

Adatértékelő eljárások sejtfelszíni fehérjemintázatok analízisére

Szentesi Gergely

Témavezetők: Dr. Mátyus László és Dr. Jenei Attila



DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2005

1. BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek membránja képezi a határvonalat a sejt belseje és környezete között, valamint feladata még a sejt és környezete közötti információ- és anyagáramlás biztosítása. E határvonal felépítésének és működésének megismerése nélkülözhetetlen számos biológiai folyamat megértéséhez.

Intézetünk egyik kutatási irányvonala a membránfehérjék szerveződésének, a citoplazma membrán heterogenitásainak vizsgálata. A sejtmembrán alkotóelemei vizsgálatának számos biokémiai és biofizikai módszere ismert. A biokémiai módszerek elsősorban a membrán összetételének minőségi és mennyiségi elemzését célozzák meg. Napjainkra azonban beigazolódott, hogy a membránban a legtöbb folyamat (anyag és információáramlás) bizonyos membránkomponensek együttes jelenlétét igényli. Számos receptor (pl.: peptid növekedési faktor receptorok, interleukin-2 receptor, immunszinapszis stb.) több alegységből épül fel, melyek csak együttesen képesek az adott ligand megfelelő megkötésére és a jelátvitel megvalósítására. Ennek megfelelően a membránkomponensek proximitásviszonyainak tanulmányozása nélkülözhetetlen a sejtmembránon keresztül lejátszódó folyamatok megértéséhez, melynek egyik lehetséges megközelítési módja a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) hatékonyság mérése, mely igen érzékeny molekuláris távolságmérő spektroszkópiai módszer. A módszer számos adaptációja (mikroszkópos fotonhalványodáson alapuló energiatranszfer, áramlási citométer, közeli mező optikai mikroszkóp (SNOM) stb.) létezik. Alapját egy kvantumfizikai folyamat képezi, miszerint két kellően közel (1-10 nm) elhelyezkedő festékmolekula között sugárzás nélküli energiaátadás jöhet létre, melynek hatékonysága függ a két molekula távolságától. Az energiatranszfer hatékonyságra, a fluoroforokat

jellemző fizikai paraméterek (fluoreszcencia intenzitás, fluoreszcencia élettartam, fotonhalványodási időállandó stb.) megváltozásából következtethetünk, melyek kapcsolatban vannak a molekulák távolságviszonyaival.

A FRET technika egyik leghatékonyabb alkalmazási módszere az áramlási citometriás energiatranszfer (FCET). A mérés során a sejtszuspenzió speciálisan kialakított áramlási fejen halad keresztül, melynek feladata a hidrodinamikai fókuszálás megvalósítása, a sejtek sorba rendezése. A fókuszálást követően a szuszpenzióban a sejtek egyesével haladnak el a gerjesztő lézertény(ek) és a detektorok előtt. Így rövid idő alatt nagy számú sejt számos fluoreszcencia és fényelnyelési paramétere mérhető.

Az energiatranszfer hatékonyság meghatározása intenzitásváltozás mérésen alapszik. Bár előnye, hogy rövid idő alatt nagy számú sejt vizsgálható, azonban ebben rejlik hátránya is, hiszen a nyerhető információ felbontása sejtszintű, azaz minden sejtről egy átlagos információt kapunk.

A fotonhalványodáson alapuló rezonancia energiatranszfer (pbFRET) a FRET technika egyik mikroszkópos adaptációja. Az energiatranszfer hatékonyság meghatározás ebben az esetben a donor fotonhalványodási időállandó megváltozásának mérésén alapul. A mintát megvilágítjuk a donor gerjesztési színekének megfelelő hullámhosszúságú fényel, és eközben digitális felvételeket készítünk, melyeken rögzítjük a donor fluoreszcencia intenzitás fotonhalványodás miatt bekövetkező csökkenését. A képszekvenciák analízisével kapjuk meg a fotonhalványodási időállandó értékeket, akár képpontonként is. A csak donorral, illetve donorral és akceptorral egyaránt jelölt mintákon meghatározott fotonhalványodási időállandók átlagából számítjuk az energiatranszfer hatékonyság átlagos értékét.

Mivel ez mikroszkópos technika, így a módszer felbontóképességét a mikroszkóp optikai felbontóképessége limitálja, így a sejt felszíni heterogenitások, mikrokolóniák is tanulmányozhatóak ezzel a módszerrel.

Érdemes megjegyezni, hogy a FRET mikroszkópos mérésével az optikai mikroszkóp kb. 200 nm-es felbontási határánál sokkal jobb érzékenységgel (1-10 nm) lehet a vizsgált fluoroforok, fehérjék molekuláris közelségét vizsgálni. A mérési módból adódó alacsony sejtszám miatt azonban relatíve rossz a módszer statisztikája, illetve megvalósítása időigényes.

Az immuno-gold technika segítségével a sejtfelszíni receptorok kolloidális aranygömbbel történő jelölésével, az antigének közvetlenül detektálhatók transzmissziós elektronmikroszkóppal vagy AFM-mel (atomerő mikroszkópia). A digitalizált felvételek megfelelő matematikai módszerekkel analizálhatók, mely alapján a vizsgált receptorok eloszlásáról vonhatunk le következtetéseket.

A fent vázolt technikák mind méréstechnikailag, mind módszertanilag eltérnek egymástól, így a velük nyerhető adatok biológiai információtartalma is különböző, azonban mindegyik komoly hardver és szoftverigénnyel rendelkezik, mind adatgyűjtési mind adatfeldolgozási szempontból.

Napjainkban a mérés vezérlését, valamint az adatok tárolását és feldolgozását megfelelően kialakított hardver és szoftver segíti. A mérőberendezéseket gyártó cégek a mérőberendezéseket teljesen a megfelelő vezérlő, adatgyűjtő egységekkel és adatfeldolgozó és archiváló szoftverekkel együtt forgalmazzák. Egy-egy módszer kisebb módosítása során a hardver és a mérést vezérlő szoftver általában nem szorul módosításra, míg az adatértékelés menete nagymértékben megváltozhat, így a szoftver átdolgozása, új eljárásokra, függvényekre, grafikus felületre, adatmegjelenítésre (vizualizáció) lehet szükség. Sok esetben az adatfeldolgozás hosszúsága szab határt a mérések pontos, jó statisztikával történő feldolgozásának.

