

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Kormos József

Témavezető: Prof. Dr. Jenei Attila



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Immunfehérjék sejtfelszíni mintázatának jellemzésére alkalmazható mintaelőkészítési eljárások fejlesztése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kormos József, okleveles fizikus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Biofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Jenei Attila, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nyitrai Miklós, MTA doktora

Prof. Dr. Cserhádi Csaba, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, MTA doktora

tagok: Dr. Barkó Szilvia, PhD

Dr. Gaál Botond Ágoston, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati

Intézet „A” épület tanterme

2026. szeptember 23. 13:00

1. Bevezetés

1.1 Sejtfelszíni fehérjemintázatok jelentősége

A különböző fehérjék, különösképpen a sejtfelszíni receptorok mintázatának vizsgálata régóta nagy érdeklődésre tart számot a sejt-, és molekulárisbiológiában, immunológiában, stb. Ennek oka, hogy a felszíni molekulák homo- és hetero-asszociációja több sejt és immunfunkciókkal hozható összefüggésbe. A sejtfelszíni fehérjék konformációi összefüggésbe hozhatók többek között a jelátviteli folyamatokban, az antigénfelismerésben, aktivációs folyamatokban.

1.2 Sejtfelszíni fehérjemintázatok vizsgálatának módszerei

1.2.1 Fluoreszcens vizsgálati módszerek

Ezen a sejtfelszínen található fehérjék eloszlásának tanulmányozására főként immunfluoreszcenciai vizsgálatok adnak lehetőséget, mely során kihasználva az antitest-antigén reakciót, specifikusan jelölhetők a különböző fehérjék fluoreszcens festékek segítségével.

Így a legalapvetőbb és legegyszerűbb vizsgálati módszer a fluoreszcencia mikroszkopiai képalkotás, ahol általában indirekt fluoreszcensen jelölt minták vizsgálhatók. Kihasználva, hogy a fluoreszcens festékeket gerjeszteni képes megvilágító fény és a fluorofórok általa emittált fény hullámhossza egymáshoz képest eltolódnak, így nagy érzékenységgel detektálhatók a jelölt molekulák, kizárva a gerjesztő fényt, illetve a minta meg nem jelölt részleteit.

A fluoreszcencia mikroszkóp egy speciális változata a konfokális mikroszkóp. A konfokális elrendezést korábban is publikálták, de a technika csak a 70-es években, a lézerek kifejlesztésével terjedt el igazán. Míg a hagyományos esetben a mikroszkóp a minta teljes felületét megvilágítja és a minta teljes felületéről érkező fényt detektálja, itt speciális optikai elemek (lyukdiafragmák) segítségével megoldható, hogy a minta csak egy fókuszpontban gerjeszthető, és mintából csak ebből a fókuszpontból érkező fluoreszcens fényt legyen detektálva. Így nem csak az elhajlásból származó felbontási korlát, hanem a fókuszponton kívülről érkező fénysugarak nagy háttérét is csökkenteni tudjuk. Másik nagy előnye, hogy a különböző fókuszsíkokból 3D rekonstrukció segítségével 3D-s képek készíthetők.

A technika egyik legnagyobb korlátja a sejtfelszíni fehérjék mintázatának tanulmányozásban, a korlátozott laterális feloldás. A fényelhajlásból származó korlát, melyet az Abbe törvény ír le, minimálisan körülbelül 200 nanométer. Így az ezen távolságokon belül lévő fluoreszcens molekulák nem különíthetők el egymástól, egyetlen fényforrásnak, pontnak látszanak.

A korai konfokális lézerpásztázó mikroszkópiát (CLSM) aztán számos továbbfejlesztett változatát fejlesztették ki, amik képesek a hagyományos fénymikroszkópok feloldási korlátait átlépni.

A hagyományos fluoreszcencia mikroszkópok egyéb technikákkal való kiegészített változatai képesek kiküszöbölni a feloldási korlátokat, különböző módszerekkel. A teljesség igénye nélkül ilyenek a fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia (PALM), a sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (STROM) vagy a teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia mikroszkópia (TRIF).

Ebben az esetben képesek vagyunk az optikai mikroszkópok által megszabott 200 nm-es távolságokon belüli fluorofórokat is elkülöníteni egymástól 50-100 nm-es távolságon belül.

Hátrányi viszont, hogy korlátozott hozzáférésűek a készülékek, illetve speciális festékmolekulákat igényelnek.

Egy másik széleskörben alkalmazott szuperfeloldású mikroszkópia, a stimulált emisszió kioltású mikroszkópia (STED). Itt az egy pontban gerjesztett mintának a gerjesztett pont körvonalát egy speciális optikával kialakított speciális profilú STED lézerrel stimulált módon legerjesztjük, melynek hatására a legerjesztett fluorofórok által emittált fotonok hullámhossza különböző lesz a spontán emisszióból származó fotonok hullámhosszával, és így elkülöníthető. Viszont az eredetileg gerjesztett pár 100 nm-es folt közepén lévő, spontán emisszióra képes rész csak párszor 10 nm. Így az elméletileg lefoldható távolság megközelítőleg 50 nm.

Hátránya, hogy mikroszkóp sajátosságaiból fakadóan, a felbontás erősen függ a STED lézer intenzitásától. Ez biológiai mintáknál negatív hatással jár, ugyanis nem alkalmazhatunk bármekkora lézerintenzitást, a minta károsodása nélkül.

Egy másik technika, ami segítségével a fehérjék proximitás viszonyait nagyon érzékenyen tanulmányozhatunk, ami ugyancsak fluoreszcens elven működik, de nem sorolható a mikroszkópok családjába a Förster-típusú rezonancia energiatranszfer.

