

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**FUNKCIONÁLIS FEHÉRJE-MIKRODOMÉNEK A T ÉS B
SEJTEK PLAZMAMEMBRÁNJÁBAN: SZEREPÜK AZ
ANTIGÉN-SPECIFIKUS T SEJT AKTIVÁCIÓBAN ÉS
PROLIFERÁCIÓBAN**

BODNÁR ANDREA



**Témavezető:
Dr. Damjanovich Sándor
Dr. Matkó János**

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2002**

Témavezető:

Dr. Damjanovich Sándor, az MTA rendes tagja
Dr. Matkó János, a biológiai tudomány doktora

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Gergely Pál, a biológiai tudomány doktora

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szűcs Géza, az MTA doktora
Dr. László Glória, a biológiai tudomány kandidátusa

A védési bizottság elnöke:

Dr. Gergely Pál, a biológiai tudomány doktora

Opponensek:

Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora
Dr. Zimányi László, az MTA doktora

Tagok:

Dr. Szűcs Géza, az MTA doktora
Dr. László Glória, a biológiai tudomány kandidátusa

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, Dr. Damjanovich Sándor akadémikusnak és Dr. Matkó János tudományos tanácsadónak szakmai iránymutatásukért és baráti támogatásukért, szakmai és emberi problémáim megoldásában nyújtott pótolhatatlan segítségükért.

Köszönettel tartozom a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet és az akadémiai munkacsoport valamennyi dolgozójának munkám során nyújtott önzetlen segítségükért és a meleg baráti légkörért. Kiemelten köszönöm Szentesi Gergelyné, Őri Gabriella és Harangi Istvánné technikusok áldozatkész segítségét.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönöm családom és barátaim megértő támogatását, amely erőt és biztonságos hátteret adott munkám végzéséhez.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1 AZ I. OSZTÁLYÚ FŐ HISZTOKOMPATIBILITÁSI KOMPLEX MOLEKULÁK.....	7
2.2 AZ INTERLEUKIN-2 RECEPTOR	13
2.3 A KOLESZTERIN ÉS A PLAZMAMEMBRÁN MIKROHETEROGENITÁSA.....	15
3. CÉLKITŰZÉSEK	20
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
4.1 SEJT TENYÉSZTÉS	21
4.2 MONOKLONÁLIS ANTITESTEK	21
4.3 A SEJTFELSZÍNI FEHÉRJÉK JELÖLÉSE	22
4.4 SEJTEK KEZELÉSE β 2-MIKROGLOBULINNAL	22
4.5 A SEJTEK KOLESZTERIN TARTALMÁNAK MÓDOSÍTÁSA	22
4.5.1 A plazmamembrán koleszterin tartalmának csökkentése metil- β -ciklodextrinnel.....	22
4.5.2 A plazmamembrán koleszterin tartalmának csökkentése foszfatidil-kolinnal	23
4.5.3 A plazmamembrán koleszterin tartalmának növelése.....	23
4.5.4 A sejtek jelölése fluoreszcens lipid próbákkal	23
4.5.5 Fluoreszcencia anizotrópia mérés.....	24
4.6 DETERGENS REZISZTENS MEMBRÁNFRAKCIÓ (DRM) IZOLÁLÁSA SŰRÜSÉGGRADIENS CENTRIFUGÁLÁSSAL	24
4.7 IMMUNPRECIPITÁCIÓ	25
4.8 WESTERN-BLOT ANALÍZIS.....	25
4.9 SEJTFELSZÍNI FEHÉRJÉK EXPRESSZIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA	25
4.10 FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIATRANSZFER MÉRÉSEK	26
4.10.1 Áramlási citometriás energiatranszfer mérések	28
4.10.2 Fluoreszcens képalkotó mikroszkópiás FRET mérések	29
4.11 PÁSZTÁZÓ MIKROSKÓPIÁS VIZSGÁLATOK	30
4.12 COCAPPING KÍSÉRLETEK	31
4.13 TIROZIN FOSZFORILÁCIÓ VIZSGÁLATA	32
4.14 AZ ANTIGÉN PREZENTÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA.....	32
4.14.1 Allospecifikus effektor T sejtek előállítása	32
4.14.2 T sejt aktiváció mérése	32
4.14.3 Európium felszabadulás mérése	33
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	34
5.1 A MEMBRÁN KOLESZTERINSZINT MÓDOSÍTÁSA BEFOLYÁSOLJA A HLA I MOLEKULÁK EXPRESSZIÓJÁT ÉS OLIGOMERIZÁCIÓJÁT B (JY) SEJTEK FELSZÍNÉN	34
5.2 EXOGÉN β 2-MIKROGLOBULIN SZEREPE A HLA I OLIGOMERIZÁCIÓ ÉS AZ ANTIGÉN PREZENTÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN	38
5.3 A HLA MOLEKULÁK ÉS AZ IL-2R RÉSZVÉTELÉVEL KIALAKULT KONZERVATÍV ASSZOCIÁCIÓS MOTÍVUMOK HUMÁN T LIMFÓMA/LEUKÉMIA EREDETŰ SEJTEK PLAZMAMEMBRÁNJÁBAN	45
5.4 AZ IL-2R α ALEGYSÉGÉT LIPID TUTAJOK KOMPARTMENTALIZÁLJÁK A KIT225 K6 SEJTEK PLAZMAMEMBRÁNJÁBAN	50

6. ÖSSZEFOGLALÁS	58
7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG.....	59
8. IRODALOMJEGYZÉK	60
9. KÖZLEMÉNYEK.....	71

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

12-AS: 12-antroiloxi-sztearinsav

APC: antigén prezentáló sejt

CHS: koleszterin-hemiszukcinát

CLSM: konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (Confocal Laser Scanning Microscopy)

CTL: citotoxikus T limfocita

DPH: 1,6-difenil-hexatrién

DRM: detergens rezisztens membránfrakció

FCET: áramlási citometriás energiatranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer)

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FRET: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer

GPI: glikozil-foszfatidil-inozitol

HLA: humán leukocita antigén

IL-2: interleukin-2

IL-2R: interleukin-2 receptor

mAb: monoklonális antitest

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)

M β CD: metil- β -ciklodextrin

NSOM: pásztázó közeli mező optikai mikroszkópia (Near-field Scanning Optical Microscopy)

pbFRET: foto-elhalványításon alapuló FRET (photobleaching FRET)

PC: foszfatidil-kolin

ROI: region of interest

SFX: 6-(fluoreszcein-5-(6)-karboxiamido) hexanoilsav szukcinimidil észter

TAMRA: 5-(6)-karboxi-tetrametil-rodamin-szukcinimidil észter

TCR: T sejt receptor

TrfR: transferrin receptor

TRITC: tetrametil-rodamin-izotiocianát

β 2m: β 2-mikroglobulin

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évek során számos olyan kísérletes bizonyíték gyűlt össze, amely – ellentétben a korábbi membránmodellekkel – a plazmamembránt felépítő lipidek és fehérjék nagyfokú laterális heterogenitására, lokális rendezettségére utal. A membránalkotók kompartmentalizációja, meghatározott struktúrákba (doménekbe) történő rendeződése mai ismereteink szerint általános jelenség, amely alapvető fontossággal bír(hat) mind az adott molekulák, mind a plazmamembrán egészének működése szempontjából.

A membránfehérjék egyik alapvető szerveződési szintjét azok asszociációja, közvetlen molekuláris közelsége révén kialakuló, nem-véletlenszerű fehérje mintázatok jelentik, amelyeknek több típusa is jelen lehet a plazmamembránban:

- (1) Egy adott „funkcionális egység” felépítésében eleve több komponens/alegység vesz részt. Ilyen pl. a T sejtek antigén-receptora (TCR-CD3 komplex), amelyet két, egyenként is több alegységből álló fehérje hoz létre.
- (2) Az egyes fehérjéknek a membrán síkjában valamilyen külső inger hatására bekövetkező átrendeződése is vezethet a fehérje mintázat kialakulásához, mint pl. az epidermális növekedési faktor receptorának ligandum-kötés hatására bekövetkező aggregációja.
- (3) A különböző membránfehérjék nem-véletlenszerű kolokalizációja, amely sok esetben látszólag funkcionálisan nem „összeillő” fehérjék közelségét is magában foglalhatja.¹ Gyakran a korábban egymással „össze nem illőnek” gondolt fehérjék kölcsönhatásának a feltárása hívja fel a figyelmet a lehetséges funkcionális kapcsolatra. Ilyen pl. az I. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC I) molekulák és az inzulin receptor (IR) kolokalizációja.

Damjanovich és munkatársai már 1981-ben feltételezték a sejtfelszíni komplex fehérje-csoportosulások általános érvényű előfordulását (Damjanovich és *mtsai*, 1981). Az általuk illetve más munkacsoportok által biofizikai és/vagy biokémiai módszerekkel feltárt fehérje mintázatok létezése alátámasztja a fenti hipotézis helyességét.

A közvetlen molekuláris közelséget jelentő szerveződési szint (nanométeres távolságskála) mellett a membránfehérjék nagy része a molekuláris méreteket meghaladó magasabb hierarchikus szinten (szubmikrométeres/mikrométeres távolság-skála) is rendezettséget mutat.

¹ A gyakorlatban amikor fehérjemintázatról beszélünk, általában erre a típusára gondolunk.

Míg a lipidek laterális heterogenitásának kialakításáért és fenntartásáért felelős tényezőkről viszonylag sok kémiai és fizikai információ áll rendelkezésünkre, addig a fehérjék kompartmentalizációjában szerepet játszó folyamatok jellege, pontos mechanizmusa a legtöbb esetben még nem ismert. Ugyanakkor ezek feltárása, megismerése alapvető információkkal szolgálhat a fehérje mintázatok funkciójának és általában a membránban lezajló folyamatok (pl. jelátvitel) részleteinek a megértéséhez.

Munkám során két, a T sejt immunválasz kiváltásában illetve lezajlásában fontos szerepet játszó fehérje, az I. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC I) és az interleukin-2 (IL-2) receptor közreműködésével kialakult fehérje mintázatokat próbáltam karakterizálni illetve feltárni az ezek kialakulásáért, fenntartásáért és szabályozásáért felelős tényezőket.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az adaptív vagy szerzett immunitás az idegen eredetű antigének specifikus felismerését és szervezetből történő eltávolítását valamint a hosszabb távú védekezést lehetővé tevő immunológiai memória kialakulását foglalja magába. A folyamat alapvetően két mechanizmus szerint játszódhat le: míg a humorális (ellenanyagfüggő) immunválasz az extracelluláris térben megjelenő antigének kiiktatására szolgál, addig az intracellulárisan előforduló nem-saját és megváltozott saját struktúrák felismerése valamint eltávolítása a celluláris (sejt közvetítette) immunitás feladata. A T limfociták központi szerepet töltenek be mind a humorális, mind pedig a celluláris immunitás folyamatában. A $CD8^+$ vagy citotoxikus T limfociták (CTL-k) fő feladata a citoplazmában szaporodó kórokozók (vírusok és bizonyos baktériumok) által fertőzött valamint a tumoros sejtek elpusztítása, kiiktatása. A $CD4^+$ limfociták (helper vagy segítő/szabályozó T sejtek; T_H) a vezikuláris sejt-kompartimentumokban előforduló antigéneket ismerik fel és - ellentétben a $CD8^+$ sejtekkel - nem az antigén (ill. az azt tartalmazó sejt) közvetlen elpusztítására, hanem más sejtípusok (B sejtek, makrofágok, CTL-k) aktivációjára, működésének szabályozására specializálódtak (Erdei és *mtsai*, 1998; Janeway & Travers, 1997).

A funkcióbeli különbségek ellenére az antigén felismerés folyamata mindkét sejtípusnál alapjaiban véve azonos mechanizmus szerint megy végbe. Az antigén felismeréséhez az adott antigénre specifikus receptorral (T sejt receptor komplex; TCR) rendelkező T sejt és az antigént tartalmazó sejt (antigén prezentáló sejt; APC) közvetlen kölcsönhatása szükséges: a TCR az APC által feldolgozott antigén peptid-fragmentumát ismeri fel, amely a fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC) fehérje termékeihez

kapcsolódva jelenik meg az APC-k felszínén. A peptidprezentáció folyamatában az ún. klasszikus vagy konvencionális MHC-gének által kódolt MHC fehérjék játszanak kulcsszerepet, amelyeknek két típusát, az MHC I illetve MHC II glikoproteineket különböztetjük meg. Míg az MHC I molekulák – bár szövettípustól függő mértékben – csaknem minden magvas sejt membránjában kifejeződnek, addig az MHC II molekulák állandó jelleggel csak a „hivatásos” antigén prezentáló sejteken (makrofágok, B sejtek, dendritikus sejtek) jelennek meg, más sejtek felszínén főleg külső hatások következtében expresszálódnak. Az MHC I molekulák elsősorban az endogén eredetű² (a citoszolban termelődő), míg az MHC II molekulák az exogén eredetű antigének bemutatásában vesznek részt. Ennek megfelelően az MHC I:peptid komplexet a CD8⁺, az MHC II:peptid komplexet pedig a CD4⁺ T limfociták ismerik fel (Erdei és *mtsai*, 1998; Janeway & Travers, 1997).

Az MHC:peptid komplex „befogása” a TCR által tirozin kinázokon alapuló foszforilációs kaszkádot vált ki a T sejtben, amely – az APC és/vagy a környezet felől érkező egyéb stimulusoktól valamint a T sejt érettségi fokától (naïv vagy effektor illetve memória T sejt) függően – többféle jelátviteli útvonal beindulását eredményezheti. A TCR-MHC:peptid kapcsolat szükséges, de általában nem elégséges feltétele a TCR-on keresztüli eredményes jelátvitelnek. A jelátvitel hatékonyságát jelentősen megnöveli a CD4 illetve CD8 koreceptorok közreműködése, amelyek a TCR által „befogott” MHC molekula invariábilis részéhez kötődnek és a TCR-MHC kapcsolat stabilitásának növelése és/vagy az intracelluláris részükhöz kapcsolódó protein tirozin kinázoknak (pl. p56^{Lck}) a TCR-CD3 komplex közelébe történő juttatása révén fejtik ki hatásukat. A naïv T sejtek aktivációja, klonális osztódása és differenciálódása a TCR által közvetített antigén-specifikus jel mellett még legalább egy független, az APC felől érkező ingert (kostimuláció) igényel, amelyet főként az ún. hivatásos (professzionális) antigén prezentáló sejtek felszínén megjelenő molekulák képesek kiváltani. Az APC-T sejt közötti kontaktus kialakításában kulcsszerepet töltenek be a különféle adhéziós molekulák is: a sejtek találkozásakor először ezek közreműködésével egy laza, átmeneti kapcsolat alakul ki, amely eddigi ismereteink szerint az antigén felismerése által kiváltott jelek hatására stabilizálódik (Acuto & Cantrell, 2000; Cantrell, 1996; Dustin, 2001; Dustin & Chan, 2000; Dustin & Shaw, 1999; Janeway & Travers, 1997).

A hatékony immunválasz tehát már a „kezdetekkor” számos molekula együttműködését igényli, ami az APC-T sejt kontaktus („immunológiai szinapszis”) elemeinek nagyon gondosan kialakított, ugyanakkor dinamikus szerveződését tételezi fel

² Bizonyos esetekben exogén eredetű antigéneket is prezentálhatnak, ami normálisan az MHC II molekulák feladata.

mindkét sejt részéről (Bromley és *mtsai*, 2001; Krummel & Davis, 2002). Az immunológiai szinapszis felépítésében résztvevő molekulák akkumulációja és megfelelő (a szükséges APC-T sejt kölcsönhatások kialakulását elősegítő) laterális elrendeződésének kialakulása a TCR és az MHC:peptid komplex kapcsolódását követően, feltehetően különböző citoszkéletáris elemek (aktin mikrofilamentumok és miozin motorok) illetve speciális membrán domének közreműködésével történik (Dustin, 2002; Dustin & Cooper, 2000). Ugyanakkor nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy a releváns molekulák sejtfelszíni szerveződése már eleve nem teljesen véletlenszerű, hanem egyfajta, a kontakt-régió kialakulását megkönnyítő rendezettséget mutat, ami az egyes fehérjék közvetlen molekuláris közelségét, fizikai asszociációját is jelentheti. Az utóbbi években feltárt, az antigén prezentációban fontos szerepet betöltő molekulák (MHC I, MHC II, ICAM-1 stb.) közreműködésével kialakult komplex fehérjecsoportosulások létezése alátámasztja ezt a feltételezést (Bene és *mtsai*, 1994; Bromley és *mtsai*, 2001). A kontakt-régiót alkotó fehérjék laterális kapcsolatrendszerének feltérképezése segítséget nyújthat az immunológiai szinapszis kialakulásának és végső soron az antigén prezentáció/felismerés folyamatának minél teljesebb megértésében. Ez azért is lényeges, mert bár a T sejtben lezajló jelátviteli folyamatokról viszonylag sok információ áll rendelkezésre, az antigén felismerés kezdeti, receptor-közeli (azaz az MHC:peptid komplex „befogását” közvetlenül követő) lépéseinek mechanizmusát, molekuláris részleteit illetően még nagyon sok a tisztázatlan kérdés.

A T limfociták aktiválódásának, proliferációjának, differenciálódásának és effektor funkcióinak szabályozásában számos humorális faktor is részt vesz, amelyek közül az egyik legfontosabb az interleukin-2 (IL-2) citokin. Az IL-2 elősegíti a T sejtek antigén-specifikus proliferációját, funkcionális differenciálódását és bizonyos esetekben az effektor funkciók ellátását is.³ Ez a kisméretű, szolubilis fehérje biológiai hatását a legtöbb esetben a három különböző, szerkezetileg sem rokon gén által kódolt polipeptidlánc (α , β és γ , alegység) fizikai asszociációja által létrehozott magas affinitású receptor-komplexhez kötődve fejt ki (Nelson & Willerford, 1998).

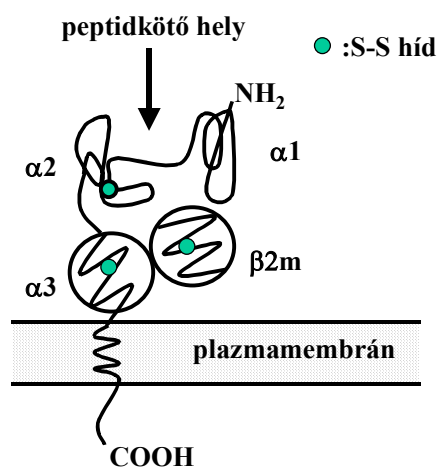
2.1 AZ I. OSZTÁLYÚ FŐ HISZTOKOMPATIBILITÁSI KOMPLEX MOLEKULÁK

A gyakorlatilag minden magvas sejt felszínén megtalálható MHC I (humán sejtek esetén HLA I-nek is nevezett) molekulák eddig legjobban karakterizált funkciója az endogén eredetű antigének bemutatása a CD8⁺ T limfocitáknak (Germain, 1994). Az antigén

³ Az IL-2-nek még számos egyéb funkciója is ismert, amelyekről később tesztek említést.

prezentációban betöltött kulcsszerepük mellett az MHC I molekulák számos, a sejtnövekedésre és differenciálódásra ható jelátviteli folyamat szabályozásában is részt vesznek (Tscherning & Claesson, 1994).