Intézetünkben és kollaborációs partnereinknél is megjelentek ezek a problémák, így célunk a hiányosságok pótlása a meglévő rendszerek adatértékelő szoftvereinek továbbfejlesztése az egyszerűbb és hatékonyabb adatfeldolgozás irányába. Ilyen módosítások végrehajtásakor elengedhetetlen a

fejlesztő számára az adott biológiai vizsgálati forma alapos ismerete és gyakorlása. A munka során készült és az alábbiakban részletesen taglalt fejlesztések részben már alkalmazásra kerültek és az egyéb közlemények fejezetben szereplő publikációk ezek segítségével jöttek létre.

Áramlási citometriás energiatranszfer (FCET)

A FCET technika alkalmazásakor az áramlási citométerben sejtenként mért energiatranszfer hatékonyság meghatározása a jelölő donor és akceptor molekulák intenzitásváltozásán alapszik. Energiatranszfer esetén a donor kvantumhatásfoka lecsökken, mivel az energiatranszfer során a gerjesztett állapotú donor molekula átadja energiáját vagy annak egy részét az akceptor molekulának, így a gerjesztett állapotú akceptor molekulák száma és ennek következtében az akceptor molekulák fluoreszcencia intenzitása megnő, mely jelenséget szenzitizált emisszióknak nevezzük. A módszer előnye, hogy rövid idő alatt nagy számú sejten végezhetünk kvantitatív fényszórás és fluoreszcencia intenzitásméréseket. A mért paramétereiből sejtenként számíthatunk más jellemzőket, többek között átlagos energiatranszfer hatékonyságot, a nagy sejtszám miatt relatíve jó statisztikával. Azonban hátrányt jelent, hogy a meghatározott fluoreszcencia intenzitás értékek egy sejtről nyújtanak átlagolt információt. Ennek következtében ez a módszer nem alkalmas a sejteken mért tulajdonságok esetleges sejtfelszíni heterogenitásainak vizsgálatára.

Fotohalványodáson alapuló energiatranszfer (pbFRET)

A fotohalványodáson alapuló rezonancia energiatranszfer (pbFRET) a FRET technika egyik mikroszkópos adaptációja. Az energiatranszfer hatékonyság meghatározás ebben az esetben a donor fotohalványodási

időálló megváltozásának mérésén alapul. A halványodási folyamat során fluoreszcens mikroszkópot alkalmazva több digitális képet veszünk fel az idő függvényében a különböző intenzitások detektálására.

A mérés során felvett képek száma a fluorofor fotohalványodási időállandójától, valamint az energiatranszfer hatékonyságtól függ. A nagyobb fotohalványodási időállandó hosszabb ideig tartó gerjesztést igényel adott fényintenzitás mellett. Amennyiben energiatranszfer szintén létrejöhet, úgy a fotohalványodás folyamata tovább lassul, mivel az energiatranszfer ugyancsak egy lehetséges út a gerjesztett állapotú donor molekulák relaxációjára.

A mért képszekvenciákból az egyes képek megfelelő pixeléhez tartozó intenzitás értékek az idő függvényében történő ábrázolásával jön létre a fluoreszcencia intenzitás lecsengés görbe. A fotohalványodási időállandók pixelenkénti meghatározásához minden egyes pixelhez tartozó lecsengés görbére illeszteni kell egy két exponenciális tagot tartalmazó függvényt. Az illesztési paraméterekből számítjuk az amplitúdókkal súlyozott, átlagos fotohalványodási időállandót ($\langle \tau \rangle$). A csak donorral, valamint donorral és akceptorral egyaránt jelölt mintákon meghatározott fotohalványodási időállandók átlagából az energiatranszfer hatékonyság átlagos értékét határozzuk meg.

Immuno-gold jelölés, sejtfelszíni receptormintázatok analízise

A FRET technikák távolságtartománya néhány nanométer, és bár a FRET fluorofor koncentrációtól való függését vizsgálva akár ennél nagyobb méretű asszociátumok is vizsgálhatók, a FRET nem vagy csak nehezen alkalmazható a sejtfelszíni fehérjék magasabb szerveződési szintjeinek, az esetleges homo- és heterokolóniák, valamint azok méreteinek vizsgálatára. A membránkomponensek nano- és mikrométer nagyságrendbe eső kolóniamintázatainak tanulmányozására alkalmas módszer az immuno-gold jelölés. A megfelelő fehérje immuno-gold jelölése után elektronmikroszkópos

felvételeket készítünk a mintákról, melyeken az aranygömbök fekete pontként jelennek meg. A pontok mérete alapján a különböző receptorok elkülöníthetők és távolságviszonyaik tanulmányozhatóak az eloszlás első- és másodrendű paramétereinek alapján.

Az elsőrendű paraméter a pontok felületi sűrűségének (λ) helyfüggését írja le a vizsgált területen. Homogén ponteloszlás esetén $\lambda(x, y) = \text{állandó}$, azaz helyfüggetlen és egységnyi területen adott számú pont megtalálhatósági valószínűsége λ paraméterű Poisson eloszlást követ. Az analízis során minden egyes aranygömbnek meghatározzuk a helyét, majd a kép egységnyi területekre (cellák) történő felosztása után az egyes cellák aranygömb számát. Végezetül a cellák aranygömb száma alapján egy hisztogramot hozunk létre, azaz ábrázoljuk a cellák számát az aranygömbök számának függvényében. Amennyiben a ponteloszlás véletlenszerű, a hisztogram burkoló görbéje Poisson eloszlást követ. Szignifikáns eltérés esetén az aranygömbök illetve az antigének sejtfelszíni eloszlása nem véletlenszerű, azaz az antigének között valamilyen rendező erő működik.