Ebben az esetben két különböző fluoreszcens festéket alkalmazunk. A két úgynevezett donor és akceptor molekulák speciálisan vannak összeválogatva. A donor molekula emissziós spektrumának átfedésben kell lennie az akceptor molekula abszorpciós spektrumával. Ebben az esetben a donor molekula sugárzásmentes átmenettel képes gerjeszteni az akceptor molekulát, abban az esetben, ha molekulák távolsága nem haladja meg a 10 nm-es távolságot, illetve ha a

festékmolekulák dipól momentumaik párhuzamosak egymással. Ennek az átmenetnek a valószínűsége erős függést mutat a két molekula közötti távolság nagyságával, ami a távolság hatodik hatványának reciprokával arányos. Így tulajdonképpen ez egy nagyon érzékeny távolságmérési lehetőség. De hátránya, hogy csak a 10 nm-es távolságokon belül alkalmazható.

1.2.2 Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálati technika

Egy másik széleskörben alkalmazott technika, amivel a proteinmintázatok vizsgálhatók, az transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM). A TEM mikroszkópiának messze jobb a feloldó képessége, mint a hagyományos fénymikroszkópoknak (körülbelül 1 nm), viszont erősen szigorú a mintával szemben támasztott követelményei. Ennek a mikroszkópiának a sajátossága, hogy önmagában csak erősen korlátozottan alkalmazható biológiai minták vizsgálatára. A nehézséget a minta összetétele jelenti, ami többségében könnyű elemek. Ezek a könnyű atomok elektrondenzitása, azaz az elektronnyaláb szórásának képessége csekély. Így a biológiai minták, szövetek sejtek, az transzmissziós elektronmikroszkóp felvételeken csak igen kis kontrasztot szolgáltatnak. Ezt például anatómiai, szövettani vizsgálatoknál a mintát valamilyen, a kontrasztot növelő nehézelemek sóival „festjük”. Ilyen anyagok például az ozmium-tetroxid, ólom-citrát, uranil-acetát.

Ezek a festési eljárások azonban nem megfelelőek a specifikus fehérjék lokalizációjának a meghatározására, ugyanis nem fehérje specifikus festési eljárások.

Abban az esetben, ha specifikusan szeretnénk megjelölni és TEM-es vizsgálni a fehérjék eloszlását, az immunogold technika jelent megoldást.

Ebben az esetben a vizsgálni kívánt proteint, specifikusan tudjuk jelölni kolloidális méretű aranygömbökkel. Ez egyrészt csak a vizsgálandó fehérjéhez kötődik, másrészt az aranyak, mint nehézelemnek nagyon nagy az elektrondenzitása, így igen jó kontrasztot szolgáltat a TEM felvételeken. Ahogy a fénymikroszkópok esetében a különböző spektrumú festékekkel egyidőben különböző fehérjék vizsgálhatók, úgy itt ezt különböző méretű aranygömbök segítségével tudjuk megvalósítani.

Mivel viszonylag széleskörben elterjedt a transzmissziós elektronmikroszkópia, illetve a kiemelkedő felbontóképessége miatt választottuk ezt a technikát a sejtfelszíni proteinmintázatok vizsgálatára és jellemzésére. A legnagyobb akadály, amibe beleütköztünk, ami a TEM minták egyik legerősebb feltétele, a minták maximális vastagsága, ami nem haladhatja meg a körülbelüli 100 nm-t. Ez nagyban megnehezíti az immunogolddal jelölt sejtfelszíni receptorok vizsgálatát, ugyanis a sejtek párszor 10 mikrométeres vastagsága,

nagyságrendekkel nagyobb a TEM minták maximális vastagságával. A minta vékonyítása viszont nem károsíthatja a sejtet jelölt kettős lipid rétegét.

Ilyen TEM mintapreparálási eljárás azonban nem volt fellelhető a szakirodalomban, így a vizsgálatainkat megelőzően egy külön minta-előkészítési eljárást fejlesztettünk ki, amivel vizsgálhatóvá vált a különböző proteinek eloszlásai, mintázatai a sejtek felszínén.

1.2.3 TEM mintával szemben támasztott követelmények

Az elektronmikroszkóp felépítéséből következik, hogy a hagyományos fénymikroszkópos mintákhoz képest különleges feltételeknek kell teljesülnie.

- Mivel az elektronmikroszkóp vákuumban üzemel, így a minta nem tartalmazhat folyadékot, így gondoskodnunk kell a minta szárításáról.
- A TEM-ben használt elektronnyaláb áthatolóképesége minimális, így a mintának a maximális vastagsága erősen korlátozott, ami körülbelüli érték maximum 100 nm. Így a mintából ultravékony metszeteket kell készíteni, vagy egyéb mintavékonyítási eljárást kell alkalmazni a biológiai mintákon.
- Mivel a biológiai mintákban lévő szerves könnyűelemek (N_2 , O_2 , H_2 , stb.) kontrasztja kicsi a TEM-nél, így meg kell növelnünk a vizsgálandó minta kontrasztját nehéz elemek sóival, vagy immunogold jelölési technikával, láthatóvá tenni a vizsgálandó fehérjéket.