Az MHC I glikoproteinek az MHC génkomplex I régiója által kódolt polimorf α - vagy nehézláncból és a hozzá nem kovalensen kapcsolódó, nem MHC-kódolt $\beta 2$ -mikroglobulinból (könnyűlánc) valamint a prezentált peptidből felépülő heterotrimerek⁴ formájában expresszálódnak a sejtfelszínen (Madden, 1995). A transzmembrán nehézlánc extracelluláris része 3 doménből áll: a peptidkötőhely kialakításáért felelős $\alpha 1$ és $\alpha 2$ doménekből valamint a $\beta 2$ -mikroglobulinnal elsősorban kölcsönható $\alpha 3$ -doménből (1. ábra).

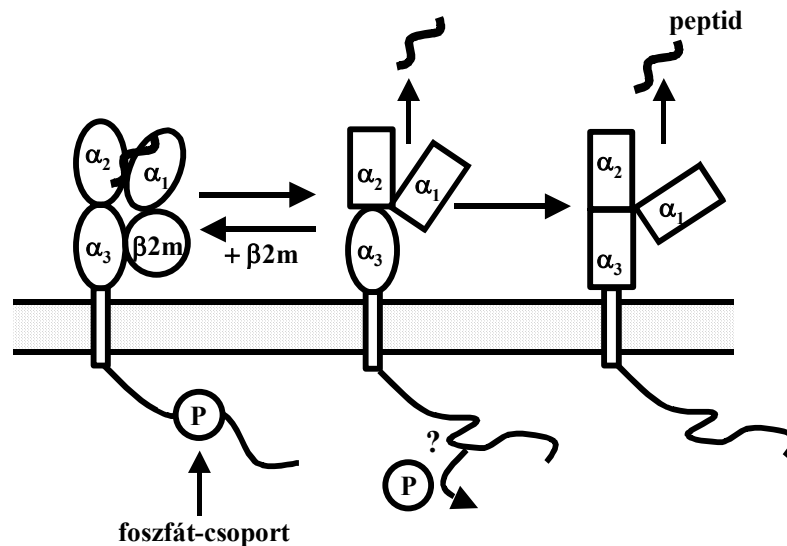


1. ábra: Az MHC I molekula vázlatos szerkezete

$\beta 2$ -mikroglobulin-deficiens sejtekkel végzett kísérletek alapján a natív, peptid-receptív $\alpha 1$ - $\alpha 2$ konformáció kialakításához és az MHC I molekulák sejtfelszínre történő kijutásához szükséges a $\beta 2$ -mikroglobulin kapcsolódása (Seong és *mtsai*, 1988; Williams és *mtsai*, 1989). Kivételt képez néhány egér eredetű $\beta 2m^-$ sejtvonal, ahol, bár a natívtól eltérő konformációban, detektálták a H-2D^b ill. a H-2L^d variáns nehézláncát a sejtfelszínen, sőt bizonyos esetekben ezek a nehézláncok citotoxikus immunválasz kiváltására is képesek voltak (Allen és *mtsai*, 1986; Bix & Raulet, 1992; Williams és *mtsai*, 1989). A peptidkötőhely betöltése szintén alapvető fontossággal bír a molekula stabil sejtfelszíni megjelenésében: a peptid transzport hiányossága a legtöbb esetben a molekula endoplazmatikus retikulumban történő visszatartását és degradációját, de legalábbis instabil sejtfelszíni expresszióját eredményezi (Townsend és *mtsai*, 1989; Townsend és *mtsai*, 1990).

⁴ A prezentált peptidet gyakran nem említjük külön, ilyenkor MHC I heterodimerről beszélünk. A továbbiakban az egyszerűség kedvéért én is a heterodimer elnevezést használom.

A fentiek alapján kicsit meglepőnek adódott a szabad, $\beta 2m$ -t nem kötő nehézláncok felfedezése $\beta 2m^+$ sejtek felszínén. A szabad nehézláncok jelenlétét először aktivált T és B limfociták, vírustranzformált limfo- illetve fibroblasztok valamint neuroblasztoma sejtek plazmamembránjában észlelték, később azonban – bár jóval kisebb mennyiségben – nyugvó limfocitákon és lépsejteken is detektálták őket (Carreno & Hansen, 1994; Madrigal és *mtsai*, 1991; Marozzi és *mtsai*, 1993; Matkó és *mtsai*, 1994; Schnabl és *mtsai*, 1990). Az eddigi vizsgálatok alapján a szabad nehézláncok a sejt felszíni MHC I heterodimerekből származtathatók azoknak közvetlenül a plazmamembránban bekövetkező disszociációja és/vagy internalizációja, a $\beta 2m$ disszociációja és a nehézlánc plazmamembránba történő recirkulációja révén (Demaria és *mtsai*, 1992; Pickl és *mtsai*, 1996; Rock és *mtsai*, 1991).



2. ábra: Az MHC I molekulák különböző sejt felszíni megjelenési formái

A $\beta 2m$ leválása a nehézlánc konformáció változását eredményezi, amely feltehetően több lépésben megy végbe. Először a peptidkötőhely ($\alpha 1/\alpha 2$ domén) és a molekula intracelluláris részének szerkezete (pl. foszforiláltsága) módosul, ugyanakkor a $\beta 2m$ megkötéséért felelős $\alpha 3$ domén még az eredetihez hasonló konformációval rendelkezik. Ebben az állapotban a szabad nehézláncok még képesek a $\beta 2m$ -nal történő re-asszociációra, azaz natív szerkezetük visszanyerésére. A $\beta 2m$ tartós hiányában bekövetkezik a nehézláncok teljes, irreverzibilis denaturációja (2. ábra) (Little és *mtsai*, 1995; Matkó és *mtsai*, 1994; Otten és *mtsai*, 1992; Thor és *mtsai*, 1993). (Természetesen e kettőn kívül még számos, köztes konformáció is elképzelhető, sőt az esetek egy részében valószínűleg a peptidek jelenléte sem kizárható, ami további változatokat eredményezhet.) Az intakt heterodimerek és a szabad nehézláncok feltehetően egymással egyensúlyban léteznek a plazmamembránban, amelyet a

sejtfelszínen elérhető $\beta 2m$ koncentráció befolyásolhat (Matkó és *mtsai*, 1994). A szabad nehézláncok expressziós szintjét és „élettartamát” a fentiek mellett befolyásolhatja még az intra- illetve extracelluláris peptidkészlet illetve a molekulák spontán vagy kiváltott proteolitikus hasítása egy membránhoz kötött metalloproteáz által (Carreno & Hansen, 1994; Demaria és *mtsai*, 1994; Pickl és *mtsai*, 1998).

A korábbi elképzelésekkel ellentétben ma már feltételezik, hogy a szabad nehézláncok nemcsak az MHC I molekulák „elrontott” változatai, hanem fiziológiás jelentőséggel is bírnak (Demaria & Bushkin, 1993). Szerepet tulajdonítanak nekik az exogén eredetű antigének bemutatásában illetve szolubilis formában a sejtek környezetében előforduló $\beta 2m$ és peptid fragmentumok „eltakarításában”, a természetes ölü sejt – target sejt kölcsönhatásban, membrán-kötött illetve szolubilis formában a T sejtek immunregulációjában (Bix & Raulet, 1992; Carbone és *mtsai*, 1993; Demaria & Bushkin, 1993; Hauser T.A. és *mtsai*, 1998). A szabad nehézláncok az intakt heterodimerekhez hasonlóan különböző jelátviteli folyamatok szabályozásában is részt vehetnek, ám az általuk közvetített jel akár teljesen ellentétes végeredménnyel járhat, mint a heterodimerek közreműködésével átvitt jel (Demaria & Bushkin, 1993).

Az utóbbi évek vizsgálatai hívták fel a figyelmet az MHC I molekulák részvételével kialakult fehérje komplexek létezésére. A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) valamint az ún. „hosszú távú” (long-range) elektron transzfer (LRET) hatásfokának mérésén alapuló módszerekkel az MHC I molekulák jelentős mértékű homoasszociációját mutatták ki aktivált T és B limfociták, vírus-transzformált limfoblasztok és fibroblasztok felszínén (Bene és *mtsai*, 1994; Matkó és *mtsai*, 1994). Kombinált FRET valamint atomerő és/vagy elektronmikroszkópiás vizsgálatok eredménye szerint, az MHC I molekulák két különböző hierarchikus szinten is rendezettséget mutatnak a plazmamembránban: a FRET mérések által feltárt, közvetlen molekuláris közelségben (nm) lévő asszociátumok mellett kimutatták az MHC I „clusterek” nagyobb szigetcsoportokba történő rendeződését is a molekuláris méreteket meghaladó szubmikrométeres skálán (Damjanovich és *mtsai*, 1995).

Az MHC I molekulák oligomerizációjának mértéke jó korrelációt mutat a szabad nehézláncok expressziós szintjével: mindkettő a felgyorsult anyagcserével rendelkező (aktivált vagy vírus-transzformált) sejtek felszínén számot tevő (Matkó és *mtsai*, 1994).

Biokémiai és/vagy biofizikai módszerek alkalmazásával az MHC I molekulák számos egyéb membránfehérjével történő kolokalizációját is kimutatták (ld. I. táblázat).

Partnermolekula	Sejttípus	Referencia
MHC II	JY humán B ill. HUT102 B2 humán T limfóma sejtek	(Bene és mtsai, 1994; Szöllősi és mtsai, 1989)
IL-2R α alegység	HUT102 B2 sejtek; aktivált humán perifériás limfociták	(Bene és mtsai, 1994; Harel-Bellan és mtsai, 1990; Sharon és mtsai, 1988)
intercelluláris adhézións molekula (ICAM-1)	JY humán B ill. HUT102 B2 humán T limfóma sejtek	(Bene és mtsai, 1994)
CD8 koreceptor	aktivált T limfociták, citotoxikus T sejtek	(Bushkin és mtsai, 1988)
tetraspan molekulák (CD53, CD81, CD82)	humán B limfoblasztoid sejtvonalak (JY, LCL-721)	(Lagaudriere-Gesbert C és mtsai, 1997; Szöllősi és mtsai, 1996)
transzferrin receptor	HUT102 B2	(Mátyus és mtsai, 1995)
inzulin receptor	limfociták, adipociták, hepatóma sejtek	(Ramalingam és mtsai, 1997; Reiland & Edidin, 1993)
epidermális növekedési faktor (EGF) receptor	A431 humán epidermoid carcinóma sejtek; normál humán fibroblasztok	(Schreiber és mtsai, 1984)

I. táblázat: Az MHC I molekulák néhány eddig feltárt hetero-asszociációja

Ennek megfelelően az MHC I molekulák a plazmamembránban valószínűleg több különféle, esetenként funkcionális jelentőséggel is bíró molekula-csoportosulásban vesznek részt. Feltehetően a homoasszociációk sem „tisztá” formában léteznek, nem zárható ki más fehérjék jelenléte ezekben a fehérje komplexekben. A „partner” molekulák plazmamembránbeli szerveződése szintén különböző hierarchikus szinteken történik (Jenei és mtsai, 1997; Vereb és mtsai, 2000).

Az MHC I molekulák részvételével kialakult homo- és hetero-asszociátumok létezését rotációs diffúziós illetve az egyedi részecskék membránbeli mozgásának nyomon követésére alkalmas ún. „Single Particle Tracking” (SPT) módszerrel végzett vizsgálatok egyaránt megerősítették. Ez utóbbiak az MHC I anomális diffúzióját mutatták ki HeLa sejtek felszínén (Smith és mtsai, 1999). A fehérjék anomális diffúzióját az őket csapdába ejtő, egy adott területre koncentráló „akadályok” – citoszkeletális elemek, lipid domének, fehérje asszociátumok – jelenléte okozhatja. Ezek a fehérjemozgást gátló tényezők nem függetlenek egymástól, hiszen a fehérje asszociátumok kialakításában és fenntartásában – többek között – a citoszkeletális elemeknek illetve a lipid doméneknek egyaránt szerepe lehet.

Mi lehet a fent felsorolt fehérje komplexek biológiai jelentősége? A legtöbb esetben még nem adható egzakt válasz erre a kérdésre, az irodalomban fellelhető adatok alapján csak feltételezéssel élhetünk a funkcionális jelentőséget illetően.

Szolubilis MHC:peptid multimerekkel (dimerek, trimerek illetve tetramerek) végzett kísérletek szerint az MHC molekulák aggregációja jelentősen megnövelheti a T sejtben kiváltott válasz eredményességét (Boniface és *mtsai*, 1998; Cochran és *mtsai*, 2000; Daniels & Jameson, 2000). Több, az utóbbi időben napvilágot látott cikk az immunológiai szinapszis molekuláinak meghatározott rend szerinti elhelyezkedéséről (szupramolekuláris „clusterekbe” történő szerveződéséről) tudósít (Grakoui és *mtsai*, 1999; Monks és *mtsai*, 1998). Ezen tények birtokában feltételezhető, hogy az ismertetett asszociátumok egy része (pl. a homoasszociáció; az MHC I-MHC II illetve az MHC I-ICAM-1 hetero-asszociáció) az antigén prezentáció folyamatában, hatékonyságának szabályozásában játszik szerepet. Létezésük elősegítheti az immunológiai szinapszis kialakulását, emellett az MHC I molekulák oligomerizációja által biztosított magas lokális MHC koncentráció jelentősen megnövelheti a két sejt közötti kapcsolat aviditását is (Bromley és *mtsai*, 2001).

Számos, a sejtek növekedéséért és differenciálódásáért felelős sejtfelszíni receptor esetében találtak funkcionális kapcsolatot az adott receptor és az MHC I molekulák között (Tscherning & Claesson, 1994). Az MHC I molekulák receptor-működés szabályozó funkciója – többek között – az adott receptorral történő fizikai asszociációjuk révén valósulhat meg. Erre példa a humán inzulin receptor (IR), ahol direkt összefüggést találtak a receptor-funkció és a két fehérje plazmamembrán-beli asszociációja között: az MHC I molekulák és az IR kolokalizációja módosítja az IR működését (a receptor ligand-affinitását illetve tirozin kináz aktivitását egyaránt), de emellett az MHC I glikoproteinek önmaguk is részt vesznek az inzulin által kiváltott jelátviteli kaszkádban (Ramalingam és *mtsai*, 1997). A fentiek alapján elképzelhető, hogy az MHC I molekuláknak más sejtfelszíni receptorokkal megvalósuló fizikai asszociációja az adott receptor működésének szabályozásában játszik szerepet.

A T sejteken expresszáldó MHC I molekulák aktívan részt vesznek a T sejtek jelátviteli folyamataiban, beleértve a T sejtek aktivációját, proliferációját is. Miután az aktivációs szignál kiváltása nem igényli az MHC I molekulák citoplazmatikus részének jelenlétét, a jelátvitel minden bizonnyal más fehérjékkel való asszociáció révén valósul meg (pl. CD8 vagy CD3) (Tscherning & Claesson, 1994).

Több, az I. táblázatban felsorolt fehérje esetében kimutatták, hogy azok az MHC I molekulák mindkét formájával (heterodimer illetve szabad nehézlánc) asszociálódnak (Lagaudriere-Gesbert C és *mtsai*, 1997; Ramalingam és *mtsai*, 1997). A szabad nehézláncok

és a heterodimerek részt vehetnek egyazon fehérje csoportosulás kialakításában, amelyekben az asszociált receptor (vagy egyéb fehérje) funkciójának szabályozásához a két forma együttes jelenléte szükséges, de egymástól különálló, az asszociált fehérje működését (akár teljesen) eltérő módon befolyásoló fehérje komplexekben is megjelenhetnek (Demaria & Bushkin, 1993). A sejtfelszínen elérhető $\beta 2m$ -szint feltehetően mindkét esetben fontos szabályozó funkciót tölt be (Matkó és *mtsai*, 1994; Ramalingam és *mtsai*, 1997).

2.2 AZ INTERLEUKIN-2 RECEPTOR

A régebben T sejt növekedési faktornak is nevezett interleukin-2 fontos szerepet tölt be a tímusból származó T sejtek perifériás homeosztázisának fenntartásában: amellett, hogy elősegíti a naív T sejtek klonális osztódását és funkcionális (effektor vagy memória sejt irányába történő) differenciálódását, serkenti a T_H1 sejtek aktiválódását valamint a $CD8^+$ effektor sejtek aktivációját és citolitikus funkciójának ellátását, de emellett szerepet játszik az ún. „aktiváció indukálta sejthalál” (activation induced cell death; AICD) folyamatában is (Nelson & Willerford, 1998; Waldmann, 1991).⁵

Az interleukin-2 receptor (IL-2R) felépítésében 3, különböző gének által kódolt alegység, az α -lánc és az ún. hemopoetikus receptorcsaládba tartozó β - és γ_c -lánc vesz részt. Az α -lánc (CD25) kivételével, amely csak az IL-2 receptor-komplex része lehet, a másik két alegységen több interleukin receptor is osztozik: a β -lánc részt vesz a T sejteken található IL-15 receptor felépítésében, az ún. közös (common) γ_c -lánc pedig az IL-4, IL-7, IL-9 és IL-15 receptoroknak egyaránt alkotórésze lehet (DiSanto, 1997; Nelson & Willerford, 1998).

