációs függvényt adatblokkonként kell kiszámolni, s mivel a blokkok csak minden második végrehajtás után adnak új intenzitás elemet a következő blokknak, így a blokkok végrehajtási frekvenciája hatványfüggvény szerint csökken:

$$f_i = \frac{f_{i-1}}{2} \quad (27)$$

f_i az i -edik blokk végrehajtási frekvenciáját jelenti.

A biofizikai mérések során gyakran szükség van a korrelációs függvények valós idejű (real time) kiszámolására és megjelenítésére. Ugyan a szoftverkorrelátorok flexibilitása sokszorosan felülmúlja a célhardverekét, és az utóbbi években számos szoftverfejlesztés történt [163-168], de a sebességük még mindig nem elég nagy a görbék futásidőben való számolásához és megjelenítéséhez. Így a számoláshoz gyakran célhardvert (hardver korrelátort) használnak [169].

2.11. FPGA - programozható logikai kapumátrix

Az FPGA (field-programmable gate array, programozható logikai kapumátrix) egy olyan újraprogramozható félvezető eszköz, amely programozható logikai blokkok mátrixából áll [170]. A blokkok lehetnek konfigurálható logikai blokkok, flip-flopok (bistabil multivibrátor), I/O (Input/Output) elemek, órajelkezelő-egységek, memóriablokkok és blokkok közötti programozható összeköttetések. Ezen áramköri elemek a felhasználó által szabadon programozhatóak, így egy meghatározott célú hardver hozható általuk létre. Az FPGA eszközök ötvözik az integrálható áramkörök alkalmazás specifikusságát és a processzor alapú rendszerek flexibilitását. Az FPGA-k hátránya, hogy alacsony órajelen működnek (10-200MHz), gyártási költségük sokszorosa az ASIC (Application Specific Integrated Circuits) chipekének és a hagyományos processzorokénak, és korlátozott erőforrásokkal rendelkeznek. További hátrányuk, hogy programozásukhoz hardverközeli programozási szemlélet szükséges, a programok fordítási folyamata hosszú lehet (akár 5-60 perc). Az FPGA-k előnyei, hogy nagy sebességű párhuzamos feldolgozásra képesek, az I/O elemeknek köszönhetően akár 6 ns feloldási idejű digitális jelfeldolgozásra képesek. A felhasznált elemek számának függvényében 200 MHz-es ciklusfrekvencia is elérhető, nincs operációs rendszer (a párhuzamosan futó szálaknak nem kell az erőforrásért versenyezniük).

Az előző fejezetben ismertetett multiple- τ algoritmussal a korrelációs függvényt logaritmikusan ekvidisztáns időpontokban lehet meghatározni. Figyelembe véve az FPGA chipek memória és számítási kapacitását, valamint a multiple- τ algoritmus sajátosságait (27. egyenlet), egy modern FPGA-n akár egy többcsatornás (hardver) korrelátor is kivitelezhető lehet.

3. Célkitűzések

Dolgozatom fő témája az immunfolyamatokban alapvető szerepet játszó membránfehérjék által alkotott kis- és nagyméretű molekulaklaszterek szerkezetének és dinamikájának vizsgálata. Az MHC I molekula és az interleukin-2/15 receptorok asszociációját már korábban kimutatták, de ennek a kölcsönhatásnak a szerepe ismeretlen. Munkánk során az MHC I molekulák szabályozó szerepét vizsgáltuk az IL-2/15 citokin receptorok és MHC I molekulák klaszterizációjában és mobilitásában MHC I géncsendesítés segítségével. Dolgozatomban egy többszörös multiple- τ korrelátor validálását is be fogom mutatni, melyet mobilitás és ko-mobilitás vizsgálatokra is fel lehet használni. Disszertációm további részében az IL-2 jelátvitel által is aktivált c-Jun - c-Fos transzkripció faktorok heterodimerjének konformációját és DNS-kötődését vizsgáltam meg.

Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen szerepe van az MHC I molekuláknak az IL-2/15 receptorok klaszterizációjában és dinamikájában?
- Az MHC I molekulák expressziója hogyan változtatja meg azok mobilitását és klaszterezettségét?
- A c-Jun és c-Fos transzkripció faktorok dimerjének milyen a konformációja élő sejtekben?

Eredményeim segíthetnek megérteni a membránfehérjék klaszterizációjának és transzkripció faktorok dinamikáját, valamint például szolgálhatnak a modern mikroszkópos technikák komplementer információkat nyújtó alkalmazására.

4. Metodikák

4.1. Sejttenyésztés, antitestek fluoreszcens jelölése, immunfluoreszcens jelölés

A T sejtek sejtfelszíni fehérjeinek vizsgálatához IL-2 függő FT7.10 humán T limfóma sejtvonalat használtuk, amely a Kit 225 sejtvonalból származik [171]. A sejtvonal stabilan transzfektálva van FLAG peptiddel ellátott IL-15R α -val, és az IL-2R mindhárom alegységét konstitutívan expresszálja. A sejteket 5% CO₂-t tartalmazó párásított légtérű termosztátban 37°C-on tenyésztettük RPMI 1640 tápoldatban (hozzáadott anyagok: 10% FBS (Gibco, New York, USA), 100 U/l Penicillin, 100mg/l Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 800 μ g/ml G418 (Gibco) az IL-15R α -val transzfektált sejtek szelekciójához. A sejtekhez 48 óránként 500 pM humán rekombináns IL-2-t adtunk. A c-Fos és c-Jun transzkripció faktorok vizsgálatához HeLa sejteket használtunk, a sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük (10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/l Penicillin, 100mg/l Streptomycin). A sejteket 2-3 naponta passzáltuk.

A sejtfelszíni fehérjéket fluoreszcens monoklonális antitestekkel jelöltük: az IL-2R α alegységet anti-Tac (Repligen Corporation, MA, USA), vagy 7G7/B6 [172] (NCI-Frederick, MD); az IL-15R α -FLAG epitópot anti-FLAG-M2 [173] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) vagy 7A4-24 [171]; az IL-2/15R β alegységet Mik β 3 (BD Pharmingen, San Diego, CA); Az MHC I molekulák nehézláncát W6/32 (IgG2a), míg a β 2m-et L368 (IgG1), az MHC II-t L243 antitestekkel. Azon antitesteket, melyeket nem a megadott cégektől vásároltunk, hibridóma sejtek felülúszójából izoláltuk vagy kollaborációs partnereinktől kaptuk (Dr. Thomas A. Waldmann, National Institutes of Health). A sejtfelszíni fehérjék mobilitásának meghatározásához a felsorolt antitestek Fab fragmentumait használtuk. Az Fab fragmentumokat papainos emésztéssel állítottunk elő [174]: az átdializált IgG-t L-cisztein (4 mg/ml) jelenlétében 37°C-on 12 óráig papainnal (Fab Preparation Kit, Thermo Scientific) emésztettük. Az oldatot protein-A oszlopon átengedve tiszta Fab frakciót nyertünk.

Az antitesteket szukcinimidil észter csoporttal rendelkező Alexa Fluor 488, 546, 594, 647 (Invitrogen, Oregon, USA) vagy ATTO 647N (ATTO-TEC, Siegen, Németország) festékekkel konjugáltuk. A festék/antitest jelölési arányt abszorpciós fotometriával határoztuk meg [175], a teljes antitesteknél ez az 1,1-3,9, míg az Fab fragmentumoknál a 0,4-0,79 tartományba esett. A GM₁ gangliozid lipid tutaj markert Alexa-488-cal konjugált kolera toxin B-vel jelöltük (Invitrogen, Oregon, USA).

Az FT 7.10 sejtek immunfluoreszcens jelölését az alábbiak szerint végeztük el. A sejteket kétszer mostuk HBSS-ben (1 liter desztillált víz, 1mM CaCl₂; 5,36mM KCl; 0,44mM KH₂PO₄; 136,9mM NaCl; 0,75mM MgSO₄; 0,33mM Na₂HPO₄; 5,55mM D-glükóz; 10nM Hepes;

pH=7,4) 1100 rpm fordulatszámon, 6 percig. 10 µl 50 µg/ml koncentrációjú antitestekhez vagy 25 µg/ml koncentrációjú CTX-B-hez 40 µl sejtszuspenziót adtunk, majd a mintákat 30 percig jégen inkubáltuk. Jelölés után a mintákat kétszer mostuk hideg HBSS-ben, majd 8 lyukú, fedőlemez aljú mikroszkópos kamrában (Ibidi GmbH., Martinsried, Németország) mértük őket le. A FRET és a STED mérésekhez a mintákat 1%-os formaldehid oldattal fixáltuk. A FRET méréseket 8 lyukú kamrába kicseppentett sejteken végeztük el. A kolokalizációs és STED mérésekhez a jelölt sejteket 1 mg/ml poli-L-lizinnel előkezelt fedőlemezre cseppentettük. Az irreverzibilis fotoelhalványodás minimalizálása végett a kicseppentett mintához 10 µl 50%-glicerín/50% 1xPBS-ben (10xPBS: 1,5 M NaCl; 32,18 mM KCl; 85,96 mM Na₂HPO₄; 16,9 mM KH₂PO₄) oldott Mowiol-t (Calbiochem, Darmstadt, Németország) is adtunk. A Mowiol megköti a singlet oxigént, a glicerín a nagyobb viszkozitása miatt a szabad gyökök lassabban diffundálnak így az irreverzibilis fotoelhalványodás mértéke csökkeni fog.

4.2. Géncsendesítés RNS interferenciával

Az RNS interferencia specifikusan használható egy célgén csendesítésére. Mivel az MHCI nehézlánccal ellentétben a könnyűlánc konzervatív szekvenciájú, és az MHC I molekula a könnyűlánc nélkül nem expresszálódik, így az siRNS szekvenciát a β2-mikroglobulinra specifikusan terveztük. Az siRNS-t Prof. Dr. Nagy Péter tervezte a Wistar Institute siRNA Selector programjával, a géncsendesítést Volkó Julianna optimalizálta és végezte el. A sejtek transzfekcióját steril fülkében AMAXA elektroporátorral (AMAXA GmbH, Köln, Németország), 100 µl térfogatban, 2×10⁶ sejten végeztük Nucleofector Solution-V oldatban 100 µM siRNS koncentrációval. Az elektroporálást követően a sejteket 24-lyukú plate-ben tenyésztettük (500 µl médium, 12 µl G418) 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. Negatív kontrollként elektroporált, de siRNS-t nem kapott, vagy pedig GFP-ellenes, ErbB2-ellenes vagy negatív kontroll (Bioneer, Daejeon, Dél-Korea) siRNS-sel transzfektált sejteket használtunk. Az MHC I és II fehérjék, valamint az IL-2/15R alegységek sejtenkénti abszolút mennyiségét áramlási citométeres mérésekkel határoztuk meg fluoreszcencia intenzitás sztenderd gyöngyök (Dako QIFIKIT; Dako North America, Carpinteria, CA, USA) segítségével.

4.3. Plazmidok, plazmidok transzfekciója

Az AP-1 komplex vizsgálatát a C-terminálison EGFP vagy mRFP1 fluoreszcens fehérjével jelölt c-Fos és c-Jun transzfekciójával, HeLa sejteken végeztük. Az FP-vel jelölt transzkripció faktorok konstruktjait az pSV-EGFP-N1 (Clontech, CA, USA) vektorból kiindulva hoztuk létre [103, 176]. A dimerizációs doméntól számított C-terminális domén a Fos

fehérjében hosszabb, mint a Jun-ban, így a C-végen elhelyezett festékek távol vannak egymástól a dimerben. Ezért a teljes hosszúságú c-Fos fehérjék mellett használtunk egy olyan mutánt is, melynek C végéről eltávolítottak 164 aminosavat (c-Fos²¹⁵). A FRET és FCCS mérésekhez a pozitív kontroll egy olyan fehérje volt, ahol a donor és akceptor festéket (EGFP-mRFP1) egy 7 aminosavból álló linker köti össze, ami a festékek közelsége miatt magas fluoreszcencia rezonancia energia transzfer hatásfokot és keresztkorrelációs együttthatót eredményez. Negatív kontrollként EGFP-vel és mRFP1-vel kotranszfectált sejteket használtunk fel; mivel a donor és akceptor festékek egymáshoz nem kapcsolódnak, így a közöttük fellépő FRET várható értéke nulla. A plazmidok tervezését és a transzekciók optimalizálását és kivitelezését Nina Baudendistel végezte el.

4.4. Konfokális mikroszkópia, FRET mérése konfokális mikroszkóppal

A konfokális képalkotás lényege: a minta adott pontjára fókuszált lézer által kiváltott fluoreszcencia csak egy tűlyukon keresztül haladva érheti el a detektort, ami kizárja a képalkotásból a fókuszszíkon kívülről érkező fotonok nagy részét [177]. A lézersugár X-Y irányú eltérítését a pásztázó tükrök irányítják, a tűlyuk átmérőjének változtatásával a mikroszkóppal elérhető Z irányú feloldás javítható. Az IL-2/15 receptorok konformációváltozását az alegységeikhez kötődött fluoreszcens antitestek közötti Förster rezonancia energiatranszfer (FRET) méréssel vizsgáltuk.

Figyelembe véve az FT 7.10 sejtvonalon az IL-2R β alacsony expressziós szintjét, a FRET hatásfokot konfokális mikroszkóppal, akceptor elhalványítás módszerrel határoztuk meg.

Az akceptor fotoelhalványítás módszere azon alapul, hogy ha az akceptor festéket irreverzibilisen kiégetjük, azok már nem képesek a FRET kölcsönhatásban részt venni, így a donor fluoreszcenciája megnő [178]. A spektrális átvilágításokat, a donorelhalványítást, valamint az akceptorok elhalványodási arányát is figyelembe vevő egyenlet az alábbi alakú [179]:

$$E(i, j) = 1 - \frac{(1 - \alpha)(F_{D1(i,j)} - \delta F_{A1(i,j)})}{\gamma(F_{D2(i,j)} - (\alpha\delta + (1 - \alpha)\epsilon)F_{A1(i,j)}) - \alpha(F_{D1(i,j)} - \delta F_{A1(i,j)})} \quad (28)$$

a képletben az $F_{D1(i,j)}$ és $F_{D2(i,j)}$ a háttérrel korrigált donor fluoreszcencia intenzitás az (i,j)-edik pixelben az akceptor fotoelhalványítás előtt és után; $F_{A1(i,j)}$ az akceptor fluoreszcenciája a fotoelhalványítás előtt; α az akceptor fluoreszcenciájának megmaradó hányada fotoelhalványítás után; γ a donor fluoreszcencia elhalványodásának hányada; a δ és ϵ paraméterek az akceptorok átvilágítási tényezői a donorcsatornába elhalványítás előtt és után. Mivel az átvilágítási és

elhalványodási faktorok nagyságát elhanyagolható mértékűnek találtuk Alexa 546 és Alexa 647 festékek esetén, így a pixelenkénti a FRET hatásfokot az alábbi képlettel számoltuk ki:

$$E(i, j) = 1 - \frac{F_{D1(i,j)}}{F_{D2(i,j)}} \quad (29)$$

A képeket 3×3 pixeles átlagszűrővel simítottuk digitálisan, az intenzitásokat a jelöletlen sejteken mért intenzitásokkal korrigáltuk (háttérkorrekció).

Méréseinkhez Olympus FluoView 1000 konfokális lézerpasztázó mikroszkópot használtunk. A donor molekulák (Alexa 546) gerjesztéséhez 543 nm-es lézervonalat és 555-625 nm detektálási tartományt használtunk. Az akceptorok (Alexa 647) gerjesztéséhez 633 nm-es lézervonalat, detektálásához 655-755 nm sávszűrőt alkalmaztunk. 60× nagyítású olajimmerziós objektívvel (NA 1,35), 4 µs pixelenkénti gyűjtési idővel 512×512 pixel méretű képeket készítettünk 20,1×20,1 µm² nagyságú területekről.

A c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok közötti kölcsönhatás vizsgálatához a FRET méréseket Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Németország) végeztük. A donor és transzfer csatornában a gerjesztéshez Argon ion lézer 488 nm-es vonalát használtuk, a fluoreszcenciát 505-550 nm, illetve 560-610 nm közötti tartományban detektáltuk. Az akceptor gerjesztéséhez 543 nm-es lézervonalat, detektálásához és 560-610 nm-es sávszűrőt használtunk. A konfokális mikroszkóp különböző csatornáiban a donor és az akceptor adott hullámhosszú lézeres gerjesztése esetén az azokra jellemző emissziós hullámhossz-tartományokban az alábbi fluoreszcencia intenzitások detektálhatóak:

$$\begin{aligned} \text{Donor csatorna:} \quad & I_1(488, 505-550) = I_D(1-E) + B_1 \\ \text{Transzfer csatorna:} \quad & I_2(488, 560-610) = I_D(1-E) \cdot S_1 + I_A \cdot S_2 + I_D \cdot E \cdot \alpha + B_2 \\ \text{Akceptor csatorna:} \quad & I_3(543, 560-610) = I_A + B_3 \end{aligned} \quad (30)$$

B₁, B₂ és B₃ a sejtek autofluoreszcenciájából származó háttér értékek, amelyek a jelöletlen mintákból detektálhatóak. Az átvilágítási tényezők, az α faktor definíciója, valamint az egyenletrendszer megoldása az irodalomban megtalálható [180, 181]. Az S₁ paraméter a csak donorral jelölt mintából határozható meg (I_A=0 és E=0) az alábbi képlettel:

$$S_1 = \frac{I_2 - B_2}{I_1 - B_1} \quad (31)$$

Az S_2 paraméter a csak akceptorral jelölt mintából határozható meg ($I_D=0$, $E=0$) a következő módon:

$$S_2 = \frac{I_2 - B_2}{I_3 - B_3} \quad (32)$$

Az α faktor a detektálás érzékenységére és a festékek kvantumhatásfokára jellemző szám, amely annak a mértéke, hogy az adott számú gerjesztett akceptortól származó, a transzfer csatornában detektált fluoreszcencia intenzitás hogyan aránylik ugyanennyi gerjesztett donortól származó, a donor csatornában detektált fluoreszcencia intenzitáshoz.

$$\alpha = \frac{I_2^A}{I_1^D} \cdot \frac{L_D}{L_A} \cdot \frac{\varepsilon(488)_D}{\varepsilon(488)_A} \quad (33)$$

L_D : a donorral jelölt antitest jelölési aránya (festék/antitest)

L_A : az akceptorral jelölt antitest jelölési aránya

ε : a donor ill. akceptor 488 nm hullámhosszhoz tartozó extinkciós koefficiense.

4.5. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiai mérések

Az MHC I glikoproteinek és az IL-2/15 receptorok sejtfelszíni mobilitását fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával mértük meg. A korrelációs mérésekhez Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot használtunk, melynek negyedik detektálási csatornája fotonyszámláló lavina fotodiódákkal van felszerelve. A mérésekhez 60× vízimmerziós ($NA=1,2$) objektívet használtunk. A mikroszkóp leírása a következő cikkekben megtalálható: [182] és [183]. Az FCS méréshez a sejteket Alexa 488 festékkel konjugált Fab antitestekkel jelöltük. Minden sejtben egy kiválasztott pontban mértünk, 25°C hőmérsékleten. Az Alexa 488 festéket az Ar-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, $<1 \text{ kW/cm}^2$ ($<1 \text{ }\mu\text{W}$) intenzitással. A festékek fluoreszcencia emisszióját 515-545 nm sávszűrővel szűrtük, s lavina fotodiódával detektáltuk. A fotodiódák kimenetén a fotonok beérkezése után egy 50 ns szélességű TTL jel jelenik meg, ezen TTL jelek felfutó élének a beérkezési idejét regisztráltuk NI7833 FPGA (National Instruments, Austin, TX) mérőkártyával, 80 MHz-es mintavételezési frekvenciával, saját készítésű szoftverrel. Az autokorrelációs görbéket a foton beérkezési adatokból, saját fejlesztésű programmal, multiple- τ algoritmussal számoltuk ki.

A görbék offline kalkulációja a rendelkezésre álló eszközökön néhány percet is igénybe vehet. A mikroszkóp beállításainak gyors optimalizálását a real-time adatmegjelenítés megkönnyíti, így az Alexa 488 kalibrációs oldatok autokorrelációjának kiszámolásához ALV 5000E hardware korrelátort (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m-b.H., Langen, Németország) használtunk. Az 50 nM Alexa 488 kalibrációs oldat (10 mM Tris-EDTA puffer, pH=7,4) görbéit 10×20 s mérési idővel határoztuk meg. A sejtenkénti FCS mérések hossza 100 s volt, az autokorrelációs görbéket ennek 5 másodperces részintervallumaira vonatkoztatva számoltuk ki, hogy a fotoelhalványulás okozta relatív intenzitáscsökkenést és az ebből származó műterméket az autokorrelációs függvényben minimalizáljuk.

A c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok mobilitási viszonyait a kollaborációs partnerünk laboratóriumában kifejlesztett [184] konfokális mikroszkóppal, valamint az arra felszerelt korrelációs modullal vizsgáltuk meg. Az EGFP és az mRFP1 gerjesztéséhez az Ar-Kr lézer (Omnichrome, Melles Griot, Bensheim, Németország) 488 nm-es, illetve 568 nm-es vonalát használtuk, a lézerek teljesítménye 5 és 10 kW/cm² között volt. A fluoreszcens jeleket 515–545, illetve 608–635 nm-es sávszűrővel szűrtük, majd lavina fotodiódákkal (SPCM-AQR-13, Perkin-Elmer, Wellesley, MA) detektáltuk. Az auto- és keresztkorrelációs függvényeket ALV-5000/E hardver korrelátorral határoztuk meg. A méréseket 23°C-on végeztük el. A konfokális térfogatok méretének meghatározásához 100 nM koncentrációjú fluoreszcein és Alexa 568 festékből készített kalibrációs oldatokat használtunk, a mérések hossza 60 s volt. A fókuszterfogat laterális sugarát a festékoldatok ismert diffúziós állandói (D), valamint a mért diffúziós idejük (τ_D) ismeretében az alábbi képlettel határoztuk meg:

$$\omega_{xy} = \sqrt{4 \cdot D \cdot \tau_d} \quad (34)$$

Az Alexa 488 diffúziós állandója 25°C hőmérsékleten 414 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ [185], a fluoreszceiné 425 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ [186], az Alexa 568 festéké pedig 332 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ [187]. A kalibrációs festékoldatok diffúziós idejei a 18–33 μs tartományba estek, így az ω_{xy} laterális sugarak 180–200 nm szélességűnek adódtak. A membránfehérjék diffúziós állandóit a becsült diffúziós idejükből, valamint a ω_{xy} sugarak ismeretében a 12. egyenlet segítségével számoltuk ki.

A fókuszterfogatban levő, Fab-vel megjelölt fehérjék átlagos számát az alábbi képlettel határoztuk meg:

$$F_0 / \left[\left(F/N \right)_{Fab, oldatban} \left(D/p \right)_{Fab} \right] \quad (35)$$

A képletben az F_0 a mérés kezdeti 400 ms-ban detektált fluoreszcencia intenzitás. Az F/N paraméter az adott antitest specifikus fényességét jelöli, a D/p a jelölési arányát (Dye to protein ratio, azonos a 33. egyenletben szereplő L értékkel). Az antitestek molekuláris fényességeit a 18. egyenlet felhasználásával, 50-100 nM koncentrációjú antitest tesztoldatok (10 mM Tris-EDTA pufferben, pH=7,4) segítségével számoltuk ki. Az MHC I, MHC II, valamint az IL-2R α és IL-15R α elleni antitestek molekuláris fényessége az alkalmazott lézer intenzitás mellett 1,4; 1,7; 1,7 és 1,7 kHz volt.

Az irreverzibilis fotokárosodástól és a fehérjék immobilis hányadától függő fotoelhalványodási hányadost (*bleaching fraction*) az alábbi képlettel számoltuk ki:

$$1 - \frac{F(t)}{F(0)} \quad (36)$$

A képletben az $F(0)$ a mérés első 300 ms idejében detektált, az $F(t)$, a mérés t -edik másodpercében detektált átlagos fluoreszcencia intenzitást jelöli. A hányados nagyságát $t=5$ s, 20 s és 100 s időpontokban határoztuk meg.

4.6. Mérések szuperfeloldású (STED) mikroszkóppal

A fluorofórok gerjesztéséhez 570 $\pm$ 5 és 647 nm-es, a gerjesztett állapot depléciójához (STED lézerek) 710 $\pm$ 10 és 750 $\pm$ 10 nm lézervonalakat használtunk. A méréseket Alexa 594 és ATTO-647N festékekkel végeztük el, fluoreszcenciájukat 615 $\pm$ 15 és 675 $\pm$ 15 nm-es sávszűrőkön keresztül detektáltuk. A mikroszkóp feloldási határa mindkét csatornában ~40 nm-nek adódott, a pixelek mérete 20 nm, az 512 $\times$ 512 pixeles kép mérete pedig 15 μ m² volt.

4.7. Digitális képfeldolgozás

4.7.1. Fehérjeklaszterek méretének meghatározása STED képekből

Az IL-2/15 receptorok, valamint az MHC I molekulák sejtfelszíni klaszterméreteinek meghatározását szuperfeloldású STED képek analízisével végeztük el. A képeket Richardson-Lucy konvolúcióval [131] simítottuk, 40 nm széles Lorentz-alakú PSF (point spread function) feltételezése mellett. Az IL-2/15R α és az MHC I fehérjeklaszterek nagyságát három módszerrel számszerűsítettük. A három módszer három eltérő megközelítésen alapul, így az eredmények direkt összehasonlítása csak nehezen kivitelezhető, ezért az adatok értelmezésénél célszerű a klaszterméret változások trendjeit alapul venni. A képelemzést és a függvényillesztéseket saját fejlesztésű Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) programokkal végeztem el.

Elsőként a fluoreszcencia intenzitásmaximumok félértékszélességét (full width at half maximum, FWHM) mértük meg. Az IL-2/15R α és MHC I molekulákról készült STED képek minden lokális maximumának szélességét 20 különböző szög mellett megmértük, és az egyes klaszterek nagyságát a különböző szögek alatt mért szélességek számtani átlaga jelentette.