A másodrendű paramétereiből a vizsgált terület egyes részeinek lokális vagy szomszédsági ponteloszlás mintázatára lehet következtetéseket levonni, az egész eloszlásra nézve. A másodrendű analízis magában foglalja többek között a Ripley féle K függvény, valamint a párkorrelációs függvény (PCF) meghatározását és analízisét.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célunk volt három sejtfelszíni fehérje proximitásviszonyainak tanulmányozására alkalmas módszer adatfeldolgozásának szoftveres hátterének megteremtése, illetve a meglévő programok kiegészítése az adatok feldolgozását segítő rutinok létrehozásával.

Az analízis programokban a következő funkciók megvalósítását tűztük ki célul:

- Az áramlási citométereket elsősorban rutindiagnosztikai eljárásokra tervezik, így bár rendelkeznek a méréshez, illetve az adatok feldolgozásához nélkülözhetetlen szoftvercsomagokkal, de azok nem alkalmasak energiatranszfer számításra. Célunk volt a hiány pótlása, egy olyan adatfeldolgozó szoftver kifejlesztése, melynek segítségével egyszerre több mérési fájl is feldolgozható párhuzamosan, továbbá egy olyan felhasználói felület biztosítása, melyen keresztül a felhasználó definiálhat sejtenként mért paramétereken aritmetikai műveleteket.
- Mivel a kereskedelemben nem kapható fotohalványodási képsorozatok pixelenkénti kiértékelésére alkalmas szoftver, célunk volt egy olyan szoftvercsomag létrehozása, mely teljes körű támogatást nyújt az analízishez, valamint az eredmények prezentációjához.
- Aranygömbbel jelzett antigének elektronmikroszkópos felvételeinek analíziséhez célunk volt egy olyan program fejlesztése, mely alkalmas a különböző méretű aranygömbökkel jelölt antigének helyzetének meghatározására, valamint a pozíciók koordinátáinak megfelelő fájlformátumban történő tárolására, az aranygömb mérettől függően, további statisztikai analízishez.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A FCET és AFCET kísérlet során használt sejtek, antitestek és festékek

A FCET kísérlethez N87 gyomor tumor sejt vonalat (American Type Culture Collection (Rockville, MD)) használtunk, és a specifikáció szerint (10% FCS-t, 2mM L-glutamint és 0,25 % gentamycint tartalmazó RPMI médiumban 5%-os CO₂ koncentráció és 37 °C-os hőmérséklet mellett) növesztettük korai konfluens állapotig. Az ErbB2 receptorok jelöléséhez Cy3 és Cy5 fluoreszkáló festékek maleimid-származékaival konjugált humanizált 4D5 (Trastuzumab, Herceptin™) és 2C4 (Pertuzumab, Omnitarg™) Fab-t használtunk, melyeket a Genentech Inc.-től kaptunk. A sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben (pH=7,4), majd kb. 1 millió sejtet szuszpendáltunk fel 50 µl foszfát pufferben (PBS, phosphate buffered saline). A sejteket ezután 30 percig, jégen, sötétben jelöltük a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestek Fab fragmentumainak telítő koncentrációjával. A FRET mérésekben használt kettős jelölés esetén a fluoreszcensen jelölt antitest fragmentumokat egyszerre adtuk a sejtekhez. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk kétszer és 1%-os hideg formaldehid PBS-ben fixáltuk.

A pbFRET kísérlet során használt sejtek, antitestek és festékek

Az EBV-módosított humán B limfoblasztoid JY sejt vonal, RPMI 1640 médiumban növesztettük (10% hőkezeléssel inaktivált FCS-t, 2 mM L-glutamint és 50 µg/ml koncentrációban gentamycint tartalmaz) 5%-os CO₂ koncentráció mellett, 37 °C-on. Az MHC I (HLA-A,B,C) nehézlánc jelölésére W6/32 (IgG2 α) antitestet, a β 2-microglobulin (MHC I könnyű lánc) jelölésére L368 (IgG1 κ) antitestet, míg MHC II (HLA-DR) jelölésére L243 (IgG2a) antitestet használtunk. A megtisztított antitestekhez, 6-(fluoreszcein-5-karboxamido)-hexánsav-szukcinimidil-észtert (SFX) vagy 6-(tetrametil-rodamine-5-(és-6)-karboxamido) hexánsav-szukcinimidil-észtert (TAMRAX, Molecular Probes, USA) kötöttünk. A festék antitest jelölési arányt spektrofotométerrel határoztuk meg. A sejtszuspenzió koncentrációját kétszeri mosás után 0,5-1 \times 10⁶ sejt/50 µl-re állítottuk be, majd szuszpendáltuk PBS-ben (pH=7,4). Majd a sejteket

telítési koncentrációjú SFX- és/vagy TAMRAX- konjugált monoklonális antitestekkel inkubáltuk 45 percig jégen. Az inkubálás után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel és fixáltuk 1% formaldehid PBS-ben jégen 30 percig. A jelölés alatt külön figyelmet fordítottunk arra, hogy a sejteket 4 CO₂ alatt tartsuk, az esetleges sejtfelszíni aggregációk elkerülése érdekében.

Az Immuno-gold kísérlet során használt sejtek, és antitestek

A kísérlet során transzfektált Jurkat TagC15 sejt vonalakat használtunk, melyeket 5%-os CO₂ koncentráció mellett 37 °C-on RPMI 1640 médiumban növesztettünk, mely 10% hőkezeléssel inaktivált FCS-t, 2 mM L-glutamint és 50 µg/ml koncentrációban gentamycint tartalmaz. Az immuno-gold jelölés során a transzfektált sejteket kétszer mostuk Hanks' oldatban, majd anti-FLAG M² elsődleges antitesttel jelöltük (Sigma, Budapest) jégen 40 percig. Majd a sejtszuspenziót mostuk kétszer és egy másodlagos poliklonális antitesthez konjugált 10 nm-es kolloidális aranygömbökkel (AuroProbe EM 10 nm, Amersham Pharmacia) jelöltük. Végül a sejteket jégen fixáltuk 1%-os paraformaldehiddel 1 órán át, majd 2%-os glutaraldehiddel 0,1 M Sorensen's pufferben (pH=7,2) egy éjszakán át.