2. Célkitűzések

1. Vizsgálni kívántuk, az IL-2 és IL-15 molekulák sejtfelszíni mintázatát. Esetlegesen mutatnak-e valamilyen rendeződést saját maguk és egymás között, illetve ha igen, mekkorák és milyen számosságúak ezek a kialakult klaszterek?
2. Az immunogold jelölt minták transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokra alkalmazott minta-preparálási eljárás továbbfejlesztése, a sejtfelszíni antigén-mintázatok vizsgálatának pontosabb leírása érdekében. Az új minta-előkészítési protokoll segítségével, választ találni, hogy a felszínen kifejeződő MHC I illetve MHC II molekulák mintázatában a véletlenszerű eloszláshoz képest milyen csoportosulások találhatók nanométeres skálától egészen a mikrométeres mérettartományokig?

3. Szerettük volna megvizsgálni, hogy hogyan befolyásolhatja a különböző sejtfelszíni molekulák homo- és hetero-asszociációját, ha egy addig a sejtfelszínen nem kifejeződő molekula jelenik meg. A BLS sejteken nem expresszálódó HLA II fehérje, a transzfekciót követő megjelenése, befolyásolja-e a HLA I és HLA II proteinek proximitás viszonyait?

3. Anyagok és módszerek

3.1 A vizsgálatokhoz alkalmazott sejtvonalak tenyésztése

Kit 225 FT7.10 sejtvonal:

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

JY és BLS-1 limfóma sejtvonalak:

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

3.2 Az IL-2Rα és IL-15Rα sejtfelszíni receptorok vizsgálata Kit225 FT7.10 sejtvonalon

3.2.1 Az IL-2Rα és IL-15Rα sejtfelszíni receptorok immunogold jelölése

Az IL-2 és IL-15 receptorok mintázatának vizsgálata az új mintaelőkészítési eljárást megelőzően végeztük, a korábban alkalmazott mintapreparálási protokoll alkalmazásával Kit 225 FT7.10 sejtvonalon. Ebben az esetben receptorokat indirekt módon jelöltük, az IL-2R esetében az elsődleges antitest egér hibridóma felülúszójából tisztított anti-IL-2Rα 7G7/B6 (IG2a) antitestből előállított Fab fragment volt, illetve az IL-15 esetében az elsődleges antitest egér hibridóma felülúszójából tisztított anti-IL-15Rα 7A424 (IgG) egész antitest volt. A kolokalizációs vizsgálatoknál a másodlagos jelölők 15 és 30 nm-es aranygömbökhöz kötött poliklonális antiegeér antitestek voltak. (Az Aurogamig G15, anti-egér IgG nehéz és könnyű

láncc ellenes poliklonális antitestekkel volt telítve, az Aurogamig G30 pedig anti-egér IgG Fc része ellenes poliklonális antitestekkel, Amersham Pharmacia). A szekvenciális jelölésnél a sejtek IL2 receptorát először anti-IL-2R α 7G7/B6 (IG2a) antitestből előállított Fab fragmenttel jelöltük, majd mosás után Aurogamig G15-el. Ezután ismételt mosás következett, majd az Aurogamig G15 aranygyöngyöket beborító poliklonális antitestek nem használt kötőhelyeit blokkoltuk feleslegben adott nem specifikus (a sejtek sejtfelszíni fehérjeihez nem kötődő) Fab fragmentekkel. A következő lépésben az IL-15 receptor jelöltük anti-IL-15R α 7A424 (IgG) egész antitesttel, majd mosás után Aurogamig G 30-al. Az újabb PBS-es mosás után, a mintákat 1%-os formaldehid/PBS oldatban fixáltuk 30 percig, majd 2%-os glutáraldehidet tartalmazó nátrium-kakodilát pufferben (0,1 M, pH: 7,2) egy éjszakán keresztül.

3.2.2 Az immunogolddal jelölt IL-2R α és IL-15R α receptorok TEM mintaelőkészítése

Az első lépésben a TEM mintahordozó grid-ek lettek „formvar” hártáával bevonva, ami egy párszor 10 nm-es vékony műanyag hártá, a sejtek megtartásának céljából, melynek felületét poly-L lizinnel lettek kezelve, hogy a sejtek letapadjanak a hártáára.

Utána lettek kirakva rá az immunogolddal jelölt sejtek szuszpenzióban. Ezek után a mintát alkohol felszálló sorával dehidráltuk (10, 30, 50, 70, 95%).

Előzőekben az immunogolddal jelölt mintát alkohol felszálló sorával dehidráltuk, majd szabadlevegőn szárítottuk. Az így összeesett sejtek külső korvonalán keletkezett, egy kellően vékony, a TEM számára átvilágítható terület.

3.3 HLA I és HLA II homo- és hetero-asszociációjának vizsgálata az új mintaelőkészítési eljárás segítségével

3.3.1 HLA I és HLA II sejtfelszíni receptorok jelölése immunogold konjugációs kit segítségével

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

miatt, így hatványozottan nagyobb a valószínűsége, hogy a már kötődött antitesteket is eltávolítjuk a mintáról.

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

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

3.3.2 Immunogolddal jelölt HLA I, HLA II receptorok TEM minta-előkészítése JY, BLS-1 és tDQ6-BLS-1 sejtvonalokon

Az előző kísérleteinkben a TEM mintaelőkészítési eljárásnak három számottevő hiányossága volt, melyek rontották az eredményeink statisztikai pontosságát:

1. A legnagyobb problémát a vizsgálható terület nagysága okozta, ugyanis a szárítást követően csak igen korlátozott, a sejtet szélén lévő gyűrű lett kellőképpen vékony a TEM számára (~100 nm).
2. A másik gondot az okozta, hogy a minta a szuszpenzióban való jelölés után a mintáról a transzmissziós elektronmikroszkóp egy vetületi képet biztosított. Ezáltal a képen nem csak egy sejtmembránon jelenlévő immunogold gömbök voltak láthatóak, hanem a sejt mindkét membránján lévő. Így a valóságban a két (fél)membrán egymásra vetített receptoreloszlását tudjuk vizsgálni, ami meghamisíthatja az eredményeinket
3. a szabadlevegőn történő szárítás hatására a sejtek alakja, morfológiája megváltozik, ami befolyásolhatja az eredményeket.