Második módszerként a STED képek térbeli autokorrelációs függvényének alakjából következtettünk az IL-2/15R α és MHC I klaszterméretek nagyságára. Az autokorrelációs görbéket modellfüggvénnyel illesztettük, mely paraméterként tartalmazza az átlagos klaszternagyságot. Ha a sejtfelszínen több részecskeklaszter is található, belátható hogy a teljes korrelációs függvény három tag összegeként írható fel:

$$G(r) = G^{PSF}(r) + G^{klasztereken\ belül}(r) + G^{klaszterek\ között}(r), \quad (37)$$

ahol az első tag a PSF korrelációs függvénye, a második és harmadik tag pedig a részecskék klaszteren belüli és klaszterek közötti párkorrelációs függvénye. Mivel egy digitális kép diszkrét pixelekből áll, így az experimentális térbeli autokorrelációs görbét az alábbi képlet szerint számoltuk ki:

$$G(r) = N(r) \times \frac{\sum_{\substack{i,j \in ROI \\ k,l \in ROI}} I(i,j) \times I(k,l)}{\left(\sum_{i,j \in ROI} I(i,j) \right)^2} - 1 \quad (38)$$

ahol $I(i,j)$ az (i,j) -edik pixel intenzitása, r az (i,j) és (k,l) pixelek távolsága, $N(r)$ azon pixelek száma amelyek egymástól r távolságra vannak. (A $G(r)$ függvény egy adott r távolsághoz

tartozó értékének kiszámításakor az összegzésben csak azok a pixelpárok szerepelnek, melyek távolsága éppen r). Az empirikus korrelációs függvényeket 3 tagból álló Gauss függvénnyel illesztettük:

$$G(r) = \rho_1 \times e^{-r^2/w^2} + \rho_2 \times e^{-r^2/d^2} + \rho_3 \times e^{-r^2/g^2} \quad (39)$$

ahol w a PSF sugara, d a klaszterméret átlagértéke, g a klaszterek közötti átlagos távolság. A tagok különböző súlyait a ρ_1 , ρ_2 és ρ_3 együtthatók illesztésével vettük figyelembe. A képlet alkalmazhatóságát Monte-Carlo szimulációkkal teszteltem. A szimuláció során 40 nm-es feloldás mellett különböző sugarú, kör alakú klasztereket definiáltam. A klasztereken belül a részecskesűrűség állandó, a részecskék eloszlása véletlenszerű volt. A képek térbeli autokorrelációs függvényéből becsült klaszterméret lineáris függvénye volt a tényleges klaszterméretnek, így a szimuláció segítségével a sejtfelszíni klaszterizációs viszonyok változása jól modellezhető.

A klaszterek méreteit képszegmentációs módszerrel is meghatároztuk. A kétcsatornás képek mindkét csatornájához intenzitás küszöbértékeket rendeltünk, a küszöbértékek nagyságát a kisebb méretű lokális intenzitásmaximumok egyharmad részére állítottuk be. A molekulaklaszterek azonosításához az egymással szomszédos és a küszöbértéknél nagyobb intenzitású pixelek unióját képeztük, az analízis során ezen egybefüggő magas intenzitású területeket neveztük klasztereknek. Statisztikákat készítettünk a klaszterek területéről, összintenzitásáról, valamint a különböző színnel jelölt, független csatornában detektált klaszterek átfedésről is. Ezen módszerrel mind az egyedi MHC I és IL-2/15R α , mind a közös molekuláris ko-klasztereket azonosítottuk, és a közös molekuláris frakcióikat is számszerűsítettük (lásd alább).

4.7.2. Pearson-féle kolokalizáció meghatározása konfokális és STED képekből

A membránfehérjék és lipid tutajok kolokalizációját néhány száz nm-es felbontással kétcsatornás FV1000 konfokális mikroszkóppal készült képeken vizsgáltuk meg. A sejtek fedőlemeztől távoli felszínéről 3, egymástól 500 nm-re levő, $\sim 1 \mu\text{m}$ vastagságú optikai szeletet vettünk fel, a zajt 3×3 pixel méretű átlagoló szűrővel szűrtük, majd projekcióval a szeleteket egy képpé egyesítettük. Az IL-2/15R α és az MHC I molekulák együttállásának néhány tíz nm-es felbontással történő vizsgálatához kétcsatornás STED mikroszkóppal készült képeket elemeztünk. A domén szintű együttállás jellemzéséhez a konfokális mikroszkóppal készült

képeket használtuk. Az együttállás számszerűsítéséhez az alábbi statisztikát, a Pearson-féle korrelációs együtthatót használtam fel [41, 188, 189]:

$$C = \frac{\sum_i \sum_j (x_{i,j} - \bar{x})(y_{i,j} - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i \sum_j (x_{i,j} - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_i \sum_j (y_{i,j} - \bar{y})^2}} \quad (40)$$

Az $x_{i,j}$ és $y_{i,j}$ a mikroszkóp két csatornájában, az (i,j) indexekkel jellemzett pixelben detektált fluoreszcencia intenzitásokat jelöli. Az így definiált együtthatónak három nevezetes értéke van. Amennyiben a két csatornában a pixelek egymással egyenesen arányosak, úgy C értéke eggyel egyenlő. Ha a két csatorna ugyanazon pixeleiben az átlagtól mért eltérések ellentétes előjelűek, de az eltérések értéke egymással arányos, C értéke -1. Amennyiben a két csatornában az intenzitás eloszlások egymástól függetlenek, úgy a koefficiens várható értéke 0. Az analízisbe csak azokat a pixeleket vettük be, amely a sejtfelszínen voltak, valamint legalább az egyik csatornában egy előre definiált küszöbérték felett álltak. A számolásokat vagy LabVIEW [41] vagy saját fejlesztésű Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) rutinokkal végeztük el.

4.7.3. Molekuláris frakciók kiszámolása

Az IL-2 és -15 receptor α alegységek és az MHC I glikoproteinek egymással asszociált hányadait STED képek segítségével az alábbi módon becsültük meg. A csatornák intenzitásviszonyait figyelembe véve, az egyedi molekulákhoz tartozó intenzitásmaximumok feléhez definiáltuk a küszöbértékeket. Az asszociált hányadokat a sejtenként kijelölt területen az alábbi képlettel határoztuk meg [188]:

$$\frac{[IL - 2R\alpha] \cap [MHC I]}{[IL - 2R\alpha]} = \frac{\sum_{\substack{i,j \in ROI \\ \text{vörös} > \text{küszöb} \\ \text{zöld} > \text{küszöb}}} I^{\text{vörös}, IL-2R\alpha}(i, j)}{\sum_{\substack{i,j \in ROI \\ \text{vörös} > \text{küszöb}}} I^{\text{vörös}, IL-2R\alpha}(i, j)} \quad (41)$$

ahol $I^{\text{vörös}, IL-2R}(i, j)$ az IL-2R α intenzitása a vörös csatorna i,j -edik pixelében. A MHC I molekulák IL-2 vagy -15 receptorok melletti frakcióját analóg módon határoztuk meg. A képek analíziséhez saját fejlesztésű MATLAB szkripteket használtam.

4.9. Statisztikai elemzés

A mérési eredmények összehasonlítására szolgáló statisztikai tesztek (kétmintás t próba, valamint a kétmintás Kolmogorov-Szmirnov próba) beépített MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) függvényekkel és saját fejlesztésű programmal végeztem el.

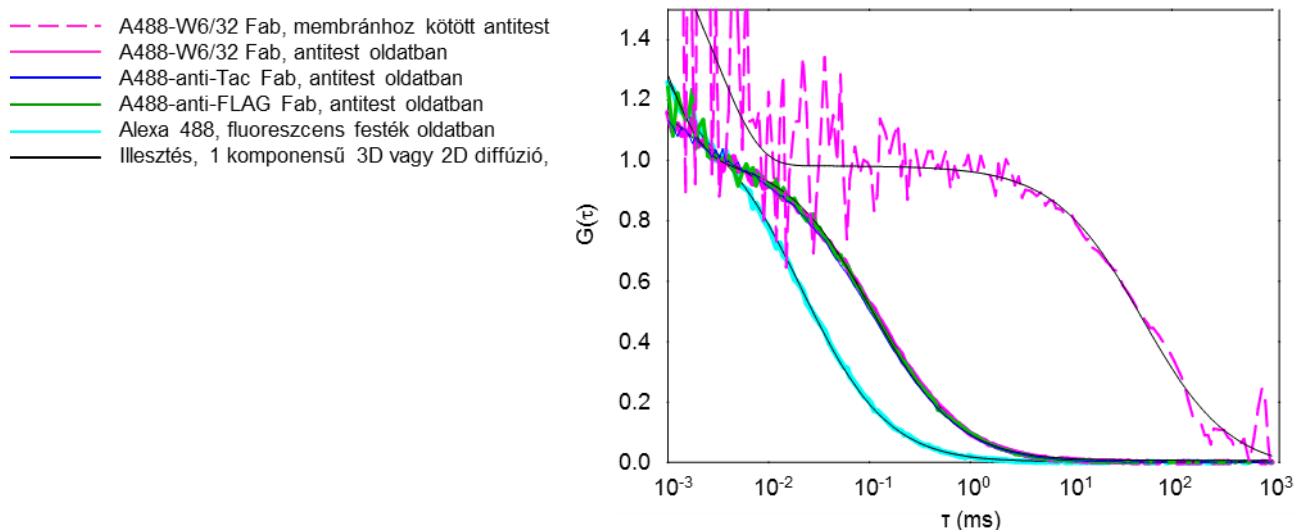
5. Eredmények

5.1. MHC I géncsendesítés hatásának a vizsgálata az IL-2/15 citokin receptorokra

Az MHC I molekulának a klaszterizációjában betöltött szerepének a vizsgálatához a glikoproteinek expresszióját siRNA transzfekcióval csökkentettük le. A fehérjemobilitásokat fluoreszcencia korrelációs mérésekkel, a klaszternagyságokat szuperfeloldású mikroszkópiával, membrán domén lokalizációkat Pearson korrelációs analízis segítségével vizsgáltuk meg.

5.1.1. Korrelációs mérések optimalizálása, alkalmazása

Az MHC I molekuláris mobilitást szabályozó szerepének vizsgálatához fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiai méréseket végeztünk. A mobilitások és klaszterizációs viszonyok kvantitív jellemzéséhez a fókuszterfogaton átdiffundáló fluoreszcens jelek autokorrelációs függvényeinek paraméterbecslését végeztük el. Az alábbi 12. ábrán tesztoldatok (Alexa 488, Alexa 488-W6/32-Fab, Alexa 488-anti-Tac-Fab, Alexa 488-anti-FLAG-Fab) valamint sejtfelszíni MHC I-hez kötött Alexa 488-W6/32-Fab demonstratív korrelációs függvényei láthatóak.

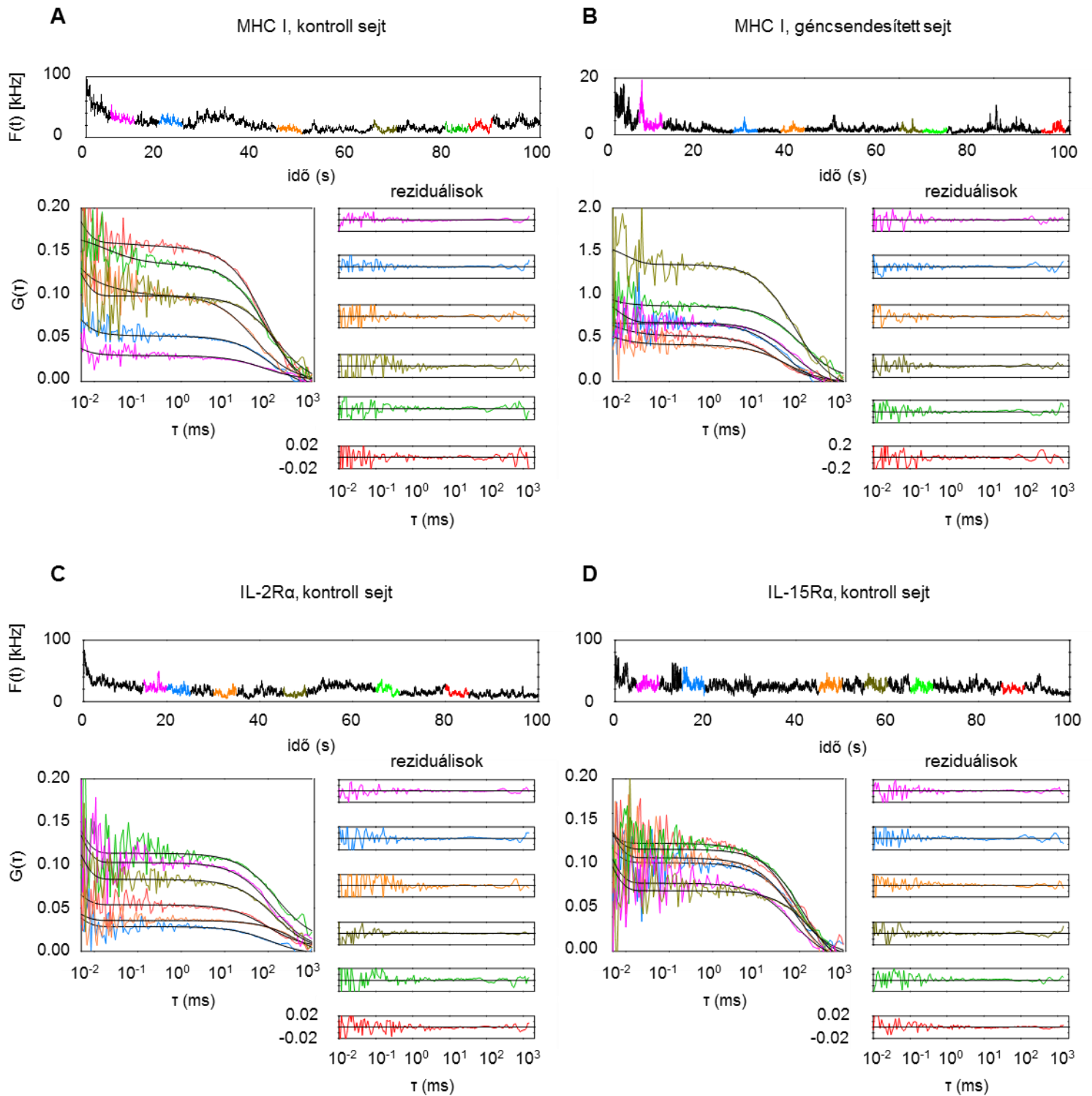


12. ábra: Tesztoldatok valamint Alexa 488W6/32-Fab-val jelölt sejtfelszíni MHC I normalizált korrelációs függvényei és illesztései

Az ábrán szabad és antitesthez konjugált Alexa 488 festékek TE oldatban (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH=7,4) mért, valamint az Fab sejtfelszínen mért autokorrelációs görbéi láthatóak. A korrelációs függvények jobbra tolódtak a csökkenő mobilitás, növekvő diffúziós idő sorrendjében. A488-W6/32-Fab, A488-anti-Tac-Fab és A488-anti-FLAG-Fab: Alexa fluor 488 festékekkel konjugált MHC I, IL-2R α és IL-15R α ellenes antitesteket jelöli.

Az autokorrelációs görbék általában jól illeszthetőek voltak egy komponens térbeli (oldat) vagy síkbeli (membrán) szabad diffúzióját leíró modellfüggvényekkel (11. és 13. egyenlet). Az autokorrelációs görbék láthatóan jobbra tolódtak a csökkent mobilitás miatt. Korábbi biofizikai mérések kimutatták, hogy az IL-2/15 receptorok valamint az MHC I glikoproteinek változatos sejtfelszíni mintázatokba rendeződnek [41, 42, 72]. A nm-es távolságú párkölcsönhatástól akár a mikrodomén szintű klaszterizációig is asszociálhatnak. Ezen inhomogén sejtfelszíni eloszlás egyik következménye, hogy a sejtfelszínen diffundáló molekulák autokorrelációs függvénye olykor jelentős mértékben eltérhet a 2D-ben szabadon diffundáló részecskék modellfüggvényétől. Az analízisbe csak azokat a görbéket vettük bele, amelyek jól illeszthetőek voltak a 2D-ben diffundáló részecskék próbafüggvényével.

Irodalmi adatok szerint a korrelációs mérések hosszának minimálisan $1000\times$ akkora kell lennie, mint a szóban forgó fehérjék diffúziós ideje [190]. $\omega_{xy}=200$ nm fókuszterefogat sugara mellett a membránfehérjék diffúziós ideje tipikusan néhány 10 ms; $\tau_D=50$ ms diffúziós időt feltételezve görbénként 50 s mérési idő lenne szükséges. A majdnem egyperces görbénkénti mérési idő inkompatibilis a sejtek felszínén tapasztalt hosszú távú változások miatt. Az irreverzibilis fotokárosodás következtében az átlagos fluoreszcencia időben csökken, így az autokorrelációs függvényben a diffúziós időnél hosszabb műtermék korrelációs idők is megjelenének. Mérési időnek 5 s-ot választottunk, ezen kompromisszumos választás mellett a diffúziós idők is feloldhatóak, valamint a mérési szakaszon belüli irreverzibilis fotodestrukció nem járt hosszabb korrelációs komponensek megjelenésével. A 100 s-os sejtenkénti mérési idő minden 5 s hosszúságú szakaszában kiszámoltuk és modellfüggvénnyel illesztettük a korrelációs függvényeket. A 13A és B ábra felső részén a sejtfelszíni Alexa-488-W6/32-Fab (MHC I) fluoreszcenciáját ábrázoltam az idő függvényében. Az adatok kontroll (A) és géncsendesített (B) sejtekből származnak. Az analízisbe csak azokat a korrelációs görbéket választottuk bele, amelyek illesztési maradékfüggvénye (*fit residual*) nullára szimmetrikus és kis amplitúdójú volt. Az adatanalízisből a 2D modellfüggvénytől szignifikánsan különböző experimentális görbéket szisztematikusan kizártuk. Hasonló eljárással szelektáltuk az IL-2R α (Alexa 488-anti-Tac-Fab) és IL-15R α (Alexa 488-anti-FLAG-Fab) autokorrelációs függvényeit is (13C és D ábra).



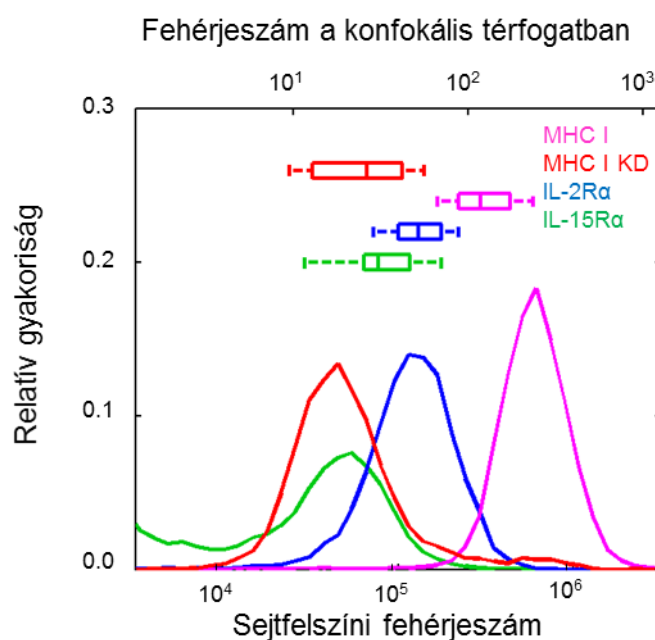
13. ábra: MHC I, IL-2Rα és IL-15Rα korrelációs görbéinek analízise

Minden sejtről 100 s-ig gyűjtöttük a fluoreszcenciát, és 5 s-os szakaszonként kiszámoltuk a korrelációs görbéket. Az analízisbe csak azokat a görbéket vettük bele, melyek jól illeszthetők voltak a 2D szabad diffúziót és triplet állapotot figyelembe vevő modellfüggvénnyel (folytonos vonal). A) MHC I (kontroll sejtek), B) MHC I (MHC I géncsendesített sejtek), C) IL-2Rα

(kontroll sejtek), D) IL-15R α (kontroll sejtek). Az eltérő színek a mérés különböző részintervallumaira vonatkoznak.

5.1.2. MHC I géncsendesítés hatása az IL-2/15R α alegységek és MHC I glikoproteinek sejtfelszíni részecskeszámaira

A 14. ábrán az IL-2R α és IL-15R α alegységek és MHC I glikoproteinek sejtenkénti molekulaszám eloszlását tüntettem fel kontroll és MHC I géncsendesített sejteken. Az siRNS-t 100 μ g/ml koncentrációban alkalmazva az eredeti MHC I mennyiség 5-10%-a maradt meg. A géncsendesítés specifikusan csak az MHC I glikoproteinek expresszióját csökkentette.



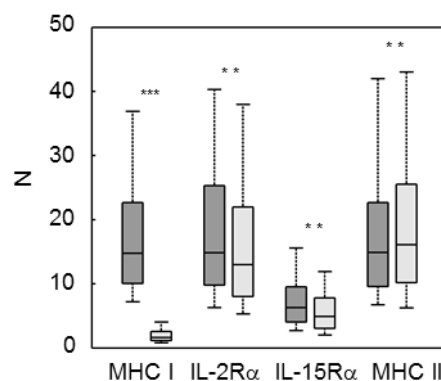
14. ábra: IL-2R α , IL-15R α és MHC I sejtenkénti molekulaszám eloszlása

A hisztogramok a sejtfelszíni sejtenkénti molekulaszám eloszlásokat ábrázolják a populációban, áramlási citométerrel, Dako Qifikit kalibrációs gyöngyökkel meghatározva (10^4 sejt/minta). A box & whisker ábrák az FCS mérésekben mintavételezett sejtek teljes sejtfelszíni molekulaszám becslései vannak feltüntetve (35. egyenlet alapján 25–35 sejt/minta). A teljes sejtfelszínre vonatkozó molekulaszámokat a konfokális térfogatban elhelyezkedő molekulák számából aránypárral számoltuk ki a konfokális térfogat laterális sugarát $\omega_{xy}=0,2$ μ m-nek, a sejtet 6,5 μ m sugarú gömbnek feltételezve. A hibavonalak szélei a minták 10 és 90%-os, a dobozok szélei a 25 és 75%-os percentiliseit jelölik.

Az FCS mérések végrehajtása során csak relatíve kis elemszámú mintavételezés lehetséges (mintánként $n \approx 20-40$ sejt), ezért célszerű volt összevetni a korrelációs mérésekből származtatott sejtenkénti részecskeszámokat a populációban mértékekkel (hisztogramok, $n > 10\,000$ sejt). Az 14. ábra felső részén a korrelációs mérések intenzitásértékeiből származtatott sejtfelszíni részecskeszámok vannak „box & whisker” ábrázolással feltüntetve. A konfokális

térfogatban lévő részecskeszámokat a 35. egyenlet segítségével számoltuk ki, ez alapján becsültük a részecskeszámot a teljes sejtfelszínre. Az FCS mérésekkel mintavételezett sejteken számolt részecskeszámok átfedésben voltak a teljes populációban áramlási citometriával meghatározottakkal.

A korrelációs függvények amplitúdójából a fókuszterfogatban diffundáló részecskék átlagos száma meghatározható, a háttérkorrekciót a 17. egyenletnek megfelelően végeztük el. Az alábbi 15. ábrán az MHC I, MHC II és IL-2/15R α korrelációs függvényeiből számolt átlagos részecskeszámokat tüntettem fel, MHC I géncsendesítés előtt és után.



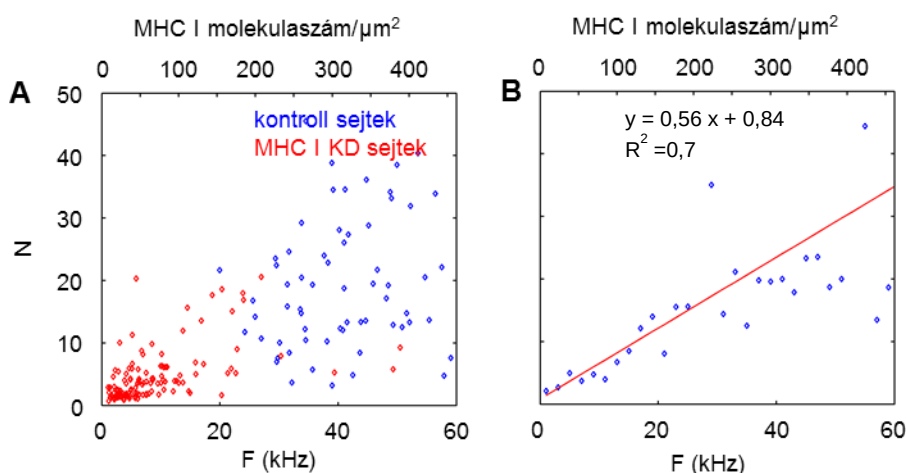
15. ábra: Részecskeszámok (N) meghatározása FCS görbék analizisével

A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov tesztel végeztük el:

***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,1$; A hibavonalak szélei a minták 10 és 90%-os, a dobozok szélei a 25 és 75%-os percentiliseit jelölik. $n \sim 25-35$ sejt/minta.

A géncsendesítés következtében az MHC I átlagos részecskeszáma körülbelül tizedrészére csökkent, összhangban a kalibrációs gyöngyökkel meghatározottakkal. A többi fehérje mintaátlagai közötti eltérések feltehetően a sejtek kiválasztásának az inhomogenitását tükrözik, a populációból meghatározott sejtfelszíni részecskeszámok nem különböztek egymástól. Fontos megjegyeznünk, hogy a konfokális térfogatban levő fehérjék száma nagyobb lehet, mint az amplitúdókból származtatott részecskeszám. A különbség egyrészt származhat abból, hogy a membránfehérjék klaszterizálódhatnak, immobilizálódhatnak – ezáltal a diffundáló részecskék látszólagos száma kevesebb lehet, mint a tényleges részecskeszám. Másrészt, a különbség származhat abból, hogy heterogén fényességű részecskék esetén az átlagos részecskeszámhoz egy komponens részleges amplitúdójának a fényesség négyzetével arányos járuléka van (14. és 15. egyenlet), a kisebb fényességű komponensek részleges amplitúdója kisebb, mint a tényleges részarányuk, így az amplitúdó reciprokából számolt átlagos részecskeszám alulbecsüli a tényleges értékeket.