Attól függően, hogy mely alegységekből tevődik össze, az IL-2 receptornak több különböző IL-2-kötő affinitással rendelkező formája lehet jelen a sejtfelszínen (Nelson & Willerford, 1998). A lehetséges receptor kombinációk közül csak a közepes affinitású ($K_d \approx 10$ nM) $\beta\gamma_c$ heterodimer és a magas affinitású ($K_d \approx 10$ pM), mindhárom alegységet tartalmazó $\alpha\beta\gamma_c$ receptor-komplex képes az IL-2 kötődését követő jelátvitelre, ugyanis a szignál továbbításának szükséges (és elegendő) feltétele a β - és a γ_c -lánc intracelluláris részének ligandkötés hatására bekövetkező heterodimerizációja (Nakamura és *mtsai*, 1994). Az α -lánc a receptor-komplex IL-2-kötő affinitását szabályozza, jelenléte a specifikus, nagy affinitású kötést biztosítja. Bár elvileg mindkét forma képes a jelátvitelre, az IL-2 *in vivo* biológiai hatását a legtöbb esetben a magas affinitású receptor-komplex közvetíti a sejt belseje felé. Így, bár az intracelluláris jelátvitelben önmaga nem vesz részt, az IL-2R α mégis kritikus eleme a

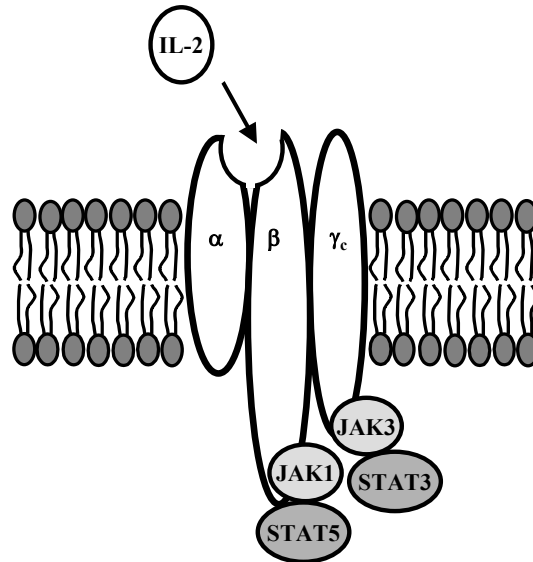
⁵ Az IL-2 a B és a természetes öltő sejtek növekedését és effektor funkcióját is serkenti.

sejtek IL-2-érzékenységének. Miután az IL-2R más citokin receptorokhoz hasonlóan nem rendelkezik saját enzimaktivitással, a jelátvitel a β - és γ_c -láncok intracelluláris részéhez asszociálódó nem-receptor típusú tirozin kinázok, főként a Jak (Janus arcú kináz) családba tartozó Jak1 és Jak3 révén valósul meg. Az IL-2 kötődését követően a két lánc citoplazmatikus részének heterodimerizációja megfelelő közelségbe hozza a Jak-kinázokat, lehetővé téve ezzel maguk a Jak kinázok valamint az IL-2R β és γ_c tirozin-foszforylációját. A β - és γ -láncon így kialakuló foszfortirozin motívumok kapcsolódási helyet biztosítanak számos SH2 vagy foszfortirozin-kötő doménnel rendelkező citoplazmatikus jelátvivő fehérje, többek között a STAT3 és a STAT5 transzkripciós faktorok számára. Ezek a molekulák bekerülve az aktivált receptor-komplexbe maguk is aktiválódnak (foszforylálódnak), ami dimerizációjukat követően a jel továbbvitelét eredményezi (Leonard & O'Shea, 1998; Lin & Leonard, 1997; Lin & Leonard, 2000; Nelson & Willerford, 1998).

A β - és a γ_c -láncal ellentétben, amelyek a naív limfociták felszínén is megtalálhatók, az α -lánc expressziója általában különféle aktiválódási folyamatok eredménye. Az immunválasz során az IL-2R α sejt felszíni expressziója az IL-2 szintézisével és szekréciójával egyidejűleg történik, bár ez utóbbi termelődése sokkal szigorúbb feltételekhez kötött, azt csak az antigén-specifikus aktivációs és az ún. kostimuláló jel együttes jelenléte váltja ki. A CD25 megjelenéséhez ezzel szemben elegendő a TCR (nem feltétlenül antigén-specifikus) stimulációja.⁶ A normál T limfocitákkal szemben számos leukémia/limfóma eredetű sejt vagy sejtvonal felszínén mindenféle előzetes aktiváció nélkül is nagyszámú IL-2R α expresszálódik, legtöbbször a másik két alegységét jóval meghaladó mennyiségben. Itt kell még megjegyezni, hogy az IL-2 kötődése ugyancsak fokozza az α -lánc sejt felszíni expresszióját (Nelson & Willerford, 1998; Waldmann, 1991).

Sokáig kérdéses volt, hogy a magas affinitású receptor-komplex kialakulásához feltétlenül szükséges-e az IL-2 α lánchoz való kötődése. Egy korábbi, az ún. „szekvenciális affinitás konverzió” modell szerint az egyes alegységek egymástól függetlenül léteznek a sejt felszínén, a nagy affinitású heterotrimer csak az IL-2 α -láncához való kötődését követően, több lépésben alakul ki (Kondo és *mtsai*, 1986). Ugyanakkor számos tanulmány támasztotta alá ennek az ellenkezőjét: a „surface plasmon resonance” affinitásmérések (Balasubramanian és *mtsai*, 1995), az IL-2R α -t különböző számban kifejező sejtvonalakon elvégzett Scatchard analízis és a keresztkötéses vizsgálatok eredményei egyaránt az $\alpha\beta$ heterodimerek létezésére utaltak már IL-2 távollétében is (Goldstein és *mtsai*, 1992; Roessler és *mtsai*, 1994; Saragovi

& Malek, 1988). Damjanovich és munkatársai pedig FRET mérésekkel kimutatták, hogy az IL-2 jelenlététől függetlenül, mindhárom alegység egymás molekuláris közelségében található (3. ábra), ugyanakkor az IL-2 és az egyéb releváns citokinek (pl. IL-7, IL-15) kötődése az



3. ábra: Az IL-2R vázlatos felépítése

egyes alegységek kölcsönös távolságát/kölcsönhatásait szelektíven módosíthatja (Damjanovich és *mtsai*, 1997a).

Az IL-2 receptor-komplex kialakulásában és az alegységek fenti, citokinekkal módosítható (feltehetően az egyes IL receptorok alegységeken való osztozkodását is elősegítő) dinamikus egyensúlyának fenntartásában szerepet játszó tényezőkkel kapcsolatos ismereteink azonban még meglehetősen hiányosak.

Ugyancsak nem ismerjük az IL-2R α és a HLA I molekulák aktivált humán perifériás limfociták illetve T limfóma sejtek felszínén feltárt (korábban már említett) hetero-asszociációját létrehozó/stabilizáló erőket, sem ezen kolokalizáció fiziológias jelentőségét.

2.3 A KOLESZTERIN ÉS A PLAZMAMEMBRÁN MIKROHETEROGENITÁSA

A fehérjék inhomogén sejtfelszíni eloszlásának (laterális rendezettségének) kialakulása korlátozott laterális diffúziójukra vezethető vissza, amelyért – a genetikai meghatározottságon kívül - feltehetően az alábbi tényezők valamelyike tehető felelőssé (Damjanovich és *mtsai*, 1997b; Kusumi & Sako, 1996):

⁶ Az IL-2R α expressziója T sejteken indukálható egyéb, nem a TCR-ra ható stimulusokkal is (pl. IL-1 vagy TNF- α).

- (1) A membránban működő erők: A plazmamembrán lipid-domén struktúrája, amely az egyes fehérjéknek a membránba illeszkedő, azaz a lipidekkel közvetlenül kölcsönható régiójától függően azok szelektív akkumulációját illetve külön doménekbe történő szegregációját egyaránt lehetővé teszi. A specifikus lipid-fehérje kölcsönhatások mellett az egyes membránrégiók mikroviszkozitása (rendezettsége) is befolyásolhatja fizikailag a fehérje mintázatokat. Az egyes fehérjék membránt áthidaló α -helikális régióinak kölcsönhatása szintén szerepet játszhat a fehérje asszociációk létrehozásában (hélix-hélix kölcsönhatás).
- (2) Intracellulárisan ható tényezők: A citoszkeleton plazmamembránnal asszociált része (membrán-szkeleton) direkt (a citoszkeletonhoz kapcsolódó adapter fehérjék esetén) vagy indirekt módon (sztérikus gátlás) egyaránt gátolhatja a fehérjék mozgását, ezáltal egy adott térrészbe szorítva azokat. A különféle intracelluláris jelátvivő rendszerek elemeivel (kinázok, G-fehérjék) való kapcsolat szintén korlátozhatja a fehérjék szabad diffúzióját. A vezikuláris transzport folyamatok a vezikulák tartalmának a plazmamembrán egy adott helyére történő „célzott” szállításával járulhatnak hozzá a fehérjék szelektív akkumulációjához.
- (3) Extracellulárisan ható tényezők: Ebbe a kategóriába a különféle elektrosztatikus erők, keresztkötő ligandumok valamint az extracelluláris mátrix tartozik, amelyek mind hozzájárulhatnak a fehérje kolokalizációk kialakulásához.
- (4) Egyéb, általában indirekt módon ható 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 általában nem egymástól függetlenül, hanem egymás hatását kiegészítve/módosítva hatnak: pl. a T sejtek felszínén az antigén felismerését (vagy egyéb stimuláló hatást) követően kialakuló ún. „szupramolekuláris aktivációs cluster” létrehozásában mind a citoszkeletonnak, mind pedig a glikoszfingolipidben és koleszterinben gazdag lipid mikrodoméneknek („raft”, ld. később) szerepet tulajdonítanak (Dustin, 2002; Dustin & Cooper, 2000).

A membránfehérjék lipidkörnyezete, a membrán lipid-domén struktúrája kitüntetett jelentőséggel bír a fehérje mintázatok kialakulása és fenntartása szempontjából, hiszen saját, a fehérjék mozgásának korlátozásában, az egyes fehérjék szelektív akkumulációjában illetve szegregációjában betöltött szerepe mellett a plazmamembrán a színtere a fehérje mintázatokban lejátszódó, a többi szabályozó tényező által okozott összes változásnak. (Az

indirekt módon ható tényezők is gyakran a membrán szerkezetét módosítva fejtik ki hatásukat.)

A plazmamembrán koleszterin tartalma a lipid kettősréteg domén struktúrájának valamint az egyes membránrégiók megfelelő fluiditásának/mikroviszkózitásának szabályozásában/stabilizálásában egyaránt fontos szerepet játszik.

A koleszterin részvételével kialakuló mikrodomének közül napjainkban kitüntetett érdeklődés övezi a szfingolipidben és koleszterinben gazdag membrándoméneket, az ún. „lipid raftokat” („lipid tutajokat”). A „raft-hipotézis” kialakulásához egyes specializált membránrégiók detergens rezisztenciájának felismerése vezetett: a feltételezések szerint a lipid tutajok ezen detergens rezisztens membránfrakciók (DRM-ek) sejtfelszíni megjelenési formái (Simons & Ikonen, 1997). Bár a detergens rezisztencián alapuló biokémiai vizsgálatok magukban rejtik annak a lehetőségét, hogy a DRM-ek a sejtek detergenssel történő feltárása következtében kialakuló műtermékek, ma már számos, intakt sejteken elvégzett vizsgálat támasztja alá a szfingolipid mikrodomének létezését (Jacobson & Dietrich, 1999).

A lipid tutajokat a plazmamembrán külső rétegében feldúsuló szfingolipidek (glikoszfingolipidek és szfingomielin) és a koleszterin laterális asszociációja hozza létre, amelynek kialakításában egyes elképzelések szerint a glikoszfingolipidek szénhidrát tartalmú fejcsoportjai közötti H-kötések játszanak kulcsszerepet. A glikoszfingolipidek fejcsoportjai nagyobb területet foglalnak el a külső membránréteg síkjában, mint a zsírsavrészek, a zsírsavlánccok között ennek következtében kialakuló üres teret töltik be a koleszterin molekulák (Hooper, 1999; Simons & Ikonen, 1997). Egy másik elképzelés szerint a lipid tutajok szerveződésében a természetben előforduló szfingolipidek hosszú, általában telített zsírsavláncai közötti van der Waals kölcsönhatásoké a főszerep, amelyekkel – kémiai szerkezetük révén – a koleszterin molekulák is szoros kölcsönhatás kialakítására képesek. (Ezt támasztja alá az az eredmény, mely szerint a glikoszfingolipidek jelenléte nem minden esetben szükséges a lipid tutajok – detergens rezisztens membrándomének – kialakulásához (Ostermeyer és *mtsai*, 1999)). Koleszterin távollétében a szfingolipidek laterális kölcsönhatása rigid, gél halmazállapotú membrándomének kialakulását vonná maga után, amelyben az egyes molekulák igencsak korlátozott rotációs és laterális mobilitással rendelkeznek. A szfingolipidek és a koleszterin molekulák szoros kölcsönhatása révén ugyanakkor a membrán egyéb – főként telítetlen foszfolipideket tartalmazó – régióitól ugyancsak jól elhatárolható, de viszonylag magas rotációs és kevésbé korlátozott laterális mobilitást megengedő, ún. folyadékkristályos szerkezettel rendelkező domének alakulnak ki, amely megfelelő szintere lehet a sejtmembránban lezajló dinamikus változásoknak (Brown &

London, 1998; Brown & London, 2000).

Bár a lipid tutajok felépítésében a citoplazmatikus oldalról résztvevő lipidek természete még nem ismert, a kölcsönhatások optimalizálása a telített zsírsavláncú foszfolipidek jelenlétét feltételezi (Hooper, 1999).

A lipid tutajok jellemző sajátága a hideg, nem-ionos detergensben való oldhatatlanságuk, amely elválasztásukat és a raft-asszociált fehérjék illetve lipidek azonosítását és tanulmányozását is lehetővé teszi (Brown & London, 1998; Hooper, 1999). Ily módon már számos, a különféle jelátviteli folyamatokban szerepet játszó fehérjét azonosítottak a detergens rezisztens membrán frakciókban. Ezek nagy része a membrán külső rétegéhez kapcsolódó glikozil-foszfatidilinozitol (GPI)-horgonyzott valamint a citoplazmatikus lipidrétteghez zsírsavláncon keresztül kapcsolódó (acilezett) fehérje, de több transzmembrán fehérje – állandó vagy valamilyen stimulus által kiváltott – jelenlétét is kimutatták már (Brown & London, 2000; Horejsi és *mtsai*, 1999; Melkonian és *mtsai*, 1999; Vainio és *mtsai*, 2002; Xavier & Seed, 1999). A raftok fehérjetartalmának analízise valamint a lipid tutajokat módosító kezelések alkalmazásával igazolták a raftok különböző jelátviteli folyamatokban (pl. T sejt aktiváció, antigén-prezentáció; B sejt aktiváció, hízósejtek aktiválása IgE-receptoron keresztül stb.) betöltött szerepét (Anderson és *mtsai*, 2000; Cheng és *mtsai*, 2001; Holowka & Baird, 2001; Janes és *mtsai*, 2000; Langlet és *mtsai*, 2000; Sedwick & Altman, 2002; Sheets és *mtsai*, 1999). Mindezeket összevetve a lipid tutajok feltehetően kettős funkcióval rendelkeznek a jelátviteli folyamatok során: egyrészt megnövelhetik az egyes molekulák lokális koncentrációját, másrészt a különböző (eredetileg akár különálló raftokban ill. ellentétes lipidréttegben elhelyezkedő) fehérjéket egymás közvetlen közelébe „terelve, toborozva” (másokat pedig egymástól elkülönítve) elősegíthetik a jelátvitel szempontjából fontos kölcsönhatások kialakulását. A fentiek mellett a lipid tutajok fontos funkciót töltenek be a lipidek és fehérjék szortírozásában, a különféle vezikuláris transzport folyamatokban (Ikonen, 2001). Itt kell megemlítenem, hogy bár sok tulajdonságukban megegyeznek, a lipid tutajok nem azonosak a morfológiailag is azonosítható, flaskaszerű membrán invaginációként megjelenő kaveolákkal, melyek képződése kaveolin génhez kötött (Hooper, 1999).

A klasszikus, detergens rezisztencián alapuló biokémiai analízis mellett, ma már számos, főként biofizikai/sejtbiológiai módszert alkalmaznak a lipid tutajok sajátságainak feltárására. Ezen módszerek előnye, hogy intakt sejteken is alkalmazhatók, így egyrészt kisebb a műtermék keletkezésének esélye, másrészt alkalmazásukkal a lipid tutajok mérete, élettartama is tanulmányozható. Ezen technikák rendszerint egy ismert raft-komponens

specifikus megjelölésén (pl. GM-1 gangliozid jelölése fluoreszcens kolera-toxinnal) vagy a raftokba beépülő lipidpróbák alkalmazásán, ezek eloszlásának, mozgásának stb. nyomonkövetésén alapulnak. A lipid tutajok méretére vonatkozóan számos, a néhány tíz nanométertől a mikrométerig terjedő skálára eső kísérletes adat született (Pralle és *mtsai*, 2000; Schutz és *mtsai*, 2000; Sheets és *mtsai*, 1997; Suzuki és *mtsai*, 2000; Varma & Mayor, 1998). A tapasztalt eltérések oka valószínűleg az alkalmazott módszerek eltérő feloldóképességében, megközelítési módjában valamint specificitásában (pl. a vizsgált molekula illetve biológiai membrán típusában) rejlik (Edidin, 2001). A különböző módszerekkel kapott eredményeket összevetve a legvalószínűbb feltételezés az, hogy a lipid tutajok kisméretű, tranziens (rövid élettartamú) képződmények, amelyek viszonylag szétszórtnan helyezkednek el a plazmamembránban, de a raft-komponensek keresztkötése a raftok aggregációját és akár fénymikroszkóppal is feloldható, nagyobb membrándomének kialakulását eredményezheti (Harder és *mtsai*, 1998; Hooper, 1999). Feltehetően a lipid tutajok tranziens természete, állandó változása (pl. aggregációja, „disszociációja”, internalizációja stb.) képezi a különféle sejtbioológiai folyamatokban betöltött funkciójuk alapját.

Annak ellenére, hogy a biológiai membránokban előforduló lipidek közül kémiai szerkezete alapján leginkább a szfingolipidekkel alakíthat ki szoros kölcsönhatást, a koleszterinnek a lipid tutajokban való előfordulása – a sejtmembrán viszonylag magas koleszterintartalma miatt – nem kizárólagos. A koleszterin a membrán folyadékfázisú, főként foszfoglicerideket tartalmazó (rendezetlenebb) részein is megtalálható, bár kisebb mennyiségben. Bár a foszfogliceridekkel való keveredés mértéke és az adott membránrégió rendezettségi állapota számos tényező függvénye, általában igaz az, hogy a koleszterin jelenléte az adott membránrégiót alkotó foszfolipidek nagyobb lokális rendezettségét/rigiditását illetve az általuk elfoglalt membránfelszín csökkenését eredményezi, amely ugyancsak szerepet játszhat az egyes membránfehérjék kölcsönhatásának szabályozásában (Brown, 1998).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen munkám során alapvetően a humán eredetű B és T limfoid sejtek felszínén fizikai módszerekkel megfigyelhető szupramolekuláris fehérje asszociátumok (clusterek) iniciálásában, fenntartásában és szabályozásában szerepet játszó tényezők feltárása volt a célom. Mint a bevezetés és az irodalmi áttekintés során említettem, elsősorban az antigének bemutatásában kulcsszerepet játszó HLA I molekulák valamint a T sejtek antigén-specifikus stimulációt követő proliferációjában esszenciális IL-2 receptor sejt felszíni szerveződése képezte vizsgálataink tárgyát.