Ezért egy új minta-előkészítési protokollt fejlesztettünk ki, ami kiküszöböli az előző hiányosságait.

Az új eljárás lényege, hogy egyfajta szendvicsszerkezetet hozunk létre, melyet úgy tudunk vékonyítani, hogy csak a sejtek felső, immunogolddal jelölt lipid kettősrétege marad, amit utána TEM segítségével tudunk vizsgálni.

A protokoll lépései röviden, pontokba szedve a következő:

- Az immunogolddal szuszpenzióban jelölt mintát (sejteket) egy előzőleg poly-L lizinnel kezelt kollódium hártával bevont TEM mintahordozó gridre preparáljuk
- ezután dehidratáljuk felszálló etanolsorral (10, 30, 50, 70, 95%)
- kritikuspontra szárítjuk, elkerülve a szárítást követő morfológiai változásokat

- vékony, párszor 10 nm-es szénréteggel vonjuk be, vákuumpárologtató segítségével, ami mechanikailag rögzíti a sejteket a grid TEM hordozóra
- amyl-acetát segítségével kioldjuk a minta alatt lévő kollódiumhártyát
- kémiaailag kioldjuk a minta alól a sejtalkotókat, megahagyva a szénhártyával rögzített felső jelölt lipid kettősréteget
- mosást követően, a minta alkalmas a transzmissziós elektronmikroszkóp vizsgálatra.

3.4 Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

A méréseinket Jeol 2000FX (Akishima, Tokió, Japán) transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük 200 kV-os gyorsítófeszültség alkalmazásával. A biológiai mintákat jellemzően 80-100 kV-os gyorsítófeszültség alkalmazásával vizsgálják, aminek két oka van:

Egyrészt, mert a biológiai minták mechanikai szilárdsága kicsi, és a nagyenergiás elektronnyaláb roncsolná a mintákat, másrészt mert a biológiai minták elemeinek rendszáma kicsi, így nagy a gyorsítófeszültség használata kis kontrasztot biztosítana.

Esetünkben viszont, nem a sejtösszetevőit vizsgáljuk hanem az jelölő immunogold részecskéket kívánjuk detektálni, aminek igen magas a rendszáma, így az úgynevezett elektrondenzitása. Ezáltal az aranyatom nagymértékben téríti el az elektronokat, ami eltérítés adja a transzmissziós elektronmikroszkóp kontrasztját.

A minta kicsi mechanikai szilárdság sem jelent gondot, mivel a minta-előkészítési protokoll alatt a mintára párologtatott szénréteg kellő szilárdságot biztosít, hogy akár 200 kV-os gyorsítófeszültség alkalmazása mellett sem okozzon károsodást a mintában.

A TEM felvételeket törölhető, és újra felhasználható „image plate”-kre fényképeztük, és Ditabis® (Pforzheim, Németország) „imaging scanner”-rel hívtuk elő, ami lényegesen jobb minőségű képet szolgáltat, mint a hagyományos fotólemez, és nagy előnye, hogy a TEM felvételeket közvetlenül digitális formátumban kapjuk meg.

3.5 Az immunogold részecskék helyzetének (koordinátáinak meghatározása)

Első lépésben az elkészült digitalizált képekből kivágtuk (croppoltuk) a számunkra jelentős részeket.

Ezt követően a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett „ClickOnGold” szoftver segítségével megkerestük az immunogold részecskékről a TEM által leképezett fekete korongok közepéinek koordinátáit.

A szoftver ezután mentette ezeket a koordinátákat, a későbbi kiértékeléshez.

3.6 A kiértékelésre használt pár- és keresztpárkorrelációs függvények (PCF és PCCF) meghatározása

A PCF és PCCF függvény meghatározását a Cseh Tudományos Akadémia Molekuláris Genetikai Intézete által kifejlesztett „Gold” programmal végeztük. A szoftver könnyen alkalmazható immunogold jelölt minták PCF és PCCF függvényeinek meghatározására.

A függvényeket és a hozzájuk tartozó 95%-os konfidenciaintervallumokat a szoftver Monte Carlo szimuláció segítségével határozza meg.

3.7 A PCF és PCCF értelmezése pontmintázatok leírására

A párkorrelációs és párkeresztkorrelációs függvények az úgynevezett másodfokú ponteloszlás leíró függvények. A másodfokú kifejezés arra utal, hogy a függvénynek két független változója van, ami esetünkben nem más, mint a TEM felvételeken az előző fejezetben leírtak szerint a foltok (x,y) Descartes féle koordinátája. Egy pontmintázatról ugyanakkor nemcsak arról tud információt szolgáltatni, hogy különbözik a véletlenszerű pontmintázattól vagy sem, hanem információt tudnak szolgáltatni az esetlegesen meglévő klaszterek tulajdonságairól is. Az általunk alkalmazott függvény az úgynevezett párkorrelációs és párkeresztkorrelációs függvény (PCF, PCCF), ami a Ripley féle párkorrelációs függvényből eredeztethető.