A 16A ábrán az MHC I diffundáló részecskeszámait az adott mérési szakaszban vett átlagintenzitás függvényében ábrázoltam. Az ábrán a géncsendesített és a kontroll mintából mintavételezett adatokat más-más színnel jelöltem.



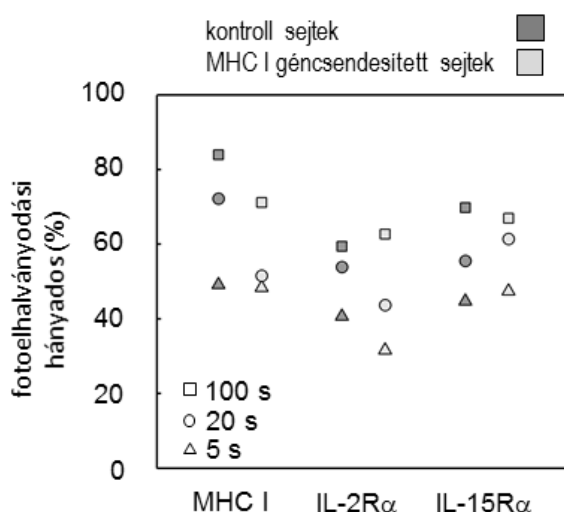
16. ábra: Az amplitúdóból és az intenzitásból számolt részecskeszámok összehasonlítása

A) Az adott mérési szakaszban meghatározott részecskeszámok (N) az átlagos fluoreszcencia (F) függvényében. Kék: kontroll, piros: MHC I géncsendesített sejtek. B) Az előbbi adatok uniójából készült statisztika: átlagos részecskeszám az egyes intenzitásosztályokban. Az osztályok szélessége (*bin width*) 2 kHz.

Az amplitúdóból becsült részecskeszámok pozitívan korreláltak az abban a mérési szakaszban számolt átlagos fluoreszcencia intenzitással illetve fehérjeszámmal. A 16B ábrán a géncsendesített és kontroll sejtek adatainak uniójából készült grafikon látható, mely az intenzitás osztályokhoz tartozó átlagos részecskeszámokat mutatja. Az adatpontokra illesztett egyenes egyenletét az ábrán tüntettem fel. Az adatok uniójából készült statisztika is alátámasztotta, hogy az amplitúdóból becsült részecskeszám monoton függvénye az átlagos fluoreszcencia intenzitásnak.

5.1.3. IL-2/15R α alegységek és MHC I aggregációs állapotának becslése a molekuláris fényességek analízisével

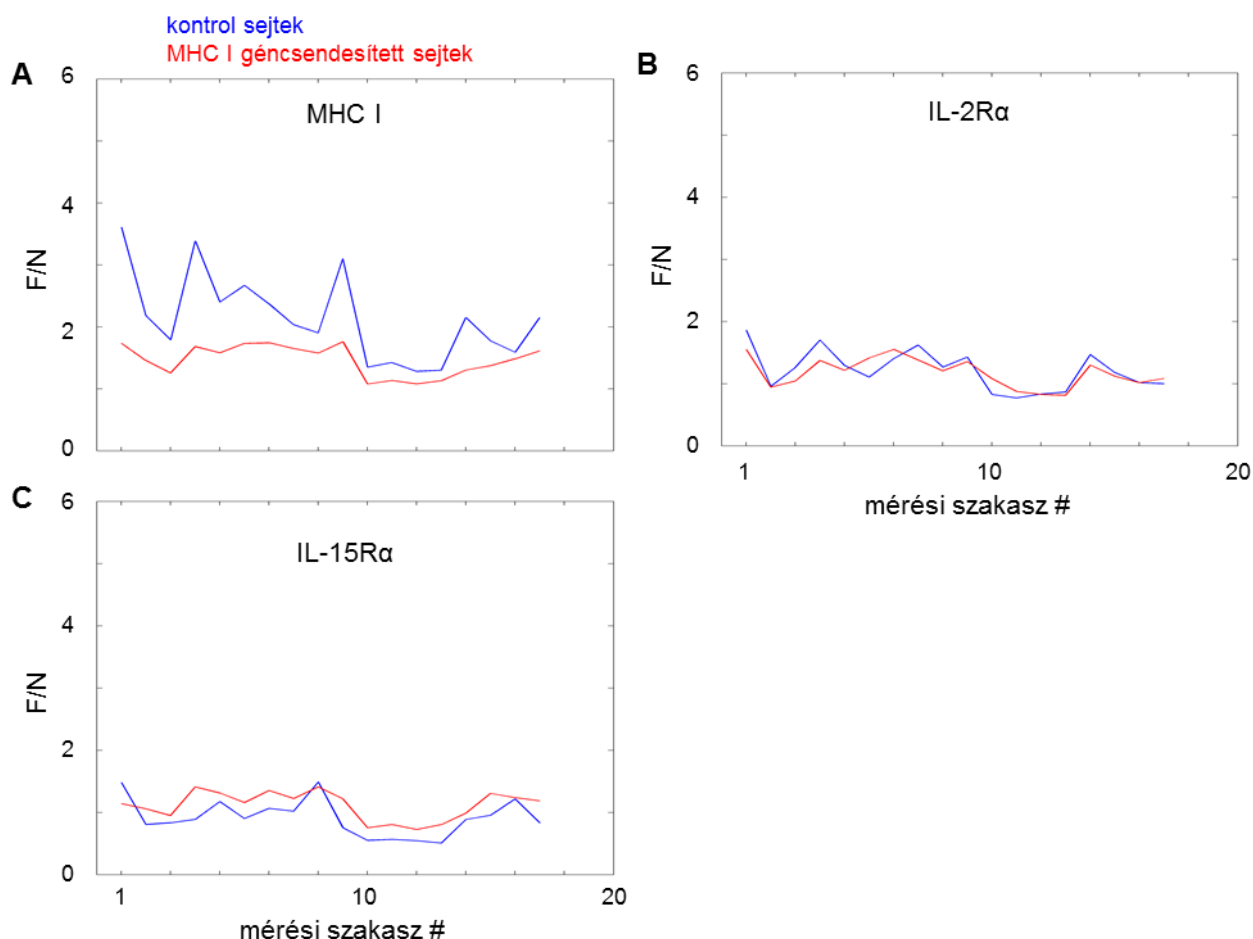
A molekuláris fényesség (F/N) ismeretében a fehérjék homoaggregációs képességét lehet megbecsülni, a molekuláris fényesség nagysága egyenlő egy diffundáló részecskétől időegység alatt detektált fotonok számával. A molekuláris fényességek összehasonlítása előtt megvizsgáltuk, hogy vajon a fluoreszcencia intenzitás milyen mértékben csökken a mérést megkezdését követően. A csökkenés mértékét a fotoelhalványodási hányadossal (*bleaching fraction*) számszerűsítettük, lásd 36. egyenlet. A hányados értéke függ a fehérjék immobilis hányadától és az irreverzibilis fotodestrukció valószínűségétől. A mérések során általában egyik tényező sem elhanyagolható, így fotoelhalványodási hányados általában nullától különböző. A 17. ábrán az MHC I és az IL-2/-15R α alegységeinek az átlagos fotoelhalványodási hányadosait ábrázoltam a mérés kezdete után 5-20-100 s időpontokban, kontroll és géncsendesített sejteken egyaránt.



17. ábra: Az MHC I és az IL-2/-15R α alegységek átlagos fotoelhalványodási hányadosai

Mivel a fotoelhalványodási hányadosok 20 s után meghaladták az 50%-ot, így indokolt, hogy csak a mérési idő első 15 s-ából származó F/N adatokból készítsünk statisztikákat. A sejtfelszínen diffundáló antitestek molekuláris fényességét az adott mérési szakaszban számolt háttérrel korrigált átlagos fluoreszcencia intenzitás (F_{tot}), és abban a mérési szakaszban meghatározott átlagos korrigált részecskeszám (N_{kor}) hányadosaként számoltuk ki, a 18. egyenlet felhasználásával. A molekuláris fényesség arányos az együtt diffundáló komplexben levő fluorofórok számával. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy a komplexek molekuláris fényessége a mérés kezdetét követően csökkentő tendenciát mutat, vélhetően a festékmolekulák

irreverzibilis fotoelhalványodása következtében. Az 18. ábrán az Alexa 488-W6/32-Fab (MHC I), az Alexa 488-anti-Tac Fab (IL-2R α), valamint az Alexa 488-anti-FLAG Fab (IL-15R α) átlagos molekuláris fényességét tüntettem fel az egyes mérési szakaszokban, kontroll és MHC I géncsendesített sejteken.



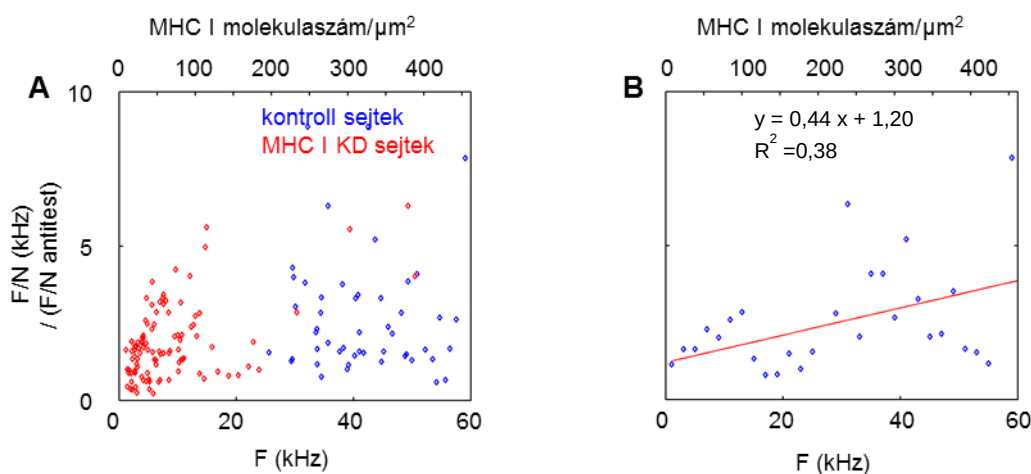
18. ábra: Az MHC I, IL-2R α és IL-15R α molekuláris fényességei az egyes mérési szakaszokban

Az F/N értékek geometriai átlagai láthatóak a mérés 5 s-os szakaszaiban. A molekuláris fényességek az antitestek F/N értékeivel normalizálva voltak. n=25-35 sejt/minta

Mivel a molekuláris fényesség csökkenő tendenciát mutatott a mérési idő előrehaladtával, így az FCS görbék illesztett paramétereinek analízisébe csak az első 15 s-ból vett értékeket vettük bele.

A 19. ábrán az egyes mérési szakaszokban az MHC I molekuláris fényességét ábrázoltam az átlagos MHC I intenzitás függvényében. A géncsendesített és a kontroll mintából mintavételezett adatokat más-más színnel jelöltem. A 19B ábrán a géncsendesített és kontroll

sejtek adatainak uniójából készült ábra látható, az adatpontokra illesztett egyenes egyenletét az ábrán tüntettem fel.

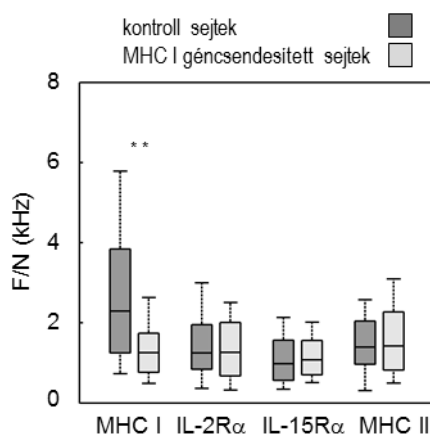


19. ábra: MHC I molekuláris fényessége az intenzitás függvényében

Az ábrán az MHC I aggregáció mértéke (F/N) az MHC I expressziójával arányos fluoreszcencia intenzitás függvényében van ábrázolva. A) kontroll (kék) és géncsendesített sejtekről (piros) B) az adatok uniójából készült statisztika: adott F intenzitás melletti átlagos F/N . A fluoreszcencia intenzitás osztályok tartománya (*bin width*) 2 kHz volt.

Az F/N értékek pozitívan korreláltak az abban a mérési szakaszban számolt átlagos fluoreszcencia intenzitással. Megállapítottuk, hogy a molekuláris fényesség lineárisan nő a fehérjetartalom függvényében, magasabb lokális expressziós szint mellett az MHC I fehérjék jobban aggregálódnak.

A 20. ábrán az MHC I és az IL-2/-15 receptorok α alegységeinek molekuláris fényességeit ábrázoltam kontroll és géncsendesített sejteken; az adatok a mérési idő első 15 s-ából származnak.



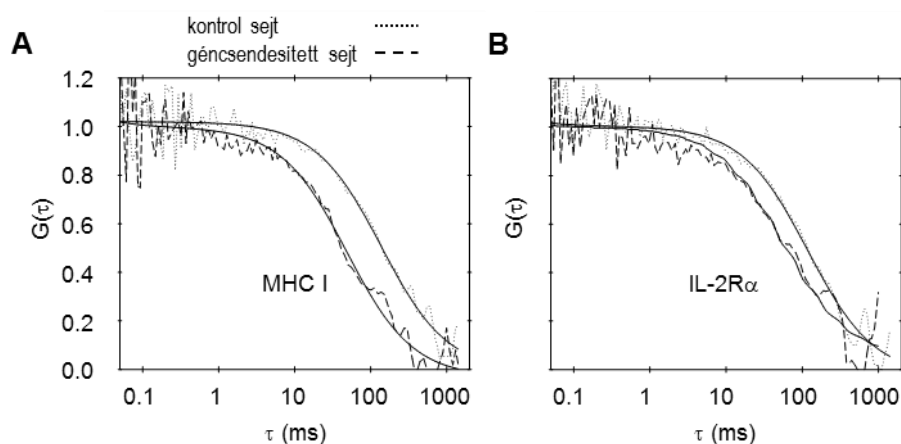
20. ábra: MHC I és IL-2/-15R α molekuláris fényessége (F/N) kontroll és géncsendesített sejteken

Az F/N értékeket normalizáltuk az antitestek molekuláris fényességével, így a fehérje/aggregátum értékek láthatóak. A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük el: **: $p < 0,01$; A hibavonalak szélei a minták 10 és 90%-os, a dobozok szélei a 25 és 75% percentiliseit jelölik. $n \sim 25-35$ sejt/minta.

A fenti adatokból megállapítottuk, hogy az MHC I homoaggregációja szignifikánsan csökkent a géncsendesítés következtében. Eredményeink szerint mind az IL-2/15R α , mind az MHC II homoaggregációs hajlandósága független az MHC I jelenlététől.

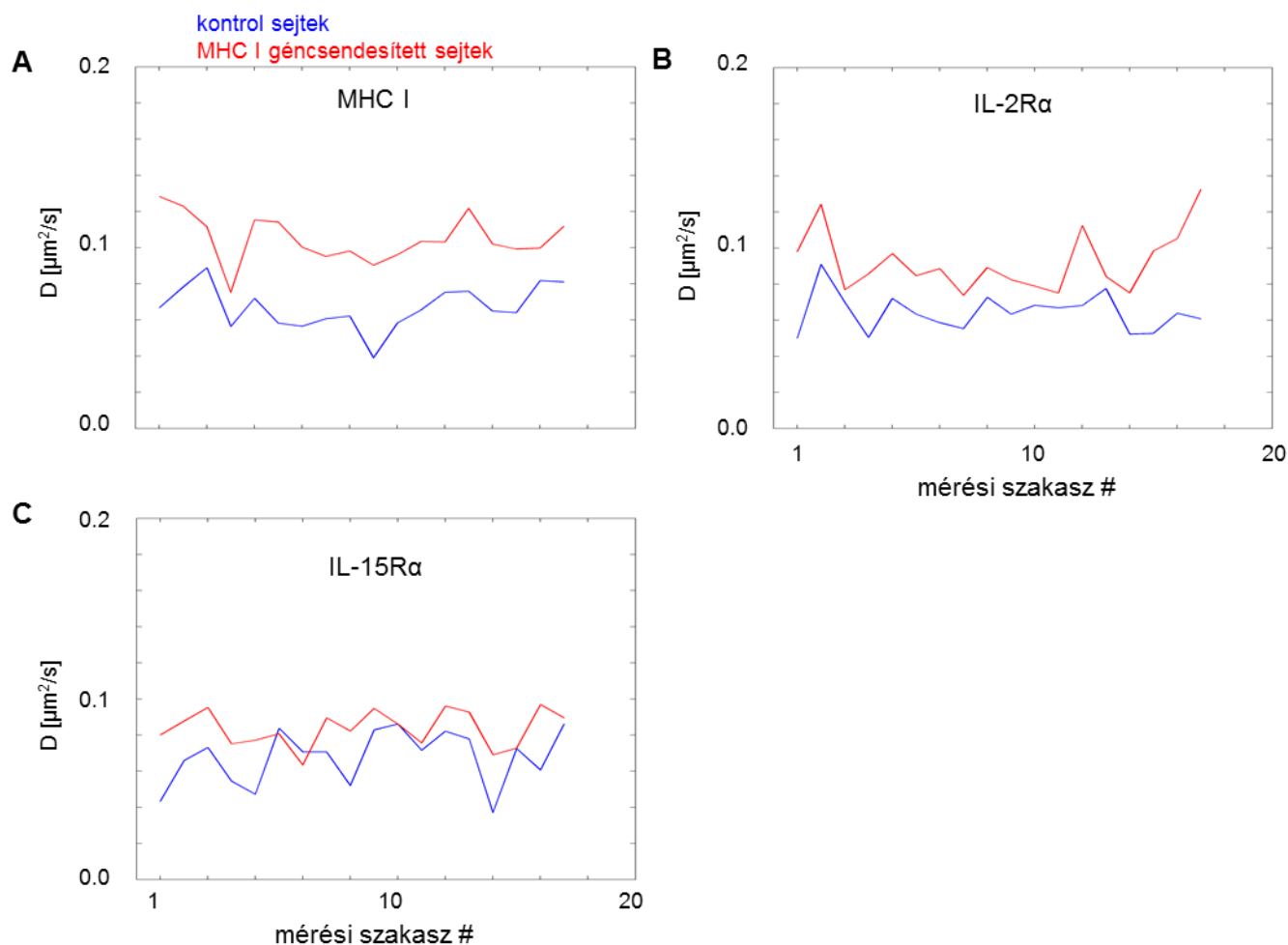
5.1.4. IL-2R α , IL-15R α alegységek és MHC I mobilitásának változása MHC I géncsendesítés hatására

Amennyiben a fehérjék aggregációja megváltozik, a megváltozott aggregációs méretnek következtében azt várhatjuk, hogy a molekuláris mobilitásuk is változni fog. A 21A és B ábrán az MHC I és IL-2R α reprezentatív normalizált autokorrelációs függvényeit, illetve azok illesztéseit ábrázoltam kontroll és géncsendesített sejteken.



21. ábra: of MHC I és IL-2R α normalizált autokorrelációs görbéi

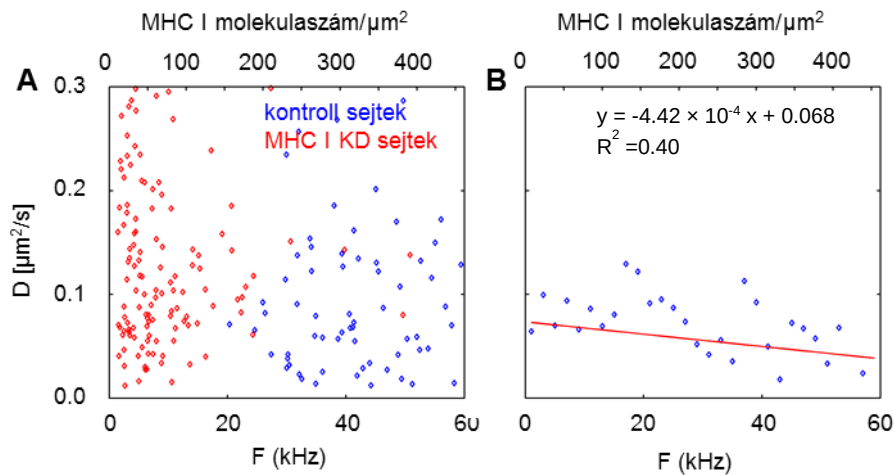
Az MHC I géncsendesített sejteken mért görbék balra tolódtak, így az adatok részletes elemzésekor az átlagos diffúziós idők csökkenése, a fehérjék átlagos mobilitásának a növekedése várható. A 22. ábrán az átlagos diffúziós állandókat tüntettem fel minden egyes mérési szakaszban.



22. ábra: Az MHC I, IL-2Rα és IL-15Rα diffúziós állandói az egyes mérési szakaszokban

Az D értékek geometriai átlagai láthatóak a mérés 5 s-os szakaszaiban. A) MHC I (Alexa 488-W6/32 Fab), B) IL-2Rα (Alexa 488-anti-Tac Fab), C) IL-15Rα (Alexa 488-anti-FLAG Fab), kontroll sejtek: kék, géncsendesített sejtek: piros, $n=25-35$ sejt/minta

A molekuláris fényességgel ellentétben a fehérjék mobilitásai függetlennek voltak a mérés kezdete óta eltelt időtől, így indokolt az összes mobilitási adatból statisztikát számolni. Megvizsgáltuk, hogy a diffúziós állandó milyen trend szerint függ az átlagos fehérjetartalomtól. A 23A ábrán az adott mérési szakaszban az MHC I átlagos diffúziós állandóját tüntettem fel az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MHC I tartalom) függvényében. A 23B ábrán a géncsendesített és kontroll sejtek adatai uniójából készült grafikon látható, az adatpontokra illesztett egyenes egyenletét az ábrán tüntettem fel.

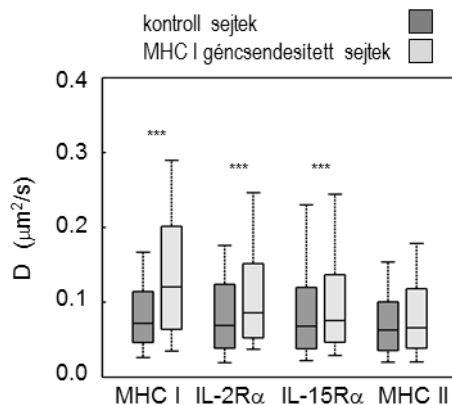


23. ábra: MHC I diffúziós állandója az MHC I sejtfelszíni sűrűségének függvényében

Az ábrán az MHC I (Alexa 488-W6/32 Fab) diffúziós állandója (D) az átlagos MHC I tartalom függvényében van ábrázolva. A) kontroll (kék) és géncsökkentett sejtekről (piros), B) az adatok uniójából készült statisztika, az fluoreszcencia intenzitás osztályok tartománya (*bin width*) 2 kHz volt, $n=25-35$ sejt/minta

Megállapítottuk, hogy az MHC I glikoproteinek átlagos diffúziós állandója negatívan korrelált az abban a mérési szakaszban számolt átlagos fluoreszcencia intenzitással, a több fehérjét tartalmazó klaszterek lassabban diffundálnak.

A 24. ábrán az MHC I és az IL-2/15 receptorok α alegységeinek mobilitását ábrázoltam kontroll és géncsökkentett sejteken.

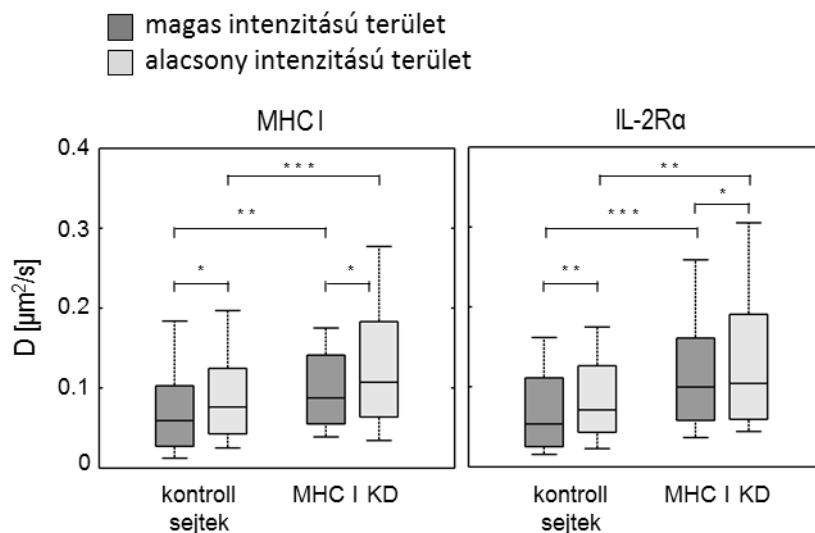


24. ábra: MHC I és IL-2/15R α diffúziós együtthatói kontroll és géncsökkentett sejteken

A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük el: ***: $p < 0,001$; A hibavonalak szélei a minták 10 és 90%-os, a dobozok szélei a 25 és 75% percentiliseit jelölik. 25–35 sejt/minta.

Megállapítottuk, hogy mind az MHC I, mint az IL-2/15R α mobilitása szignifikánsan nagyobb volt az MHC I géncsökkentett sejteken. Ezen adatok ismeretében kijelenthetjük, hogy az MHC I glikoproteineknek a sejtmembránban jelentős szerepe lehet a mobilitás szabályozásában.

Megvizsgáltuk, hogy vajon a sejtfelszínen található inhomogén mintázatokban milyenek a lokális fehérjemobilitások. A sejtek magas és alacsony intenzitású területein vizsgáltuk az IL-2/15R α alegységek diffúziós állandóit (25. ábra).