A mérések során használt mérőberendezések

A FCET és AFCET méréseket Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose, CA) végeztük el. A donor molekulák gerjesztésére 488 nm-es, az akceptor molekulák gerjesztésére 635 nm-es hullámhosszúságú lézert fényt, míg a donor és akceptor fluoreszcencia detektálásánál rendre 585/42 nm-es sávszűrőt és 570 nm-es felüáteresztő szűrőt használtunk. Az AFCET méréseknél a sejtek autofluoreszcenciájának detektálására 530/30 nm-es sávszűrőt használtunk.

A pbFRET méréseket Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkópon végeztük el. A donor molekulák gerjesztésére Ar ion lézer 488 nm-es hullámhosszát, míg az akceptor molekulák gerjesztéséhez He-Ne lézer 543 nm-es hullámhosszúságú

fényét használtuk. A donor és akceptor fluoreszcencia detektáláshoz rendre 525/20 nm-es sávszűrőt valamint 570 nm-es felüláteresztő szűrőt használtunk.

Az aranygömbökkel jelölt sejteket JEOL elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (JEM 100 B mikroszkóp, 80 kV-os feszültség).

Fejlesztőkörnyezetek

A FCET analízis (ReFlex) és elektronmikroszkópos képfeldolgozó (ClickOnGold) programokat Borland Delphi Stúdióban (Borland Software Corporation, Scotts Walley CA, USA) fejlesztettük. Azért esett a választás erre a fejlesztő környezetre, mivel támogatja az objektum orientált programozást, valamint számos beépített grafikus eszközt és komponenst tartalmaz (pl.: táblázatok (TStringGrid), és fanézetek (TTreeView)). Mindemellett a beépített programtervező felülete olyan eszközöket biztosít (object inspector, tulajdonság szerkesztő stb.), melyek megkönnyítik és felgyorsítják a felhasználói felület tervezését.

A fotonalványodás képszekvencia analízis programot a National Instruments LabVIEW- 6.1 (National Instruments Corporation, Austin TX) környezetben fejlesztettük ki az NI Europe céggel történő együttműködés során, mivel igen egyszerűen használható grafikus fejlesztőfelülettel rendelkezik. A LabVIEW egy ún. adatútvézérelt grafikus fejlesztőkörnyezet, melyet eredetileg mérnököknek fejlesztettek ki intelligens vezérlő és folyamatirányító berendezések szoftveres vezérlésének egyszerű megvalósításához. Azonban az utóbbi időben az eszköztára olyan dinamikusán bővült, hogy mára egy gyakorlatilag teljes értékű programozási nyelvnek tekinthető, mely számos grafikus eszközt és matematikai rutint, ún. VI-t (virtual instrument) foglal magába.

Mindhárom szoftvert Windows platformra fejlesztettük és teszteltük Windows9X, WindowsNT, Windows2000 és WindowsXP operációs rendszereken.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Az áramlási citometriás energiatranszfer program, az ErbB2 receptor epitópok távolságviszonyainak meghatározása

A FCET és AFCET (autofluoreszcenciára korrigált áramlási citometriás energiatranszfer) számítások elvégzése speciális szoftvert igényel, mivel ekkor a sejtenként mért paraméterekből sejtenként határozzuk meg az energiatranszfer hatékonyság értékeit. A programnak képesnek kell lennie az áramlási citométerek által szolgáltatott fájl típusok (flow cytometry standard, FCS) megnyitására, a megfelelő számítások elvégzésére, valamint megfelelő felületet kell biztosítania a kapuzások (a vizsgálni kívánt sejtpopuláció kiválasztása) elvégzéséhez.

A program fejlesztése során, mivel ezt a technikát intézetünk és kollaborációs partnereink számos biológiai probléma megoldásánál használják, célunk volt a korábban felmerült igények kielégítése. Ennek megfelelően kifejlesztettünk egy olyan szoftvert, mely alkalmas az FCS fájlok feldolgozására, valamint a mért paraméterekből a FCET és az AFCET értékek meghatározására. A hatékonyabb adatfeldolgozás érdekében a programot többdokumentumos felülettel láttuk el, mely lehetővé teszi tetszőleges számú adatsor egyidejű / párhuzamos feldolgozását. A program tartalmazza a jelenleg használt grafikon típusokat, valamint a kapuzások elvégzéséhez szükséges grafikus eszközöket. Mivel a számítások eltérőek lehetnek a különböző számítási módszereknél, a programot elláttuk egyenletszerkesztő modullal is, melyen keresztül a felhasználó adhatja meg az elvégzendő számítások matematikai formuláit.

A program tesztelésére, valamint hogy bemutassuk a különböző számítási módszerekkel nyerhető energiatranszfer hatékonyságok közötti különbségeket, meghatároztuk az áramlási citometriás energiatranszfer módszer segítségével az N87 gyomor tumor sejtek felszínén az ErbB2 receptor két epitópjának átlagos távolságát. A receptor két humanizált epitópját 4D5 és 2C4 antitestek Fab fragmentumával jelöltük. Az antitestek Fab fragmentumait Cy3 (donor) és Cy5 (akceptor) festékekhez konjugáltuk, majd megmértük a különböző minták fluoreszcencia intenzitásait a megfelelő csatornában Becton Dickinson

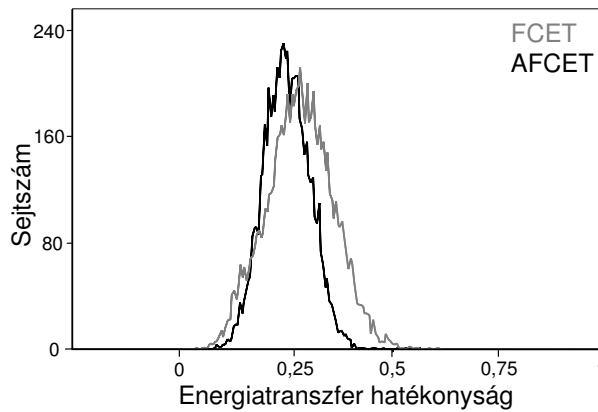
FACSCalibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose, CA). A számítások elvégzéséhez csak donorral, csak akceptorral, donorral és akceptorral egyszerre jelölt, valamint a háttér meghatározásához jelöletlen mintára is szükségünk volt.