A pontmintázatok tulajdonképpen 3 típusát különböztetjük meg: véletlen, szabályos és klaszterizált. A véletlen mintázatban nincs semmilyen korreláció az egyes pontok (sejtfelszíni receptorok) között, a szabályos esetben a pontok valamilyen szabályos hálózatban oszlanak el, mintha taszító jellegű erő hatna köztük, illetve a klaszterizált esetben csomókban rendeződnek, azaz valamiféle vonzó kölcsönhatás tulajdonítható köztük.

Ezekhez az esetekhez a következő PCFF és PCCF értékek rendelkeznek:

- Véletlenszerű PCF=1
- szabályos PCF<1
- klaszterizált PCF>1

A „Gold” szoftver az egyes távolságintervallumokhoz tartozó függvényértékeken kívül meghatározza azok 95%-os alsó- és felső konfidenciaintervallumát is.

Így ha a függvény értéke kisebb az adott intervallumhoz tartozó alsókonfidencia intervallumnál, akkor a pontmintázat szabályos, ha az alsó- és felső intervallum között található akkor véletlenszerű, ha pedig meghaladja a felső konfidenciaintervallumot, akkor klaszterizált a

pontmintázat. Az intervallumok nagysága becslést ad például az esetleges klaszterek méretéről, és a függvény nagysága az adott méretű klaszterek számosságára.

4. Eredmények

4.1 IL-2R α és IL-15R α sejtfelszíni fehérjék proximitás viszonyainak vizsgálata Kit 225

FT7.10 T-limfocita sejtvonalon

Az IL-2 és az IL-15 sok esetben hasonló sejtválaszokat vált ki, de ellentétes hatásuk is van a T-limfociták életére és halálára. A jelátviteli utak eltérésének már a plazmamembránon kell bekövetkeznie, ahol a citokinek kölcsönhatásba lépnek receptoraikkal. Ezért kulcsfontosságú a receptorok szerveződésének molekuláris részleteinek megértése. Modellrendszerként az IL-2R α és IL-15R α sejtfelszíni szerveződését és közös lokalizációját Kit225 FT7.10 humán T-limfóma sejtekben vizsgáltuk TEM segítségével. A rögzített képeket képfeldolgozó alkalmazásunkkal elemeztük, majd Monte Carlo szimulációval meghatároztuk a párkorrelációs és a kereszt-párkorrelációs függvényeket. A kérdéses fehérjéket különböző méretű (15, 30 nm) immunogold aranygömbökkel jelöltük.

Elsődleges anti-IL-2R α 7G7/B6 és elsődleges anti-IL-15R α 7A424, valamint aranygyöngyökkel konjugált (IL2: 15 nm és IL15: 30 nm) kecskében termelt anti-egér IgG másodlagos antitestekkel jelöltük.

Bár az IL-2R α és az IL-15R α klaszterizációja néhány száz nanométeres skálán konfokális mikroszkóppal és Közelimezős Pásztázó Optikai Mikroszkóppal (SNOM) is megfigyelték, de a klaszterek eloszlásának közvetlen elemzése mindeddig hiányzott. Az immunogold jelölés segítségével, viszont közvetlenül is meg tudtuk figyelni az IL-2R α és IL-15R α doménjeit. Ezen a hierarchikus szinten az IL-15R α és az IL-2R α csoportosulását is megfigyeltük az FT7.10 sejtek plazmamembránjában. TEM-kísérleteink megerősítették az IL-2R α -t és IL-15R α -t tartalmazó membrándomének együttes lokalizációját. A homo- és hetero-asszociációit igazoló PCF és PCCF értékeinek elemzése után azt találtuk, hogy Az IL-2 (15 nm-es aranyrészecskék) klasztereződése jól látható a 10-20 nm-es, 40-50 nm-es és 70-80 nm-es intervallumokban, azaz a PCF függvények ebben az intervallumokban szignifikánsan meghaladják a random eloszláshoz tartozó 1-es értéket. Az IL-15 receptorok (30 nm-es aranyrészecskék) klasztereződése 20-30 nm-es és 50-60 nm-es intervallumba tehető. A PCCF értékei az IL-2 és IL-15 receptorok kolokalizációjára utal. Így két receptor kolokalizálódását figyelhetjük meg 40-80 nm-es, illetve 140-170 nm-es intervallumokban.

4.2 Transzmissziós elektronmikroszkópos minták előkészítésének továbbfejlesztése sejtfelszíni fehérjék eloszlásának vizsgálatára

Kísérleteink során a legfontosabb célul azt tűztük ki, hogy minél pontosabb statisztikával tudjuk leírni a sejtfelszíni fehérjék eloszlásának korrelációját, illetve keresztkorrelációját. Matematikailag ezt akkor lehet elérni, ha az adott mintában minél több az „esemény”, ami esetünkben az, hogy minél több legyen az immunogold aranygömbök száma az egyedi TEM felvételeken.

Ezt úgy érhetjük el, hogy vagy az jelölőmolekulák felületi sűrűségét vagy a vizsgálható terület nagyságát növeljük. Az első esetben viszonylag korlátozottak a lehetőségeink. A sejtfelszíni fehérjék aranygömbbel való jelölésnél viszont problémát jelenthet az, hogy a minta mosásánál (centrifugálásánál) viszonylag könnyű a gömbök leoldásának esélye. Így az egyik leghatásosabb módszer ennek az esélyének a csökkentésére, ha a mosások számát csökkentjük, az indirekt jelölés helyett a direkt jelölést alkalmazzuk.

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

Korábban, a munkacsoportunkban már korábban vizsgált minta előkészítésének alapja az volt, hogy a sejtszuspenzióban jelölt mintát a TEM mintahordozó felületére kicseppentve szabadlevegőn lettek kiszárítva. Így a sejt egy vékony külső körvonalán keletkezett sáv már átlátható volt a transzmissziós elektronmikroszkóp számára.