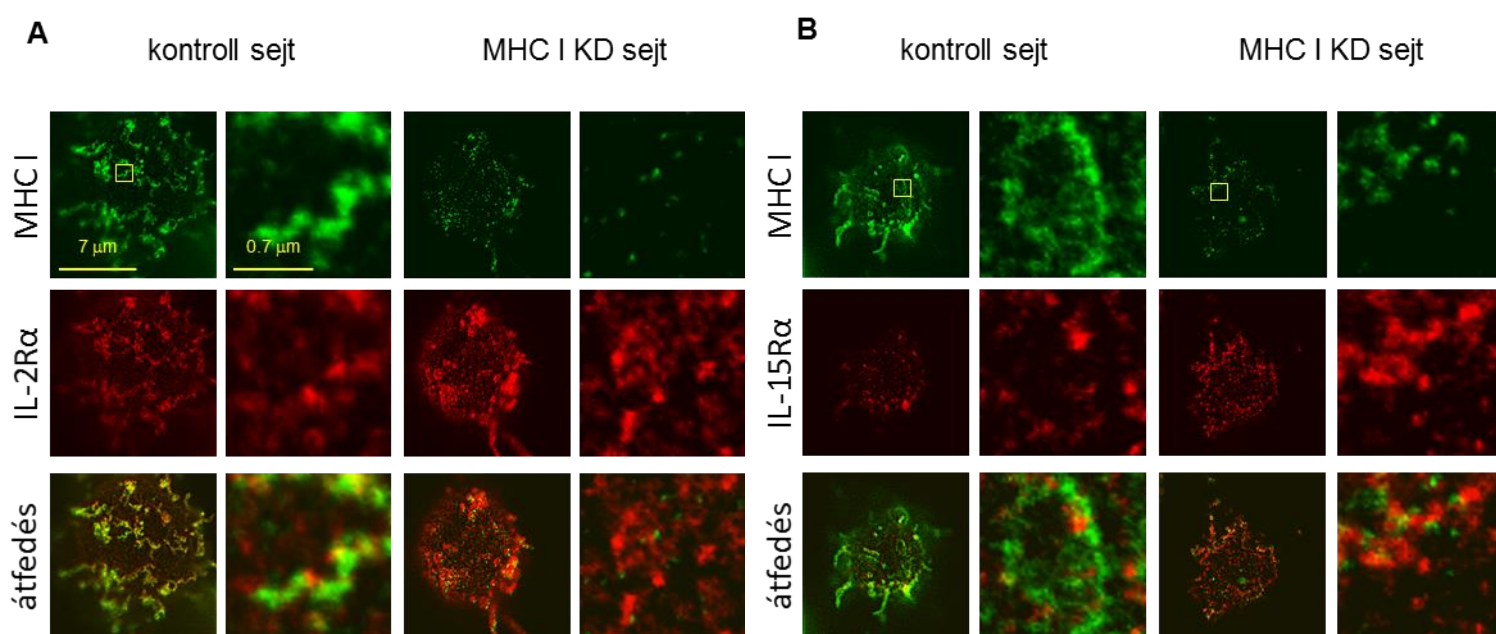
25. ábra: IL-2R α és IL-15R α diffúziós együtthatói klaszterekben és azokon kívül kontroll és géncsendesített sejteken

A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük el: ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; A hibavonalak szélei a minták 10 és 90%-os, a dobozok szélei a 25 és 75% percentiliseit jelölik. 25–35 sejt/minta.

Megállapítottuk, hogy mind az IL-2R α , mind az IL-15R α alegységek mobilitása csökkent azon területeken, ahol a lokális koncentrációjuk magasabb volt. Adataink teljes összhangban voltak a korábbi eredményekkel, miszerint az MHC I expressziójának csökkentése az IL-2/15R α fehérjemobilitások növekedését eredményezte.

5.1.5. Sejtfelszíni fehérjemintázatok vizsgálata szuperfeloldású mikroszkóppal

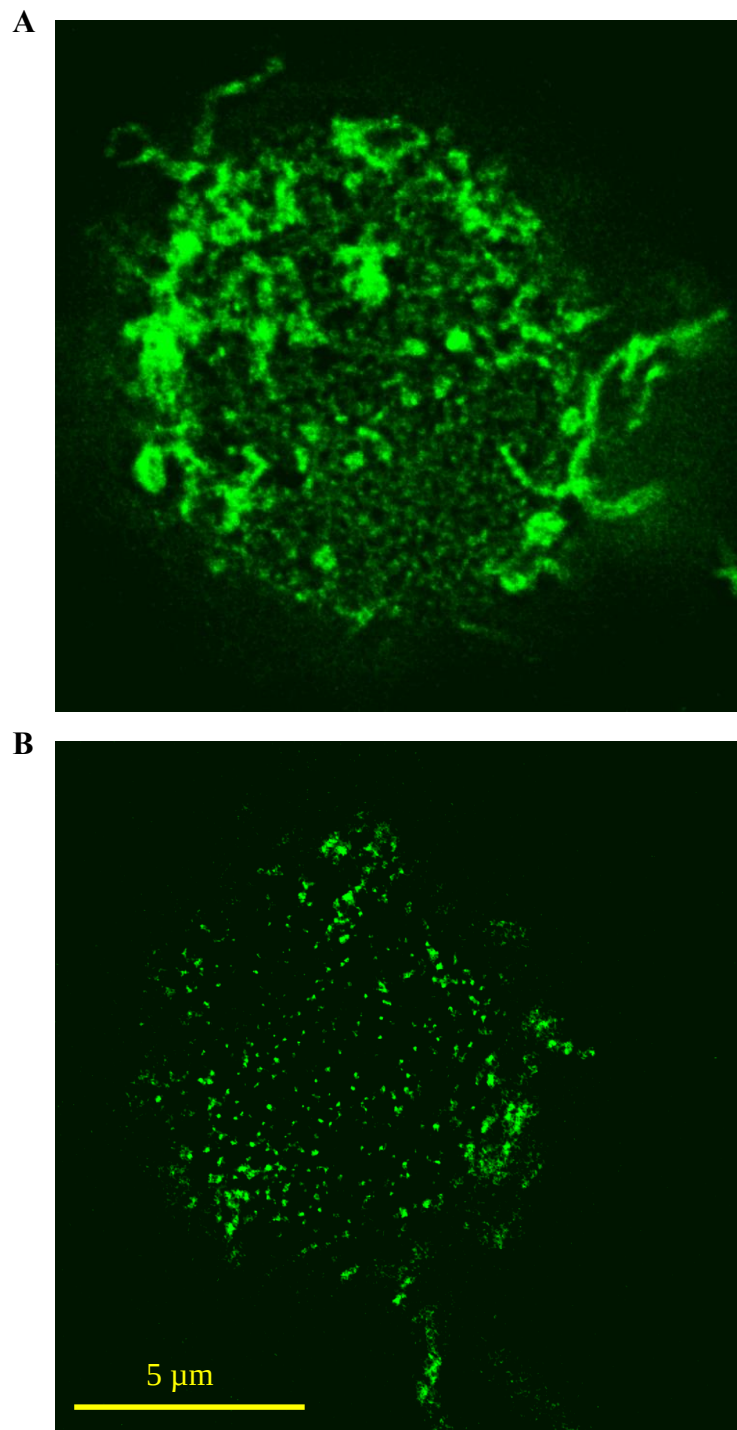
Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiai módszerrel kimutattuk, hogy a vizsgált fehérjék mobilitására és aggregációs képességére szignifikáns hatással volt az MHC I expressziójának csökkentése. Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy az MHC I expresszióinak mind az interleukin receptorok, mind az MHC I sejtfelszíni klaszterizációjának szabályozásában szerepe lehet. Hipotézisünket szuperfeloldású mikroszkópos képek analízisével teszteltük. A ko-disztribúciós analízis lehetősége érdekében mind a kontroll, mind a kezelt sejteket duplán jelöltük, a zöld csatornában MHC I ellenes antitesttel, a vörös csatornában IL-2R α - vagy IL-15R α -ellenes antitestekkel (26. ábra).



26. ábra: Az MHC I és IL-2R α / IL-15R α sejtfelszíni eloszlása STED képeken

A) MHC I és IL-2R α ; B) MHC I és IL-15R α . MHC I: Alexa 594-W6/32 antitest. (zöld); IL-2R α : ATTO 647N-anti-Tac (piros), IL-15R α ATTO 647N-anti-FLAG (piros). A sárga szín az átfedő membránrégiókat jelöli.

A szuperfeloldású képeken láthatóvá váltak a molekuláris klaszterek, a kinagyított képeken jól látható, amint az MHC I klaszterek mérete csökkent az MHC I géncsökkentés eredményeképpen (27. ábra). A klaszterméretek kvantitatív jellemzéséhez három különböző megközelítésen alapuló képelemzési eljárást használtunk.

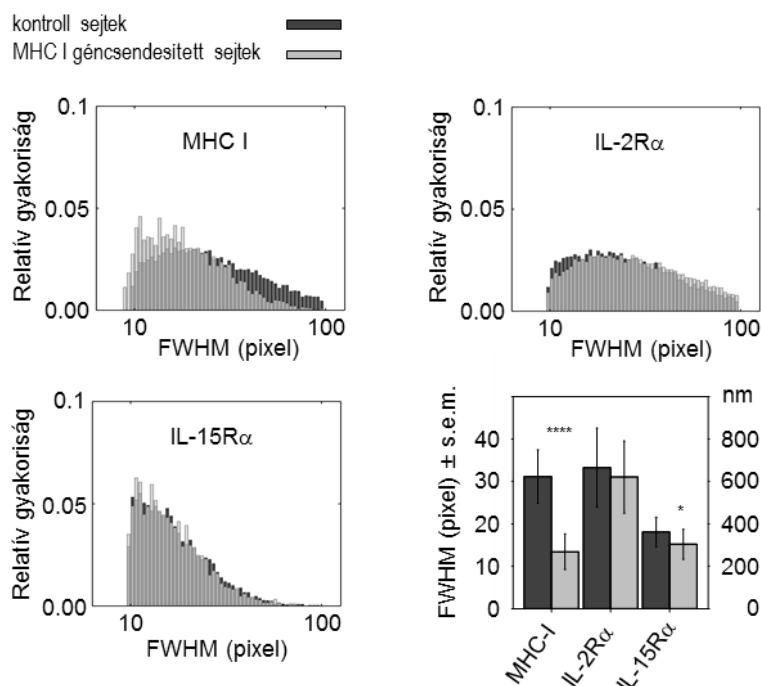


27. ábra: Az MHC I sejtfelszíni eloszlása STED képeken

MHC I: Alexa 594-W6/32 antitest, A) kontroll sejt, B) MHC I géncsendesített sejt

5.1.6. Fehérjeklaszterek méretének a meghatározása FWHM mérésével

Elsőként a fluoreszcencia intenzitásmaximumok félértékszélességét (full width at half maximum, FWHM) mértük meg. Az IL-2/15R α alegységek valamint az MHC I klaszterek félértékszélességének sűrűséghistogramja a 28. ábrán látható, mind kontroll mind a géncsendesített sejtekről. Géncsendesített sejteken az MHC I klaszterméret sűrűséghistogramja balra tolódott, az átlagos klaszterméret 640 ± 120 nm-ről 260 ± 80 nm-re csökkent (átlag $\pm$ SEM), a különbség szignifikáns volt.



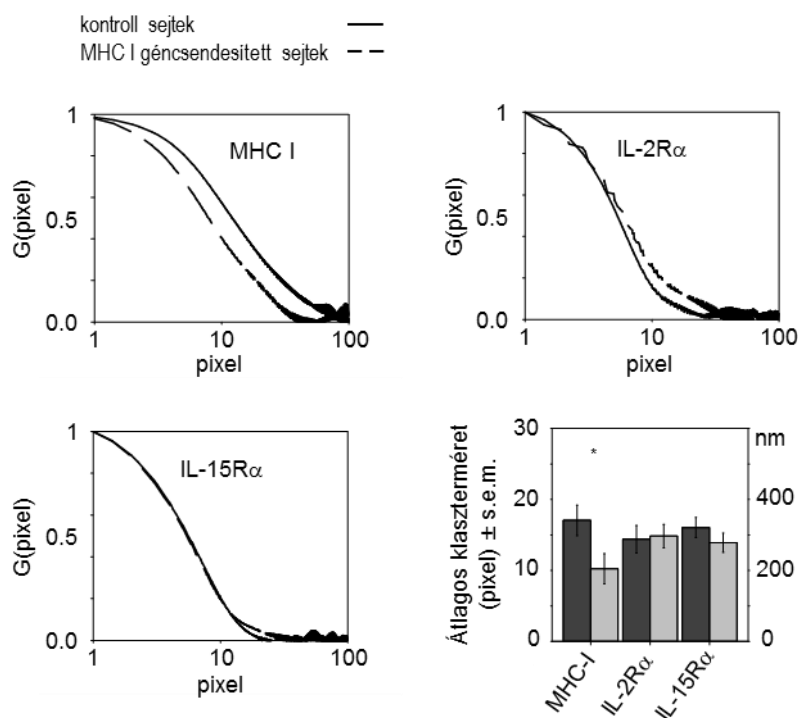
28. ábra: Az MHC I, IL-2R α és IL-15R α klaszterméret eloszlása

Az ábrán a géncsendesítés okozta klaszterméret változás látható. A histogramok az MHC I, IL-2R α és IL-15R α klaszterméret eloszlását ábrázolják kontroll és géncsendesített sejteken. A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük el: ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; 10-15 sejt/minta.

Az IL-2R α histogramja nem változott az MHC I géncsendesítés hatására, az átlagértékek közötti különbségek nem voltak szignifikánsak. Az IL-15R α átlagos klasztermérete a géncsendesített sejteken 360 ± 60 nm volt, a kontroll sejteken 300 ± 60 nm (átlag $\pm$ SEM).

5.1.7. Fehérjeklaszterek méretének meghatározása térbeli autokorrelációs függvénynel

Második módszerként a szuperfeloldású képek térbeli intenzitás korrelációs függvényeinek paraméterbecslésével határoztuk meg a fehérjek sejtfelszíni klaszterméreteit. A géncsendesített és kontroll sejtekből meghatározott reprezentatív korrelációs görbék a 29. ábrán láthatóak.



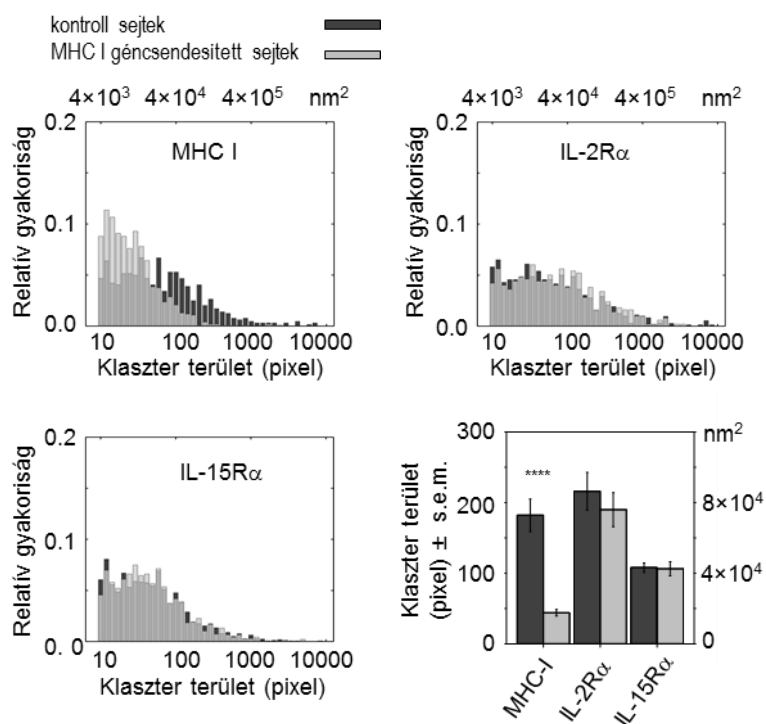
29. ábra: Az MHC I, IL-2R α és IL-15R α térbeli autokorrelációs függvényei és klaszterméretei

Az ábrán reprezentatív korrelációs függvények láthatóak kontroll és géncsendesített sejteken. A statisztikai összehasonlításokat kétmintás t teszttel végeztük el: * $p < 0,05$, 10-15 sejt/minta.

A függvényeket három exponenciális függvény összegével értelmezett modellfüggvénnyel illesztettük meg (39. egyenlet). Az első tag paraméterével (w) a PSF kiszélesedésének nagyságát lehet megbecsülni. A második exponenciális taggal (d) a fehérjeklaszterek átlagos méretét becsültük, a harmadik tag paramétere (g) a klaszterek közötti távolsággal arányos. Az MHC I klaszterek átlagos mérete szignifikánsan csökkent a géncsendesítés hatására, 340 ± 120 nm-ről 200 ± 120 nm-re (átlag $\pm$ SEM). Az IL-2R α és IL-15 R α átlagos klaszterméretei a géncsendesítés hatására nem változtak szignifikánsan.

5.1.8. Fehérjeklaszterek méretének meghatározása képszegmentációs módszerrel

Harmadik eljárásként a fehérjeklaszterek méretét képszegmentációs eljárással kvantitáltuk. Az egy klaszterbe tartozó, azaz intenzitásküszöb feletti, egymással szomszédos pixelek területeinek sűrűséghistogramjait az 29. ábrán ábrázoltam.



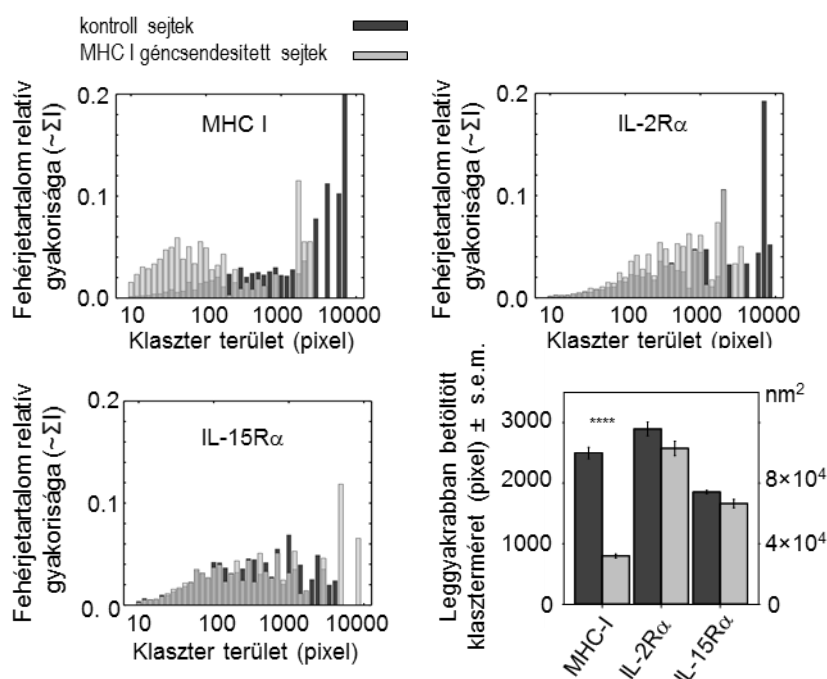
28. ábra Az MHC I, IL-2Rα és IL-15Rα klaszterméret terület eloszlása

A hisztogramok az MHC I, IL-2Rα és IL-15Rα klaszterméret eloszlását ábrázolják kontroll és géncsenedesített sejteken. A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük el: ****p < 0,0005; n=10-15 sejt/minta.

Géncsenedesített sejteken az MHC I klaszterméret sűrűséghistogramja a kontroll mintához képest balra tolódott, a területek átlagértéke $(7,2 \pm 0,9) \times 10^4 \text{ nm}^2$ -ről szignifikánsan csökkent $(1,8 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ nm}^2$ -re. Az IL-2Rα és IL-15Rα klaszterei által lefedett terület átlagosan független volt az MHC I jelenlététől, az átlagos klaszter nagyságok nem különböztek szignifikánsan egymástól.

5.1.9. Fehérjeklaszterek méret szerinti betöltöttségének a vizsgálata

A képek analízise során azt is megvizsgáltuk, hogy vajon a klaszterek méret szerinti átlagos fehérjetartalma hogyan változik a géncsendesítés hatására. A klaszterméret betöltöttségek sűrűséghistogramjait az 29. ábrán ábrázoltam.



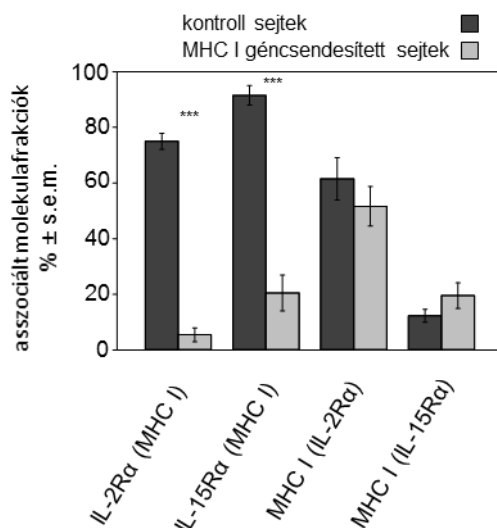
29. ábra Az MHC I, IL-2Rα és IL-15Rα fehérjeklaszterek méret szerinti betöltöttsége

Az ábrán a klaszterméret szerinti átlagos fehérjetartalom sűrűséghistogramja látható kontroll és géncsendesített sejteken. A statisztikai összehasonlításokat Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük el: ****p < 0,0005 10-15 sejt/minta.

Összhangban a klaszterméretetek változásával az MHC I klaszterek kisebb klaszterekre estek szét, a preferált klaszterméret szignifikánsan kisebb lett. Ezen képelemzési módszer is megerősítette a korábbi tapasztalatunkat, miszerint az IL-2Rα klaszterizációja változatlan maradt, annak ellenére, hogy a receptor alegységek mobilitása szignifikánsan megnöttek. Mint az ábrán is látható, az IL-15Rα klaszterizációja az MHC I expressziótól független volt, a leginkább preferált klaszterek mérete nem változott szignifikánsan a géncsendesítés hatására. Megállapítottuk, hogy az MHC I glikoproteinek mobilitást moduláló szerepét nem az IL-2Rα és IL-15Rα klaszterméret változtatásán keresztül fejtí. Kimutattuk, hogy az MHC I homoaggregációjára az MHCI I expressziós szintje szignifikáns hatással van, csökkentése a fehérjék mobilitásának emelkedését eredményezi.

5.1.10. Molekulafrakciók meghatározása

A mobilitási adatok arra világítottak rá, hogy az IL-2/15R α mobilitására szignifikáns hatással volt közvetlen molekuláris környezetének a módosítása. Az MHC I homoaggregációs képessége és klasztermérete csökkent a géncsendesítés következtében, így a mobilitásnövekedés mögött a csökkent hidrodinamikai méret is állhat. Ezzel ellentétben a receptorok átlagos klasztermérete függetlennek adódott az MHC I jelenlététől illetve hiányától, így a mobilitások változása nem a klaszterméretük csökkenésnek a következménye. A további képelemzési vizsgálatokban a receptor alegységek és MHC I glikoproteinek közötti párkölcsönhatásokat kvantitáltuk. Az IL-2/15R α receptor alegységek MHC I melletti asszociált hányadait számszerűsítettük kontroll és géncsendesített sejteken egyaránt (30. ábra).



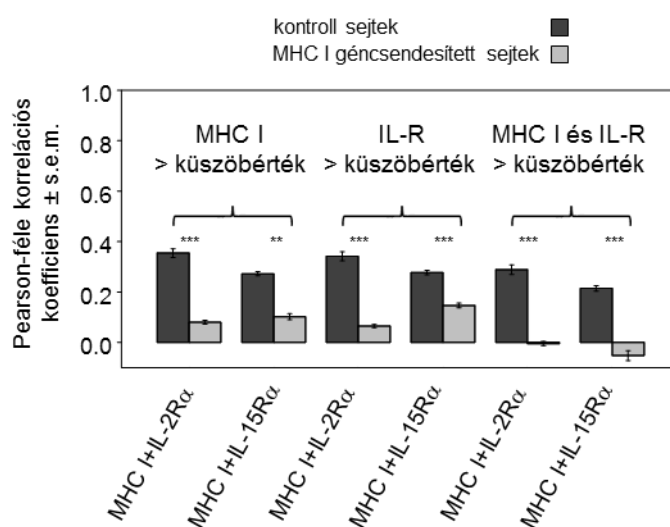
30. ábra: Az MHC I - IL-2R α és MHC I - IL-15R α asszociált molekulafrakciói

A statisztikai összehasonlításokat kétoldali t próbával végeztük: ***p<0,001, 10-15 sejt/minta.

A géncsendesítés következtében az MHC I expressziója 90%-kal csökkent, az IL-2R α és IL-15R α szintjei változatlanok maradtak. Az IL-2R α MHC I melletti asszociált hányada csökkent 75 $\pm$ 3%-ról 5,4 $\pm$ 3%-ra. Hasonlóan az IL-15R α MHC I-gyel asszociált hányada is szignifikánsan csökkent, 91 $\pm$ 4%-ról 20 $\pm$ 6%-ra. Ilyen mértékű csökkenést az MHC I asszociált hányadaiban nem tapasztaltunk, az IL-2R α -al való asszociációja 61 $\pm$ 8%-ról csökkent 52 $\pm$ 7%-ra, míg az IL-15R α -al való asszociációja 12 $\pm$ 2%-ról 19 $\pm$ 5%-ra nőtt (átlag $\pm$ SD). Ezen utóbbi adatok ismeretében megállapítottuk, hogy az MHC I, IL-2R α valamint IL-15R α molekulák közös sejtfelszíni komplexeket alkotnak.