Az energiatranszfer számításának legegyszerűbb és egyben legnagyobb hibával terhelt módja a donor kioltás (quenching) mérése, amely egy átlagos energiatranszfer hatékonyságot határoz meg a teljes sejtpopulációra. Számítása során meghatározzuk a donorral és akceptorral egyaránt jelölt ún. transzferes minta átlagos fluoreszcencia intenzitását a donor csatornában, valamint a csak donorral jelölt minta fluoreszcencia intenzitását ugyanebben a csatornában, végül a két átlagintenzitás hányadosát kivonjuk egyből. Ez a számítás bármelyik kereskedelmi forgalomban lévő szoftver segítségével elvégezhető, mely képes az FCS fájlok kezelésére. Ezzel szemben a FCET és az AFCET számítások elvégzése komolyabb matematikai számításokat igényelnek az energiatranszfer hatékonyság értékek sejtenkénti meghatározásához.

A mért adatok feldolgozásához és a FCET és az AFCET számítások elvégzéséhez az általunk fejlesztett szoftvert használtuk. Eredményeink szerint az $E(\text{quenching})$ (0,145) módszerrel számított energiatranszfer hatékonyság szignifikánsan eltér a sejtenként és a sejtenkénti autofluoreszcenciára korrigált átlagos energiatranszfer értékektől ($EFRET = 0,282$; $EAFRET = 0,253$).

Az eltérés magyarázata a számítás módjában keresendő, hiszen az $E(\text{quenching})$ értéket a fluoreszcencia intenzitások átlagából számítottuk ki. Ezzel szemben a sejtenkénti energiatranszfer számítás esetén sejtenként számított energiatranszfer eloszlást kaptunk, majd ezen az eloszláson számítottuk ki a megfelelő statisztikát.

A FCET és az AFCET módszerekkel nyert eredmények közötti eltérés bár nem szignifikáns, de az eloszlás szórása a második esetben kisebb (4 - 1. ábra), mivel sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciót alkalmaztunk. Amennyiben a vizsgált membránkomponens expressziós szintje alacsony, a fluoreszcencia intenzitások összemérhetővé válhatnak a minta (sejtek) autofluoreszcencia intenzitásával. Ilyenkor az autofluoreszcencia korrekcióval a számítások eredménye megbízhatóbb, mivel a nyert eloszlások szórása kisebb.



4 - 1 ábra: **Energiaátvitel hisztogramok.** Az ábrán a fekete görbe jelöli az AFCET, míg a szürke görbe a FCET módszerrel számított energiaátvitel eloszlásokat. A két számítási módszerrel a kapott energiaátvitel eloszlások átlaga szignifikánsan nem tér el, azonban szórási különbség látható (az AFCET módszerrel nyert eloszlás szórása kisebb), melynek oka az, hogy az AFCET módszernél sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciót alkalmaztunk.

A fotonáramlás képszekvencia analízis program, az MHC I és II molekulák aegységeinek proximitás viszonyainak vizsgálata

A FCET mérések előnye, hogy rövid idő alatt nagy számú sejt vizsgálható, jó statisztikával, azonban ebben rejlik hátránya is, hiszen a nyerhető információ felbontása sejtszintű, azaz minden sejtről egy átlagos paraméterrel jellemezhető információ nyerhető. Amennyiben szubcelluláris felbontást kívánunk elérni, az egyik lehetséges megoldás a fotonáramláson alapuló rezonancia energiaátvitel módszer (pbFRET).

Az energiaátvitel hatékonyság meghatározás ebben az esetben a donor fotonáramlási időállandó megváltozásának mérésén alapul. A fluorofor áramlási időállandóját a fluoreszcencia intenzitás csökkenésével, fluoreszcencia mikroszkópot alkalmazva, digitális képek felvételével detektálhatjuk. A mérés során felvett képek száma a fluorofor fotonáramlási időállandójától, a megvilágítás intenzitásától (ami a fotonáramlás sebességét befolyásolja), valamint az energiaátvitel hatékonyságtól függ. A mért képszekvenciákból az egyes képek megfelelő pixeléhez tartozó intenzitásértékek idő függvényében történő ábrázolásával jön létre a fluoreszcencia intenzitás lecsengés görbe, melyre két exponenciális tagot tartalmazó függvény illesztése után a fotonáramlási időállandó az illesztési paraméterekből számítható.

Mivel célunk volt az esetleges sejtfelszíni heterogenitások, mikrokolóniák tanulmányozása, a lehető legjobb felbontással kellett a fotohalványodási időállandókat meghatározni. Ez azt jelenti, hogy képpontonként (pixel) határoztuk meg a fotohalványodási időállandókat. Egy kép általában 512×512 pixelből áll, azaz 262144 fotohalványodási görbét kell kétszeresen exponenciális görbével illeszteni. Ennek a feladatnak az elvégzése kereskedelmi forgalomban kapható programmal lehetetlen. Ezért létrehoztunk egy olyan szoftvert, mely alkalmas a pbFRET mérés során felvett képszekvenciák analízisére. Annak érdekében, hogy a szoftver független legyen a mérőműszer és a vele generált képfájlok típusától, a program csak a „raw” képfarmátumot támogatja, melyet minden kereskedelmi szoftver ismer. A programot olyan felülettel láttuk el, hogy alkalmas legyen több mérés képszekvenciáinak egymást követő automatikus analízisére, valamint az eredmények statisztikai feldolgozására.