Így a sejtek közepén található sejtalkotók a TEM számára átláthatatlanok, így az egyik hátránya módszernek, hogy nagy a vizsgálható területvesztése. Másik hátránya, hogy a minta kiszáradása után a vetületi képen nem egy kettőslipidrétgen található aranygömböket láthatjuk, hanem a két réteg összeszáradása után keletkezett két kettőslipidrétget. Ezért nem a sejtfelszíni immunogold aranygömbök eloszlását láthatjuk, hanem a két felszín egymásra vetített képét. Másik probléma, hogy a szabadlevegőn való szárítás után megváltozik a sejt morfológiája és így változhat a fehérje eloszlás a sejt felületén.

Ezért egy komplex minta-előkészítési eljárást fejlesztettünk ki, ami egyfajta szendvicsszerkezet képez. A minta vékonyítására kémiai maratást alkalmaztunk 100 g/l-es koncentrációjú nátriumhidroxid vizes oldatával, a szárításhoz pedig kritikuspontra szárítás

választottuk. A legnagyobb kihívást azt jelentette, hogy fizikailag hogyan rögzítjük a sejteket a hordozófelületre a kezelések alatt.

Így egyfajta szendvicsszerkezetet hoztunk létre, amit kezeltünk:

- A szuszpenzióban direktén jelölt sejteket kicseppentettük egy korábban kollódiumhártyával bevont és poli-L lizinnel kezelt TEM hordozó gridre
- felszálló etanolsorral dehidráltuk (10, 30, 50, 70, 95%)
- majd mintát kritikuspontra szárítottuk, ami megőrzi a sejtek morfológiai tulajdonságait
- vékony, párszor 10 nm-es szénréteggel vontuk be a mintát vákuumpárologtató segítségével
- amid-acetáttal itatott szűrőpapír segítségével kioldottuk az ideiglenes tartófunkciót biztosító kollódium hártyát
- kémiai kioldottuk a mintaalkotókat a sejtekből 100 g/l-es, megtartva a szénhártya segítségével fixált felső lipid kettősréteget a jelölő immunogold részecskékkel

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

4.3 Sejtfelszíni fehérjék proximitás viszonyainak megváltozásának vizsgálata HLA DQ fehérjének megjelenésével, Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) sejtvonalon transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével

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

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

Mivel a korábbi FRET vizsgálatok eredményei a HLA fehérjék megváltozott sejtfelszíni eloszlási mintázatára utaltak [58], célul tűztük ki a HLA I és HLA II molekulák membrán topológiájának vizsgálatát szubmikrométeres skálán TEM segítségével. A klaszterenkénti

különböző molekulák megjelenítéséhez az immunogold jelölt mintán végeztünk TEM vizsgálatot, amely információt nyújt a pár 100 nm-es és egy mikrométeres skála közötti molekulamintázatokról.

Itt közvetlenül mértük a HLA I és HLA II klaszterek eloszlását ezen a hierarchikus szinten a három különböző sejtvonal (JY, tDQ6-BLS-1, BLS-1) plazmamembránjában immunogold jelölés segítségével. Mind a HLA I, mind a HLA II molekulákat különböző méretű, 10, 20 vagy 30 nm-es aranygyöngyökkel konjugált antitestekkel jelöltük.

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

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

A kontroll JY sejtvonalon, a HLA I és HLA II molekulák PCCF-je enyhe asszociációt mutatott a HLA I és HLA II molekulák között körülbelül 25, 75 és 175 nm-en. Megjegyzendő, hogy a csúcsok egy része alig haladja meg a 95%-os szignifikancia szintet, ezért ezeket az eredmények értelmezését óvatosan kell kezelni.

A JY sejtekkel ellentétben a tDQ6-BLS-1 sejtek HLA I és HLA II molekuláinak PCCF-je nem mutatott mérhető eltéréseket a véletlenszerűhöz képest a HLA I és HLA II molekulák között (26. ábra (F) panel), ami arra utal, hogy ezekben a sejtekben a de novo szintetizált HLA DQ molekulák nem keverednek HLA I klaszterekkel.

5 Megbeszélés

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

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

A legnagyobb hátránya a hagyományos fénymikroszkópoknak a maximális felbontási vagy diffrakciós korlát, amit az Abbe törvény értelmében az emissziós fény hullámhosszával. Így az elérhető minimálisan feloldható távolság körülbelül 200 nm.

Az utóbbi időkben azonban nagy előrelépés volt a különböző szuperfeloldású optikai mikroszkópok fejlesztésében, melyek különböző elveken keresztül képesek kikerülni a hagyományos mikroszkópok feloldási limitációját jelentő diffrakciós korlátot.

Hátrányi, hogy nehezen hozzáférhetőek a készülékek, vagy speciális követelményeknek kell megfelelniük, például a mintáknak vagy az alkalmazható speciális festékeknek igényelnek.

Egy külön osztályba sorolható a Förster rezonancia energia transzfer (FRET), amivel nanométeres tartományba eső fehérje proximitás vizsgálható.

Ennek az energiatranszfernek a feltételei, hogy a fluoreszcens molekulák közötti távolság nem haladhatja meg a 10 nm-es távolságot, másrészt a molekulák dipólus orientációinak minél jobban egybe kell esnie.

Ez a hátránya is, hogy csak az 1-től 10 nm-es közelségi tartományba eső molekulák tanulmányozhatók vele.

Ezért fordult a választásunk az transzmissziós elektronmikroszkópiára (TEM).