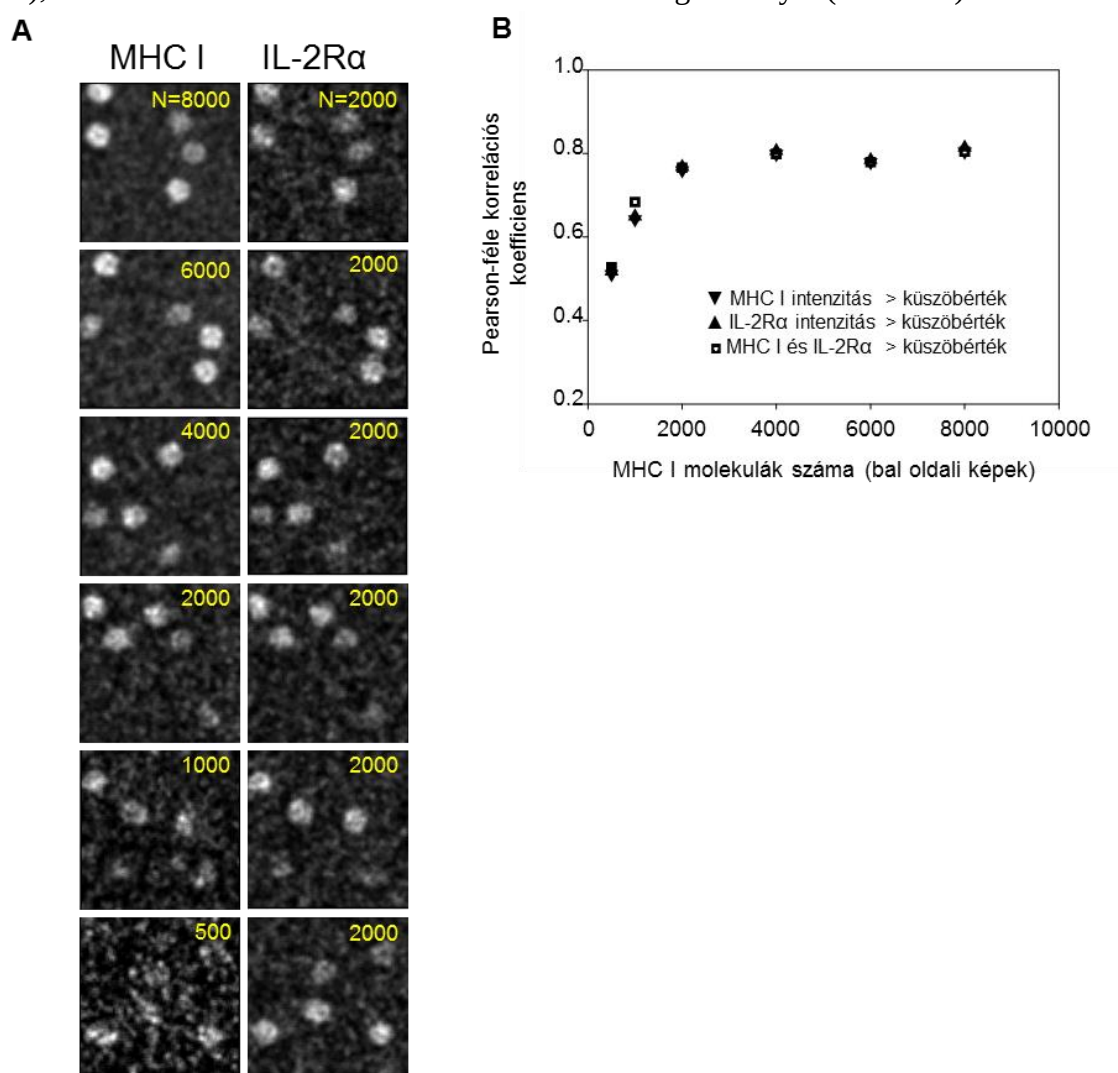
5.1.11. Párkölcsonhatások jellemzése Pearson-korrelációs koefficienssel

Az MHC I és IL-2/15R α közötti asszociált hányadok meghatározása után a molekuláris együttállás mértékét a Pearson-féle korrelációs koefficiens meghatározásával is számszerűsítettük. Az együththató meghatározását több különböző intenzitásra vonatkozó küszöbérték feltétel mellett is elvégeztük: kiszámoltuk a korrelációt azon pixelekből, amelyekben az intenzitás az egyik, a másik, illetve mindkét csatornában a küszöbérték felett volt (31A, B és C ábra). A géncsendesítés hatására a korrelációs koefficiens értéke mindkét fehérjepárra (MHC I - IL-2R α valamint MHC I - IL-15R α), mindegyik feltétel mellett szignifikánsan csökkent. Az analízissel megerősítettük korábbi eredményünket, miszerint a géncsendesítés után az IL-2R α és IL-15R α többsége MHC I mentes területen foglal helyet.



31. ábra: Az MHC I - IL-2R α és MHC I - IL-15R α közötti Pearson korrelációk
A statisztikai összehasonlításokat kétoldali t próbával végeztük: ***p<0,001, **p<0,01, 10-15 sejt/minta.

A számításhoz negatív kontrollként a pixelek nagyszámú (>10,000) véletlenszerű összekeverésével kapott képeket használtunk. A randomizált STED képeken meghatározott korrelációs koeficiens érték $0,007 \pm 0,0001$ (SD) volt. A következőkben Monte-Carlo szimulációval vizsgáltuk, hogy amennyiben változtatjuk a sejtfelszíni részecskeszámokat, milyen trend szerint fog változni a korrelációs koeficiens értéke. Az alábbi szimulációt végeztük el: superfeloldású kondíciók mellett az egyik csatornában az IL-2R α -nak megfeleltethető 0,2 részecske/pixel fehérjeelosztást szimuláltunk; a másik csatornában az MHC I expressziójának a változását követtük nyomon, ahol a pixelenkénti várható részecskeszám 0,8 részecske/pixel-ről (kontroll sejtek) csökkent 0,05 részecske/pixel értékre (gécnsendesített sejtek); a közös klaszterekben a részecskék 20-20%-a foglalt helyet (32A ábra).



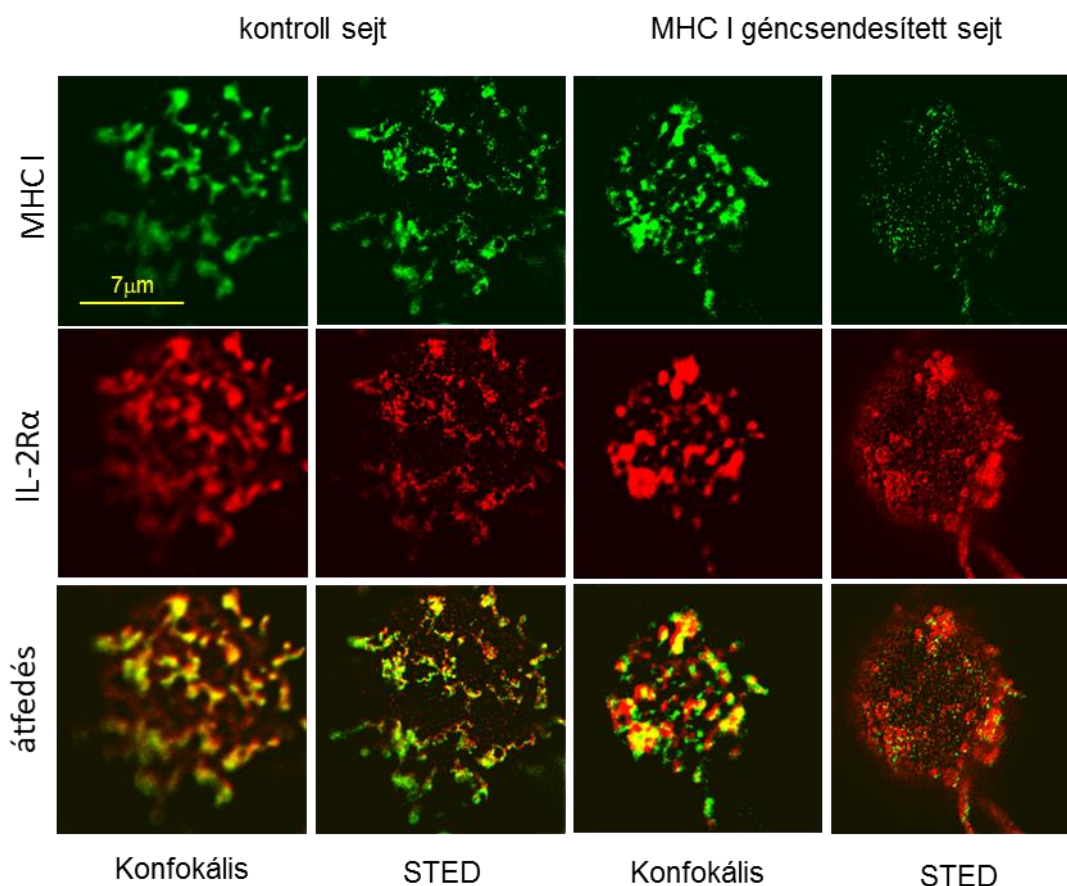
32. ábra: A Pearson-féle korrelációs koeficiens a részecskeszám függvényében

A szimulációban 50 nm sugarú, kör alakú és különálló klasztereket definiáltunk. A részecskék mindkét csatornában 0,2 valószínűséggel voltak a klaszterekben. A kép területe $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ volt, a bal oldali csatornában a részecskeszámokat 8000-ről 500-ra csökkentettük, a jobb oldali csatornában 2000 részecske volt. A képek 100×100 pixel méretűek, PSF: $w_{\text{laterális}} = 40$ nm; $I_{\text{csúcs}} = 5$; $I_{\text{háttér}} = 2 \pm 1$ s.d.; küszöbérték=3. A képek szimulációját és kiértékelését saját fejlesztésű MATLAB programmal végeztem el.

Megállapíthatjuk, hogy a részecskeszám csökkentésével a korrelációs koefficiens nagysága csökkent (32B ábra), így a szimulációs tapasztalatok megerősítették a kísérletes eredményeket. Fontos megjegyeznünk, hogy a Pearson-féle korrelációs koefficiens értékét a jel/zaj viszony is befolyásolja. A szimulációban a közös klaszterben levő fehérjék aránya a részecskeszámoktól függetlenül mindkét csatornában 20-20% volt. Eredményeink szerint a Pearson-féle korrelációs együttható nagysága a konstans asszociált hányadtól függetlenül csökkent, az együttható értékét az abszolút részecskeszám csökkentése a jel/zaj viszony nagyságán keresztül befolyásolta.

5.1.12. Asszociált hányadok és Pearson-féle korrelációs koefficiensek meghatározása konfokális képeken

A szuperfeloldású képek analízise mellett, ugyanazon sejtekről készült konfokális képek (33. ábra) ugyanilyen mélységű analízisét is elvégeztük.

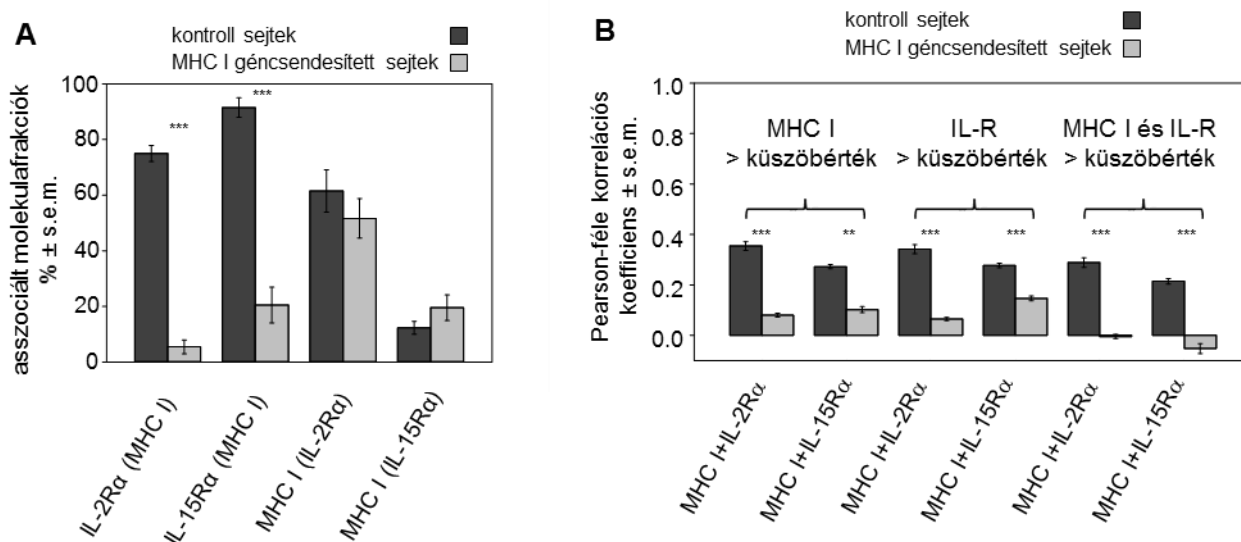


33. ábra: Az MHC I és IL-2Rα / IL-15Rα sejtfelszíni eloszlása konfokális és STED képeken

A) MHC I és IL-2Rα; B) MHC I és IL-15Rα. MHC I: Alexa 594-W6/32 antitest. (zöld); IL-2Rα: ATTO 647N-anti-Tac (piros), IL-15Rα ATTO 647N-anti-FLAG (piros). A sárga szín az átfedő membránrégiókat jelöli.

A konfokális módban készült képek vizsgálatának eredményei összhangban voltak a STED eredményekkel.

Az IL-2R α és IL-15R α MHC I melletti asszociált hányadai csökkentek az MHC I expressziójának a csökkentése következtében (34A ábra). Eközben a megmaradó MHC I glikoproteineknek az interleukin receptorokkal asszociált hányadai nem változtak szignifikánsan.



34. ábra: MHC I - IL-2R α és MHC I - IL-15R α közös molekulafrakciói és Pearson korrelációs együtthatói

A statisztikai összehasonlításokat kétoldali t próbával végeztük: ***p < 0,001;

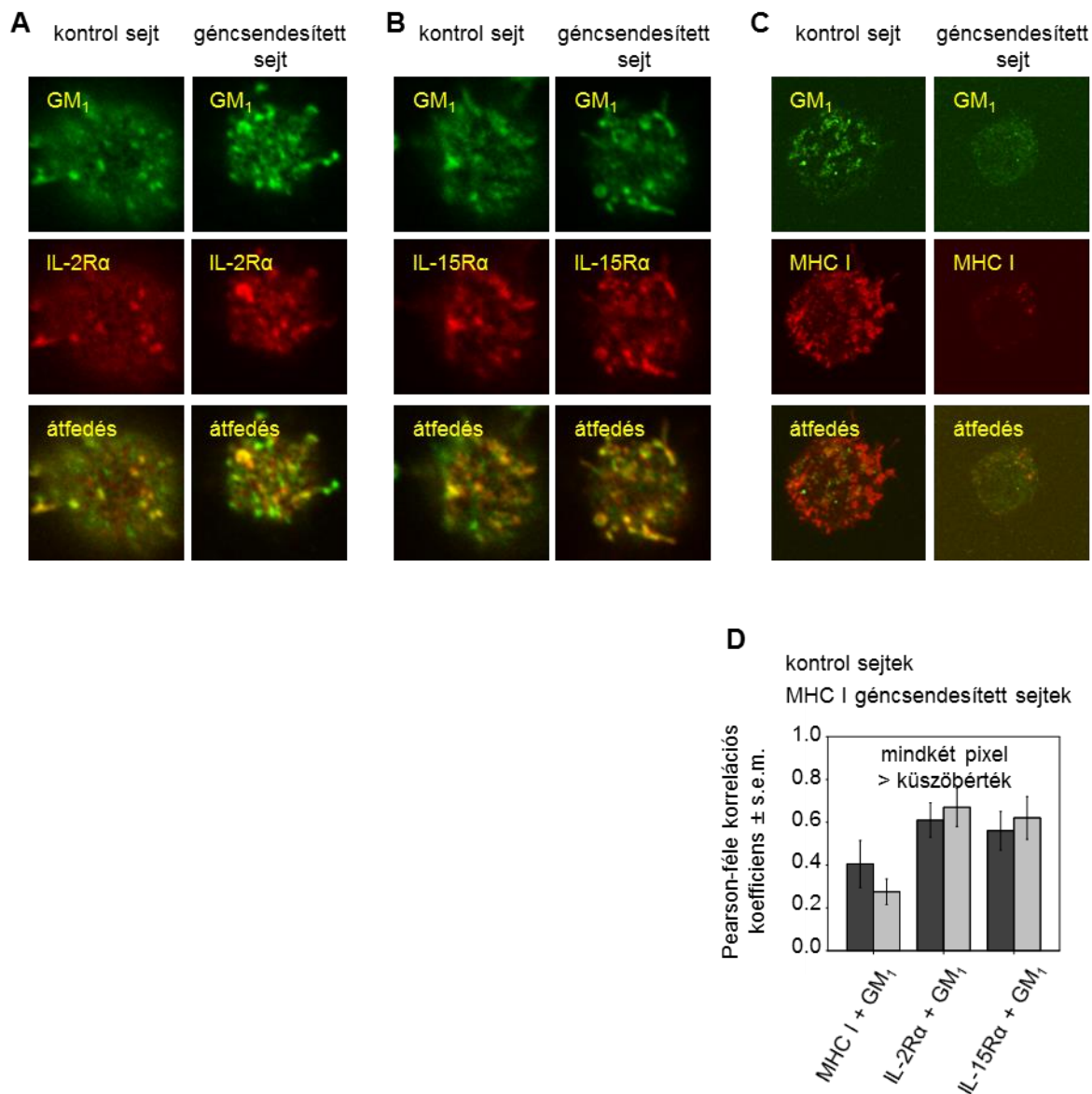
**p < 0,01; 10-15 sejt/minta.

A géncsendesítés hatására a korrelációs koefficiens értéke mindegyik fehérjepárra, minden vizsgált kapuzási feltétel mellett szignifikánsan csökkent (34B ábra).

A szuperfeloldású és konfokális feloldás mellett meghatározott asszociált hányadok különböztek egymástól. A Pearson korrelációs koefficiens nagysága ugyancsak eltérő volt. A konfokális és STED beállítás mellett nyert adatok direkt összehasonlítását különböző pixelméretet túlmenően az is nehézkessé teszi, hogy a fluoreszcencia detektálása más típusú fotodetektorokkal történt így a jel/zaj viszonyok nagysága és eloszlása is különbözik. A különbség másik lényeges oka a más-más optikai feloldóképesség, konfokális mikroszkóppal a néhányszor 10 nm-es szintű különállások nem különböztethetőek meg, így 200 nm-es feloldással nagyobb asszociált hányad és korrelációs koefficiens értékeket várhatunk. Mindezeket összevetve a más optikai feloldással készült képeken meghatározott paraméterek direkt összehasonlítása csak nehezen lenne lehetséges, de a vizsgált paraméterek változásainak irányai az optikai eszköztől függetlenül megegyeztek.

5.1.13. MHC I, IL-2/15R α alegységek lipid tutajokban való lokalizációja

A mobilitás és aggregációs viszonyok változásának az ismeretében hipotézisként feltehetjük, hogy a receptoroknak és glikoproteineknek nemcsak a mikro-, hanem akár a makrokörnyezetére is befolyással lehet az MHC I expressziójának változása. Ismert, hogy az IL-2/15R α és az MHC I is feldúsul a lipid tutajokban [41, 42, 72]. Felvetődik a kérdés, hogy a megváltozott MHC I expresszió befolyásolja-e az MHC I és a vele asszociált interleukin receptorok lipid tutajokban történő szegregációját. Ezt a kérdést konfokális mikroszkóppal készült képekkel, a lipid tutajok és a receptor alegységek közötti Pearson korrelációs koefficiensek összehasonlításával teszteltük. A kontroll és kezelt sejtekről készült reprezentatív képek a 35. ábrán láthatóak. A zöld csatornában a GM₁ gangliosidhoz kötődő Alexa 488-CTX B lipid tutaj marker sejtfelszíni eloszlása látható, a piros csatornában az IL-2/15R α (35A és B ábra) vagy az MHC I (35C ábra) sejtfelszíni disztribúcióját jelenítettem meg. A harmadik csatornában sárga színnel azon pixelek vannak jelölve, amelyekben mindkét csatorna pixelében magas az intenzitás, ezen régiók a közös domének régióit jelölik.



35. ábra: MHC I és IL-2/15Rα alegységek lipid tutajokban való lokalizációja

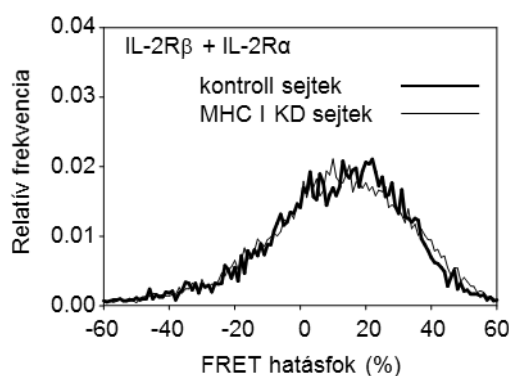
A) IL-2Rα – GM₁ közös disztribúciója kontroll és MHC I géncsendesített sejteken; B) IL-15Rα – GM₁, C) MHC I – GM₁ (n=15-20 sejt/minta); D) Pearson-féle korrelációs együtthatók

Az analízis során csak azokból a pixelekből számoltunk korrelációt, amelyek mindkét csatornában a küszöbértékeknél nagyobb intenzitással rendelkeztek. A küszöbérték nagyságát a sejtmentes területek intenzitás eloszlásának a maximumához állítottuk be. A Pearson korrelációs koefficiens átlagértékei az IL-2Rα vagy IL-15Rα és a GM₁ között nem változtak szignifikánsan a géncsendesítés hatására. Eredményeink azt mutatták, hogy az IL-2Rα és az IL-15Rα membrán mikrodomén lokalizációjára nem volt szignifikáns hatással az MHC I molekulák jelenlétének csökkentése. Az MHC I molekulák és lipid tutajok közötti korrelációs

együttható csökkent. Adataink alapján megállapíthatjuk, hogy az expressziós szint változása következtében a sejtfelszíni MHC I lipid tutajbeli lokalizációja szignifikánsan csökkent, így a mobilitás növekedéséért a megváltozott membrán domén asszociáció legalább részben felelőssé tehető. A korrelációs együttható csökkenésének másik lehetséges oka az, hogy a részecskeszám redukciója a jel/zaj viszonyt is csökkenti, így az együttható csökkenni fog.

5.1.14. IL-2R β - IL-2R α kölcsönhatás vizsgálata akceptor fotoelhányításos FRET méréssel

A fehérjemobilitási és klaszterizációs változások jellemzésén túlmenően megvizsgáltuk, hogy vajon az MHC I molekuláknak van-e kritikus szerepe az IL-2/15R β - IL-2R α dimer létrejöttében, konformációjában? A receptor alegységek közötti FRET hatásfokot akceptor elhanyításos módszerrel mértük meg. A pixelenkénti FRET értékek sűrűséghisztogramja a 36. ábrán látható.



36. ábra: Pixelenkénti IL-2R β - IL-2R α FRET értékek eloszlása kontroll és géncsökkentett sejteken

IL-2/15R β : Alexa 546-Mik β 3, IL-2R α : Alexa 647-7G7-B6. A FRET hatásfok átlagértéke a kontroll mintában 9%, a géncsökkentett mintában 10% volt. A mérések formaldehydben fixált sejteken történtek, $n > 25$ sejt/minta.

A kontroll és géncsökkentett sejteken az alegységek között mért FRET értékek átlagértékei hibahatáron belül megegyeztek, szignifikánsan nem különböztek egymástól. Megállapítottuk, hogy az az IL-2/-15R β - IL-2R α asszociációja, konformációja független az MHC I glikoproteinek jelenlététől.

5.2. Az AP-1 komplex vizsgálata

Disszertációm következő részében az IL-2 jelátvitel által is aktivált c-Jun - c-Fos transzkripciós faktorok heterodimerjének konformációját vizsgáltam FRET segítségével. A heterodimerek DNS-hez való kötődését fluoreszcencia korrelációs és keresztkorrelációs görbék analízisével vizsgáltuk.