Az alábbi specifikus kérdéseket kívántuk tanulmányozni:

- Van-e összefüggés a membrán mikrodomén struktúrája (koleszterin szintje) és a B sejtek felszínén megfigyelhető HLA I oligomerizáció között?
- Mi a szerepe a B sejteken megfigyelt HLA I oligomerizációban a „szabad” ($\beta 2m$) nehézláncoknak illetve az exogén $\beta 2m$ szintnek? Függ-e az antigén-prezentáció és a citotoxikus T limfociták aktiválódásának hatékonysága az exogén $\beta 2m$ szinttől illetve az HLA I oligomerizáció mértékétől?
- Mennyire általánosítható az IL-2R és a HLA molekulák részvételével kialakuló asszociációs motívumok létezése a különböző leukémia/limfóma eredetű T sejtek felszínén? Milyen tényezők vehetnek részt ezen asszociációs mintázatok kialakításában illetve fenntartásában?
- Mi okozhatja az IL-2R alegységeinek genetikailag nem determinált „együttállását” (kompartmentalizációját) az előbbi T sejt típusok plazmamembránjában?
- Van-e funkcionális (pl. jelátviteli) következménye az IL-2R alegységek membrán kompartmentalizációjának?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 SEJT TENYÉSZTÉS

Vizsgálataink során a következő humán eredetű sejtvonalakat használtuk: JY, Epstein-Barr vírussal transzformált B limfoblaszt; Kit225 K6, Kit225 IG3 valamint HUT102B2 T limfóma eredetű sejtek. A sejteket 10 % FCS-t és antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban tenyésztettük. A Kit225 K6 sejtekhez 48 órás rendszerességgel 20 egység/ml humán rekombináns IL-2-t adtunk; egyes esetekben a sejteket citokint nem tartalmazó médiumban mostuk, majd 72 órán keresztül IL-2 nélkül tenyésztettük, kísérleteinkben a „nyugvó” sejtek modelljeként használtuk őket.

4.2 MONOKLONÁLIS ANTITESTEK

Az MHC I molekulákkal kapcsolatos kísérleteinkben az intakt HLA I heterodimerek nehézláncát felismerő W6/32 (IgG2a) és KE-2 (IgG2a), a szabad nehézláncokhoz kapcsolódó HC-10 valamint a β 2m-ra specifikus L368 (IgG1) monoklonális antitesteket használtuk. Az antitesteket Protein-A affinitás kromatográfia alkalmazásával hibridóma sejtek felülúszójából izoláltuk. A hibridóma sejtvonalakat F. Brodsky (University of California, San Francisco, USA) és M. Edidin (The Johns Hopkins University, Baltimore, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. Az ugyancsak az intakt heterodimerekre specifikus MEM-147 monoklonális antitestet V. Horejsitől (Institute of Molecular Genetics, Prága, Csehország) kaptuk.

Az IL-2R α , β és γ_c alegységét a T. Waldmann (NIH, Washington, USA) által rendelkezésünkre bocsátott anti-Tac (IgG2a), Mik β 1 (IgG1 κ) illetve a Pharmingentől (San Diego, CA, USA) beszerzett TugH4 (IgG2b) antitesttel jelöltük meg vizsgálataink során. A CD48 ellenes MEM-102 (IgG1) valamint a transzferrin receptor ellenes MEM-75 (IgG1) antitesteket V. Horejsitől kaptuk.

Kísérleteink során több esetben a fent felsorolt antitestek Fab fragmentumait használtuk, amelyet papainos emésztéssel állítottunk elő. Ennek során az előzőleg pH=8,0 PBS-be (100 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) átdializált IgG-t L-cisztein jelenlétében 37 °C-on 11 percig papainnal emésztettük, majd a reakciót jóacetamiddal leállítottuk. Sephadex G-100 oszlopon történő gélszűréssel elválasztottuk az Fab és az Fc fragmentumokat tartalmazó frakciókat, amelyeket az antitestek Fc részét megkötő Protein-A oszlopon átengedve tiszta Fab frakciót nyertünk (Matkó & Edidin, 1997).

Áramlási citometriás és képalkotó mikroszkópiás méréseinkhez az antitesteket vagy azok Fab fragmentumait fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), tetrametil-rodamin-izotiocianáttal (TRITC), 6-(fluoreszcein-5-karboxiamido)-hexanoilsav szukcinimidil észterrel (SFX), Rhodamine RedTM-X szukcinimidil észterrel (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) illetve szulfoindocianin-szukcinimidil észterrel (Cy3 és Cy5) (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA) konjugáltuk. A felesleges festéket Sephadex G-25 oszlopon való szűréssel távolítottuk el. A spektrofotometriásan meghatározott festék/fehérje arány teljes IgG esetén 1 és 4 között (Cy3 esetén 4 és 8 között), Fab esetén ~1 volt. Jelöletlen antitesttel (Fab-vel) elvégzett kompetíciós vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a fluoreszcensen jelzett antitestek illetve Fab fragmentumaik megtartották kötődési képességüket.

4.3 A SEJTFELSZÍNI FEHÉRJÉK JELÖLÉSE

A sejteket PBS-ben vagy előkezelés esetén az alkalmazott pufferben 2× mostuk (200×g, 8 perc), majd 1-2×10⁷ koncentrációban szuszpendáltuk az adott pufferben. A jelölés során 50-100 µl sejtsuszpenziót adtunk az előre bemért, telítési koncentrációban alkalmazott antitestekhez majd a mintákat 45 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a mintákat hideg pufferrel 2× mostuk, majd 1 % -os hideg formaldehid oldattal fixáltuk.

4.4 SEJTEK KEZELÉSE β 2-MIKROGLOBULINNAL

Az EBV transzformált JY B limfoblasztokat egy éjszakán keresztül 5 µM humán rekombináns β 2-mikroglobulin jelenlétében, CO₂ termosztátban tenyésztettük.

4.5 A SEJTEK KOLESZTERIN TARTALMÁNAK MÓDOSÍTÁSA

4.5.1 A plazmamembrán koleszterin tartalmának csökkentése metil- β -ciklodextrinnel

A ciklodextrinek egymáshoz α -1,4-glikozidkötéssel kapcsolódó glükopiranozid gyűrűkből álló, kristályos, vízben oldható ciklikus oligomerek, amelyek közepén egy (a cukoregységek által körbevett) nem-poláros üreg található. A belső, nem-poláros üregnek köszönhetően a ciklodextrinek különféle hidrofób anyagokkal komplexeket képezhetnek és ezáltal azok vízdékonyságát megnövelik. Emiatt a tulajdonságuk miatt a ciklodextrineket széleskörűen alkalmazzák pl. különböző lipofil gyógyszerek hordozójaként a gyógyszerkutatásban. A 7 gyűrűből álló β -ciklodextrinek és azok kémiaiilag módosított változatai *in vitro* körülmények között a többi lipidhez képest jóval nagyobb affinitást mutatnak a szterolokkal szemben. Az utóbbi években számos sejtípus esetén kimutatták, hogy a β -ciklodextrin képes a koleszterin szelektív kivonására a sejtek plazmamembránjából.

Ez és az a tény, hogy a ciklodextrin – más koleszterin-kötő ágensekkel ellentétben – nem épül be a membránba, hanem kizárólag annak felszínén fejti ki hatását, kivételes eszközzé teszi a membránok tanulmányozásában (Christian és *mtsai*, 1997). (Miután a ciklodextrinek a koleszterin direkt transzportját teszik lehetővé a sejtmembrán és a ciklodextrin molekula között, a β -ciklodextrin koleszterin-donorként ugyanúgy felhasználható, mint koleszterin-akzeptorként: a ciklodextrin-koleszterin zárványkomplex felhasználható a membránok koleszterinnel történő feltöltésére is.)

Vizsgálatainkban a β -ciklodextrin metilezett származékát, a metil- β -ciklodextrint (M β CD) használtuk a sejtek koleszterin tartalmának csökkentésére. A sejteket 2×10^6 /ml koncentrációban 7 mM M β CD-t tartalmazó HBSS-ben szuszpendáltuk, majd 37°C-on, 1 órán keresztül inkubáltuk. A kontroll sejteket ciklodextrint nem tartalmazó HBSS-ben, azonos körülmények között tartottuk.

4.5.2 A plazmamembrán koleszterin tartalmának csökkentése foszfatidil-kolinnal

A sejteket 250 illetve 500 μ g/ml foszfatidil-kolin (PC) jelenlétében 90 percig, 37 °C-on inkubáltuk. A foszfatidil-kolin liposzómával történő kezelés egy korábbi, klasszikus módja a membrán koleszterin szint csökkentésének (Muller és *mtsai*, 1983).

4.5.3 A plazmamembrán koleszterin tartalmának növelése

A plazmamembrán koleszterin tartalmának növeléséhez a sejteket 2×10^6 /ml koncentrációban PBS-ben szuszpendáltuk, majd koleszterin-hemiszukcinát (CHS) abszolút etanolban elkészített 20 mg/ml-s törzsoldatát adtuk a sejtszuspenzióhoz. A CHS végkoncentrációja 160-200 μ g/ml volt. A sejteket 37°C-on, 1 órán keresztül inkubáltuk. A kontroll sejteket a megfelelő térfogatú abszolút etanol hozzáadása után azonos körülmények között tartottuk. A kezeléseket követően a mintákat $2 \times$ mostuk az adott pufferben majd a további céljainknak megfelelően készítettük elő őket (Muller és *mtsai*, 1983).

4.5.4 A sejtek jelölése fluoreszcens lipid próbákkal

A koleszterin tartalom módosítására irányuló kezelések hatásosságát a sejtek plazmamembránjába beépülő lipid próbák fluoreszcencia anizotrópiájának meghatározásával ellenőriztük. Alapja, hogy a koleszterin tartalom módosítása a sejtmembrán mikroviszkozitásának megváltozását vonja maga után, ami a membrán megfelelő rétegébe beépülő fluoreszkáló próbák segítségével nyomon követhető (Szöllősi, 1994).

Jelölés 12-antiroiloxi-sztearinsavval (12-AS): 2.5 ml sejtszuspenzióhoz ($\sim 2 \times 10^6$ sejt/ml) lassan, folyamatos keverés közben 20 μ l 12-AS törzsoldatot (1 mg/ml, abszolút

etanolban) adtuk. A reakcióelegyet 25-30 percig sötétben, 37°C-on inkubáltuk, ezt követően mértük a beépült próba fluoreszcencia anizotrópiáját (gerjesztés: 382 nm; emisszió: 438 nm).

Jelölés 1,6-difenil-hexatriénnel (DPH): 60 µl DPH törzsoldatot (1 mg/ml DPH tetrahidrofuránban feloldva) lassan, állandó keverés közben 50 ml PBS-hez csepegtettünk majd az így kapott oldatot sötétben, 1 órán át folyamatosan kevertettük. A sejteket PBS-ben szuszpendáltuk, az így kapott sejtsuszpenziót ($2-3 \times 10^6$ sejt/ml) a DPH-PBS oldattal kétszeresére hígítottuk és 20 percig 37°C-on, sötétben inkubáltuk. A sejteket PBS-sel mostuk, $\sim 1 \times 10^6$ sejt/ml koncentrációban PBS-ben szuszpendáltuk és mértük a beépült lipid próba fluoreszcencia anizotrópiáját (gerjesztés: 355 nm; emisszió: 430 nm).

4.5.5 Fluoreszcencia anizotrópia mérés

A fluoreszcencia anizotrópia méréseket Perkin-Elmer MPF-44 B típusú spektrofluoriméteren hajtottuk végre. A sejtek plazmamembránjába beépült lipidpróbák „steady-state” fluoreszcencia anizotrópiáját (r) a következő módon határoztuk meg:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} - 2GI_{VH}} \quad \{1\}$$

ahol I_{VV} és I_{VH} a polarizátor és az analizátor egymáshoz viszonyítva párhuzamos (vertikális-vertikális) illetve keresztezett (vertikális-horizontális) pozíciója esetén mért fluoreszcencia intenzitások ($G = I_{HV}/I_{HH}$, korrekciós faktor).

4.6 DETERGENS REZISZTENS MEMBRÁNFRAKCIÓ (DRM) IZOLÁLÁSA SŰRŰSÉGGRADIENS CENTRIFUGÁLÁSSAL

A DRM izolálása egyensúlyi sűrűséggradiens centrifugálással történt (Ilangumaran és *mtsai*, 1999). A sejteket 73 % (w/v) szacharózt és 7 µl proteáz- inhibitor koktélt (10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin, 500 mM benzamidin, 0.1 M DFP és 2 % PMSF) tartalmazó jéghideg TKM pufferben (50 mM Tris-HCl, pH:7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA) homogenizáltuk $\sim 10^8$ sejt/ml töménységben. A homogenizátumot 1 % Triton-X 100 vagy 15 mM CHAPS jelenlétében 20 percig jégen tartottuk, majd a szacharóz koncentráció 40 %-osra történő beállítása után egy SW41 típusú centrifugacső (Beckman Instruments, Nyon, Switzerland) aljára helyeztük. A mintát 6 ml 36 % és 3 ml 5 % szacharózt tartalmazó TKM pufferrel felülrétegeztük és 18 órán keresztül $250,000 \times g$ -vel 4 °C-on Centrikon T1180 ultracentrifugával (Kontron Instruments, Milánó, Olaszország) centrifugáltuk. Ezt követően az 5 és a 36 %-os szacharóz-rétegek határfelületén látható, opálos sáv formájában elhelyezkedő detergens rezisztens frakciót összegyűjtöttük és a további

felhasználásig -20°C-on tároltuk. A DRM-k fehérjetartalmát SDS-PAGE és Western-blot módszerekkel analizáltuk.

4.7 IMMUNPRECIPITÁCIÓ

A sejteket 5×10^7 sejt/ml koncentrációban 15 mM CHAPS-et tartalmazó lízispufferben (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM jódiacetamid, 1 mM EDTA, proteáz-inhibitor koktél, ld. DRM izolálás) erőteljesen szuszpendáltuk (vortex), a szuszpenziót 50 percig jégen inkubáltuk, majd további használatig -20 °C-on tároltuk.

A lízispufferrel 3× mosott Protein-G gyöngyöket a megfelelő antitest jelenlétében 2 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk (50 µg mAb/ 10 µl gyöngy) majd detergens-mentes lízispufferben történő mosással eltávolítottuk az antitest felesleget. Ezt követően a Protein-G gyöngyök és a sejt-lizátum elegyét (10 µl gyöngy/10⁷ sejt) egy éjszakán keresztül, állandó keverés közben, 4 °C-on inkubáltuk. (A felolvasztott sejt-lizátumból az oldhatatlan csapadékot előzetesen centrifugálással eltávolítottuk.) A gyöngyöket detergens-mentes lízispufferben mostuk, a felkötődött fehérjéket nem-redukáló SDS-PAGE mintapufferben való főzéssel szolubilizáltuk majd centrifugálással választottuk el a gyöngyöktől. Az alkalmazott antitest által precipitált fehérjéket SDS-PAGE és Western-blot módszerekkel analizáltuk.

4.8 WESTERN-BLOT ANALÍZIS

A nem-redukáló SDS-PAGE mintapufferben felfőzött mintákban található fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Az aspecifikus kötőhelyek alacsony zsírtartalmú tejport tartalmazó Tween20 – PBS (TPBS) pufferben történő blokkolása után a membránokat a megfelelő elsődleges mAb jelenlétében, 1 % BSA-t is tartalmazó TPBS-ben 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a membránokat háromszor mostuk TPBS-ben, majd újabb egy órán át inkubáltuk a torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (RAMIG). Újabb alapos mosás után (4×, TPBS-ben) a membránokat kemilumineszcens reagenssel előhívtuk és a kérdéses fehérjék jelenlétét röntgenfilmen kemilumineszcencia analízissel mutattuk ki.

4.9 SEJTFELSZÍNI FEHÉRJÉK EXPRESSZIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

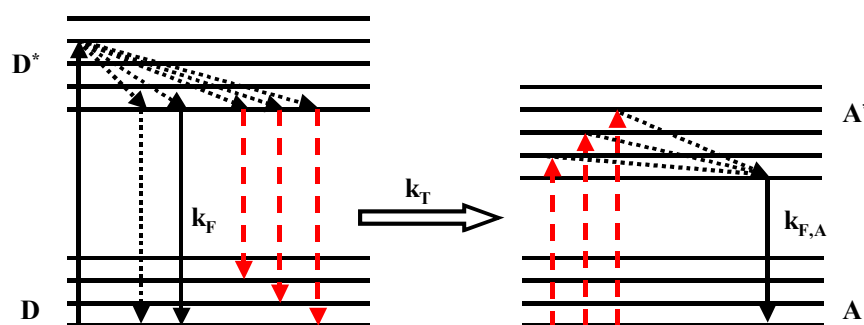
A sejtfelszíni fehérjék expresszióját fluoreszkáló festékekkel konjugált monoklonális antitestek kötődésének áramlási citometriás vizsgálatával határoztuk meg. Vizsgálatainkat a 4.10.1 részben részletesebben ismertetett Becton-Dickinson FACStar Plus áramlási citométerrel végeztük. A kötőhelyek számát a telítésben adott, általában fluoreszceinnel

jelzett antitesttel a 4.3 fejezetben leírt módon megjelölt sejtek fluoreszcencia hisztogramjának (autofluoreszcenciával korrigált) középértékéből határoztuk meg. A fluoreszcencia intenzitás – kötőhely szám kalibrációt ismert számú fluorofórt tartalmazó mikrogöngyök segítségével végeztük el.

4.10 FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIATRANSZFER MÉRÉSEK

A Förster típusú fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) (öszefoglalót ld. (Stryer, 1978; Trón, 1994)) egy gerjesztett állapotú donor fluorofór energiájának egy másik, megfelelő paraméterekkel rendelkező, ún. akceptor molekulának történő, gyenge dipólus-dipólus kölcsönhatás (rezonancia) révén megvalósuló, sugárzásmentes átadása. Az energiatranszfer következtében a donor alap- míg az akceptor gerjesztett állapotba kerül. Megfelelő körülmények között az utóbbi relaxációját szintén kísérheti fluoreszcencia kibocsátása.

A 4. ábra egy donor (D) és egy akceptor (A) molekula energiaszintjeit és a lehetséges átmeneteket mutatja be. A folytonos nyilak a donor abszorpcióját valamint a gerjesztett állapotú donor (D^*) illetve akceptor (A^*) fluoreszcencia emisszióját, a pontozott vonalak pedig az egyéb belső, sugárzásmentes legerjesztődési folyamatokat jelölik. Szaggatott vonalak jelzik a donor emisszió és az akceptor abszorpció azon, egymással átfedő energiájú átmeneteit, amelyek révén az energiatranszfer létrejöhet.



4. ábra: Donor (D) és akceptor (A) fluorofór energiaszintjei és lehetséges átmenetei

Egy adott donor és akceptor molekula közötti energiatranszfer valószínűsége (k_T) egyéb paraméterek mellett a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektruma átfedésének mértékétől (J), a donor emissziós dipólusának és az akceptor abszorpciós dipólusának relatív orientációjától (κ^2) valamint a két molekula közötti távolságtól (R) függ:

$$k_T \propto JR^{-6}\kappa^2 \quad \{2\}$$

A 4. ábrán feltüntetett folyamatok sebességi állandóit figyelembe véve, az energiatranszfer hatásfoka (E) a következőképpen írható le:

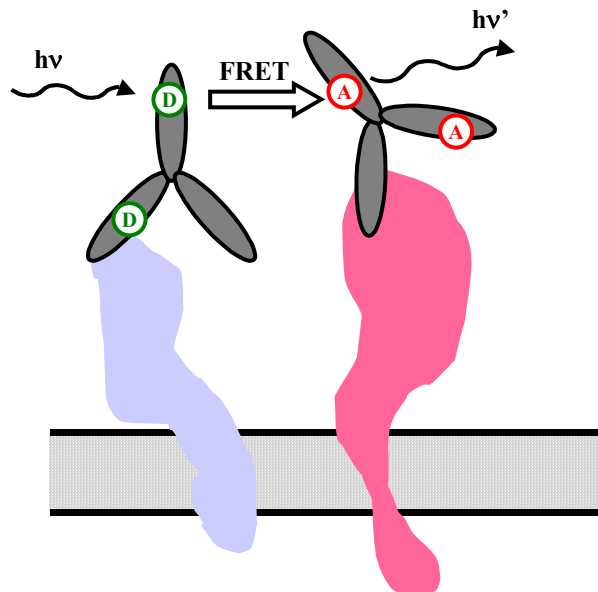
$$E = \frac{k_T}{k_T + k_F + k_E} \quad \{3\}$$

ahol k_F és k_E a donor fluoreszcencia emissziójának illetve egyéb legerjesztődési folyamatainak sebességi állandója. E közvetlen összefüggésbe hozható a donor – akceptor távolsággal (R):

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

ahol R_0 az 50 %-os transzfer hatásfokhoz tartozó távolság. Az E meghatározása a donor és/vagy az akceptor különböző fluoreszcenciás paramétereinek értékében bekövetkező változások detektálásán keresztül történik.