A TEM egy viszonylag széleskörben elterjedt készülék, amely a mm-es tartományoktól akár a nm-es tartományokig használható. A TEM-el vizsgálható a receptormintázatok, ha a specifikus jelölésre úgynevezett immunogold jelölést alkalmazunk, ami egy kolloidális mérettartományba eső (párszor 10 nm) aranygömb, ami tökéletes kontrasztot biztosít a TEM felvételeken.

Munkacsoportunkban már korábban is folytattunk vizsgálatokat immunogolddal jelölt minták sejtfelszíni molekulamintázatok jellemzésére, transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek segítségével. Ugyanakkor a korábban használt Poisson függvény helyett a párkorrelációs (PCF) illetve párkeresztkorrelációs (PCCF) függvényt alkalmazva lényegesen pontosabb leírást tudtunk a receptormintázatok jellemzésére. A függvények segítségével becslést tudtunk adni a klaszterek esetleges meglétére, a klaszterek méretére illetve azok számosságára is.

Az új PCF függvény segítségével vizsgálni szeretnénk volna, a Kit225 FT7.10 sejtvonalon kifejeződő, IL-2 és IL-15 sejtfelszíni receptorok eloszlásának. Az eredményeink szerint az IL-2 receptorok a 10-20 nm-es, 40-50 nm-es és 70-80 nm-es intervallumokban, az IL-15 receptorok pedig a 20-30 nm-es és 50-60 nm-es intervallumban klasztereket alkotnak a kapott PCF értékek szerint. Megvizsgáltuk az IL-2 és IL-15 receptorok keresztkorrelációit is a PCCF segítségével, azaz jelen van-e valamilyen korreláció a két sejtfelszíni fehérje között. A kapott eredmények az IL-2 és IL-15 receptorok keresztkorrelációját mutatta 40-80 nm-es, illetve 140-170 nm-es intervallumokban. Az kísérleti eredményeinket összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy az IL-2 és IL-15 sejtfelszíni receptorok eloszlása nem véletlenszerű, illetve, hogy a két receptor keresztkorrelációt mutat egymással a sejtfelszínen.

A vizsgálat alatt viszont azzal a problémával szembesültünk, hogy az eddig alkalmazott mintaelőkészítésnek az egyik hátránya, hogy a vizsgálandó terület erősen korlátozott. Az első kísérleteinkben a TEM mintaelőkészítés röviden a következő volt: A jelölt sejteket, TEM mintahordozóra alkoholos dehidráció során kiszárítottuk. Így a sejt egy szélső, vékony sávja kellően vékony lett, hogy a transzmissziós elektronmikroszkóp számára átláthatóvá váljék.

A hibák kiküszöbölésére egy új minta-előkészítési eljárást fejlesztettünk ki. A kifejlesztett protokoll röviden egyfajta szendvicsszerkezet. A jelölt, és kritikuspontra szárított sejteket, egy párszor 10 nm-es szénhártya fizikailag fixálja a mintahordozó, úgynevezett TEM grid (egy 3 mm átmérőjű aranyrácsra) felületére, mely sejtekből a sejtalkotókat kémiai maratással pedig eltávolítottuk. Az így előkészített mintákon a vizsgálható felület a többszöröse lett a korábban alkalmazottnak, pontosabban a teljes sejt felső, immunogolddal jelölt lipid kettős rétege átvilágítható a mikroszkóp számára. Az új minta-előkészítési eljárásunkat alkalmazva a későbbi vizsgálataiban nagyobb statisztikai pontosságot érhetünk el a sejtfelszíni immunogolddal jelölt fehérjék mintázatának (homo- és hetero-asszociációinak) leírásában.

Az új TEM módszer kidolgozása során csatlakoztam a munkacsoportunkban folytatott kutatáshoz, ahol azt vizsgálták, hogy a sejtfelszínen egy addig nem kifejeződő fehérje megjelenése milyen hatással van a hozzá kapcsolódó egyéb sejtfelszíni fehérjék eloszlására. Ezekhez a vizsgálatokhoz a Bare lymphocyte syndrome (BLS) sejtvonalat választottuk (BLS-1), ami egy ritka genetikai mutációjának köszönhetően a humán leukocita antigén II osztályú (HLA II) egyáltalán nem fejeződik ki a sejtfelszínen.

A BLS-1 sejteket DQA1*0102/pCIneo és DQB1*0602/pCIneo vektorokkal transzfektáltuk. A transzfekció hatására az HLA II molekula kifejeződött a sejtfelszínen.

Kíváncsiak voltunk, hogy az újonnan megjelent molekula milyen hatással van a többi környező fehérjék sejtfelszíni eloszlására, illetve kíváncsiak voltunk arra is, hogy egy harmadik,

kontrollsejtvonalhoz (JY) képest különbségeket tudunk-e kimutatni. Ezért immunogolddal konjugált specifikus antitestekkel jelöltük az HLA I, HLA II molekulákat a BLS, a transzfektált-BLS és a JY sejtvonalakon, kettős jelöléssel.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy az újonnan kifejeződő (HLA II) DQ molekulák a transzfektált tDQ6-BLS-1 sejtvonalon magas korrelációt mutattak, azaz saját magukkal asszociálva klaszterekben fejeződnek ki, ugyanakkor az HLA I molekulákkal azok klasztereivel nem keveredtek. Ez a viselkedés nem volt megfigyelhető JY sejtvonalon, ahol HLA I klaszterek, HLA II klaszterek, illetve HLA I és HLA II molekulákat tartalmazó klaszterek is megfigyelhetők voltak.