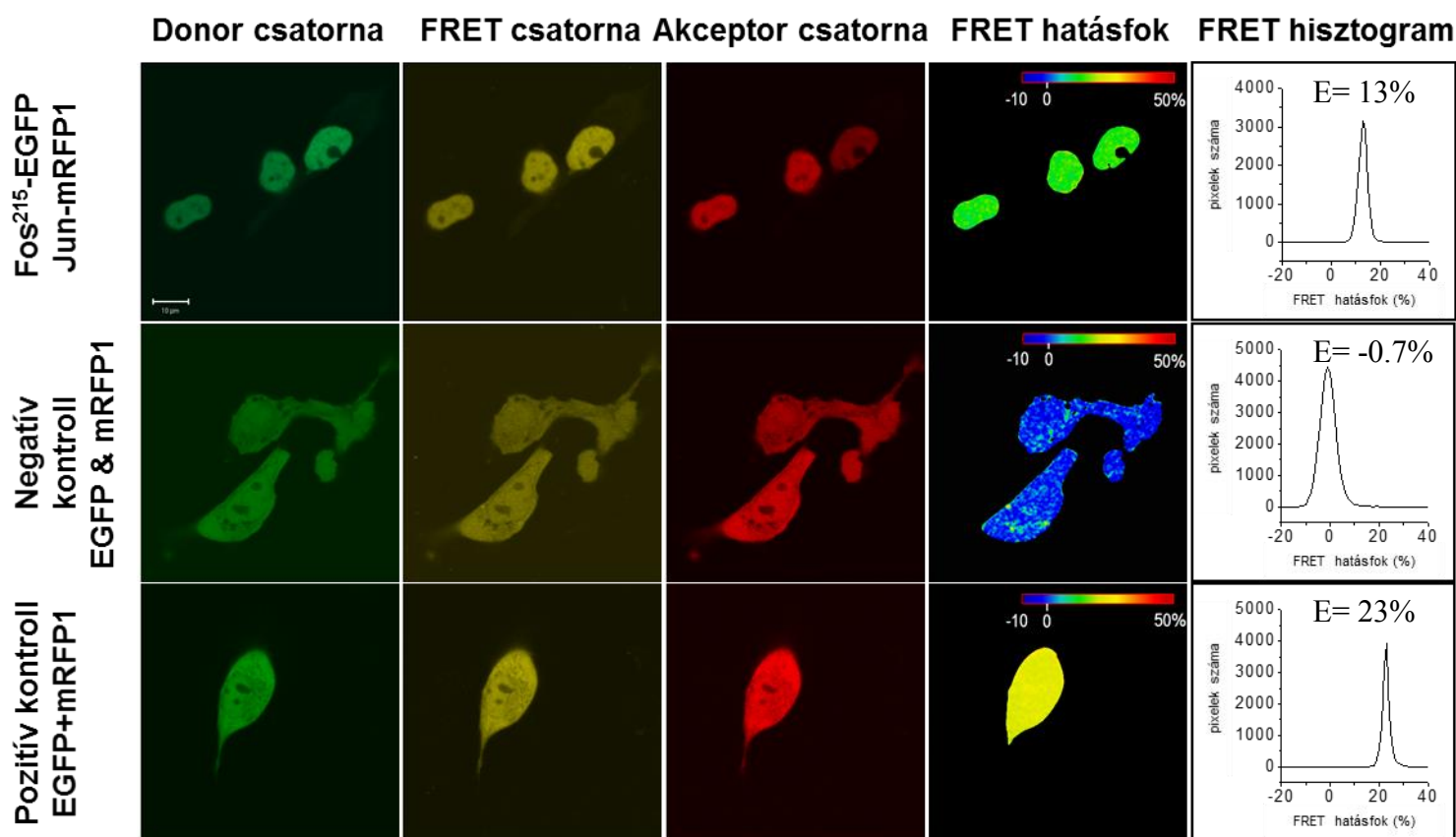
5.2.1. c-Fos és c-Jun heterodimerizációjának vizsgálata FRET segítségével

A transzkripciós faktor dimerek konformációjának vizsgálatához FRET méréseket végeztünk. A c-Fos – c-Jun dimernek csak a dimerizációs és DNS-kötő doménjéről áll rendelkezésre kristályszerkezeti adat, a C-terminális domének konformációja ismeretlen. Ezért C-végükön fluoreszcens fehérjékkel jelölt c-Fos - c-Jun komplexeket FRET segítségével vizsgáltunk élő sejtekben, hogy megbecsüljük a C-terminális domének távolságát. Mivel a c-Fos C-terminális doménje a dimerizációs régiótól számítva hosszabb, mint a c-Jun esetében, létrehoztunk egy olyan c-Fos deléciós mutánt is (c-Fos²¹⁵), melynek C-végét 165 aminosavval megrövidítettük, hogy a c-Fos és c-Jun C-terminális doménjeinek hossza kiegyenlítődjön. A FRET méréseket konfokális mikroszkóppal végeztük el. Így a transzkripciós faktorok eloszlásának sejten belüli inhomogenitása és dimerizációs hajlandóságának az eloszlása is feltérképezhető 200 nm-es feloldással.

A 37. ábra felső sorában az c-Fos²¹⁵-EGFP és c-Jun-mRFP1 sejten belüli intenzitás eloszlását tüntettem fel. Megállapítottuk, hogy a transzkripciós faktorok a sejtmagot egyenletesen töltik ki. Korábbi irodalmi adatok a STAT1 és néhány szteroid receptor foltos eloszlását írták le [191, 192], míg saját megfigyelésünk rámutat arra, hogy a transzkripciós faktorok térbeli eloszlása különbözhet egymástól. Negatív kontrollként az EGFP és mRFP1 festékekkel kotranszfektált, pozitív kontrollként az EGFP és mRFP1 festékeket fúziós fehérjeként expresszáló sejteket használtunk. A kontrollok fluoreszcenciája a citoplazmában és a sejtmagban is egyenletes volt. A sejtmagvacská minden vizsgált mintában csaknem fluoreszcenciamentes maradt.

Az EGFP-Fos²¹⁵ és mRFP1-Jun sejtmagon belüli eloszlását homogénnek tapasztaltuk, de a molekuláris szintű interakciójukat a lokális fehérjekörnyezet is befolyásolhatja. A dimerizációjuk kvantitatív jellemzéséhez a jelző fluorofórok közötti FRET hatásfokokat határoztunk meg. A pixelenkénti FRET hisztogramokat a 37. ábrán tüntettem fel. Megállapítottuk, hogy a transzkripciós faktorok közötti FRET hatásfok a sejtmagon belül homogén volt. A molekuláris környezet heterogenitását tükröző FRET hisztogram keskeny volt, a közvetlen molekuláris környezet feltehetően csak kismértékben befolyásolja a C-terminális végek közötti átlagos távolságot és a dimerizációs hajlandóságot. Összehasonlítául

az IL-2R β és IL-2R α között mért FRET hisztogram jóval szélesebb, nagyobb molekuláris heterogenitást jelez (36. ábra).



37. ábra: FRET mérések konfokális mikroszkóppal a rövidített c-Fos²¹⁵ – c-Jun transzkripció faktor dimerek között

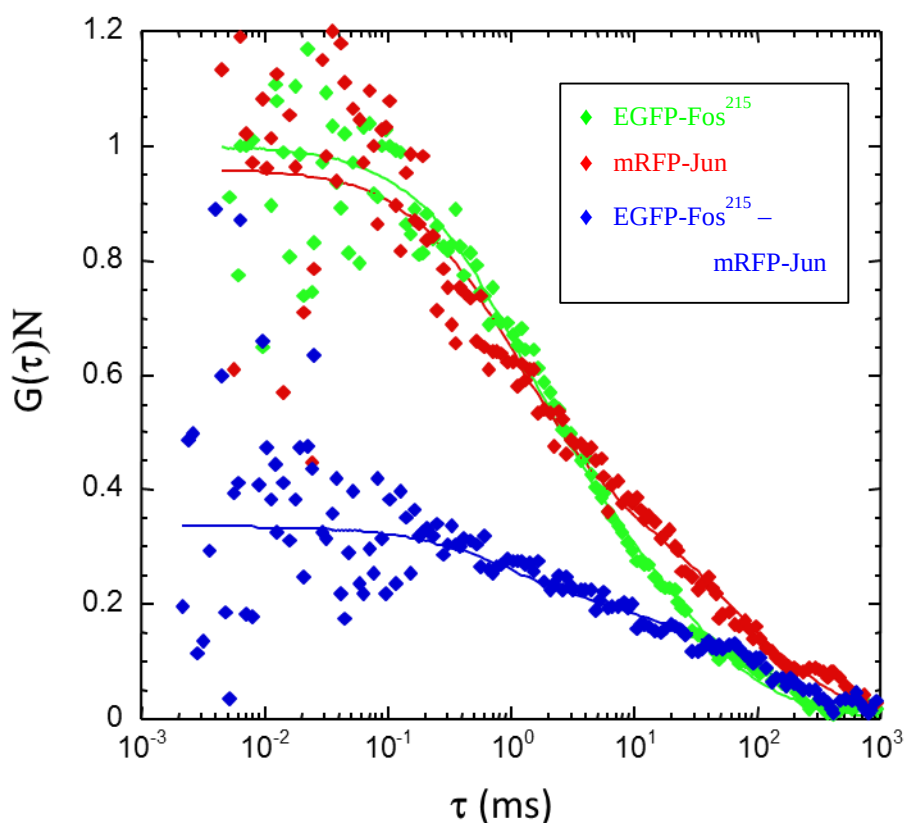
A méréseket élő méhnyakrák (HeLa) sejtvonalon végeztük. 200 nm-es feloldással a sejtekről egy 1,6 μ m vastagságú optikai szelet fluoreszcenciáját képeztük le. A felső sorban az c-Fos²¹⁵EGFP és c-Jun mRFP1 fluoreszcenciája látható a donor, transzfer és akceptor csatornában (30. egyenlet), valamint pixelenkénti FRET térkép és gyakoriság hisztogramjai láthatóak. Az egyes sejteken a FRET várható értékét a hisztogram felett tüntettem fel. A középső sorban a negatív kontroll sejtekről (EGFP-t és mRFP1-et függetlenül expresszáló sejtek, alacsony FRET) készült képek és hisztogram van feltüntetve. Az alsó sorban a pozitív kontroll sejtek (EGFP-mRFP1 fúziós fehérjét expresszáló sejtek, magas FRET) intenzitás és FRET eloszlásai láthatóak.

Az átlagos FRET hatásfok a pozitív kontroll mintában (fúziós EGFP-mRFP1) $22,1 \pm 2,8\%$ volt, míg a negatív kontroll sejtekben $0,3 \pm 0,8\%$. A c-Fos lerövidítése az átlagos FRET hatásfok növekedését eredményezte: a teljes hosszúságú c-Fos-EGFP és c-Jun-mRFP1 közötti érték $3,0 \pm 1\%$ -volt ($8,4 \pm 0,5$ nm), míg c-Fos²¹⁵-EGFP és c-Jun-mRFP1 között $9,9 \pm 0,5\%$ ($6,8 \pm 0,1$ nm). Ezen FRET változás összhangban van azzal, hogy a teljes hosszúságú heterodimerben a

C terminális c-Fos 165 aminosavval távolabb helyezkedik el a Jun-tól, így várható volt, hogy a molekuláris rövidítés a FRET hatásfok növekedését eredményezi. A fluorofórok közötti távolságok kiszámolásához $\kappa^2=2/3$ és $R_0=4,7$ nm Förster távolságot feltételeztünk [193, 194], lásd 4. egyenlet.

5.2.2. c-Jun és c-Fos transzkripciós faktorok DNS-kötődésének vizsgálata FCCS-el

A c-Fos – c-Jun heterodimerek DNS-hez való kötődését FCS és FCCS görbék analízisével végeztük el. Megvizsgáltuk, hogy a c-Fos rövidítése vajon befolyásolja-e a dimer mobilitását, DNS-hez való kötődését és dimerizációját. A 38. ábrán az c-Fos²¹⁵-EGFP – c-Jun-mRFP1 reprezentatív normált autokorrelációs és keresztkorrelációs görbéi láthatóak. A nem zero keresztkorrelációs görbe a heterodimerek stabil jelenlétére utal.



38. ábra: c-Fos²¹⁵ – c-Jun heterodimerek normált autokorrelációs és keresztkorrelációs függvényei

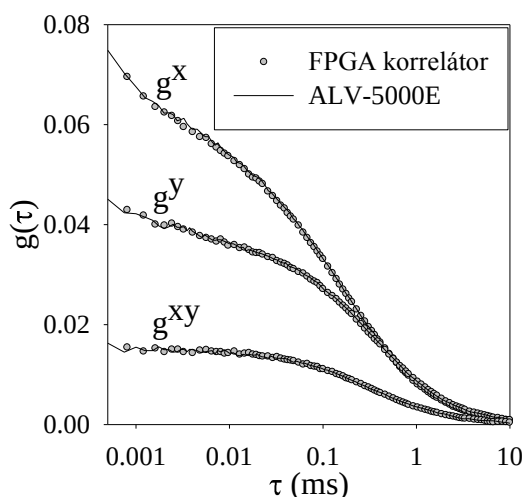
Az experimentális görbék kétkomponensű szabad diffúziót leíró modellfüggvénnyel illesztettük meg (16. egyenlet). A gyors komponens a nem kötődött, a lassú komponens a kromatinhoz kötődött transzkripciós faktorokat jelzi.

Az auto- és keresztkorrelációs görbék kétkomponensű, 3D-ben szabadon diffundáló részecskék modellfüggvényével illesztettük (16. egyenlet). A gyors komponens a DNS-hez nem kötődött, a lassú komponens a kromatinhoz kötődött transzkripciós faktorokat jelzi. A

keresztkorrelációs amplitúdó a c-Fos²¹⁵ EGFP amplitúdójának átlagosan 34±6%-a volt. Ez a hányados hasonló a korábban teljes hosszúságú heterodimerek között mért 31±6% értékhez [103]. A negatív kontroll sejteken a keresztkorrelációs hányados 13±3% volt, a nem nulla érték a csatornák közötti spektrális átvilágításból származik [103]. A pozitív kontroll sejteken a fúziós EGFP-mRFP1 fehérjével mért keresztkorrelációs hányados 45±4% volt [103]. A korrelációs görbék lecsengésének analiziséből a transzkripciós faktorok mobilitási viszonyaira, valamint a DNS-hez való kötődés arányára lehet következtetni. A gyors komponens diffúziós ideje 1,0 - 1,4 ms volt, míg a lassú komponensé a 67–91 ms tartományba esett. A teljes hosszúságú c-Fos - c-Jun kotranszfektált minta esetén a lassú komponens aránya 77±13%-volt, míg a rövidített Fos²¹⁵ – Jun minta esetén mindösszesen 56±4%. A Fos – Jun komplex gyors és lassú komponenseinek a diffúziós ideje hasonló nagyságúnak adódott az irodalomban más transzkripciós faktorok szabad és kötött komponensére vonatkozó adatokhoz [195], így a paraméter jól tükrözi a még szabadon diffundáló, illetve a DNS-hez kötődött transzkripciós faktorok mobilitási viszonyait. A lassú komponens arányának a megváltozása a Fos C-terminális szakaszának a DNS-kötésben való funkcióját valószínűsíti. Megállapítottuk, hogy a korrelációs függvények lassú komponenseinek hányadaiból levont következtetés egyezésben van korábbi megfigyelésekkel, miszerint fibroblaszt sejtekben a C-terminális régiónak transzaktivációs szerepe van [101].

5.3. FPGA korrelátor validálása

Értekezésemben bemutatom a membránfehérjék mobilitásának és aggregációs állapotának jellemzéséhez használt szoftverkorrelátor, valamint a munkacsoportunkban fejlesztett FPGA hardverkorrelátor validálását, amit tesztoldatok korrelációs függvényeinek összehasonlításával és paraméterbecslésével végeztük el. A 39. ábrán 300 nM koncentrációjú Alexa 488 és Cy5 festékekkel duplán jelölt W6/32 antitest Tris-EDTA pufferben felvett auto- és keresztkorrelációs görbéit jelenítettem meg. A fekete vonallal a kereskedelmi forgalomban kapható ALV5000E hardver korrelátorral meghatározott függvényeket jelöltem. Ezzel az eszközzel egyidejűleg vagy a két csatorna autokorrelációs függvényeinek, vagy azok keresztkorrelációs függvényeinek kiszámolására van lehetőség. A másik adatsor a munkacsoportunkban fejlesztett FPGA hardverkorrelátorral egyidejűleg számolt auto- és keresztkorrelációs függvényeket jelöli ugyanazon mintából (26. egyenlet).



39. ábra: FPGA-korrelátor validálása

Alexa 488 és Cy5 festékekkel jelölt W6/32 antitest átlagolt auto- és keresztkorrelációs függvényei. A mérési idő 5×20 s volt; szürke körök: FPGA korrelátor, folytonos fekete vonal: ALV5000E korrelátor

Az I. táblázatban a tesztoldatoknak az ALV-5000E és az FPGA korrelátorral meghatározott korrelációs függvények nonlinearis illesztéssel becsült paramétereit tüntettem fel. Az autokorrelációs adatok összehasonlításához 50 nM koncentrációjú Alexa 488 illetve Cy5 festéket használtunk, a korrelációs függvényeket a 11. egyenlettel illesztettük meg.

A keresztkorrelációs függvények összehasonlításához duplán jelölt antitestek korrelációs függvényeit használtuk fel. Az antitestek autokorrelációs függvényeinek az illesztéséhez a szabad, valamint az antitestekhez kötött festékek különböző diffúziós állandóit is figyelembe vevő kétkomponensű modellfüggvényt használtuk, lásd 16. egyenlet. Az antitestek keresztkorrelációs modellfüggvényében a szabad festékek valamint a triplet átmenet

keresztkorrelációs járuléka nem szerepel, így a függvényeket az egykomponensű diffúziót leíró 11. egyenlettel illesztettük meg $T=0$ feltétel mellett. A kétféle eszközzel kapott korrelációs függvények illesztett paramétereit az I. táblázatban foglaltam össze.

		Korrelátor	T	τ_{tr} [μs]	N	r_1	τ_{D1} [μs]	τ_{D2} [μs]	S
Alexa 488 tesztoldat	g^x	FPGA	0,26±0,02	1,6±0,2	15,5±0,1	-	26,6±0,4	-	7,1±0,5
	g^y	ALV	0,28±0,04	1,2±0,2	15,0±0,1	-	25,4±0,5	-	7,7±0,9
Cy5 tesztoldat	g^x	FPGA	0,49±0,01	1,8±0,1	16,4±0,1	-	44,8±0,5	-	6,8±0,4
	g^y	ALV	0,48±0,01	1,9±0,1	16,2±0,1	-	43,7±0,6	-	8,0±0,9
Alexa 488-Cy5-W6/32 antitest tesztoldat	g^x	FPGA	0,15±0,01	2,0±0,2	16,5±0,1	0,33±0,0	27,0±2,4	256,2±6,4	8,1±1,2
	g^y	ALV	0,14±0,01	2,3±0,3	16,4±0,1	0,34±0,0	27,2±2,6	256,3±4,9	9,0±1,9
	g^x	FPGA	0,12±0,02	1,9±0,5	25,3±0,6	0,17±0,0	29,2±5,5	405,4±13	6,0±1,6
	g^y	ALV	0,12±0,03	2,9±0,8	26,4±0,7	0,14±0,0	27,3±4,9	401,0±31	6,0±4,7
	g^{xy}	FPGA	-	-	67,4±16	-	-	312,3±3,0	8,8±3,3
	g^{yx}	ALV	-	-	65,8±1,6	-	-	328,8±9,1	8,6±4,1
	g^{yx}	FPGA	-	-	68,1±3,4	-	-	358,8±3,9	8,4±4,7
	g^{yx}	ALV	-	-	67,7±0,4	-	-	340,4±3,2	9,1±3,2

I. Táblázat:

Tesztoldatok auto- és keresztkorrelációs függvényeinek illesztési paramétere

Az korrelációs függvényeket a 11. és 16. egyenlettel illesztettük meg. A g^x , g^y az autokorrelációs, a g^{xy} és g^{yx} a keresztkorrelációs függvényeket jelöli. A táblázatban a paraméterek 5×20 s-os mérésre vett átlagértéke ± szórása van feltüntetve.

T : az egyensúlyi tripethányad, τ_{tr} : a triplet állapot korrelációs ideje, N : a detektálási térfogatban levő molekulák átlagos száma, S : a forgási ellipszoid alakú fókuszterefogat axiális és laterális sugarának hányadosa, r_1 : az első komponens relatív hányada, $\tau_{1,d}$, $\tau_{2,d}$: az első és második komponens diffúziós ideje (a részecskék által a fókuszterefogatban átlagosan eltöltött idő).

Az keresztkorrelációs adatok összevetésekor lényeges, hogy a kereskedelmi forgalomból származó ALV5000E korrelátor nem alkalmas az auto- és keresztkorreláció egyidejű mérésére, a függvényeket csak egymás után, külön mérésekből lehet meghatározni. Ezzel szemben az FPGA-korrelátorral az eszköz adattárolási kapacitásának és jelfeldolgozási sebességének köszönhetően az auto- és keresztkorrelációs függvények egyidejűleg is kiszámolhatóak. Az illesztett paraméterek a két korrelátor eszközön közel azonosak voltak.

6. Megbeszélés

6.1. MHC I géncsendesítés hatásának a vizsgálata az IL-2/15 citokin receptorokra

A membránfehérjékből felépülő sejtfelszíni struktúrák változatos térbeli és időbeli szerkezettel rendelkeznek, több hierarchikus szinten szerveződnek [3, 66, 196]. A sokrétű fehérjeszerveződés több tényező és kölcsönhatás együttes következménye. A struktúrák méretének és életidejének eloszlását mind a membránban ható, mind intra és extracellulárisan ható kölcsönhatások egyaránt befolyásolhatják.

A klasszikussá vált kísérletben Frye és Edidin humán és egér limfociták fúziója után a más-más színnel jelölt MHC I molekulák keveredését figyelte meg a sejtek között [197]. Ezen kísérletek demonstrálták elsőként a membránt alkotó fehérjék szabad laterális elmozdulását. Elsőként fluoreszcencia visszatérési görbék analízisével [198], majd jelzett részecskék nagysebességű videó nyomkövetésével [199] (*single particle tracking*) egyre több fehérjéről mutatták ki a sejtmembránban való elmozdulásukat, valamint korlátozott térrészben történő gátolt diffúziójukat [26]. Az azóta eltelt évtizedekben egyre több fehérjéről bizonyosodott be, hogy speciális összetételű, magas koleszterin koncentrációjú, szfingomielint, glikoszfingolipideket és GPI- horgonyzott fehérjéket tartalmazó, detergens-rezisztens doménekben, lipid tutajokban dúsulnak fel. A szuperfeldolósó mikroszkópia alkalmazásával a korábbi modellek pontosítása várható, és várható a bizonytalanság csökkenése a membránban levő lipid tutajok és fehérjestruktúrák életidejének és méretének meghatározásában.

Értekezésemben az immunfolyamatokban fontos szereppel rendelkező IL-2/15 citokin receptorok és MHC I molekulák által alkotott kisméretű molekulaklaszterek dinamikáját vizsgáltam meg. Az MHC I glikoproteinek több hierarchikus szinten történő organizációját Damjanovich és munkatársai FRET adatok, illetve atomerő és elektronmikroszkópos felvételek analízise révén állapította meg elsőként [66]. Eredményeik szerint az MHC glikoproteinek néhány nanométeres nagyságú szerveződését azok akár mikrométer méretű doménekben való akkumulációja követi. A Frye-Edidin kísérlettel analóg módon Nagy és munkatársai megvizsgálták, hogy vajon a csak donor vagy csak akceptor molekulákkal jelölt sejtek fúziója után a másik sejtről származó jelölt epitópok (MHC I, II és IL-2R) fognak-e molekuláris, FRET távolságon belülre (2-10 nm) kerülni? [200] Adataik alapján a nagyméretű MHC I és IL-2R klaszterek közötti dinamikus részecskekiecserelődést valószínűsítettek. Vereb és munkatársai a plazmamembrán koleszterin koncentrációjának metil- β -ciklodextrinnel történő csökkentésének hatására az IL-2R α , MHC I és MHC II klaszterek elmosódását figyelték meg. Kimutatták a CD48 lipid tutaj marker, valamint az IL-2 receptor alegységek kolokalizációját a sejtmembránban ($c_{\text{Pearson}} > 0,40$), így igazolták az IL-2R lipid tutajokban való feldúsulását.

FRET adatok alapján Bodnár és munkatársai kimutatták, hogy az MHC I homoasszociációját exogén eredetű β 2m hozzáadásával csökkenteni lehetett [201]. Munkacsoportunk korábban kimutatta az MHC I, II és IL-2/15R által alkotott molekulaklaszterek lipid tutajokban való feldúsulását, valamint az IL-2/15 receptorok heterotetramer konfigurációját [42]. A FRET adatok egy fehérjepár közötti kölcsönhatásnak csak egy időpontjáról szolgáltatnak információkat, a kölcsönhatás időbeli stabilitásáról nem adnak felvilágosítást. Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) segítségével kimutatható volt az IL-2/15 receptorok és MHC I molekulák legalább néhány tíz ms életidejű együttmozgása [42]. Edidin és munkatársai igazolták a citoszkeleton szerepét a nagyméretű MHC I klaszterizációjának stabilizálásában [202].

Ezen előzmények ismeretében megvizsgáltuk, hogy egy klaszterbeli komponens eltávolítása milyen következményekkel jár a molekulaklaszterek aggregációjára és dinamikusságára. A fehérjék klaszterizációjának vizsgálatához különféle módszereket kombináltunk, melyek különböző hierarchikus szinteket vizsgálnak. Azért, hogy az MHC I expressziójának szerepét tanulmányozhassuk az IL-2/15R és MHC I klaszterizációjában és mobilitásában, az MHC I expressziót siRNS transzfekcióval csendesítettük. Az aggregációt, valamint a molekuláris mobilitást fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiai mérésekkel és szuperfeloldású képek analízisével vizsgáltuk.

A molekuláris fényességek analízisével kimutattuk, hogy a kisméretű MHC I komplexekben több MHC I molekula is jelen van, az aggregáció mértéke csökkent az expressziós szint csökkentésével. Az MHC I glikoproteinekkal ellentétben az IL-2/15 receptor alegységek homo- és egymással történő heteroaggregációját függetlennek találtuk az MHC I expressziójától. Fontos megjegyezni, hogy a molekuláris fényesség analízisével kapott fehérjeszám alulbecsülheti a tényleges aggregáció fokot. Az irreverzibilis fotoelháványulás vagy a fehérjék homoaggregációja esetén fellépő önkioztás csökkentheti a fluoreszcencia intenzitást, így az F/N értékek kisebbek lesznek a valódinál. Eredményeink kiemelik, hogy egyes membránalkotók homoaggregációs készsége a koncentrációjuk függvénye, míg más membránfehérjék aggregációja nem mutat ilyen összefüggést [203-205].

Molekula aggregációs adataink más munkacsoportok eredményeivel hasonlóságot mutattak. Eggeling és munkatársai szuperfeloldású fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (STED-FCS) segítségével kimutatták, hogy a lipid tutajok rövid életidejű és legalább 10-300 nm nagyságú nanodomének [19]. Méréseink kimutatták a lipid nanodoménekhez hasonló méretű kisméretű fehérje nanoklaszterek jelenlétét, hozzájárultak a több szintű szerveződés építőelemeinek kialakulásához szükséges tényezők megértéséhez.