Az energiatranszfer érzékeny távolságfüggése, valamint a legtöbb fehérje méretével és a biológiai membránok vastagságával összemérhető kritikus távolságtartománya (1-10 nm) számos biológiai alkalmazást tesz lehetővé (Clegg, 1995; Selvin, 2000; Szöllősi és *mtsai*, 1998).



5. ábra: Sejt felszíni fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata FRET módszerrel

A FRET többek között alkalmas a membránfehérjék kölcsönhatásainak, asszociációinak kimutatására is (5. ábra) (Matkó & Edidin, 1997). Ebben az esetben a mérhető transzfer hatásfok több lehetséges donor-akceptor távolság statisztikus átlagából adódik, a kapott érték alapján csak a vizsgált fehérjék molekuláris közelségére következtethetünk, pontos távolság meghatározásra nem alkalmas. Ugyanakkor megfelelő

módon, több irányban elvégezve a mérést, feltérképezhetjük a vizsgált fehérjék kölcsönhatásait és a laterális elrendeződésükre vonatkozó modellt állíthatunk elő (Damjanovich és *mtsai*, 1997b).

FRET méréseink során a vizsgált fehérjét donor- illetve akceptor fluorofórral konjugált monoklonális antitestekkel illetve azok Fab fragmentumaival jelöltük meg a 4.6 részben leírt módon (5. ábra). (Az Fab fragmentumok használata minimálisra csökkenti a jelölt fehérjék kiváltott aggregációjának valószínűségét.) Az energiatranszfer hatásfokát kísérleteinkben kétféle, az alábbiakban ismertetett módon határoztuk meg.

4.10.1 Áramlási citometriás energiatranszfer mérések

Áramlási citometriás energiatranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer; FCET) méréseink során azt a tényt használtuk ki, hogy energiatranszfer hatására mind a donor, mind pedig az akceptor által emittált fluoreszcencia intenzitás megváltozik: a donor fluoreszcenciája csökken (kioltás), ugyanakkor az akceptoré növekszik (szenzitizált emisszió). A transzfer hatásfokot a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet munkatársai által korábban leírt módszerrel a donor kioltás (quenching) és a szenzitizált akceptor emisszió kombinált felhasználásával, sejtenként határoztuk meg (Szöllősi és *mtsai*, 1984; Trón és *mtsai*, 1984).

Vizsgálatainkhoz egy módosított, kétsugaras gerjesztésre is alkalmas, Ar-ion lézerrel felszerelt Becton-Dickinson FACStar Plus áramlási citométert alkalmaztunk. A sejteket az ún. all-line (összes vonal) módra hangolt Ar-ion lézer 514 illetve 488 nm hullámhosszúságú vonalaival egymásután gerjesztettük, majd a megfelelő – a donor- illetve az akceptor-oldali emisszió detektálására alkalmas - szűrőkombinációkat használva a következő három fluoreszcencia intenzitást detektáltuk:

	Gerjesztés	Detektálás
I₁	488 nm	donor-oldali
I₂	488 nm	akceptor-oldali
I₃	514 nm	akceptor-oldali

II. táblázat: A FCET mérés során detektált fluoreszcencia intenzitások

Ennek megfelelően I_1 a direkt gerjesztett donor, I_3 a direkt gerjesztett akceptor fluoreszcencia intenzitása az adott minta esetén. I_2 felel meg az energiatranszfer csatornának, azaz a donor hullámhosszán gerjesztett akceptor emisszióknak. A sejttermelékeny az 514 nm-es gerjesztő fény előre irányuló fényszórása alapján kapztuk ki. A donorral és akceptorral duplán jelzett sejtek

esetén detektált fluoreszcencia intenzitások alapján az energiatranszfer hatásfokát (E) az alábbi képletek segítségével, sejtenként határoztuk meg:

$$A = \frac{1}{\alpha} \left[\frac{I_2 - S_2 I_3}{\left(1 - \frac{S_2 S_3}{S_1}\right) I_1} - S_1 \right] \quad E = \frac{A}{1 + A} \quad \{5\}$$

A képletben S_1 , S_2 és S_3 a csak donorral (S_1 , S_3) illetve a csak akceptorral (S_2) megjelölt minták alapján számítható korrekciós faktorok, amivel a különböző csatornák közötti átfedést vehetjük figyelembe ($S_1=I_2/I_1$; $S_2=I_2/I_3$; $S_3=I_3/I_1$). Az α konstans a műszernek az akceptor illetve a donor által emittált fotonokra mutatott érzékenységet jellemzi, és azonos számú gerjesztett akceptor illetve donor molekula esetén az I_2 és az I_1 csatornában mérhető fluoreszcencia intenzitások hányadosával egyenlő.

Az energiatranszfer hatásfokát általában 10000 sejtre számolt értékek átlagaként, %-os formában adtuk meg. Az E értékének változása a két fehérje távolságának változását és/vagy a donor/akceptor arány megváltozását jelezheti.

A FCET módszerrel rövid idő alatt nagyszámú sejt vizsgálható, ezért statisztikailag igen megbízható. Emellett lehetővé teszi az egy sejtpopuláción belüli alpopulációk detektálását, ugyanakkor nem képes az egyes sejteken belüli heterogenitások feltárására.

4.10.2 Fluoreszcens képalkotó mikroszkópiás FRET mérések

A FRET hatékonyság sejten belüli térbeli eloszlásának feltárására kiválóan alkalmasak a fluoreszcens mikroszkóppal végzett FRET vizsgálatok. Többféle lehetőség adódik a mikroszkóppal történő energiatranszfer hatásfok meghatározásra (pl. a donor fluoreszcencia élettartamának mérése (Gadella, Jr. & Jovin, 1995), intenzitásmérésen alapuló FRET (Nagy és *mtsai*, 1998)), ezek közül mi a donor fotohalványítási (photobleaching) kinetikájának megváltozásán alapuló módszert (photobleaching Energy Transfer; pbFRET) választottuk (Jovin & Arndt-Jovin, 1989). Ennek alapja az, hogy a donor gerjesztett állapotban bekövetkező – a donor fluoreszcencia időbeli csökkenését, elhalványodását okozó – irreverzibilis fotokémiai átalakulásának sebessége energiatranszfer hatására lecsökken. A donor fotohalványítási kinetikáját akceptor jelenlétében illetve anélkül megmérve, meghatározható az energiatranszfer hatásfoka (ld. később).

A pbFRET méréseket Zeiss Axiovert 135 TV inverz fluoreszcens digitális képalkotó mikroszkóppal végeztük el. Fényforrásként 75 W-os Xe-gőz vagy 100 W-os Hg-gőz lámpát alkalmaztunk. A csak donorral illetve a donorral + akceptorral duplán jelzett sejteket 488

(± 10) nm-es sávszűrőt alkalmazva folyamatosan megvilágítottuk majd az emittált, egy 530 (± 15) nm-es sávszűrőn áthaladó, fluoreszcencia intenzitást CCD kamerával felszerelt Attofluor 5.44 digitális képalkotó rendszer segítségével meghatározott időpontokban detektáltuk. Az adatok tárolása és feldolgozása személyi számítógépen történt. A kiértékelés során a sejtek területére tetszőlegesen elhelyezett néhány (1-4) pixelnyi méretű négyzetekben (Region of Interest; ROI) határoztuk meg a fluoreszcencia intenzitás időbeli változását. A kapott görbék illesztésére az alábbi dupla exponenciális függvényt alkalmaztuk:

$$F(t) = F_0 + A_1 e^{-t/T_1} + A_2 e^{-t/T_2} \quad \{6\}$$

ahol $F(t)$ a detektált fluoreszcencia intenzitás, F_0 a háttér fluoreszcencia intenzitás, T_1 és T_2 a két exponenciális tag időállandója, A_1 és A_2 pedig a megfelelő amplitúdók. Az egy adott ROI intenzitás csökkenését leíró, ún. „effektív” időállandót (τ) a két időállandó amplitúdó súlyozott átlagolásával kaptuk:

$$\tau = \frac{A_1 T_1 + A_2 T_2}{A_1 + A_2} \quad \{7\}$$

Az egyes ROI-kra kapott τ értékekből eloszlási hisztogramot (ld. 9. ábra) készítettünk mind a donorral, mind pedig a donor + akceptorral jelzett minták esetén, majd a hisztogramok átlagértékét felhasználva meghatároztuk az energiatranszfer hatásfokát (E):

$$E = 1 - \frac{\tau_d}{\tau_{da}} \quad \{8\}$$

ahol τ_d és τ_{da} a donorral illetve a donorral + akceptorral jelzett minták átlagos effektív photobleaching időállandói. Egy hisztogram általában 200-300 ROI (10-15 sejt) adatait tartalmazza.

A későbbiekben Szentesi Gergely (Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) által LabView alapon megírt kiértékelő program lehetővé tette sejtenként nemcsak néhány ROI, hanem tetszőleges számú képpont kiértékelését, így a pbFRET mérések statisztikája jelentősen javult.

4.11 PÁSZTÁZÓ MIKROSKÓPIÁS VIZSGÁLATOK

Az esetek egy részében konfokális pásztázó lézer mikroszkópia (CLSM) illetve közeli mező optikai mikroszkópia (NSOM) alkalmazásával vizsgáltuk a különféle membránkomponensek sejtfelszíni szerveződését. Míg a FRET mérésekkel a molekulák nanométeres skálán (közvetlen molekuláris közelségben) megvalósuló asszociációját tanulmányozhatjuk, addig ezek a módszerek a nagyobb méretű (>100 nm) molekulacsoportosulások együttállásáról adnak információt (Nagy és *mtsai*, 1999; Vereb és

mtsai, 2000). A mikroszkópos mérésekhez a sejteket a vizsgált membránkomponensekre specifikus jelölőanyagok (monoklonális antitestek, toxinok) fluoreszkáló származékaival a 4.3 részben leírt módon megjelöltük, fixáltuk majd mikroszkóp tárgylemezre ülepítettük. Az NSOM mérések előtt a tárgylemezre ülepített mintát alkohollal dehidráltuk.

NSOM vizsgálatainkat a göttingeni Max Planck Intézetben, Thomas M. Jovin laboratóriumában végeztük. Az általunk használt NSOM rendszer egy Nanoscope-IIIa pásztázó mikroszkópiás rendszer (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) kiegészítése volt. Mind a gerjesztésre, mind az emisszió detektálására nyíróerő detektorba beépített, burkolattal nem rendelkező optikai szál (csúcsátmérő kb. 70 nm) használtunk. A visszacsatolás eredményeként az optikai szál csúcsa kb. 5 mm-es távolságban pásztázta végig a minta felszínét. A mintákat argon-kripton lézer (647 nm, Cy5 gerjesztés) és hélium-neon lézer (543 nm, Cy3 gerjesztés) segítségével gerjesztettük. A duplán (Cy3- illetve Cy5-jelzett antitesttel egyaránt) jelölt mintáknál a gerjesztő és az emittált fény elválasztására 543/647 nm-es dupla dikroikus tükröt alkalmaztunk. A két festék fluoreszcenciáját 620 nm-es dikroikus tükr segítségével különítettük el. Az emittált fényt 605/55 nm-es sávszűrő (Cy3) és 700 nm-es felül áteresztő szűrő (Cy5) alkalmazásával, „avalanche” fotodióda segítségével detektáltuk. A He-Ne lézer fényét 543.5 nm-es „notch” szűrővel szűrtük ki. A nyíróerő detektálására használt infravörös dióda fényét 750 nm-es alul áteresztő szűrővel blokkoltuk. Az NSOM felvételeket a Scil-Image (Technical University of Amsterdam, Hollandia) program segítségével értékeltük ki.

Konfokális mikroszkópos vizsgálatainkat Zeiss 420 típusú konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal végeztük. A gerjesztéshez Ar-lézer 488 nm-es (fluoreszcein) és He-Ne lézer 543 nm-es vonalát (Cy3 illetve rodamin) használtuk. A gerjesztő és az emittált fényt 488/543 nm-es dupla dikroikus tükrrel választottuk szét. Az emittált fényt 505/35 nm-es sávszűrő (fluoreszcein) illetve 580 nm-es felül áteresztő szűrő (Cy3, rodamin) segítségével detektáltuk.

4.12 COCAPPING KÍSÉRLETEK

A cocapping vizsgálatok során a vizsgálni kívánt sejt felszíni fehérjék egyikét fluorofórral jelzett monoklonális antitesttel a szokásos protokoll szerint megjelöltük, majd a sejteket anti-IgG jelenlétében (rabbit anti mouse IgG, RAMIG) 60 percig, 37 °C-on inkubáltuk. A sejteket formaldehiddel fixáltuk, majd nem-releváns antitest hozzáadásával blokkoltuk a feleslegben lévő RAMIG kötőhelyeket. Ezt követően a sejteket megjelöltük a másik vizsgált fehérje ellenes antitest fluoreszkáló (az elsőként alkalmazottól eltérő színű)

származékával majd a mintákat fluoreszcenciás képalkotó mikroszkóppal analizáltuk. (Minden egyes inkubálást természetesen a sejtek mosása követett.)

4.13 TIROZIN FOSZFORILÁCIÓ VIZSGÁLATA

A STAT3 és STAT5 transzkripciós faktorok IL-2 által kiváltott foszforilációját a Fleisher és mtsai által korábban a STAT1 foszforilációjának tanulmányozására kidolgozott áramlási citométeres módszerrel vizsgáltuk (Fleisher és mtsai, 1999). A kontroll illetve IL-2-vel stimulált sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk majd specifikus nyúl anti-(foszfo-STAT3/STAT5) poliklonális antitest (New England Biolabs Inc., Beverley, MA, USA) jelenlétében 20 percig inkubáltuk. Az alkalmazott antitestek a STAT3 és a STAT5 fehérjékben található tirozin foszforilált változatát ismerik fel és nem mutatnak keresztreaktivitást más tirozinon foszforilált STAT molekulákkal. A jelölést követően a sejteket mostuk, majd FITC-jelzett másodlagos anti-nyúl antitesttel (DAKO/Frank Diagnostica, Magyarország) 30 percig inkubáltuk. Újabb mosást követően a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk és áramlási citométerrel vizsgáltuk.

Az IL-2 által kiváltott teljes foszforilációs mintázatot Western blot technikával, tormaperoxidázzal konjugált anti-foszfotirozin antitest alkalmazásával analizáltuk.

4.14 AZ ANTIGÉN PREZENTÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

4.14.1 Allospecifikus effektor T sejtek előállítása

A JY sejtekre specifikus citotoxikus T limfocitákat humán perifériás mononukleáris sejtekből állítottuk elő és 10 mM HEPES-t (pH=7.2) valamint 50 μ M 2-merkaptó-etanol tartalmazó médiumban tartottuk fenn. A perifériás vérsejteket az első napon mitomicinnel kezelt (50 μ g/ml, 40 perc) JY sejtekkel stimuláltuk, majd két hétig tenyésztettük. A negyedik naptól kezdve 3 naponta friss, 20 U/ml humán rekombináns IL-2-t tartalmazó médiumot adtunk a sejtekhez. A 14. napon a CTL-ket újra stimuláltuk, majd az egész ciklust még 2-3 alkalommal megismételtük. Az effektor T sejteket az utolsó ciklust követő 3-5. napon használtuk fel. A CTL populáció homogenitását fluoreszcens anti-CD8 antitest alkalmazásával, áramlási citometriával ellenőriztük (Bacsó és mtsai, 1996a; Bacsó és mtsai, 1996b).

4.14.2 T sejt aktiváció mérése

Az allospecifikus T sejtek aktivációját a T sejt receptor (CD3) és a CD69 sejtfelszíni expressziójának változásán keresztül tanulmányoztuk. Aktiváció hatására a T sejt receptor

menyisége csökken („downreguláció”), míg a CD69 expressziója megnő (Testi és mtsai, 1994; Valitutti és mtsai, 1995). A JY target sejteket a CTL-kal 1:1 arányban összekevertük, majd 50 másodpercig centrifugáltuk, amely elősegíti a JY-CTL konjugátumok kialakulását. A sejteket ezt követően RPMI-ben 37 °C-on tartottuk. Megadott időközönként mintát vettünk, a sejteket mostuk, PBS-ben szuszpendáltuk és FITC-anti-CD3 illetve FITC-anti-CD69 antitestekkel jelöltük. A CD3- és CD69-fluoreszcenciát áramlási citométerrel vizsgáltuk. Az elpusztult sejteket illetve az egyedülálló JY sejteket propídium-jodid és phycoerithrin-anti-CD19 festéssel valamint az előre illetve az oldalra irányuló fényszórások felhasználásával kapuztuk ki.