6. Az értekezés új tudományos eredményei

1. Munkacsoportunkban korábban is kiemelkedő szerepet töltött a sejtfelszíni receptorok mintázatainak elemzése, azon belül is az immunogolddal jelölt minták, transzmissziós elektronmikroszkóppal történő vizsgálata. De a kiértékelés menete nehézkes és hosszú folyamat volt. Továbbá az alkalmazott matematikai statisztikai analízis nem voltak alkalmasak az esetlegesen meglévő mintázatok kellően részletes jellemzésére. Így az általunk kifejlesztett szoftver segítségével képes voltam a mintákról készített TEM felvételeken detektálni az immunogold jelölő kolloidális méretű aranygömbök képeit (foltjait), és koordinátáit a későbbi elemzés céljából elmenteni. Az így kapott adatokat később elemzi tudtam a Cseh Tudományos akadémia által kifejlesztett szoftver segítségével, ami egy sokkal hatékonyabb statisztikai függvényt alkalmazott.

Így adaptálni tudtam két új függvényt a kutatásomba, a párkorrelációs, és párkeresztkorrelációs függvényt, amivel a sejtfelszíni fehérjék esetleges klasztereinek a méretére és számosságára is becsléseket tudtam adni. Alkalmaztam az IL-2 és IL-15 receptorok klasztereinek jellemzéséhez, ahol a munkacsoportunk korábbi kutatásai csak a klaszterek jelenlétét tudta kimutatni Kit225 FT7.10 sejtvonalon.

2. A korábban alkalmazott transzmissziós elektronmikroszkópos méréseinknél használt minta-előkészítési eljárás számos hiányossággal rendelkezett. Kicsi volt a vizsgálható terület, ami miatt a statisztikai pontosság jelentősen korlátozott volt. Továbbá a szárításból adódó morfológiai változások befolyásolhatták a kapott sejtfelszíni fehérjék mintázatairól kapott eredményeket. A kapott felvételeken nem egy lipid kettősrétegen jelenlévő a fehérjék helyét reprezentáló immunogold aranygömbök voltak láthatóak, hanem két, egymásra lapult rétegé, ami torzíthatja az eredményeket.

A korábban alkalmazott minta-előkészítés hátrányos tulajdonságai miatt, egy új transzmissziós elektronmikroszkópos minta-előkészítési eljárást fejlesztettem ki, ami képes volt kiküszöbölni az előzőek hátrányait.

3. A kifejlesztett szoftver és az újonnan adaptált függvények segítségével, a munkacsoportunkban éppen folyamatban lévő kutatásba csatlakoztam be, ahol arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hogyan változik meg egy a sejtfelszíni molekula mintázata, ha egy addig nem expresszált molekula jelenik meg. Kíváncsi voltam, hogy nanométeres skálán, hogyan változik meg a korábban is expresszáldott molekula mintázata, illetve milyen mintázatot mutat az újonnan expresszáldott molekula, illetve milyen a két molekula proximitás viszonya, ahol a két vizsgált sejtfelszíni molekulának a HLA I és HLA II volt. Modellrendszerünkben a Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) sejtvonalon egy ritka génmutációnak köszönhetően nem kifejeződik ki. Viszont a transzfekciót követően megjelent a sejtfelszínen a HLA II fehérje. Kontrol sejtvonalra a JY sejtvonalat használtuk, ahol mindkét sejtfelszíni fehérje megjelenik. Az új eljárással megvizsgálva a különböző sejtvonalakat, azt az eredményt kaptam, hogy a transzfektált BLS sejtvonalon hasonló klasztereket alkot mind a HLA I és HLA II molekula, de a JY sejtvonallal ellentétbe itt a HLA I és HLA II klaszterek nem keverednek, a két fehérje hetero-asszociációja nem számottevő.

7. Összefoglalás

1. Az általunk kifejlesztett kiértékelő szoftver segítségével, és egy új a sejtfelszíni receptorok (síkbeli pontmintázat) mintázatának leírására szolgáló szoftver alkalmazása, az Interleukin-2 (IL-2R α) és az Interleukin-15 (IL-15R α) sejtfelszínen kifejeződött molekulák homo- és hetero-asszociációinak feltérképezésére a KIT 225 FT7.10 sejtvonalon. Az adott molekulákat immunogold jelölési technikát alkalmazva transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) segítségével vizualizáltuk.

Számos TEM felvétel kiértékelése után arra a következtetésre jutottunk, hogy a sejtfelszínen kifejeződő IL-2R α és IL15R α mintázatának eloszlása szignifikánsan eltér a véletlenszerű eloszlástól, ami vizsgált receptorok homo- és hetero-asszociációira utal.

2. Az első kísérleteinkben számos probléma merült fel a TEM minta-előkészítési eljárásban, amely főként a vizsgálandó terület nagyságának korlátozottsága és így a mintázat leírásának pontatlansága volt. Ennek érdekében egy új TEM mintaelőkészítési protokollt fejlesztettünk ki, amely kiküszöbölte a korábbi hiányosságokat.

Az új eljárás segítségével megvizsgáltuk a humán JY sejtvonalon kifejeződő fő hisztokompatibilitási komplex (HLA) I és II típusú sejtfelszíni fehérjék mintázatának vizsgálatára alkalmaztuk. Vizsgálatunk eredményeképpen következtetéseket vonhattunk le, hogy a vizsgált receptorok több különböző méretű klaszterekben rendeződve jelennek meg a sejtfelszínen.

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



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Kormos József
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,153

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

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

Debrecen, 2025.11.07.