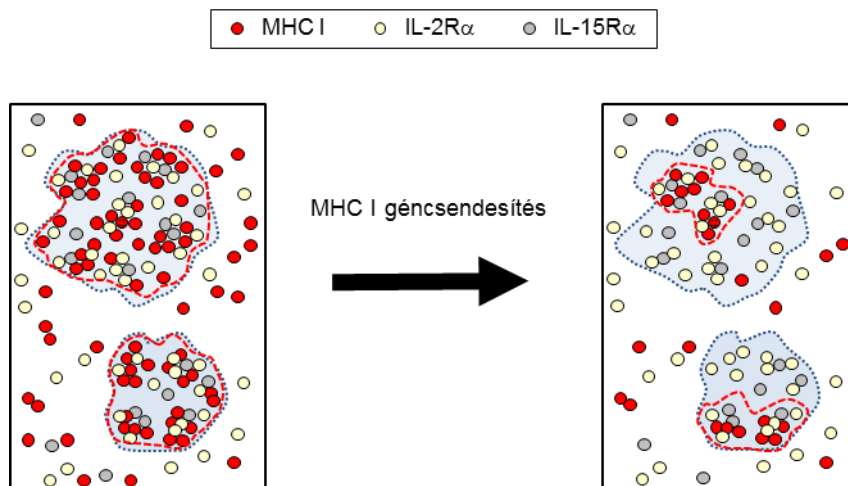
Saffman és Delbrück modellszámításaiból ismert, hogy egy membránfehérje sugarának csökkentésével a diffúziós állandójának növekedése várható [206]. Eredményeink szerint az MHC I molekulák mobilitása valóban következetesen magasabbnak bizonyult a kölcsönható fehérjék által alkotott aggregátum méretének csökkentésével. Az IL-2/15R α alegységek mobilitása ugyancsak megnőtt a kölcsönható partnerek (MHC I) számának a csökkentésével. Eredményeink rávilágítanak, hogy a citokin receptorok dinamikája érzékeny a mikrokörnyezet változására.

Feltételeztük, hogy a vizsgált fehérjék megnövekedett mobilitásának hátterében azok klaszterizációs hajlandóságának megváltozása állhat. A fehérjék magasabb szintű organizációját szuperfeloldású mikroszkópiával vizsgáltuk meg. A klaszterméret változást három eltérő megközelítést alkalmazó klaszterméret meghatározó algoritmussal teszteltük. Mindhárom eljárás eredménye egyhangúan azt támasztotta alá, hogy az MHC I molekulák klasztermérete az expressziós szint függvénye, a klaszterek átlagos mérete 400-600 nm volt a kontroll sejteken, míg 200-300 nm a géncsendesített sejteken. Ezzel ellentétben az IL-2/15R α alegységek klaszterizációját, valamint az IL-2/15 β és IL-2/15 α közötti átlagos távolságot az MHC I eliminálása nem volt képes szignifikánsan befolyásolni. Megállapítottuk, hogy az MHC I proteinek nagyméretű klaszterméretének, valamint a nano-homoaggregátumok méretének a csökkenése összhangban áll a mobilitások változásával, a kisebb méretű klaszterekben átlagosan nagyobb volt a nanoklaszterek mobilitása.

A szuperfeloldású képek analízisével kimutattuk, hogy az MHC I géncsendesítése az MHC I és a receptorok asszociált hányadát és a Pearson-féle korrelációs koefficienseket is csökkentette, így az MHC I eliminálása nem a klaszterméret változtatásán keresztül, hanem a kölcsönható partnerek számának csökkenésével járult hozzá a receptorok mobilitásának növekedéséhez. Az asszociált hányad adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a géncsendesítés után megmaradó MHC I molekulák az IL-2/15R α alegységek mellett maradtak, ami stabil kapcsolatot feltételez az MHC I és az IL-2/15R α között.

Mivel mind az IL-2/15R α , mind az MHC I proteinek lipid tutajokkal asszociált struktúrát alkotnak [41, 42, 72], és az MHC I géncsendesítés következtében mind a receptorok, mind az MHC I mobilitása megnőtt, felvetődik a kérdés, hogy vajon a receptor alegységek lipid tutajokban való feldúsulására hatással van-e a kölcsönható partnerek számának, az aggregátumok méretének csökkentése? Azt kolokalizációs adataink alapján megállapítottuk, hogy a receptorok lipid tutajokban való akkumulációjára nincsen hatással a géncsendesítés. Az eddigi irodalmi adatok alapján lipid tutajokban való feldúsulásukat csak koleszterin kivonással és ligandjuk hozzáadásával lehetett indukálni [41, 43].

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az IL-2/15 citokin receptorok és MHC I glikoproteinek klaszterizációjára szignifikáns hatással volt a legmagasabb szinten expresszált klaszterbeli komponens, az MHC I géncsendesítése. A géncsendesítés hatását a molekulaklaszterekre 40. ábra szemlélteti.



40. ábra: Az MHC I géncsendesítés hatása az IL-2/IL-15 receptorok és MHC I molekulák által alkotott klaszterek szerkezetére.

Az IL-2/15 receptorok és MHC I molekulák több hierarchikus szinten szerveződnek. Piros szaggatott vonallal az MHC I, kék pontozott vonallal a nagyméretű klaszterek határait jelöltem. Szuperfeloldású mikroszkópia és korrelációs spektroszkópiai analízis kombinálásával megállapítottuk, hogy a membrán mikrodomének több kisebb, néhány molekulát tartalmazó nanodoméneket, fehérje aggregátumokat tartalmaznak, melyek szorosan összekapcsolódnak, és együtt diffundálnak FCS méréseink alapján. A fehérjék asszociált hányadait a mikrodoménekben 40 nm-es feloldás mellett becsültük meg. Az expressziós szint redukálása következtében az MHC I klaszterek átlagos átmérője 400-600 nm-ről 200-300 nm-re csökkent. Az IL-2/15 receptorok klaszterméretét nem befolyásolta a kölcsönható partnerek számának csökkentése.

Értekezésemben funkcionális vizsgálatokat nem végeztem, általánosságban elmondhatjuk, hogy a fehérje nano- és mikroklaszterek jelátviteli platformként szolgálhatnak, így a membránfehérjék klaszterizációja több jelátviteli útvonalra és sejtfunkcióra jelentős hatással lehet [207-210]. A membránfehérjék hierarchikus és dinamikus klaszterizációjának pontos megértése feltételezi az intra- és extracelluláris, valamint a membránban ható tényezők alapos feltárását. Értekezésemben megvizsgáltam, hogy a legnagyobb számban jelenlevő klaszterbeli elem permanens csökkentése milyen konzekvenciákkal jár egyes nano- és mikroméretű formációkra.

6.2. Az AP-1 komplex vizsgálata

Az AP-1 komplex a Fos, Jun és ATF (Activating transcription factor) fehérjecsaldok elemeiből felépülő transzkripciós faktor. Értekezésem második részében a c-Jun és a c-Fos heterodimer transzkripciós faktorok konformációját és DNS-hez való kötődési képességét vizsgáltam meg. A c-Fos és c-Jun leucin cipzárral összekapcsolódó dimer, számos gén szabályozásában van szerepük, aktivációjuk az IL-2 általi jelátvitel egyik lehetséges végpontja. A C-terminális doménjük konformációja ismeretlen, az irodalomban csak dimerizációs és DNS-kötő doménjéről áll rendelkezésre kristályszerkezeti struktúra.

A transzkripciós faktor dimerek konformációjának vizsgálatához a C-végükön elhelyezkedő fluoreszcens fehérjék közötti FRET méréseket végeztünk konfokális mikroszkóppal. A transzkripciós faktorok DNS-kötődésének vizsgálatát keresztkorrelációs (FCCS) analízis segítségével végeztük el. Azért, hogy c-Fos és c-Jun C-terminális doménjeinek hossza egyenlő legyen, c-Fos deléciós mutánt hoztunk (c-Fos²¹⁵) létre, amely C-vége 165 aminosavval rövidebb. FRET adataink alapján, a teljes hosszúságú c-Fos és c-Jun fehérjék C végére kapcsolt fluorofórok közötti átlagos távolság $8,4 \pm 0,5$ nm volt, míg a c-Fos²¹⁵ és c-Jun fehérjék között $6,8 \pm 0,1$ nm. Ezen távolságadatok segítségével a molekuláris dinamikai modellek közül kiválaszthattuk azokat, melyek kompatibilisek méréseinkkel. Ez alapján megállapíthattuk, hogy a két fehérje C-terminális szakaszai a lineáris hosszak által lehetővé tett távolságoknál jelentősen közelebb, helyezkednek el, ami a transzaktivációs domének közelségére utal a dimerben. A fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiai analízis segítségével megállapítottuk, hogy DNS-hez kötött dimer transzkripciós faktorok aránya csökkent a molekuláris rövidítés következtében, tehát a C terminális régióknak funkciója van a DNS-hez való kötődésben. Ez egybecseng a C-terminális transzaktivációs szerepével. Eredményeink rávilágítanak, hogy a molekuláris dinamikai szimulációkból számolt lehetséges konformációk körét jelentősen szűkíteni lehet FRET mérésekből kapott átlagos távolságok segítségével.

Mivel a c-Fos és c-Jun heterodimerizációja régóta ismert, így jó modellrendszerként használható GFP-mRFP közötti FRET mérések optimalizálására és tervezésére. Az IL-2 receptorok sejtfelszíni összeszerelődését ligand hiányában is a receptor alegységek közötti FRET mérések bizonyították. Munkacsoportunkban jelenleg történnek kutatások az IL-2 és -15 receptor alegységek sejten belüli összeszerelődésének nyomon követésére az endoplazmás retikulumban és a Golgiban, így a c-Fos és c-Jun közötti FRET mérésének a kidolgozását használni lehet más építőpokokhoz kötött GFP és mRFP fehérjepárok közötti FRET mérésekhez is.

6.3. FPGA korrelátor validálása

Dolgozatom harmadik részében egy multifunkciós újraprogramozható mérőeszköz FCS/FCCS mérésekben való alkalmazását mutattam be. A mérések során gyakran szükség van a korrelációs függvények futásidőben való kiszámolására és megjelenítésére, így a görbék kiszámolását célhardver (hardver korrelátor) használata megkönnyíti. A korrelációs görbék kiszámolásához gyakran használt eljárás a multiple- τ algoritmus, használatával a korrelációs függvényeket logaritmikusan ekvidisztáns késleltetési időpontokban lehet kiszámolni. Az algoritmus nem túl nagy adattárolási igénye, valamint az adatblokkonkénti számolás eredményeképpen az általunk elérhető FPGA eszközön lehetséges volt többcsatornás multiple- τ hardver korrelátort fejleszteni. Az FPGA eszközök előnyei között szerepel a kereskedelmi forgalomban kapható korrelátorokhoz képesti olcsóságuk. További előnyük az újraprogramozhatóságuk, valamint a többszörös analóg illetve digitális áramköri bemenetelük, így nem csak korrelátor elemként, hanem általános célú mérésvezérlő és adatgyűjtő eszközként is használhatóak. Az eszköz programozása során szem előtt kell tartani, hogy az algoritmusok implementálásakor a párhuzamos számolások számának a maximalizálására és azok megfelelő szinkronizálására kell törekedni, ellenkező esetben az eszközök kihasználtsága az optimálistól elmaradhat. A korábban rendelkezésünkre álló ALV-5000E korrelátor egyszerre csak vagy a két csatorna autokorrelációs függvényeit, vagy pedig azok keresztkorrelációs függvényeit tudja kiszámolni. Mivel a membrán inhomogén, így az érzékeny térfogatban milliszekundumos időskálán kicserélődő fehérjekomplexek aggregációs és diffúziós paraméterei változékonyak. Ezért az egymás után elvégzett auto- és keresztkorrelációs mérések más molekulapopulációt jellemeznek, ami hátrányos, ha pl. az autokorrelációs és keresztkorrelációs függvények ismeretét is igénylő asszociált hányad meghatározása a célunk. Az FPGA kártya egyidejűleg képes az összes korrelációs függvény meghatározására, kiküszöbölve ezt a problémát.

Értekezésemben a mérőeszköz validálásaként két színnel jelölt, oldatban diffundáló antitest korrelációs függvényeinek a paraméterbecsléseit végeztem el. A paramétereket a kereskedelmi forgalomban kapható ALV5000E-korrelátorral meghatározott függvények nemlineáris illesztésével is megbecsültem. Az illesztett paraméterek a két eszközön közel azonosak voltak.

A párhuzamos auto- és keresztkorrelációs függvények kiszámolásával a molekulakomplexek asszociált hányadát lehet egy mérésen belül pontosabban megbecsülni, valamint az együttmozgó komplexek stabilitását is lehetséges jellemezni. Terveink szerint az eszközt sejtfelszíni fehérjekomplexben való asszociált hányad meghatározására is használni fogjuk. További terveink szerint az eszközön háromcsatornás hardver korrelátort is fogunk fejleszteni,

mellyel három más-más színnel jelölt fehérje mobilitási viszonyait és asszociált hányadait fogjuk megmérni (pl.: IL-2R α - IL-2R β - IL-2R γ).

7. Összefoglalás

A membránfehérjékből felépülő sejtfelszíni struktúrák változatos térbeli és időbeli szerkezettel rendelkeznek, több hierarchikus szinten szerveződnek. Az immunfolyamatokban fontos szereppel rendelkező interleukin-2 és -15 citokin receptorok és az MHC I és II molekulák közös klaszterekben fejeződnek ki T sejtek membránjában. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a legmagasabb expressziójú komponens, az MHC I hogyan befolyásolja a klaszter elemeinek aggregációját és dinamikáját. Ezért az MHC I expresszióját siRNS-sel csendesítettük. Szuperfelfodású képek analízisével kimutattuk, hogy az MHC I molekulák klasztermérete azok expressziós szintjének a függvénye. Az IL-2R α és IL-15R α alegységek klaszterizációját, valamint az IL-2/15R β és IL-2R α közötti átlagos távolságot az MHC I csendesítése nem befolyásolta. Molekuláris fényességek analízisével kimutattuk, hogy a kisméretű MHC I komplexekben a homoaggregáció mértéke csökkent az expressziós szint csökkentésével. FCS mérések segítségével megállapítottuk, hogy az MHC I molekulák mobilitása következetesen nagyobb a kölcsönható fehérjék által alkotott aggregátum méretének csökkentésével. Az IL-2/15R α alegységek mobilitása is megnőtt az MHC I számának a csökkentésével. Az MHC I és az IL-2R α /IL-15R α stabil kölcsönhatása következtében a géncsendesítés után megmaradó MHC I molekulák az IL-2R α /IL-15R α alegységek mellett maradtak. A receptorok lipid tutajokban való akkumulációjára nem volt hatással a géncsendesítés.

Értekezésem további részében az IL-2 jelútvonalban is szerepet játszó c-Jun és a c-Fos heterodimer transzkripciós faktorok konformációját és dinamikus sajátságait vizsgáltam meg. A dimerek konformációjának vizsgálatához a C-végükön elhelyezkedő fluoreszcens fehérjék között FRET méréseket végeztünk, a DNS-kötődés vizsgálatát fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiás (FCCS) analízis segítségével végeztük el. Megállapítottuk, hogy DNS-hez kötött dimer transzkripciós faktorok aránya csökkent, ha a c-Fos C-terminális végét megrövidítettük, tehát a C terminális régiónak funkciója van a DNS-hez való kötődésben. A FRET adatok alapján számolt átlagos távolságok ismeretében a molekuláris dinamikai szimulációkból számolt lehetséges konformációk körét jelentősen szűkíteni lehetett.

Az értekezés utolsó részében egy újraprogramozható mérőeszköz (FPGA) biofizikai mérésekben való lehetséges alkalmazását, illetve validálását mutattam be fluoreszcencia (kereszt)korrelációs mérésekben. Az eszközzel, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható korrelátorral meghatározott korrelációs függvények paraméterbecslését nemlineáris illesztéssel végeztem el, a paraméterek a két eszközön közel azonosak voltak. Az eszköz segítségével megbecsülhető a molekulakomplexekben levő fehérjék asszociált hányada és mobilitása, lehetővé téve téve pontosabb biofizikai modellek felállítását.

8. Summary

Membrane proteins form dynamic clusters at different hierarchical levels. MHC I and II glycoproteins and interleukin-2 and -15 receptors, which are all important players in immunological processes, form supramolecular clusters in lipid rafts of T cells. The role of the highly expressed MHC glycoproteins in these complexes has not been elucidated, we were interested in finding the effect of gene silencing of MHC I glycoproteins on the dynamics and clustering of MHC I and IL-2R α /IL-15R α . The expression level of MHC I was reduced using anti- β 2m siRNA. Combination of superresolution microscopy with image analysis methods showed that the diameter of MHC I superclusters significantly reduced, whereas those of IL-2R α /IL-15R α hardly changed upon gene silencing. Fluorescence correlation spectroscopy-based brightness analysis revealed that the molecular level of homoaggregation of MHC I molecules was reduced by decreasing their expression level. The mobility of IL-2R α , IL-15R α and MHC I increased significantly upon knockdown of MHC I, corroborating the general size decrease of protein aggregates. MHC I molecules retracted to a smaller total area, but remained in the vicinity of interleukin receptors. The interaction between IL-2R α and IL-2/15R β subunits did not change significantly, suggesting that the interactions holding these subunits together were not dependent on the presence of MHC I. Our colocalization analyses suggested that the enrichment of IL-2R α /IL-15R α in lipid rafts was not affected by removing MHC I molecules.

In the second part of the dissertation the dynamics and conformation of heterodimer-forming c-Jun and c-Fos transcription factors, which are part of the signaling pathway of IL-2, were analyzed. The conformation of the dimers was analyzed by FRET measurements between the fluorescently labeled C-termini of Jun and Fos proteins. Two-color cross-correlation analysis was used to assess co-mobility and DNA binding of the constructs. The data showed that the fraction of DNA-bound dimers decreased if we truncated the C-terminus of c-Fos, suggesting that the C-terminal end may play a role in the stabilization of the DNA-binding of the transcription factors. The average distances of the C-termini derived from our FRET measurements allowed us to narrow down the range of possible conformations of the Fos-Jun dimer predicted by molecular dynamic simulations.

Finally, an application of a reprogrammable hardware device (FPGA) in biophysical measurements, and its validation were presented in fluorescence (cross)correlation experiments. The correlation functions calculated by our commercial correlator and the FPGA correlator overlapped perfectly and yielded practically identical fit parameters. By using this hardware, the associated fraction of diffusing molecules and their co-mobility can be quantified, allowing the establishment of more precise biophysical models.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Lombard, J., *Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research*. Biol Direct, 2014. **9**: p. 32.
2. Danielli JF, D.H., *A contribution to the theory of permeability of thin films*. J Cell Comp Physiol, 1935(5): p. 13.
3. Nicolson, G.L., *The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(6): p. 1451-66.
4. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
5. Escriba, P.V., et al., *Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008. **12**(3): p. 829-875.
6. Vereb, G., et al., *Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8053-8.
7. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
8. Feigenson, G.W., *Phase behavior of lipid mixtures*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(11): p. 560-3.
9. Simons, K. and M.J. Gerl, *Revitalizing membrane rafts: new tools and insights*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 688-99.
10. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
11. Baron, W., et al., *Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains*. Curr Biol, 2003. **13**(2): p. 151-5.
12. Barua, D. and B. Goldstein, *A mechanistic model of early FcepsilonRI signaling: lipid rafts and the question of protection from dephosphorylation*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51669.
13. Brdicka, T., J. Cerny, and V. Horejsi, *T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 356-60.
14. Horejsi, V., et al., *GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors*. Immunol Today, 1999. **20**(8): p. 356-61.
15. Nicolau, D.V., Jr., et al., *Identifying optimal lipid raft characteristics required to promote nanoscale protein-protein interactions on the plasma membrane*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 313-23.
16. Suzuki, K.G., *Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes*. Biotechnol J, 2012. **7**(6): p. 753-61.
17. Kraft, M.L., *Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(18): p. 2765-8.
18. Levental, I. and S. Veatch, *The continuing mystery of lipid rafts*. J Mol Biol, 2016.
19. Eggeling, C., et al., *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. Nature, 2009. **457**(7233): p. 1159-62.
20. Honigsmann, A., et al., *Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5412.
21. Mueller, V., et al., *STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells*. Biophys J, 2011. **101**(7): p. 1651-60.
22. Owen, D.M., et al., *The lipid raft hypothesis revisited--new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy*. Bioessays, 2012. **34**(9): p. 739-47.
23. Kusumi, A., Y. Sako, and M. Yamamoto, *Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells*. Biophys J, 1993. **65**(5): p. 2021-40.

24. Sako, Y. and A. Kusumi, *Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis*. J Cell Biol, 1994. **125**(6): p. 1251-64.
25. Kusumi, A., et al., *Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1814-23.
26. Ritchie, K., et al., *The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review)*. Mol Membr Biol, 2003. **20**(1): p. 13-8.
27. Thomas, C. and C.J. Staiger, *A dynamic interplay between membranes and the cytoskeleton critical for cell development and signaling*. Frontiers in Plant Science, 2014. **5**.
28. Edidin, M., *Patches and fences: probing for plasma membrane domains*. J Cell Sci Suppl, 1993. **17**: p. 165-9.
29. Kusumi, A. and Y. Sako, *Cell surface organization by the membrane skeleton*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 566-74.
30. Andrea Bodnár, G.V., Katalin Tóth, Attila Jenei, László Mátyus, Sándor Damjanovich, *Non-random patterns of membrane proteins and their roles in transmembrane signaling*, in *Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling*, S. Damjanovich, Editor. 2005, Springer Series in Biophysics. p. 71-95.
31. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 169-83.
32. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 595-601.
33. Wang, H.M. and K.A. Smith, *The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 1055-69.
34. Lorenzen, I., et al., *The structure of the interleukin-15 alpha receptor and its implications for ligand binding*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6642-7.
35. Stauber, D.J., et al., *Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2788-93.
36. Olsen, S.K., et al., *Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37191-204.
37. Ring, A.M., et al., *Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1187-95.
38. Anderson, D.M., et al., *Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes*. J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29862-9.
39. Giri, J.G., et al., *Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor*. EMBO J, 1995. **14**(15): p. 3654-63.
40. Damjanovich, S., et al., *Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13134-9.
41. Vereb, G., et al., *Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 6013-8.
42. Vamosi, G., et al., *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.
43. Pillet, A.H., et al., *IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork*. J Mol Biol, 2010. **403**(5): p. 671-92.
44. Lin, J.X., et al., *The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 331-9.

45. Nelson, B.H., J.D. Lord, and P.D. Greenberg, *Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation*. *Nature*, 1994. **369**(6478): p. 333-6.
46. Nelson, B.H. and D.M. Willerford, *Biology of the interleukin-2 receptor*. *Adv Immunol*, 1998. **70**: p. 1-81.
47. Friedman, M.C., et al., *Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(5): p. 2077-2082.
48. Osinalde, N., et al., *Interleukin-2 signaling pathway analysis by quantitative phosphoproteomics*. *Journal of Proteomics*, 2011. **75**(1): p. 177-191.
49. Osinalde, N., et al., *Characterization of Receptor-Associated Protein Complex Assembly in Interleukin (IL)-2- and IL-15-Activated T-Cell Lines*. *J Proteome Res*, 2016.
50. Russell, S.M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor*. *Science*, 1993. **262**(5141): p. 1880-3.
51. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor*. *Science*, 1993. **262**(5141): p. 1877-80.
52. Kimura, Y., et al., *Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex*. *Int Immunol*, 1995. **7**(1): p. 115-20.
53. Asao, H., et al., *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 1-5.
54. 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.
55. Dai, Z., et al., *The role of the common cytokine receptor gamma-chain in regulating IL-2-dependent, activation-induced CD8+ T cell death*. *J Immunol*, 1999. **163**(6): p. 3131-7.
56. Ghazaryan, H., M. Petrek, and A. Boyajyan, *Chronic schizophrenia is associated with over-expression of the interleukin-2 receptor gamma gene*. *Psychiatry Res*, 2014. **217**(3): p. 158-62.
57. Burns, J.K., A. Tomita, and A.S. Kapadia, *Income inequality and schizophrenia: increased schizophrenia incidence in countries with high levels of income inequality*. *Int J Soc Psychiatry*, 2014. **60**(2): p. 185-96.
58. Erdei, A., G. Sármay, and J. Prechl, *Immunológia*. 2012.
59. Madden, D.R., *The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes*. *Annu Rev Immunol*, 1995. **13**: p. 587-622.
60. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(10): p. 702-9.
61. Ting, J.P. and J. Trowsdale, *Genetic control of MHC class II expression*. *Cell*, 2002. **109** Suppl: p. S21-33.
62. Brodsky, F.M. and L.E. Guagliardi, *The cell biology of antigen processing and presentation*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 707-44.
63. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 287-99.
64. Bodnar, A., et al., *Modification of membrane cholesterol level affects expression and clustering of class I HLA molecules at the surface of JY human lymphoblasts*. *Immunol Lett*, 1996. **54**(2-3): p. 221-6.
65. Bosch, B., et al., *Major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complexes arrive at the plasma membrane in cholesterol-rich microclusters*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(19): p. 13236-42.
66. Damjanovich, S., et al., *Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(4): p. 1122-6.
67. Huby, R.D., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(32): p. 22591-6.