4.14.3 Eurórium felszabadulás mérése

A targetsejtek specifikus lízisének mértékét az Eu^{3+} -komplexszel előzetesen feltöltött sejtekből a CTL-k hatására felszabaduló Eu^{3+} lumineszcenciájának mérésével határoztuk meg. A vizsgálathoz a JY sejteket 500 μM dextrán-szulfát jelenlétében 10 percig jégen Eu^{3+} -DTPA-val (dietilén-triamino-pentaecetsav) jelöltük. A sejtekhez ezt követően 1 mM Ca^{2+} -ot és 10 mM glükózt adtunk és további 5 percig inkubáltuk, majd 4× mostuk őket. Adott mennyiségű targetsejtet növekvő mennyiségű effektorsejttel egy 96 lyukú szövettenyésztő edény tartályaiban összekevertünk, 200×g-vel 1 percig centrifugáltuk, majd 3 órán át sejttenyésztési körülmények között inkubáltuk. A spontán és a maximális Eu -felszabadulás meghatározásához a target sejtek egy részét sima, míg egy másik részét 0.5 % Triton-X 100-at tartalmazó médiumban inkubáltuk. Egy újabb centrifugálást (200×g, 10 perc) követően a felülúszóhoz egy, az Eu^{3+} lumineszcencia intenzitását megnövelő, ún. „enhancement” oldatot adtunk, majd a különböző minták időfelbontású lumineszcenciáját egy Delfia 1232 fluoriméterrel (LKB-Wallac, Turku, Finnország) mértük. A specifikus lízis mértékét a {9} egyenlettel határoztuk meg:

$$\text{specifikus lízis (\%)} = \frac{L_{\text{minta}} - L_{\text{spont}}}{L_{\text{max}} - L_{\text{spont}}} \times 100 \quad \{9\}$$

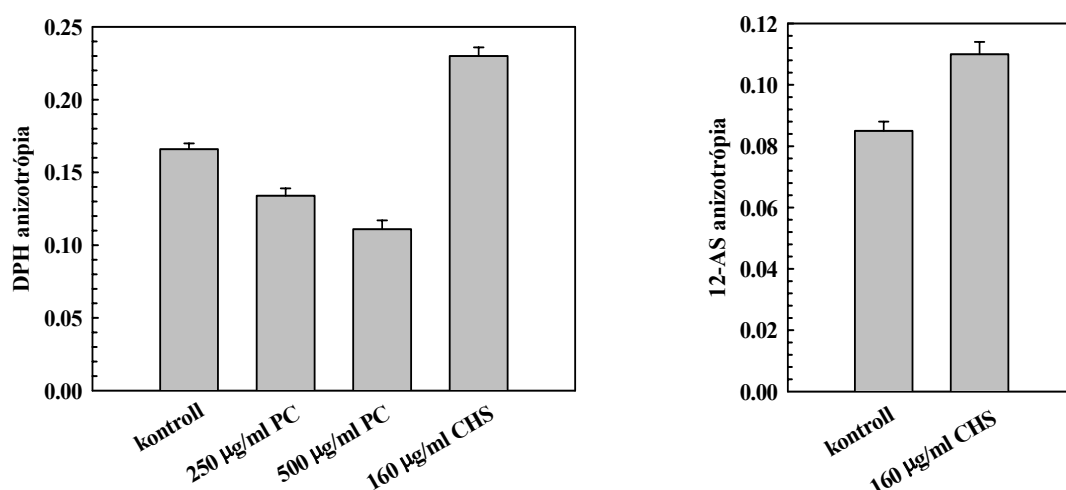
ahol L_{minta} az adott effektor:target arányhoz, míg L_{spont} és L_{max} a spontán illetve a maximális eurórium felszabaduláshoz tartozó minták lumineszcencia intenzitása (Bacsó és mtsai, 1996b).

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1 A MEMBRÁN KOLESZTERINSZINT MÓDOSÍTÁSA BEFOLYÁSOLJA A HLA I MOLEKULÁK EXPRESSZIÓJÁT ÉS OLIGOMERIZÁCIÓJÁT B (JY) SEJTEK FELSZÍNÉN

A membrán koleszterin tartalma több szempontból is fontos szerepet tölthet be a sejt felszíni fehérjék kölcsönhatásának szabályozásában. Éppen ezért elsőként azt vizsgáltuk, hogy a membrán koleszterinszintje hogyan befolyásolja a HLA I molekulák oligomerizációját.

A JY humán B sejtek plazmamembránjának koleszterinszintjét két klasszikus eljárással, a sejtek koleszterin-hemiszukcináttal illetve foszfatidil-kolinnal történő kezelésével módosítottuk (Muller és *mtsai*, 1983). A kezelések hatékonyságát a lipid kettősréteg különböző régióinak rendezettségéről informáló fluoreszcens lipid próbák emissziós anizotrópiájának mérésével ellenőriztük (Szöllősi, 1994). Mint a 6. ábrán látható, a membrán koleszterin tartalmának CHS-tal történő növelése mind a DPH, mind a 12-AS fluoreszcencia anizotrópiájának értékét jelentősen megnövelte, amely a próbák rotációs mobilitásának (illetve annak szabadsági fokainak) csökkenését jelzi. Ezzel szemben a koleszterin tartalom PC-nal történő csökkentése a sejtmembrán fluiditásának (a próbák molekuláris mobilitásának) dózis-függő növekedését okozta.



6. ábra: A koleszterin tartalom módosításának hatása a JY sejtek membrán fluiditására.

A fenti adatokból kitűnik, hogy a membrán koleszterin szintjének (bármely irányba

történő) módosítása más sejtekhez hasonlóan, a JY sejtek esetén is a membránfluiditás jelentős megváltozását eredményezi. A hatás oka feltehetően az, hogy a koleszterin jelenléte/beépülése a „lipidsűrűséget” növeli és/vagy a lipid kettősréteg szabad térfogatát csökkenti, a rendezettség lokális megnövelése révén (Shinitzky & Henkart, 1979).

Megvizsgáltuk, hogy a koleszterin tartalom módosítása hogyan befolyásolja az intakt HLA I molekulák illetve a „szabad nehézláncok” sejtfelszíni expresszióját, membránbeli elhelyezkedését. Kísérleteink során fluoreszcenciával jelzett, az intakt HLA I molekulák α_1/α_2 doménjét felismerő W6/32 (illetve KE-2), a β_2 -mikroglobulinra specifikus L368 valamint a szabad nehézlánc-ellenes HC-10 monoklonális antitestek kötődését vizsgáltuk áramlási citometriás mérésekkel. Az „expressziós” szintek változását a III. táblázat tartalmazza.

Antitest	Antigén (epitóp)	Az expressziós szint változása (ΔF , %)	
		CHS kezelés	PC kezelés
F-W6/32	HLA-A,B,C	↓ 8-12	↑ 9-10
F-L368	β_2 -mikroglobulin	↓ 10-20	↑ 5-8
F-HC-10	szabad nehézlánc	↓ 8-10	↑ 4-6

III. táblázat: A koleszterin tartalom módosításának hatása a HLA I molekulák sejtfelszíni expressziójára. ΔF a fluoreszcencia intenzitás kezelés hatására bekövetkező %-os megváltozása a kontrol sejtekhez képest. (A számításokhoz az áramlási citometriás fluoreszcencia hisztogramok autofluoreszcenciával korrigált középpértékeit használtuk.)

A membrán koleszterin szintjének dúsítása (azaz a membrán rendezettségének/viszkozitásának növelése) csökkentette, a koleszterin kivonása (a membrán fluidizálása) ezzel szemben kis mértékben növelte a vizsgált molekulák „expressziós szintjét” (antitest számára való hozzáférhetőségét). Korábban hasonló változásokat mutattak ki az egér MHC I molekulák esetén is (Muller és *mtsai*, 1983). Ennek alapján úgy tűnik, hogy az emberi és az egér MHC I glikoproteinek egyaránt az ún. „antidróóm” fehérjék csoportjába sorolhatók, azaz a lipid rendezettség növekedése sejtfelszíni „mennységük” csökkenését eredményezi (Muller & Krueger, 1986). Miután a kezelések időtartamához képest a humán limfoblasztok felszínén mind a W6/32- mind pedig a HC-10-reaktív molekulák élettartama viszonylag hosszú (~4 illetve 7 óra a fél-életidejük) (Carreno & Hansen, 1994), feltételezhetjük, hogy a tapasztalt változások a sejtmembránra korlátozódó, a lipid kettősréteg megváltozott mikrodomén struktúrájának hatására bekövetkező folyamatokat tükröznek, melyek nem az adott HLA I determinánsok tényleges számát, hanem inkább az egyes epitópok antitestek általi elérhetőségét, exponáltságát módosítják.

A koleszterin tartalom növelésének a HLA I molekulák oligomerizációjára illetve konformációjára gyakorolt hatását pbFRET módszerrel vizsgáltuk. A IV. táblázat tartalmazza

a homoasszociáció mértékére jellemző, a nehézlánchoz kötődő antitestek alkalmazásával meghatározható intermolekuláris illetve az MHC I molekulák konformációját jellemző intramolekuláris ($\beta 2m \rightarrow$ nehézlánc közötti) energiatranszfer hatékonyság megváltozását.

Donor	Akceptor	(ΔE , %)
F-W6/32	T-W6/32	$\uparrow 14 (\pm 3)$
F-KE-2	T-KE-2	$\uparrow 8$
F-L368	T-W6/32	0

IV. táblázat: CHS kezelés hatása az inter- illetve intramolekuláris energiatranszfer értékére. ΔE a FRET hatásfok %-os megváltozása a kontrollhoz képest.

A CHS kezelés a HLA I molekulák megnövekedett mértékű homoasszociációját eredményezte, ugyanakkor, ahogy ezt a változatlan intramolekuláris transzfer hatásfok is jelzi, az egyedi molekulák átlagos konformációja nem változott számottevően. Az oligomerizáció mértékének növekedése a lipid kettősréteg szabad térfogatának csökkenésével és/vagy a lipid-domének szegregációjával/átrendeződésével magyarázható. Ezen lipid átrendeződések magyarázhatják a megváltozott antitest-hozzáférhetőséget is. Jelentősebb konformációváltozások hiányában – melyet adataink is alátámasztanak – ez feltehetően az MHC transzmembrán fehérjék vertikális (a membrán síkjára merőleges) pozíciójában bekövetkezett változásnak tulajdonítható (Muller & Krueger, 1986). Ugyanakkor a HLA I epitópok csökkent mértékű expresszióját/antitestek általi elérhetőségét részben az önasszociáció fokozódása is magyarázhatja, hiszen a fehérje-fehérje kölcsönhatások is álcázhatják, elrejtetik az egyes epitópokat.

Eredményeink alapján tehát valószínűsíthető, hogy a plazmamembrán koleszterin szintje/fluiditása szerepet játszik a HLA I molekulák homoasszociációjának és ezen keresztül az antigén prezentáció hatékonyságának szabályozásában is. Ez utóbbi feltételezést látszanak alátámasztani azok a korábbi funkcionális irodalmi adatok, amelyek szerint különféle target sejtek CTL illetve NK sejtek által okozott specifikus lízisének mértékét egyaránt befolyásolta a membrán koleszterin szintje (Roozmond & Bonavida, 1985; Szekeres-Bartho és *mtsai*, 1989).

Egér antigénprezentáló sejteken végzett kísérletek alapján a közelmúltban hasonló következtetésre jutottak: kimutatták, hogy a membrán koleszterintartalmának csökkentése (feltehetően a lipid tutajok integritásának megszüntetése révén) nagymértékben csökkenti az MHC II által korlátozott antigénprezentáció hatékonyságát. Ennek lehetséges magyarázata az,

hogy a lipid tutajok az MHC II glikoproteinek akkumulálásával megnövelik azok lokális koncentrációját és így biztosítják a hatékony immunválaszhoz szükséges antigénsűrűséget, melynek jelentősége elsősorban alacsony antigénkoncentráció esetén van (Anderson és *mtsai*, 2000).

A HLA I molekulák homoasszociációjának az antigén prezentáció hatékonyságának szabályozásában betöltött szerepével kapcsolatos vizsgálatainkról a következő részben számolok be.

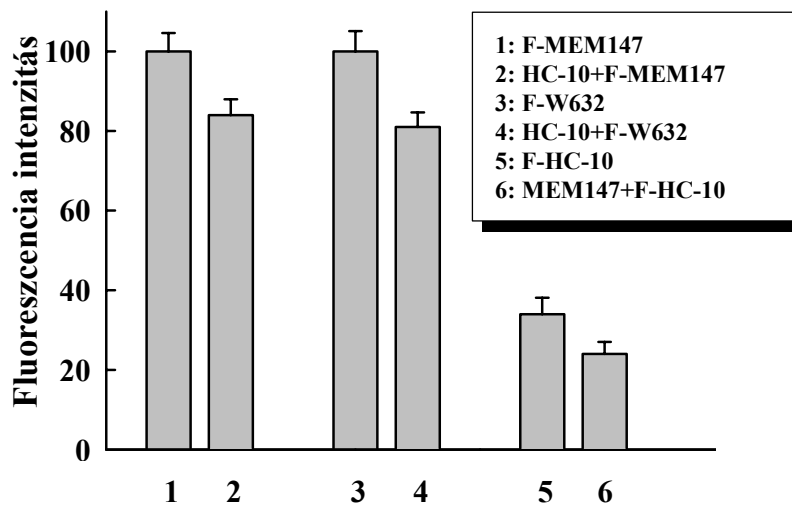
5.2 EXOGÉN $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN SZEREPE A HLA I OLIGOMERIZÁCIÓ ÉS AZ ANTIGÉN PREZENTÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

A HLA I és II glikoproteinek oligomerizációja valamint e két fehérje kolokalizációja számos, főként limfoid eredetű sejt felszínén megfigyelhető. A közvetlen molekuláris közelséget jelentő kisméretű asszociátumok (nanométeres skála) mellett a HLA molekulák a szubmikrométeres skálán is rendezettséget mutatnak (Damjanovich és *mtsai*, 1995; Jenei és *mtsai*, 1997). Miután az MHC molekulák átrendeződése, csoportosulása az immunológiai szinapszison belül is bekövetkezik, elképzelhető, hogy a HLA molekulák kis- illetve nagyméretű asszociátumai elősegítik az antigén prezentáló és a T sejt közötti kölcsönhatások kialakulását és így pozitívan befolyásolják az antigén prezentáció hatékonyságát.

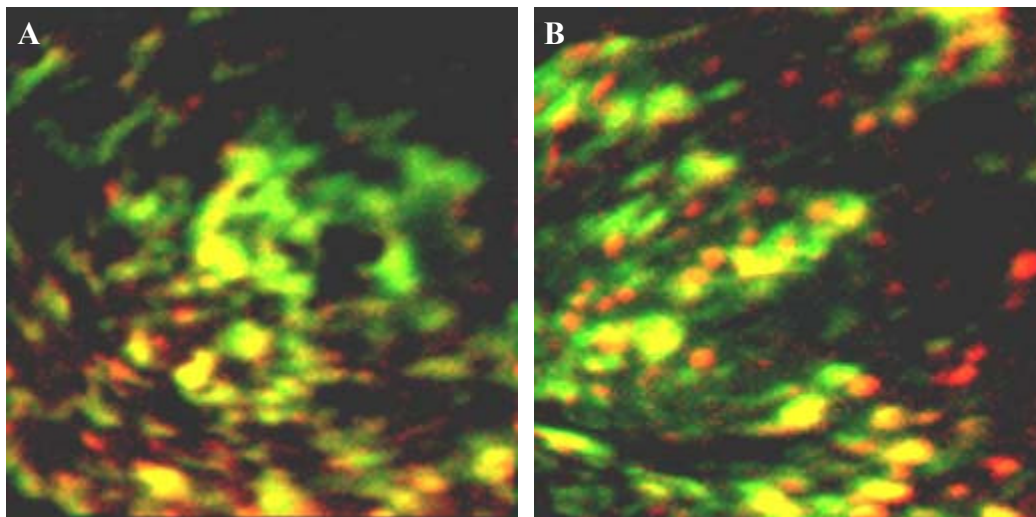
Vizsgálatainkban a fenti elképzelés helyességéről szerettünk volna meggyőződni: az előző részben már említett JY sejtek illetve allospecifikus citotoxikus T limfociták alkalmazásával azt tanulmányoztuk, hogy a HLA I homoasszociáció mértéke hogyan befolyásolja a T sejt aktiváció (antigén prezentáció) hatékonyságát.

Korábban kimutatták, hogy a szabad, $\beta 2$ -mikroglobulint nem kötő nehézláncok jelenléte elősegíti a HLA I molekula asszociátumok kialakulását: a szabad nehézláncok expressziója és a HLA I molekulák homoasszociációja között megfigyelhető jó korreláció illetve a HLA I oligomerizáció mértékének $\beta 2$ -mikroglobulin kezelés hatására bekövetkező csökkenése egyaránt erre utal (Chakrabarti és *mtsai*, 1992; Matkó és *mtsai*, 1994). A $\beta 2m$ szint változtatása így egy viszonylag egyszerű, a fiziológias körülményeket is jól modellező eljárás, amellyel az oligomerizáció mértéke és az antigén prezentáció hatékonysága közötti összefüggés tanulmányozható.

Jelen vizsgálataink során a szabad nehézláncok és az intakt heterodimerek kölcsönhatását kétféle módszerrel analizáltuk. Antitest „leszorításos” kísérleteink szerint az alkalmazott szabad ($\beta 2m^-$) illetve $\beta 2m^+$ nehézlánc ellenes antitestek kölcsönösen és részlegesen gátolják egymás kötődését, ami azt jelenti, hogy az általuk felismert epitópok egymás közvetlen közelében (néhány nanométer) helyezkednek el (7. ábra). Az NSOM technika alkalmazásával kimutattuk a szabad nehézláncok és az intakt HLA I heterodimerek nagyméretű (néhány száz nanométeres) clustereinek jelentős mértékű átfedését is (8/A. ábra). Mindkét eredmény arra utal, hogy a HLA I molekulák két megjelenési formája, legalábbis részben, azonos fehérjemintázatok kialakításában vesz részt a vizsgált sejtek felszínén.



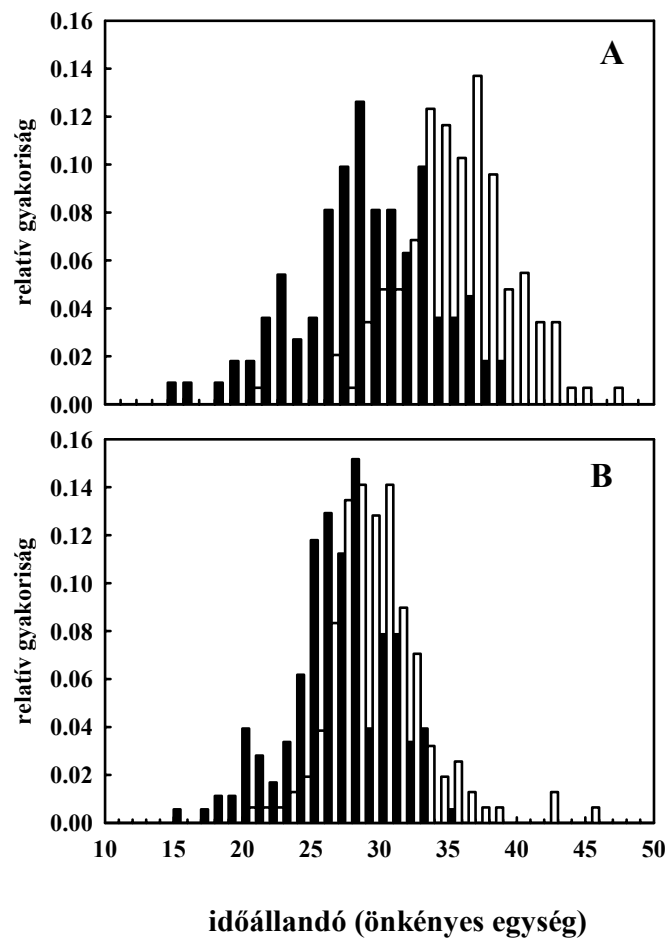
7. ábra: Konformáció-specifikus HC-10 (szabad nehézlánc), W6/32 és MEM147 (intakt nehézlánc) monoklonális antitestekkel végzett antitest „leszorításos” vizsgálatok JY sejtek felszínén. Az antitestek kötődését a fluorofórral (F = FITC) konjugált antitestekkel megjelölt sejtek fluoreszcencia intenzitás hisztogramjának háttérrel korrigált és azonos műszerbeállításra normalizált középértékéből határoztuk meg. A leszorítás hatékonyságát a csak fluoreszkáló antitesttel megjelölt illetve az ezt megelőzően jelöletlen antitesttel inkubált sejtekre kapott értékekből határoztuk meg.