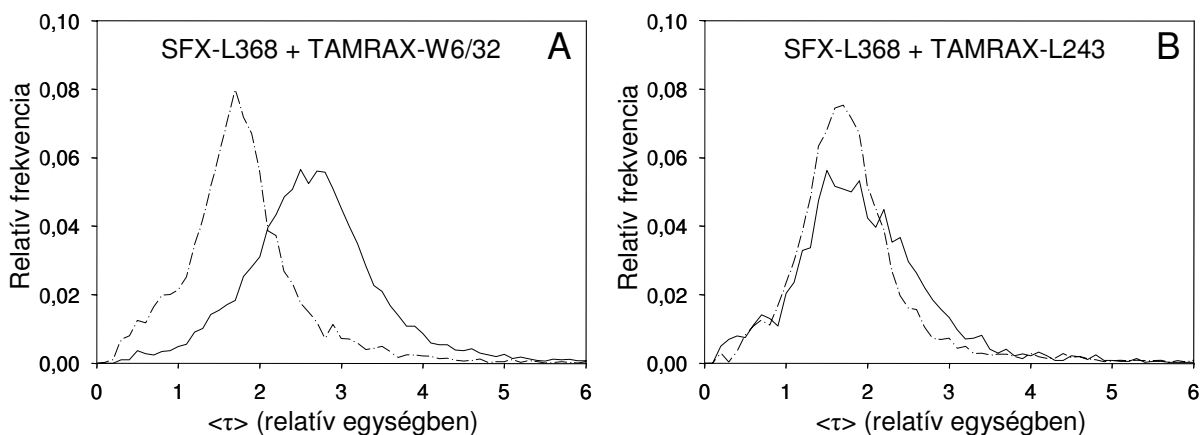
A pbFRET technikával vizsgáltuk JY humán B limfoblasztoid sejtek membránjában, a MHC I két lánc ($\beta 2m$, nehézlánc), valamint a MHC I molekulák ($\beta 2m$) és az MHC II molekulák proximitás viszonyait. A mérésekhez a fehérjéket SFX (donor) és TAMRAX (akceptor) festékekkel jelzett monoklonális antitestekkel jelöltük meg, az alábbi módon:

- 1, JY sejtek donorral konjugált L368-cal jelölve
- 2, JY sejtek donorral konjugált L368-cal és akceptorral konjugált W6/32-vel jelölve
- 3, JY sejtek donorral konjugált L368-cal és akceptorral konjugált L243-mal jelölve
- 4, JY sejtek akceptorral konjugált L243-mal jelölve
- 5, jelöletlen JY sejtek

Mivel a fotohalványodás igen érzékeny az oldott oxigén koncentrációjára, a mérés során a csak donorral és a donorral és akceptorral egyaránt jelölt minták keverékét használtuk, hogy a fotohalványodás során biztosítsuk mindkét minta azonos oxigéntartalmát. Annak érdekében, hogy az egyszeresen, csak donorral jelölt sejteket meg tudjuk különböztetni a kétszeresen jelölt (transzferes minta) sejteitől, a mérés végén a vizsgált területről az akceptor emissziós csatornában felvettünk egy-egy képet. A csak akceptorral jelölt mintát arra használtuk, hogy ellenőrizzük, hogy az akceptor intenzitás változott-e a fotohalványítási folyamat során. Amennyiben az akceptor intenzitás számottevően csökken, az azt jelenti,

hogy az akceptor molekulák is fotohalványíthatók, mely nemkívánatos folyamat, hiszen az akceptor fotohalványodás következtében elveszti energia elnyelő képességét, ennek következtében az energiatranszfer hatékonyság lecsökken, és a mért fotohalványodási időállandókból nem lehet a molekulák átlagos távolságára következtetni. Az ötödik mintát a háttér meghatározására használtuk.

A méréseket Zeiss LSM 510 mikroszkópon végeztük el (lézerek: Ar ion lézer, 488 nm, donorgerjesztés; He-Ne lézer, 543 nm, akceptor gerjesztés). Minden mintáról négy képszekvenciát (mindegyiken 2-3 sejt, mintánként kb. 10 sejt) vettünk fel. A sejt méretétől függően sejtenként 600-1500 fotohalványodási időállandót határoztunk meg, amely azt jelenti, hogy mintánként átlagosan 6000 fotohalványodási időállandó értéket kaptunk. Az eredmények hisztogramjai a 4 - 2. ábrán láthatók.



4 - 2. ábra: **A pbFRET mérés eredménye:** az MHC I két alegysége ($\beta 2m$ és nehéz lánc), valamint az MHC I $\beta 2m$ és az MHC II láncok között JY humán B limfoma sejtvonalon. Az MHC I két lánc rendre donorral jelzett L368 és akceptorral jelzett W6/32 monoklonális antitestekkel, míg az MHC II akceptorral jelzett L243-mal lett jelölve. A fotohalványítás mérést a csak donorral (szaggatott vonal), valamint donorral és akceptorral (folytonos vonal) egyaránt jelölt minták keverékén végeztük el.

Az energiatranszfer miatt a donorral és akceptorral egyaránt jelölt minta hisztogramja a nagyobb értékek felé tolódott el a csak donorral jelölt mintához képest mindkét esetben. Az A esetben az eltolódás jóval nagyobb mértékű, mint a B esetben, mivel az MHC I molekula két lánc közelebb található egymáshoz, mint a $\beta 2m$ és MHC II.

A fotohalványodási időállandó értékek az 1-es minta, csak donorral jelölt sejtjei esetében függetlenek voltak attól, hogy melyik keverékben mértük azokat: az 1-es és 2-es minta keverékében $1,65 \pm 0,48$ adódott, míg a 1-es és 3-

as minta keverékében $1,69 \pm 0,35$. A transzferes minták esetén azonban az eltérés jelentősebb. Az időállandók mértékegysége a „kép” (frame), tehát a $\tau = 1,65$ azt jelenti, hogy a fluoreszcencia intenzitás az 1,65-ik kép felvételekor csökkent az $1/e$ -ad részére. Az átlagos fotohalványodási időállandó értékek $2,62 \pm 0,56$, illetve $1,78 \pm 0,56$ a 2-es és 3-as mintákra, valamint a számított energiatranszfer hatékonyság értékek rendre 35,5% és 6,9% voltak, mely azt jelenti, hogy az MHC I molekula két lánc közelebb található egymáshoz, így az energiatranszfer létrejöttének valószínűsége nagyobb, mint a $\beta 2m$ és MHC II molekulák között.