68. Jenei, A., et al., *HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7269-74.
69. Schreiber, A.B., J. Schlessinger, and M. Edidin, *Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells*. J Cell Biol, 1984. **98**(2): p. 725-31.
70. Matyus, L., et al., *Distinct association of transferrin receptor with HLA class I molecules on HUT-102B and JY cells*. Immunol Lett, 1995. **44**(2-3): p. 203-8.
71. Bene, L., et al., *Lateral organization of the ICAM-1 molecule at the surface of human lymphoblasts: a possible model for its co-distribution with the IL-2 receptor, class I and class II HLA molecules*. Eur J Immunol, 1994. **24**(9): p. 2115-23.
72. Matko, J., et al., *GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines*. European Journal of Biochemistry, 2002. **269**(4): p. 1199-1208.
73. Edidin, M. and J. Reiland, *Dynamic measurements of the associations between class I MHC antigens and insulin receptors*. Mol Immunol, 1990. **27**(12): p. 1313-7.
74. Ramalingam, T.S., A. Chakrabarti, and M. Edidin, *Interaction of class I human leukocyte antigen (HLA-I) molecules with insulin receptors and its effect on the insulin-signaling cascade*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(12): p. 2463-74.
75. Reiland, J. and M. Edidin, *Chemical cross-linking detects association of insulin receptors with four different class I human leukocyte antigen molecules on cell surfaces*. Diabetes, 1993. **42**(4): p. 619-25.
76. Lagaudriere-Gesbert, C., et al., *The tetraspanin protein CD82 associates with both free HLA class I heavy chain and heterodimeric beta 2-microglobulin complexes*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2790-7.
77. Szollosi, J., et al., *Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2939-46.
78. Assa-Kunik, E., et al., *Alterations in the expression of MHC class I glycoproteins by B16BL6 melanoma cells modulate insulin receptor-regulated signal transduction and augment [correction of augments] resistance to apoptosis*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 2945-52.
79. Skov, S., P. Klausen, and M.H. Claesson, *Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-jun NH2-terminal kinase activity: A novel apoptotic pathway distinct from fas-induced apoptosis*. Journal of Cell Biology, 1997. **139**(6): p. 1523-1531.
80. Pedersen, A.E., et al., *Signal transduction by the major histocompatibility complex class I molecule*. Apmis, 1999. **107**(10): p. 887-895.
81. Szöllösi, J., et al., *Flow cytometric resonance energy transfer measurements support the association of a 95-kDa peptide termed T27 with the 55-kDa Tac peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7246-50.
82. Harel-Bellan, A., et al., *Flow cytometry resonance energy transfer suggests an association between low-affinity interleukin 2 binding sites and HLA class I molecules*. Biochem J, 1990. **268**(1): p. 35-40.
83. Edidin, M., et al., *Lateral diffusion measurements give evidence for association of the Tac peptide of the IL-2 receptor with the T27 peptide in the plasma membrane of HUT-102-B2 T cells*. J Immunol, 1988. **141**(4): p. 1206-10.
84. Fernando, M.M., et al., *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet, 2008. **4**(4): p. e1000024.
85. Jersild, C. and T. Fog, *Histocompatibility (HL-A) antigens associated with multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand Suppl, 1972. **51**: p. 377.
86. Harbo, H.F., et al., *Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis*. Tissue Antigens, 2004. **63**(3): p. 237-247.

87. Todd, J.A., *Genetic-Control of Autoimmunity in Type-1 Diabetes*. Immunology Today, 1990. **11**(4): p. 122-129.
88. Schur, P.H., *Genetics of systemic lupus erythematosus*. Lupus, 1995. **4**(6): p. 425-437.
89. Forabosco, P., et al., *Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus*. Genes and Immunity, 2006. **7**(7): p. 609-614.
90. Bonen, D.K. and J.H. Cho, *The genetics of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 521-36.
91. Satsangi, J., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(1): p. 3-18.
92. Mahdi, B.M., *Role of HLA typing on Crohn's disease pathogenesis*. Annals of Medicine and Surgery, 2015. **4**(3): p. 248-253.
93. Deighton, C.M., et al., *The Contribution of Hla to Rheumatoid-Arthritis*. Clinical Genetics, 1989. **36**(3): p. 178-182.
94. Newton, J.L., et al., *A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis*. Genes Immun, 2004. **5**(3): p. 151-7.
95. Arosa, F.A., S.G. Santos, and S.J. Powis, *Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules*. Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 115-23.
96. Bowness, P., S. Caplan, and M. Edidin, *MHC molecules lead many lives. Workshop on MHC Class I Molecules at the interface between Biology & Medicine*. EMBO Rep, 2009. **10**(1): p. 30-4.
97. Glover, J.N.M. and S.C. Harrison, *Crystal-Structure of the Heterodimeric Bzip Transcription Factor C-Fos-C-Jun Bound to DNA*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 257-261.
98. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
99. Angel, P. and M. Karin, *The Role of Jun, Fos and the Ap-1 Complex in Cell-Proliferation and Transformation*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1991. **1072**(2-3): p. 129-157.
100. Leonard, D.A., N. Rajaram, and T.K. Kerppola, *Structural basis of DNA bending and oriented heterodimer binding by the basic leucine zipper domains of Fos and Jun*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(10): p. 4913-4918.
101. Wisdom, R. and I.M. Verma, *Transformation by Fos Proteins Requires a C-Terminal Transactivation Domain*. Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**(12): p. 7429-7438.
102. Knippers, R., *Molecular Genetics*. 1997, Stuttgart, Germany: Thieme Verlag.
103. Baudendistel, N., et al., *Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo*. Chemphyschem, 2005. **6**(5): p. 984-90.
104. Karin, M., *The Regulation of Ap-1 Activity by Mitogen-Activated Protein-Kinases*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(28): p. 16483-16486.
105. Sheng, M., M.A. Thompson, and M.E. Greenberg, *Creb - a Ca²⁺-Regulated Transcription Factor Phosphorylated by Calmodulin-Dependent Kinases*. Science, 1991. **252**(5011): p. 1427-1430.
106. Devary, Y., et al., *Rapid and Preferential Activation of the C-Jun Gene during the Mammalian Uv Response*. Molecular and Cellular Biology, 1991. **11**(5): p. 2804-2811.
107. Vanhoutte, P., et al., *Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(1): p. 136-146.
108. Turjanski, A.G., J.P. Vaque, and J.S. Gutkind, *MAP kinases and the control of nuclear events*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3240-3253.
109. Johnston, S.R.D., et al., *Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance*. Clinical Cancer Research, 1999. **5**(2): p. 251-256.
110. Zhang, L., et al., *Fos-related activator-1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and associated with tumor lymph node metastasis*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2010. **39**(6): p. 470-476.
111. Yuen, M.F., et al., *Expression of c-Myc, c-Fos, and c-Jun in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2001. **91**(1): p. 106-112.

112. Kress, E., et al., *Cooperation Between the Thyroid Hormone Receptor TR alpha 1 and the WNT Pathway in the Induction of Intestinal Tumorigenesis*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(5): p. 1863-U58.
113. Milde-Langosch, K., *The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis*. *European Journal of Cancer*, 2005. **41**(16): p. 2449-2461.
114. BossyWetzel, E., L. Bakiri, and M. Yaniv, *Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun*. *Embo Journal*, 1997. **16**(7): p. 1695-1709.
115. Wisdom, R., R.S. Johnson, and C. Moore, *c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms*. *Embo Journal*, 1999. **18**(1): p. 188-197.
116. Schreiber, M., et al., *Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent*. *Genes & Development*, 1999. **13**(5): p. 607-619.
117. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995. **6**(1): p. 103-10.
118. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006.
119. Förster, T., *Delocalized Excitation and Excitation Transfer*. New York and London: Academic Press. 1965.
120. Sun, Y., et al., *FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Forster on the 100th anniversary of his birth*. *Chemphyschem*, 2011. **12**(3): p. 462-74.
121. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. *Annu Rev Biochem*, 1978. **47**: p. 819-46.
122. Dietrich, A., et al., *Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor-acceptor substituted DNA strands: a comparative study of ensemble and single-molecule data*. *J Biotechnol*, 2002. **82**(3): p. 211-31.
123. Akrap, N., T. Seidel, and B.G. Barisas, *Forster distances for fluorescence resonant energy transfer between mCherry and other visible fluorescent proteins*. *Anal Biochem*, 2010. **402**(1): p. 105-6.
124. Gustafsson, M.G., *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. *J Microsc*, 2000. **198**(Pt 2): p. 82-7.
125. Gustafsson, M.G., *Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(37): p. 13081-6.
126. Betzig, E., et al., *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. *Science*, 2006. **313**(5793): p. 1642-5.
127. Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. *Nat Methods*, 2006. **3**(10): p. 793-5.
128. Hell, S.W., *Far-field optical nanoscopy*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1153-8.
129. Wildanger, D., et al., *STED microscopy with a supercontinuum laser source*. *Opt Express*, 2008. **16**(13): p. 9614-21.
130. Buckers, J., et al., *Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses*. *Opt Express*, 2011. **19**(4): p. 3130-43.
131. Ronnlund, D., et al., *Spatial organization of proteins in metastasizing cells*. *Cytometry A*, 2013. **83**(9): p. 855-65.
132. Rönnlund, D., *Super-resolution optical imaging - image analysis, multicolor development and biological applications.*, in *Exp Biomol Physics*. 2014, KTH Royal Institute of Technology.
133. Xu, L., *Development and application of ultra-sensitive fluorescence spectroscopy and microscopy for biomolecular studies.*, in *Exp Biomol Physics*. 2014, KTH Royal Institute of Technology.
134. Bergemann, F., et al., *2000-fold parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy*. *Optics Express*, 2015. **23**(1): p. 211-223.
135. Lauterbach, M.A., et al., *Dynamic Imaging of Colloidal-Crystal Nanostructures at 200 Frames per Second*. *Langmuir*, 2010. **26**(18): p. 14400-14404.

136. Westphal, V., et al., *Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement*. Science, 2008. **320**(5873): p. 246-249.
137. Petrou, M. and C. Petrou, *Image processing : the fundamentals*. 2nd ed. 2010, Chichester, U.K.: Wiley. xxiii, 794 p.
138. Hwang, J., et al., *Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy*. Biophysical Journal, 1998. **74**(5): p. 2184-2190.
139. Sengupta, P., T. Jovanovic-Talisman, and J. Lippincott-Schwartz, *Quantifying spatial organization in point-localization superresolution images using pair correlation analysis*. Nature Protocols, 2013. **8**(2): p. 345-354.
140. Dittrich, P., et al., *Accessing molecular dynamics in cells by fluorescence correlation spectroscopy*. Biol Chem, 2001. **382**(3): p. 491-4.
141. Rudolf Rigler, P.E.S.E., *Fluorescence Correlation Spectroscopy Theory and Applications*. 2001.
142. Schwille, P., *Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications*. Cell Biochem Biophys, 2001. **34**(3): p. 383-408.
143. D., M. and E. E., *Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Phys. Rev. Lett, 1972. **29**: p. 705-708.
144. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 29-61.
145. Elson, E.L., *Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future*. Biophys J, 2011. **101**(12): p. 2855-70.
146. Mets, U. and R. Rigler, *Submillisecond detection of single rhodamine molecules in water*. J Fluoresc, 1994. **4**(3): p. 259-64.
147. Koppel, D.E., *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy*. Phys. Rev. A., 1974. **10**: p. 1938-1945.
148. Chen, Y., et al., *The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy*. Biophys J, 1999. **77**(1): p. 553-67.
149. Herrick-Davis, K., et al., *Oligomer size of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2C (5-HT_{2C}) receptor revealed by fluorescence correlation spectroscopy with photon counting histogram analysis: evidence for homodimers without monomers or tetramers*. J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23604-14.
150. Digman, M.A., et al., *Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope*. Biophysical Journal, 2008. **94**(6): p. 2320-2332.
151. Anikovskiy, M., et al., *Photon Counting Histogram Analysis for Two-Dimensional Systems*. Chemphyschem, 2011. **12**(13): p. 2438-2447.
152. Bacia, K., S.A. Kim, and P. Schwille, *Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells*. Nat Methods, 2006. **3**(2): p. 83-9.
153. Ma, X., Y.H. Foo, and T. Wohland, *Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) in living cells*. Methods Mol Biol, 2014. **1076**: p. 557-73.
154. Szaloki, N., et al., *Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(21): p. 3785-98.
155. Eigen, M. and R. Rigler, *Sorting Single Molecules - Application to Diagnostics and Evolutionary Biotechnology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(13): p. 5740-5747.
156. Schwille, P., F.J. Meyer-Almes, and R. Rigler, *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution*. Biophysical Journal, 1997. **72**(4): p. 1878-1886.
157. Kim, S.A., et al., *Two-photon cross-correlation analysis of intracellular reactions with variable stoichiometry*. Biophysical Journal, 2005. **88**(6): p. 4319-4336.
158. Bacia, K. and P. Schwille, *Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Nature Protocols, 2007. **2**(11): p. 2842-2856.

159. Stromqvist, J., et al., *A Modified FCCS Procedure Applied to Ly49A-MHC Class I cis-Interaction Studies in Cell Membranes*. Biophysical Journal, 2011. **101**(5): p. 1257-1269.
160. Schatzel, K., M. Drewel, and S. Stimac, *Photon-Correlation Measurements at Large Lag Times - Improving Statistical Accuracy*. Journal of Modern Optics, 1988. **35**(4): p. 711-718.
161. Wenzel, M., W. Burchard, and K. Schatzel, *Dynamic Light-Scattering from Semidilute Cellulose-Tri-Carbanilate Solutions*. Polymer, 1986. **27**(2): p. 195-201.
162. Wohland, T., R. Rigler, and H. Vogel, *The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2001. **80**(6): p. 2987-99.
163. Magatti, D. and F. Ferri, *Fast multi-tau real-time software correlator for dynamic light scattering*. Appl Opt, 2001. **40**(24): p. 4011-21.
164. Magatti, D. and F. Ferri, *25 ns software correlator for photon and fluorescence correlation spectroscopy*. Review of Scientific Instruments, 2003. **74**(2): p. 1135-1144.
165. Wahl, M., et al., *Fast calculation of fluorescence correlation data with asynchronous time-correlated single-photon counting*. Optics Express, 2003. **11**(26): p. 3583-3591.
166. Laurence, T.A., S. Fore, and T. Huser, *Fast, flexible algorithm for calculating photon correlations*. Optics Letters, 2006. **31**(6): p. 829-831.
167. Yang, L.L., et al., *Real-time data acquisition incorporating high-speed software correlator for single-molecule spectroscopy*. Journal of Microscopy-Oxford, 2009. **234**(3): p. 302-310.
168. Schaub, E., *F2Cor: fast 2-stage correlation algorithm for FCS and DLS*. Optics Express, 2012. **20**(3): p. 2184-2195.
169. Hoppe, B., et al., *Design of digital correlation systems for low-intensity precision photon spectroscopic measurements*. Ieee Proceedings-Circuits Devices and Systems, 2001. **148**(5): p. 267-271.
170. Meyer-Base, U., *Digital Signal Processing with Field Programmable Gate Arrays*. 2007: Springer.
171. Dubois, S., et al., *IL-15 α recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 537-47.
172. Rubin, L.A., et al., *A monoclonal antibody 7G7/B6, binds to an epitope on the human interleukin-2 (IL-2) receptor that is distinct from that recognized by IL-2 or anti-Tac*. Hybridoma, 1985. **4**(2): p. 91-102.
173. Brizzard, B.L., R.G. Chubet, and D.L. Vizard, *Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution*. Biotechniques, 1994. **16**(4): p. 730-5.
174. Matko, J. and M. Edidin, *Energy transfer methods for detecting molecular clusters on cell surfaces*. Methods Enzymol, 1997. **278**: p. 444-62.
175. Haugland, R.P., *Antibody conjugates for cell biology*. Curr Protoc Cell Biol, 2001. **Chapter 16**: p. Unit 16 5.
176. Vamosi, G., et al., *Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study*. Biophysical Journal, 2008. **94**(7): p. 2859-2868.
177. Pawley, J.B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. THIRD EDITION ed. 2006.
178. Bastiaens, P.I. and T.M. Jovin, *Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C β 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8407-12.
179. Roszik, J., J. Szollosi, and G. Vereb, *AccPbFRET: an ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 346.
180. Sebestyen, Z., et al., *Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer*. Cytometry, 2002. **48**(3): p. 124-35.
181. Tron, L., et al., *Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis*. Biophys J, 1984. **45**(5): p. 939-46.

182. Beck, Z., et al., *New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production*. J Lipid Res, 2010. **51**(2): p. 286-96.
183. Mocsar, G., et al., *Note: multiplexed multiple-tau auto- and cross-correlators on a single field programmable gate array*. Rev Sci Instrum, 2012. **83**(4): p. 046101.
184. Wachsmuth, M., *Fluorescence fluctuation microscopy: proto type development, theory and measurement of intranuclear mobility of biomolecules*. 2001, Ruprecht-Karls-Universitat: Heidelberg, Germany.
185. Petrov, E.P., et al., *Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA*. Phys Rev Lett, 2006. **97**(25): p. 258101.
186. Culbertson, C.T., S.C. Jacobson, and J. Michael Ramsey, *Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices*. Talanta, 2002. **56**(2): p. 365-73.
187. Montis, C., et al., *Interaction of nanoparticles with lipid membranes: a multiscale perspective*. Nanoscale, 2014. **6**(12): p. 6452-7.
188. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(4): p. C723-42.
189. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten, *Measurement of Colocalization of Objects in Dual-Color Confocal Images*. Journal of Microscopy-Oxford, 1993. **169**: p. 375-382.
190. Elson, E.L., *Introduction*, in *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications.*, R. Rigler and E.L. Elson, Editors. 2001, Springer: Berlin. p. 1-6.
191. Tan, J.A., et al., *Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(19): p. 16993-17001.
192. Saitoh, M., et al., *The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: A three-dimensional imaging study*. Molecular Endocrinology, 2002. **16**(4): p. 694-706.
193. Peter, M., et al., *Multiphoton-FLIM quantification of the EGFP-mRFP1 FRET pair for localization of membrane receptor-kinase interactions*. Biophys J, 2005. **88**(2): p. 1224-37.
194. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7877-82.
195. Brazda, P., et al., *Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(21): p. 3631-3642.
196. Garcia-Parajo, M.F., et al., *Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 23): p. 4995-5005.
197. Frye, L.D. and M. Edidin, *The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons*. J Cell Sci, 1970. **7**(2): p. 319-35.
198. Edidin, M., Y. Zagayansky, and T.J. Lardner, *Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells*. Science, 1976. **191**(4226): p. 466-8.
199. Schnapp, B.J., J. Gelles, and M.P. Sheetz, *Nanometer-scale measurements using video light microscopy*. Cell Motil Cytoskeleton, 1988. **10**(1-2): p. 47-53.
200. Nagy, P., et al., *Cell fusion experiments reveal distinctly different association characteristics of cell-surface receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 22): p. 4063-71.
201. Bodnar, A., et al., *Class IHLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes*. International Immunology, 2003. **15**(3): p. 331-339.
202. Lavi, Y., et al., *Lifetime of major histocompatibility complex class-I membrane clusters is controlled by the actin cytoskeleton*. Biophys J, 2012. **102**(7): p. 1543-50.
203. Mayor, S. and M. Rao, *Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 231-40.
204. Sharma, P., et al., *Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes*. Cell, 2004. **116**(4): p. 577-89.

205. Zhou, Y. and J.F. Hancock, *Ras nanoclusters: Versatile lipid-based signaling platforms*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(4): p. 841-9.
206. Saffman, P.G. and M. Delbruck, *Brownian motion in biological membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(8): p. 3111-3.
207. Harding, A. and J.F. Hancock, *Ras nanoclusters: combining digital and analog signaling*. Cell Cycle, 2008. **7**(2): p. 127-34.
208. Harding, A.S. and J.F. Hancock, *Using plasma membrane nanoclusters to build better signaling circuits*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(8): p. 364-71.
209. Liu, P., et al., *Low copy numbers of DC-SIGN in cell membrane microdomains: implications for structure and function*. Traffic, 2014. **15**(2): p. 179-96.
210. Szoor, A., J. Szollosi, and G. Vereb, *Rafts and the battleships of defense: the multifaceted microdomains for positive and negative signals in immune cells*. Immunol Lett, 2010. **130**(1-2): p. 2-12.

9.2. Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/284/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mocsár Gábor
Neptun kód: W56ZNY
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034348

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mocsár, G.**, Volkó, J., Rönnlund, D., Widengren, J., Nagy, P., Szöllősi, J., Tóth, K., Goldman, C. K., Damjanovich, S., Waldmann, T. A., Dóczy-Bodnár, A., Vámosi, G.: MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells. *Biophys. J.* 111 (1), 100-112, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.044>
IF: 3.632 (2015)
2. **Mocsár, G.**, Kreith, B., Buchholz, J., Krieger, J. W., Langowski, J., Vámosi, G.: Multiplexed multiple-tau auto- and cross-correlators on a single field programmable gate array. *Rev. Sci. Instrum.* 83 (4), 046101, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3700810>
IF: 1.602
3. Vámosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C. W., Szalóki, N., **Mocsár, G.**, Müller, G., Brázda, P., Waldeck, W., Damjanovich, S., Langowski, J., Tóth, K.: Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* 94 (7), 2859-2868, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120766>
IF: 4.683





További közlemények

4. Buchholz, J., Krieger, J. W., **Mocsár, G.**, Kreith, B., Charbon, E., Vámosi, G., Kebschull, U., Langowski, J.: FPGA implementation of a 32x32 autocorrelator array for analysis of fast image series.
Opt. Express. 20 (16), 17767-17782, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/OE.20.017767>
IF: 3.546
5. Beck, Z., Balogh, A., Kis, A., Izsépi, E., Cervenak, L., László, G., Bíró, A., Liliom, K., **Mocsár, G.**, Vámosi, G., Füst, G., Matkó, J.: New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production.
J. Lipid. Res. 51 (2), 286-296, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M000372>
IF: 6.115
6. Erdélyi, K., Bai, P., Kovács, I., Szabó, É., **Mocsár, G.**, Kakuk, A., Szabó, C., Gergely, P., Virág, L.: Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells.
FASEB J. 23 (10), 3553-3563, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-133264>
IF: 6.401
7. Dóczy-Bodnár, A., Nizsalóczki, E., **Mocsár, G.**, Szalóki, N., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., Vámosi, G.: A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions.
Immun. Lett. 116 (2), 117-125, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2007.12.014>
IF: 2.858

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,837

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,917

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

Debrecen, 2016.10.26.

10. Tárgyszavak

IL-2/-15 receptorok, c-Jun, c-Fos, MHC I, géncsendesítés, FCS, STED, FRET

11. Keywords

IL-2/-15 receptors, c-Jun, c-Fos, MHC I, gene silencing, FCS, STED, FRET

12. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Vámosi Györgynek a TDK-s korom óta nyújtott szakmai és emberi támogatását. Témavezetése alatt ismerkedtem meg a kísérletes alap kutatás természetével és az elméleti orvostudomány módszertanával. Köszönöm, amiért ezen az úton segítette a munkámat. Köszönöm a dolgozatom alapos átnézését, hasznos tanácsait.

Köszönöm Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Damjanovich Sándor volt intézetigazgatónak, aki kezdeti támogatásával és több évtizedes egyedülálló tapasztalatával gazdagította a tapasztalataimat. Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának.

Külön köszönet illeti Volkó Juliannát az elmúlt évek közös munkájáért; köszönettel tartozom a munkacsoportban dolgozó jelenlegi és korábbi kollégáimnak: Bravics Balázsnak, Dr. Brázda Péternek, Csomós Istvánnak, Dr. Dóczy-Bodnár Andreának, Nagy Évának, Dr. Nina Baudendistelnek, Nizsalóczki Enikőnek, Dr. Szalóki Nikolettának egyaránt, akik mindnyájan remek hangulatot teremtettek a szürke hétköznapiak során. Köszönöm Prof. Dr. Matkó Jánosnak a hasznos tanácsokat és észrevételeket.

Köszönetet mondok Utasi-Szabó Ritának, Horváth Melindának és Nagy Edinának a munkám gyakorlati része során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom a kollaborációs partnereinknek. Külön köszönettel tartozom Dr. Tóth Katalinnak, Prof. Dr. Jörg Langowskinak és Prof. Dr. Jerker Widengrennek, amiért nemzetközi kutatási tapasztalatot is szerezhettem. Köszönettel tartozom tanárainknak.

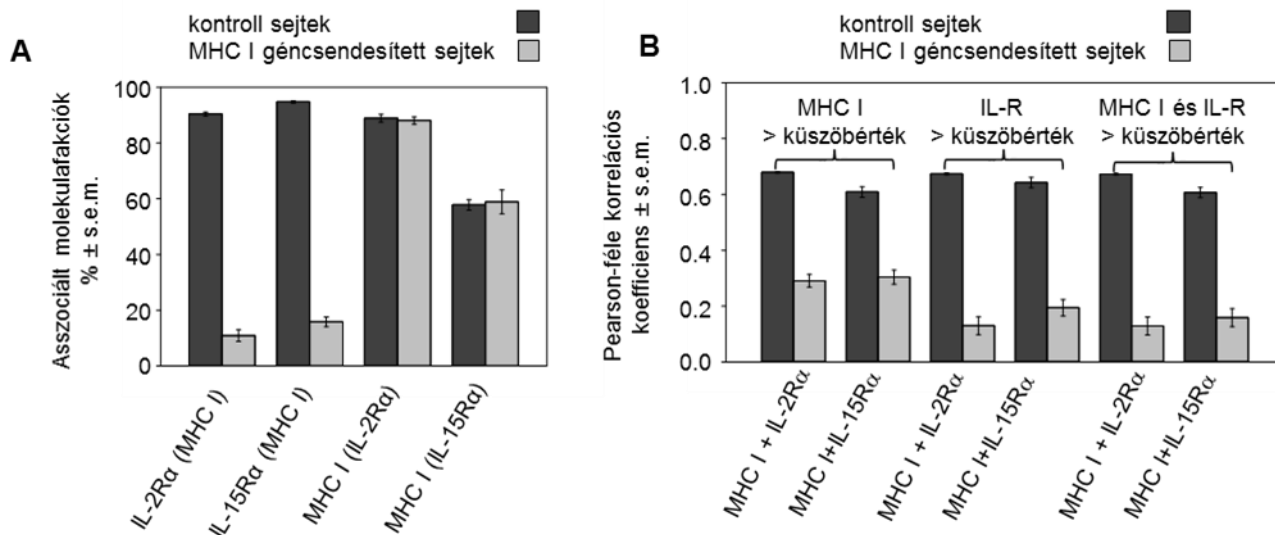
Köszönetet mondok feleségemnek és kisfiamnak, barátaimnak, a családomnak.

A munkát a következő tudományos pályázatok támogatták: A2-JÁDJ-13-0170, OTKA K103965, TKA-DAAD 73163, GINOP-2.3.2-15-2016-00026, GINOP-2.3.3-15-2016-00003.

13. Fűggelék

Javítások jegyzéke:

A benyújtott értekezés 34. ábrája tévedésből a 30. és 31. ábrák duplikátuma volt, a javított 34. ábra helyesen az alábbiakban látható (lásd megalapozó közlemény 6. és S8. ábrái):



34. ábra: MHC I - IL-2R α és MHC I - IL-15R α közös molekulafrakciói és Pearson korrelációs együtthatói