8. ábra: A szabad (β^2) nehézlánc és az intakt HLA I heterodimerek kolokalizációjának pásztázó közeli mező mikroszkópiás (NSOM) vizsgálata. Az ábrán a Cy5-HC-10 (szabad nehézlánc; piros fluoreszcencia) és az SFX-W6/32 (intakt heterodimer; zöld fluoreszcencia) antitestekkel megjelölt kontroll (A) illetve $\beta 2m$ -nal kezelt (B) sejtekről készült felvételek láthatók (skála: $15 \times 15 \mu m$). Sárga szín jelöli azokat a membránterületeket, ahol mindkét molekula megtalálható (kereszt-korrelációs koefficiens: 0.771 illetve 0.672).

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy $\beta 2$ -mikroglobulin kezelés hatására hogyan változik a HLA I molekulák sejtfelszíni szerveződése. A sejteket egy éjszakán (kb. 16 óra) keresztül $5 \mu\text{M}$ humán $\beta 2\text{m}$ jelenlétében tenyésztettük, majd FRET illetve NSOM mérésekkel analizáltuk a HLA I molekulák kis- illetve nagyméretű asszociátumaira gyakorolt hatását.

Áramlási citometriás és mikroszkópiás FRET méréseink eredményei egyaránt arra utaltak, hogy $\beta 2\text{m}$ kezelés hatására csökken a FRET hatásfoka ($12.1 \pm 0.9\%$ -ról $3.8 \pm 1.3\%$ -ra), tehát a kívülről adott $\beta 2\text{m}$ – várakozásainknak megfelelően – jelentősen lecsökkenti a HLA I molekulák homoasszociációjának mértékét (9. ábra).



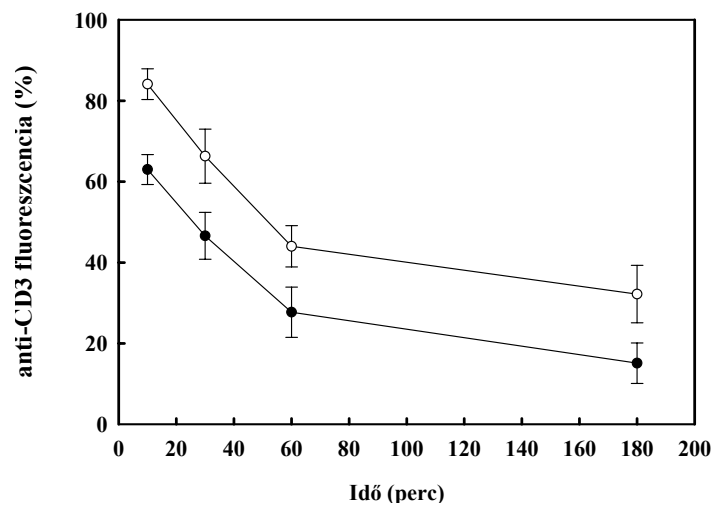
9. ábra: Exogén $\beta 2$ -mikroglobulin hatása a HLA I molekulák homoasszociációjára JY sejteken. Az intakt HLA I molekulák nehézláncára specifikus FITC-cel (donor) illetve TRITC-cel (akceptor) konjugált KE-2 monoklonális antitesttel megjelölt sejteken pbFRET módszerrel határoztuk meg a homoasszociáció mértékére jellemző energiatranszfer hatásfokokat. Az ábra a donor fotohalványítási időállandójának eloszlását mutatja a csak donorral (■) illetve a donorral és akceptorral (□) egyaránt jelölt kontroll (A) és a $\beta 2\text{m}$ -nal előkezelt (B) sejteken.

NSOM méréseink szerint (8/B. ábra) a $\beta 2\text{m}$ jelenlétében tenyésztett sejteken továbbra is jelen vannak mind a szabad nehézláncok, mind pedig az intakt heterodimerek nagyméretű asszociátumai, ugyanakkor a két molekula kolokalizációja csökken. Ez azzal magyarázható, hogy az eredetileg szabad nehézláncokat és intakt heterodimereket is tartalmazó

fehérjeszigetekben a $\beta 2m$ a HLA I molekulák két formája közötti egyensúlyt az intakt heterodimerek irányába tolja el. A FRET szinten tapasztalt változások feltehetően az ilyen szigeteken belüli molekuláris átrendeződéseket tükrözik. A szabad nehézláncok önállóan kialakított, a külső $\beta 2m$ szint által nem befolyásolt csoportosulásait valószínűleg olyan, teljesen denaturált molekulák hozzák létre, amelyek már nem képesek a $\beta 2m$ -t „megkötni”.

A sejtfelszínen elérhető (exogén) $\beta 2m$ szint tehát meghatározó szerepet tölt be a HLA I molekulák oligomerizációjának szabályozásában. Ezt a tényt kihasználva a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az exogén $\beta 2m$ szint (azaz a HLA I oligomerizáció mértéke) befolyásolja-e az allospecifikus T sejtek aktivációját illetve effektor funkcióját.

A T sejtek antigén stimulust követő aktivációja együtt jár a T sejt receptor komplex sejtfelszíni mennyiségének csökkenésével (a ligált T sejt receptorok viszonylag gyors internalizációja miatt), illetve különböző fehérjék (pl. a CD69) fokozott sejtfelszíni megjelenésével (Testi és *mtsai*, 1994; Valitutti és *mtsai*, 1995). Vizsgálataink során e két aktivációs „marker” expresszióját tanulmányoztuk a kontroll illetve $\beta 2m$ -nal előkezelt JY sejtekkel stimulált citotoxikus T limfociták felszínén.

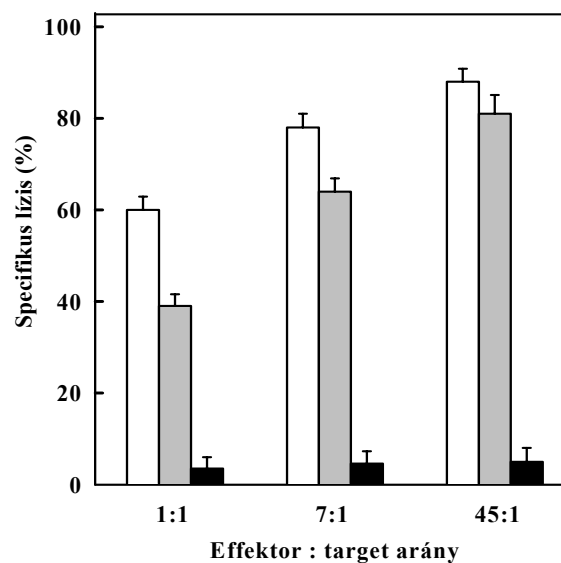


10. ábra: ábra: TCR downreguláció vizsgálata kontroll (■) illetve $\beta 2m$ -mikroglobulinnal előkezelt (□) JY sejtekkel konjugált citotoxikus T limfocitákon. A target sejteket és az allospecifikus CTL-kat 1:1 arányban összekevertük és adott ideig 37 °C-on tartottuk. A sejtfelszíni TCR szintet FITC-anti-CD3 antitesttel történő jelölés után áramlási citometriával határoztuk meg. A downreguláció mértékét a kontroll (target sejt nélkül inkubált) sejtekre kapott értékek %-ban adtuk meg.

Mint a 10. ábrán látható, a target sejtek $\beta 2m$ -el történő előkezelésének hatására a TCR „downreguláció” mértéke csökkent, ugyanakkor időbeli lefolyása, kinetikája nem változott, ami arra utalhat, hogy $\beta 2m$ hatására kisebb a megfelelő erősségű (aviditású) T sejt – antigén prezentáló sejt kapcsolat kialakulásának valószínűsége, de amennyiben a megfelelő szerkezetű kontakt régió kialakul, az aktiváció (legalábbis a kezdeti lépések) sebessége nem

változik számottevően. A target sejtek $\beta 2m$ -nal történő előkezelése ugyanakkor csökkentette a CD69 sejtfelszíni expresszióját: a kontroll sejtekkel stimulált CTL-k felszínén 2 óra elteltével csaknem kétszer annyi CD69 volt jelen, mint az előkezelt target sejtek esetén (itt nem mutatott adatok).

A target sejtek $\beta 2$ -mikroglobulinnal történő előkezelése nemcsak a citotoxikus T limfociták aktivációját, de effektor funkcióját is befolyásolta: a kontrollhoz képest jelentős mértékben csökkent a $\beta 2$ -mikroglobulinnal előkezelt JY target sejtek specifikus lízise (11. ábra).



11. ábra: $\beta 2$ -mikroglobulin hatása a JY sejtek specifikus lízisére. A kontroll (□) illetve $\beta 2$ -mikroglobulinnal kezelt (■) JY sejtek specifikus lízisének mértékét az Eu^{3+} -kompleksszel előzetesen feltöltött sejtekből az allospecifikus CTL-k hatására felszabaduló Eu^{3+} lumineszcenciájának mérésével a {9} egyenlet alapján határoztuk meg. Az alkalmazott citotoxikus T limfociták specificitását Raji sejtekkel (■) ellenőriztük.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a HLA I molekulák target sejten megfigyelhető oligomerizációja pozitívan befolyásolja az allospecifikus citotoxikus T limfociták aktivációját és effektor funkcióját, azaz az antigén prezentáció hatékonyságát. Korábban Anderson és mtsai egér APC-ken hasonló eredményre jutottak: kimutatták az MHC II akkumulációjának/lokális koncentrációjának jelentőségét az MHC II által korlátozott immunválasz eredményességében (Anderson és mtsai, 2000).

A naív T sejtekkel ellentétben az effektor/memória T sejtekben az eredményes immunválasz nem igényel kostimulációt és kiváltásához jóval alacsonyabb antigéndózis is elegendő (Alam és mtsai, 1999; Iezzi és mtsai, 1998). Ennek egyik lehetséges oka a TCR sejtfelszíni szerveződésében a fenti sejtípusok felszínén megfigyelhető különbség: a TCR komplex oligomerizációjának mértéke effektor/memória sejtek esetén nagyobb, ami jelentősen növelheti az APC és a T sejt között kialakuló MHC:peptid-TCR

kölcsönhatások aviditását és végeredményben elősegítheti az immunológiai szinapszis kialakulását. Ezáltal megnő a T sejtek érzékenysége, alacsonyabb antigén koncentrációval is hatékony immunválasz váltható ki (Fahmy és *mtsai*, 2001). Az MHC glikoproteinek target sejten kialakuló oligomerizációja/akkumulációja és az antigén prezentáció hatékonysága közötti összefüggés feltehetően hasonló okokra vezethető vissza. Intézetünkben nemrégiben kimutatták, hogy a HLA I asszociátumokon belül az egyes komponensek folyamatos cseréje, dinamikus átrendeződése megy végbe (Nagy és *mtsai*, 2001). Az asszociátumok dinamikus jellege lehetővé teszi a megfelelő számú specifikus HLA:peptid komplex kontakt-régióba jutását és TCR általi „befogását”, így szintén hozzájárulhat a stabil immunológiai szinapszis kialakulásához. Valószínűsíthető, hogy az antigén prezentáció hatékonyságát módosító tényezők egy része (pl. a membrán szerkezete, β 2-mikroglobulin szint stb.) hatását a kis- illetve nagyméretű MHC asszociátumok kialakulásának és stabilitásának szabályozásán keresztül fejt ki.

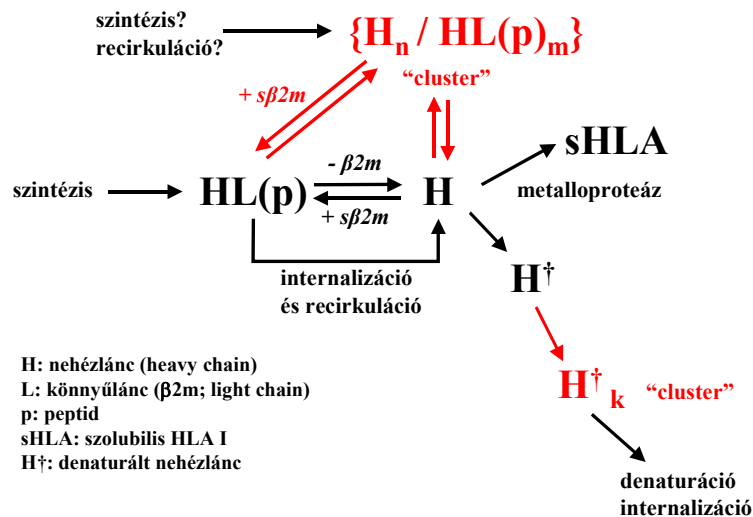
Miután a β 2-mikroglobulin hatását feltehetően a szabad nehézláncok és az intakt heterodimerek közötti egyensúly módosításán keresztül fejt ki, eredményeink amellet, hogy rámutatnak a HLA I oligomerizáció funkcionális jelentőségére, a szabad nehézláncokkal kapcsolatos ismereteinket is bővítik. Eredményeinket és a szabad nehézláncok keletkezésére és sorsára vonatkozó korábbi irodalmi adatokat összevetve (ld. Irodalmi áttekintés) a 12. ábrán látható modell állítható fel a HLA I molekulák transzformált illetve aktivált B sejtek felszínén történő molekuláris szerveződésére vonatkozóan.

A szabad nehézláncok sejtfelszíni megjelenése egyes elképzelések szerint az újonnan szintetizálódó és a sejtfelszínre kikerülő instabil HLA I komplexek disszociációjának következménye (Demaria és *mtsai*, 1992; Rock és *mtsai*, 1991). Egy alternatív lehetőség a HLA I komplexek internalizációját, a savas pH-jú endoszómákban bekövetkező disszociációját és a szabad nehézláncok recirkulációját feltételezi (Pickl és *mtsai*, 1998). A szabad nehézláncok sejtfelszíni expresszióját és élettartamát több tényező is befolyásolhatja:

- szolubilis β 2-mikroglobulin jelenlétében a szabad nehézláncok egy része visszaalakulhat heterodimerré (Matkó és *mtsai*, 1994);
- membránhoz kötött metalloproteáz működésének eredményeként a szabad nehézláncok szolubilis formában az extracelluláris térbe kerülhetnek (Demaria és *mtsai*, 1994; Pickl és *mtsai*, 1996);
- a teljesen denaturált, nem funkcionáló nehézláncoktól a sejt feltehetően internalizáció révén szabadul meg (Pickl és *mtsai*, 1996). Elképzelhető, hogy a szabad nehézláncok NSOM

mérésekkel kimutatott, $\beta 2m$ által nem befolyásolt akkumulációja a denaturált nehézláncok hatékony internalizációját segíti elő.

- a szabad nehézláncok más fehérjékkel (pl. intakt HLA I komplexek, inzulin receptor stb.) való asszociációja stabilizálhatja a működőképes konformációt és így – ellentétben az előző pontokban felsorolt folyamatokkal – megnövelheti a szabad nehézláncok sejtfelszíni élettartamát (Matkó és *mtsai*, 1994; Ramalingam és *mtsai*, 1997).



12. ábra: A HLA I molekuláris szerveződése aktivált illetve transzformált B sejtek felszínén. Pirossal jelöltük a saját eredményeink alapján javasolt részleteket.

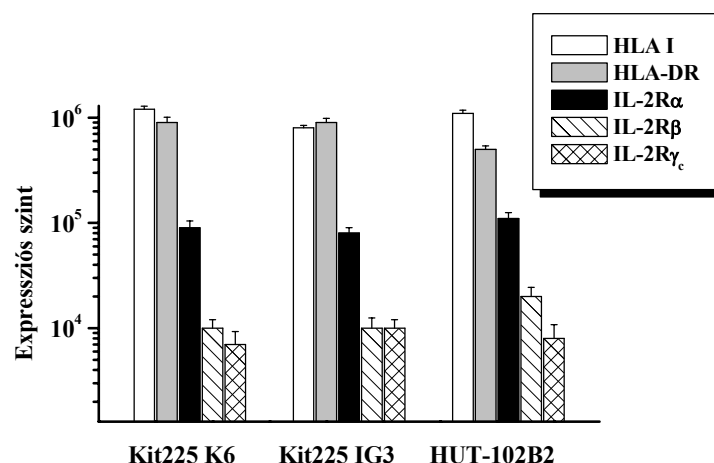
A HLA I molekula „clusterek” kialakulásának mechanizmusa még nem tisztázott. Az egyik lehetséges magyarázat szerint az aktivált illetve fertőzött sejtek felgyorsult fehérjeszintézisének köszönhetően jelentősen megnövekszik az egyes transzport vezikulák által szállított HLA molekulák mennyisége, amelyek aztán – a szabad diffúziójukat korlátozó tényező(k) következtében (pl. lipid tutajok) - a plazmamembránba kijutva is egymás közelében maradnak (Gheber & Edidin, 1999). A szabad nehézláncok az így kialakuló asszociátumokon belüli közvetlen (FRET szintű) molekuláris kölcsönhatásokat stabilizálják. A HLA I asszociátumok ugyanakkor dinamikus képződmények, amelyek komponensei, feltehetően a membrán szerkezete által meghatározott módon, folyamatosan cserélődnek (Nagy és *mtsai*, 2001).

A sejtfelszínen elérhető $\beta 2$ -mikroglobulin szint fontos szerepet tölt be a szabad nehézláncok és az intakt HLA I heterodimerek közötti egyensúly és így a HLA I molekulák sejtfelszíni szerveződésének és funkcióinak szabályozásában (pl. antigén prezentáció; NK sejt aktiváció stb.) is. Ennek a szabályozó szerepnek különösen a megnövekedett szérum $\beta 2m$ illetve szabad nehézlánc szinttel együttjáró betegségek esetében lehet gyakorlati jelentősége (Bethea & Forman, 1990; Perosa és *mtsai*, 1999; Puppó és *mtsai*, 2000).

5.3 A HLA MOLEKULÁK ÉS AZ IL-2R RÉSZVÉTELÉVEL KIALAKULT KONZERVATÍV ASSZOCIÁCIÓS MOTÍVUMOK HUMÁN T LIMFÓMA/LEUKÉMIA EREDETŰ SEJTEK PLAZMAMEMBRÁNJÁBAN

Vizsgálataink során a HLA glikoproteinek és az IL-2R nanométeres skálán megvalósuló szerveződését tanulmányoztuk három humán T limfóma/leukémia eredetű sejtvonal, az aktivált T limfociták modelljéül szolgáló, IL-2-től függetlenül növe HUT102 B2, az IL-2-től függő, helper fenotípusú Kit225 K6 valamint ennek IL-2 jelenlététől függetlenül is szaporodó alklonja, a Kit225 IG3 sejtek plazmamembránjában. Célunk annak felderítése volt, hogy a két fehérje részvételével kialakuló mintázatok jelenléte mennyire általános a különböző T sejtvonalak felszínén.