Az elektronmikroszkópos képfeldolgozó program, a Kv1.3 ioncsatornák sejt felszíni eloszlásának vizsgálata

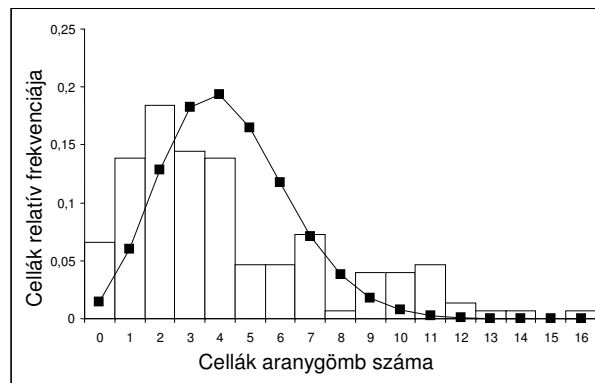
A sejt felszíni fehérjék proximitásviszonyainak nagyobb skálán (néhány száz nm) történő vizsgálatának egyik lehetséges módja az elektronmikroszkópos immuno-gold technika. A sejt felszíni fehérjék immuno-gold jelölése és mintakészítés után transzmissziós elektronmikroszkópiával az antigénekhez monoklonális antitesttel hozzákapcsolt nagy elektrondenzitású aranygömbök detektálhatók. Az elektronmikroszkópos képeken rögzített aranygömböket egy-egy pont fogja reprezentálni, melyek sejt felszíni eloszlásából a fehérjék eloszlására következtetéseket vonhatunk le a megfelelő statisztikák elvégzésével.

Az elektronmikroszkópiás képek másodrendű paraméterek becslésén alapuló statisztikai analízisére alkalmas program a rendelkezésünkre állt (Pavel Hozák és munkatársai), azonban az elsőrendű paraméter alapján történő analízishez valamint az aranygömbök helyzetének meghatározására alkalmas szoftver nem. Ezért kifejlesztettünk egy olyan programot, mely alkalmas a digitalizált elektronmikroszkópos felvételeken az aranygömbök helyzetének meghatározására, valamint azok eloszlásának elsőrendű paraméterek alapján történő analízisére.

Immuno-gold technikával vizsgáltuk a Kv1.3 ioncsatornák sejt felszíni eloszlását Jurkat sejtek felszínén, első és másodrendű paraméterek alapján. Az általunk fejlesztett program segítségével meghatároztuk az aranygömbök

helyzetét, valamint a megfelelő méretű rácsozat (120×120 képpont) kiválasztása után (kb. 5 aranyömb / cella) a cellák aranyömb szám eloszlását (4 – 3. ábra).

Az elsőrendű paramétervizsgálat egyértelműen bizonyítja, hogy a Kv1.3 ioncsatornák sejtfelszíni eloszlása nem egyenletes, hiszen a cellák aranyömb szám hisztogramja, valamint az átlagos cella aranyömb szám ($\lambda = 4,25$) alapján generált Poisson eloszlás, szignifikánsan eltér egymástól, 5%-os szignifikancia szint mellett.



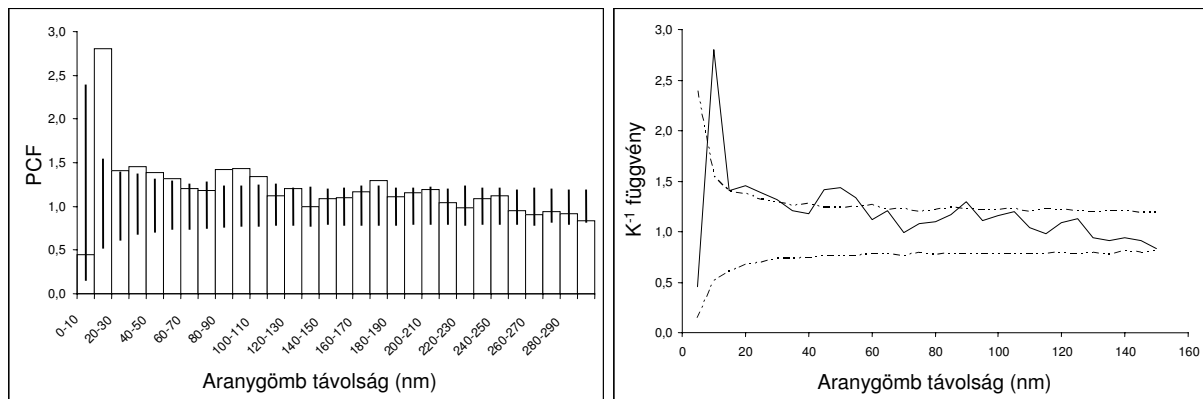
4 - 3. ábra: **Immuno-golddal jelölt Kv1.3 ioncsatornák eloszlásának vizsgálata.** A digitalizált elektronmikroszkópos képeken meghatároztuk az aranyömbök pozícióját, majd 120×120 pixel cellanagyságú rácsozaton kiszámítottuk az egyes cellák aranyömb tartalmát. A grafikon oszlopdigramja a cellák aranyömb szám eloszlása, a —■— vonal pedig a cellák átlagos aranyömb száma ($\lambda = 4,25$) alapján illesztett Poisson eloszlás hisztogramja. Az 5%-os szignifikancia szinten elvégzett χ^2 teszt igazolja, hogy a megfigyelt eloszlás eltér a teljesen véletlenszerű ponteloszlástól.

A ponteloszlás másodrendű paraméterek (Ripley féle K függvény, K-1, PCF (párkorrelációs függvény)) becslése alapján is vizsgálható. A K függvény becsléséhez meghatározzuk egy adott r távolságon belül minden egyes aranyömb körül található aranyömbök átlagos számát, majd elosztjuk az aranyömbök felületi sűrűségével. Véletlenszerű ponteloszlás esetén, a K függvény $K(r) = \pi r^2$ értéket vesz fel adott r-nél. Amennyiben a becsült K érték nagyobb az elméleti értéknél, akkor a pontok aggregálódtak (feldúsulás), amennyiben kisebb, a pontok eltávolodtak (ritkulás) egymástól.

A párkorrelációs függvény becsléséhez elsőként a K-1 függvényt becsüljük, mely a PCF integráltja az r1, r2 intervallumon. A K-1 függvény a K függvényhez hasonlóan becsülhető, de ebben az esetben a pontok számát

súlyozzuk a pontok között mért távolsággal. A K^{-1} függvény ismeretében a PCF átlagos értéke egy adott $(r, r + \Delta r)$ intervallumra meghatározható a K^{-1} függvény r szerinti deriváltjának számításával.

A csatornák aggregáció mértékének meghatározásához, megvizsgáltuk az aranygömb eloszlás másodrendű paramétereit, megbecsültük a K^{-1} és a PCF függvényeket (4 – 4. ábra).



4 - 4. ábra: **Immuno-golddal jelölt Kv1.3 ioncsatornák eloszlásának vizsgálata, PCF és K^{-1} függvények becslése.** A Kv1.3 ioncsatornák a Jurkat sejtek felszínén kolóniákat hoznak létre, mely mind a PCF és a K^{-1} függvények grafikonján látható. Mindkét függvény esetében 0-10 valamint 20 nm-es távolságtartományokra kiugró értékeket kaptunk. 0-10 nm-es távolság esetén a függvények alacsony értéke az aranygömbök méretével magyarázható, hiszen a 10 nm-es aranygömbök esetén, ezen távolságon belül a szomszédos aranygömbök lehetséges száma nulla. A 20-30 nm-es tartományban látható magas PCF és K^{-1} érték az aranygömbök, valamint a jelölés során használt antitestek között fellépő, másodrendű kölcsönhatásokkal magyarázható.

A K^{-1} függvény random ponteloszlásra vonatkozó 95%-os konfidencia intervallumot Monte-Carlo szimulációval határoztuk meg, melyek alsó és felső értékeit a jobboldali ábrán szaggatott vonal jelöli.

A párkorrelációs és K^{-1} függvények szignifikánsan eltérnek a random ponteloszlásra meghatározott értékektől, 40-60, valamint 80-100 nm-es tartományban, mely alapján megállapíthatjuk, hogy a Kv1.3 ioncsatornák sejtfelszíni eloszlása nem véletlenszerű, közöttük olyan kölcsönhatások lépnek fel, melynek következtében kolóniákat, aggregátumokat hoznak létre a sejtfelszínen.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során célunk volt három sejtfelszíni fehérje proximitás viszonyainak tanulmányozására alkalmas módszer szoftveres hátterének megteremtése, illetve a meglévő programok kiegészítése az adatok feldolgozását segítő programok létrehozásával. Mindhárom módszert alkalmaztuk egy-egy biológiai kérdés megválaszolására.

Eredményeink a következők:

- Kifejlesztettünk egy programot, melynek segítségével egyszerre több áramlási citometriás adatsor is analizálható párhuzamosan, valamint alkalmas a felhasználó által definiált aritmetikai kifejezések értékének sejtenkénti meghatározására és sorozatos alkalmazására. A programhoz olyan felhasználói felületet terveztünk, és olyan funkciókat implementáltunk, melyek segítik az analízis folyamatát, valamint az adatok áttekinthető elrendezését, az eredmények vizualizációját és értelmezését. Bemutattuk a program használatát az N87 gyomor tumor sejteken az ErbB2 sejtfelszíni receptorok két epitópja között mért energiatranszfer számításán keresztül, valamint összehasonlítottuk a korábban kidolgozott transzferszámítási módszereket.
- Kifejlesztettünk egy szoftvercsomagot a fotohalványodási képsorozatok értékeléséhez, melynek segítségével leegyszerűsödik a nyert adatok feldolgozása és az eredmények interpretálása. Megvizsgáltuk az MHC I és II molekulák alegységeinek proximitásviszonyait JY sejteken a mért fotohalványodási képszekvenciák analízisével.
- Kifejlesztettünk egy szoftvert az immuno-gold jelölt sejtfelszíni antigének helyzetének meghatározására elektronmikroszkópos képeken és elvégeztük Jurkat sejtek felszínén a Kv1.3 ioncsatornák eloszlásanalízisét első- és másodrendű paraméterek alapján.

6. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények

1. **Szentesi G**, Horváth G, Bori I, Vámosi G, Szöllősi J, Gáspár R, Damjanovich S, Jenei A, Mátyus L. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput. Meth. Prog. Bio.* 2004;75:201-211. **IF: 0,686 (JCR 2004)**

2. **Szentesi G**, Vereb G, Horváth G, Bodnár A, Fábíán A, Matkó J, Gáspár R, Damjanovich S, Mátyus L, Jenei A. Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series. *Cytometry Part A* 2005;67A:119-128. **IF: 2,698 (JCR 2004)**

Egyéb közlemények

1. Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, Vámosi G, **Szentesi G**, Szöllősi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, Damjanovich S. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem.* 2002;269:1199-1208. **IF: 3,260 (JCR 2004)**

2. Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, Vámosi G, **Szentesi G**, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S. Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100:2592-2597. **IF: 10,452 (JCR 2004)**

3. Bene L, **Szentesi G**, Mátyus L, Gáspár R, Damjanovich S. Nanoparticle energy transfer on the cell surface. *J. Mol. Recognit.* 2004;18(3):236-253. **IF: 1,859 (JCR 2004)**

4. Bene L, Szöllősi J, **Szentesi G**, Damjanovich L, Gáspár R, Waldmann TA, Damjanovich S. Detection of receptor trimers on the cell surface by flow cytometric fluorescence energy homotransfer measurements. *BBA-Mol. Cell. Res.* 2005;1744:176-198. **IF: 3,482 (JCR 2004)**

5. Horváth G, Petrás M, **Szentesi G**, Fábíán A, Park JW, Vereb G, Szöllősi J. Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements. *Cytometry Part A* 2005;65A:148-157. **IF: 2,698 (JCR 2004)**