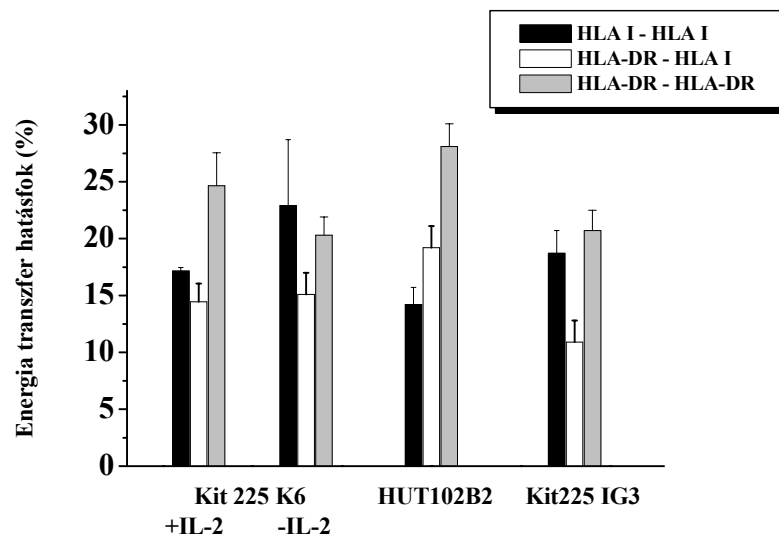
Korábban FRET mérésekkel már több T sejtvonalon kimutatták a HLA I glikoproteinek oligomerizációját illetve a HLA-DR molekulákkal való hetero-asszociációját (Bene és *mtsai*, 1994; Matkó és *mtsai*, 1994; Szöllősi és *mtsai*, 1989). Emellett perifériás vérből izolált mononukleáris sejteken (PBMC) ill. a jelen vizsgálataink során is tanulmányozott HUT102 B2 T limfóma sejtek felszínén feltárták a HLA I és az IL-2R α (CD25) kolokalizációját is (Bene és *mtsai*, 1994; Harel-Bellan és *mtsai*, 1990). Ezen előzmények ismeretében a FRET technika alkalmazásával azt szeretnénk volna meghatározni, hogy a fenti asszociációs motívumok jelen vannak-e más T sejtek felszínén. Vizsgálatainkat kiterjesztettük az IL-2R β és γ_c láncok és a HLA I valamint az IL-2R alegységek és a HLA-DR molekulák eddig még nem analizált kölcsönhatására is.



13. ábra: A HLA I, HLA-DR és az IL-2R alegységek expressziós szintje (antitest kötőhelyek száma) a vizsgált T sejteken. A kötőhelyek számát a telítésben adott, fluoreszcens antitesttel megjelölt sejtek áramlási citometriás fluoreszcencia hisztogramjának (autofluoreszcenciával korrigált) középértékéből határoztuk meg. A fluoreszcencia intenzitás – kötőhely szám kalibrációt ismert számú fluorofórt tartalmazó fluoreszcens mikrogöngyök segítségével végeztük el.

A pontos FRET analízishez nélkülözhetetlen az egyes IL-2R alegységek valamint a HLA I és II glikoproteinek sejtfelszíni expressziójának ismerete, amelyet fluoreszkáló festékekkel konjugált monoklonális antitestek kötődésének áramlási citometriás vizsgálatával becsültük meg. A HLA I molekulák mindhárom sejtvonal felszínén nagy mennyiségben ($\geq 10^6$ /sejt) expresszálódtak. A HLA-DR molekulák a Kit225 K6 és az IG3 sejtek felszínén a HLA I molekulákhoz hasonló mennyiségben ($\sim 10^6$ /sejt), míg a HUT 102 B2 sejteken annál kb. fél nagyságrenddel kisebb példányszámban ($\sim 5-6 \times 10^5$ /sejt) fejeződtek ki. Az IL-2R β és γ_c alegysége néhány ezer-tízezer, az α alegység pedig néhány tízezer-százezer példányszámban volt jelen a vizsgált sejtek felszínén (13. ábra).

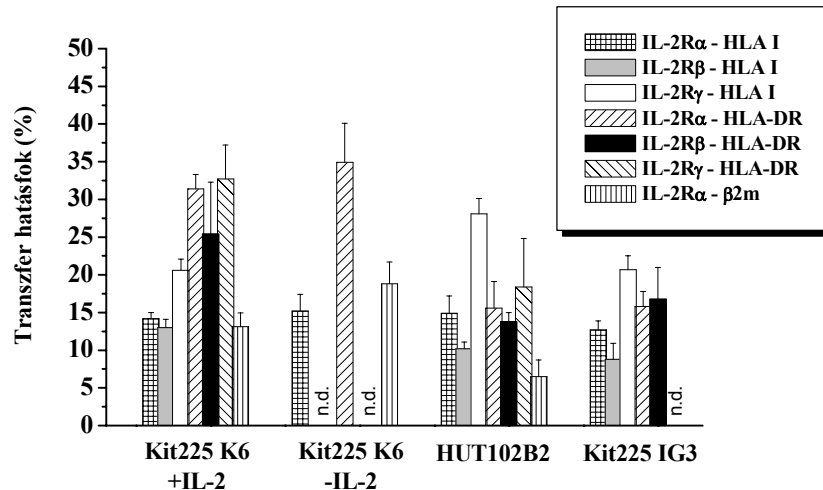
FRET méréseink a HLA I és a HLA-DR molekulák jelentős mértékű homoasszociációját, valamint e két molekula kolokalizációját (részleges heteroasszociációját) tárták fel mindhárom vizsgált sejt felszínén (14. ábra).



14. ábra: A HLA I és II molekulák sejtfelszíni szerveződésének FRET analízise a vizsgált T limfóma sejteken. Az ábra a jelmagyarázatban feltüntetett fehérjék között mérhető átlagos FRET hatásfokokat és a SEM értékeket tartalmazza. (n ≥ 3)

Miután ezen asszociációs motívumok jelenlétét korábban már több különböző eredetű sejt (aktivált T és B limfociták, vírus-transzformált limfoblasztok illetve fibroblasztok; ld „Irodalmi áttekintés”) felszínén is kimutatták, eredményeink megerősítik azt a feltételezést, mely szerint ezek a mintázatok a sejttípustól független mechanizmus szerint alakulnak ki és valamilyen általános – feltehetően a hatékony antigén prezentációt elősegítő – funkcióval rendelkeznek.

A HUT102 B2 sejtekhez hasonlóan a másik két vizsgált sejt plazmamembránjában is kimutatható volt a HLA I és a CD25 molekulák kolokalizációja (15. ábra). Aktivált humán perifériás limfocitákon végzett kísérleteik alapján Harel-Bellan és munkatársai korábban arra



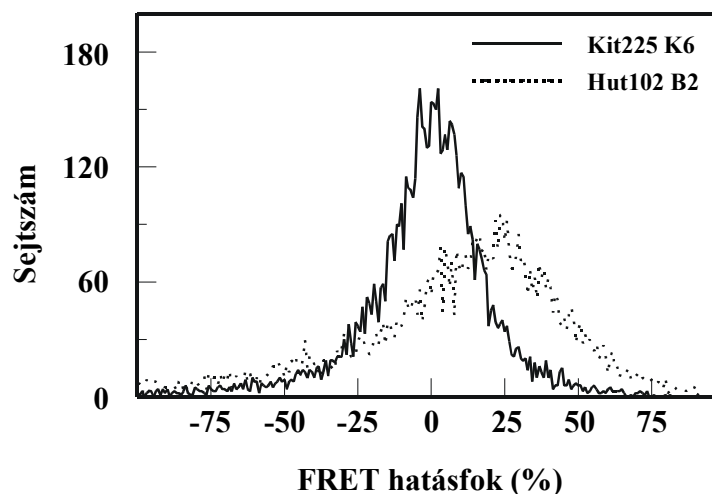
15. ábra: Az IL-2R és a HLA molekulák kolokalizációjának FRET analízise. Az ábra az egyes IL-2R alegységek és a HLA molekulák között mérhető átlagos FRET hatásfokokat és a SEM értékeket tartalmazza. ($n \geq 3$)

a következtetésre jutottak, hogy a HLA I molekulák csak az ún. „alacsony affinitású” interleukin-2 receptorral (IL-2R α) lépnek kölcsönhatásba (Harel-Bellan és *mtsai*, 1990). Ezzel szemben saját FRET méréseink arra utalnak, hogy – legalábbis az általunk vizsgált sejteken – a HLA I molekulák egy része az IL-2R β és γ_c alegységek közvetlen molekuláris közelségében helyezkedik el (15. ábra). Ez jelentheti azt, hogy a HLA I a „magas affinitású” IL-2R-al lép kölcsönhatásba, de utalhat a HLA I molekulák és az egyes IL-2R alegységek egymástól független, páronként megvalósuló kolokalizációjára is. Damjanovich és munkatársai a közelmúltban kimutatták, hogy a jelen vizsgálat során is tanulmányozott T sejteken az IL-2R alegységek már a ligandum (IL-2) távollétében is egymás közvetlen közelében találhatók (Damjanovich és *mtsai*, 1997a). Ezen előzmény és a jelen munka során bemutatott kísérletes adatok ismeretében nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a HLA I molekulák valamilyen módon elősegítik a „magas affinitású” IL-2R kialakulását és stabilizálódását. Ezt a feltételezést azok az adatok is alátámasztják, amelyek szerint a limfocita proliferáció HLA I ellenes antitestekkel gátolható (De Felice és *mtsai*, 1990). Bár e jelenség hátterében valószínűleg az IL-2 illetve az IL-2R-gén aktivációjának gátlása áll, annak kialakulásában, az optimális jelátvitelt biztosító receptor komplex módosításán keresztül, az antitesteknek a HLA I/IL-2R clusterekre gyakorolt hatása is szerepet játszhat.

Az IL-2R és a HLA I molekulák kolokalizációja mellett az IL-2R alegységek és a HLA-DR molekuláris közelségét is kimutattuk (15. ábra). Bár ezen hetero-asszociáció lehetséges funkcionális jelentőségére utaló irodalmi adat egyelőre nem áll rendelkezésünkre,

feltételezhető, hogy az IL-2R-HLA II kölcsönhatás közvetett módon szerepet játszhat az IL-2R alegységek laterális szerveződésében.

Az IL-2R-nak a vizsgált T limfóma sejtek felszínén kialakuló laterális elrendeződésében az előzőekben ismertetett hasonlóságok mellett eltéréseket is tapasztaltunk. Damjanovich és mtsai korábban kimutatták, hogy a K6 sejteken az α -láncok átlagos távolsága kívül esik a FRET hatótávolságán (>10 nm; azaz nincs mérhető energiatranszfer), ami a homoasszociáció hiányával magyarázható (Damjanovich és mtsai, 1997a). Ezzel szemben az IG3 sejteken mért viszonylag magas FRET hatásfok (15-17 %) az α -alegységek jelentős mértékű oligomerizációjára utal. Eredményeink alapján az α -láncok homoasszociációja az IG3-hoz hasonlóan IL-2 független HUT102 B2 sejtek felszínén is kimutatható (16. ábra). Az IL-2R α homoasszociáció eredete és jelentősége még nem tisztázott, felderítése további vizsgálatokat igényel.



16. ábra: Az IL-2R α alegység homoasszociációjának vizsgálata a Kit225 K6 illetve az Hut102 B2 sejtek felszínén. Az ábrán látható áramlási citometriás FRET hisztogram az α -láncok között sejtenként mérhető FRET hatásfokokat tartalmazza.

FRET méréseink tehát több, az IL-2R komplex és a HLA molekulák részvételével kialakuló „konzervatív” asszociációs motívum jelenlétét tárták fel a vizsgált T limfóma/leukémia eredetű sejtek plazmamembránjában. Az IL-2R α sejt-specifikus oligomerizációjának kivételével (16. ábra), ezen asszociációs motívumok előfordulását sem a vizsgált T sejt típusa, sem pedig az IL-2R „betöltöttsége” nem befolyásolta lényegesen (ld. 14. és 15. ábra, „IL-2” Kit225 K6 sejtek). (Az IL-2R β - és γ_c -alegységét nem expresszáló, ugyancsak T sejt leukémia eredetű MT-1 sejtekkel végzett vizsgálatok szerint az IL-2R α és a HLA molekulák asszociációja a β - és γ_c -lánc jelenlététől is független (itt nem közölt adatok).) Ugyancsak FRET mérésekkel mutatták ki a közelmúltban az IL-2R alegységeinek

az IL-2 jelenlététől független (ugyanakkor a releváns citokinekkal szelektíven módosítható) molekuláris közelségét (Damjanovich és *mtsai*, 1997a). Bár a FRET adatok alapján azt nem tudjuk eldönteni, hogy ezek a fehérje kolokalizációk egymástól függetlenül valósulnak-e meg vagy ugyanazon fehérje mintázat részleteit tükrözik, létezésük az IL-2R komplex és asszociációs partnereinek valamilyen általános „rendező elv” alapján kialakított sejtfelszíni kompartmentalizációját feltételezi. A CD25 és a HLA molekulák szubmikronos méretű (400-800 nm), egymással nagymértékben átfedő clustereinek a feltárása szintén arra utal, hogy a szóbanforgó molekulák – legalábbis részben – közös membrándoménokban találhatók (Vereb és *mtsai*, 2000). A FRET mérésekkel feltárt asszociációs mintázatok feltehetően a nagyméretű clusterek/domének belső szerkezetéről, molekuláris háttéréről adnak felvilágosítást.

Az IL-2R részvételével kialakuló szupramolekuláris clusterek előfordulása valószínűleg a humán T limfóma/leukémia eredetű sejtek sajátossága, mivel egérből származó nyugvó, perifériás T limfociták illetve sejtvonalak esetén nem sikerült kimutatni az IL-2R clusterekbe történő rendeződését (Breitfeld és *mtsai*, 1996).

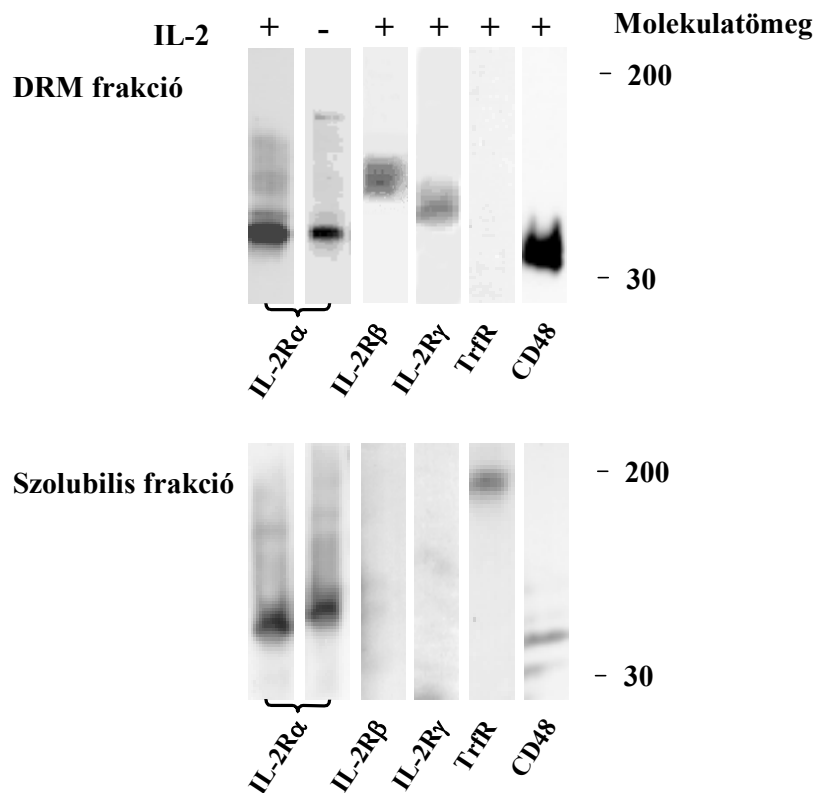
5.4 AZ IL-2R α ALEGYSÉGÉT LIPID TUTAJOK KOMPARTMENTALIZÁLJÁK A KIT225 K6 SEJTEK PLAZMAMEMBRÁNJÁBAN

Számos limfóma/leukémia eredetű T sejt illetve sejtvonal, így az általunk tanulmányozott T sejtek plazmamembránjában is, az IL-2R α alegységének állandó, előzetes aktivációt nem igénylő, legtöbbször a másik két alegységét nagymértékben meghaladó expressziója figyelhető meg. Az α -lánc expressziójában a normál illetve a leukémiás T sejtek között megfigyelhető különbséget aknázzák ki az IL-2R α ellenes antitest (anti-Tac) illetve módosított változatainak alkalmazásán alapuló monoklonális antitest terápiák (Morris & Waldmann, 2000; Waldmann és mtsai, 2000). A CD25 sejtfelszíni expressziójában az egészséges illetve beteg egyedekből származó limfociták között kimutatható különbség a CD25 sejtfelszíni eloszlásában/elrendeződésében is jelentkezik. Erre példa a nagy affinitású IL-2 receptor komplex folyamatos expressziója vagy az IL-2R α és a HLA molekulák asszociációja, amely normál esetben a sejtek előzetes aktivációját igényli. Az IL-2R α kompartmentalizációjában, asszociációs mintázatainak kialakításában és fenntartásában szerepet játszó tényezők megismerése ezért akár terápiás jelentőségű is lehet.

Kémiai keresztkötött IL-2 receptorról végzett detergens extrakciós kísérletek alapján korábban arra a következtetésre jutottak, hogy az egér IL-2R α kompartmentalizációjában detergens rezisztens és szolubilis membránrégiók egyaránt részt vesznek (Hoessli és mtsai, 1990). Bár az ily módon kapott detergens rezisztens struktúrák valószínűleg csak részben azonosak a lipid tutajokkal, mindenképpen felvetődik annak a lehetősége, hogy az IL-2R sejtfelszíni eloszlásának kialakításában ezek a koleszterinben és szfingolipidben gazdag membrándomének is fontos szerepet játszanak. Különböző humán illetve egér eredetű sejtvonalakon kimutatták az MHC II molekulák konstitutív illetve keresztkötés indukálta raft asszociációját is, amely – tekintve az IL-2R alegységek és a HLA II hetero-asszociációját az általunk vizsgált T sejtek felszínén – szintén a lipid tutajok potenciális rendező szerepére utal (Anderson és mtsai, 2000; Huby és mtsai, 1999).

A lipid tutajoknak az IL-2R α sejtfelszíni kompartmentalizációjában betöltött szerepét az IL-2 jelenlétében növekvő, humán T limfóma eredetű Kit225 K6 sejtek plazmamembránjában vizsgáltuk. Kísérleteink egy részében a sejteket hideg, nem-ionos detergenssel (1% TX-100 vagy 15 mM CHAPS) kezeltük, majd a lipid tutajokat tartalmazó, alacsony sűrűségű detergens rezisztens membránfrakciót (DRM) a plazmamembrán többi részétől sűrűség

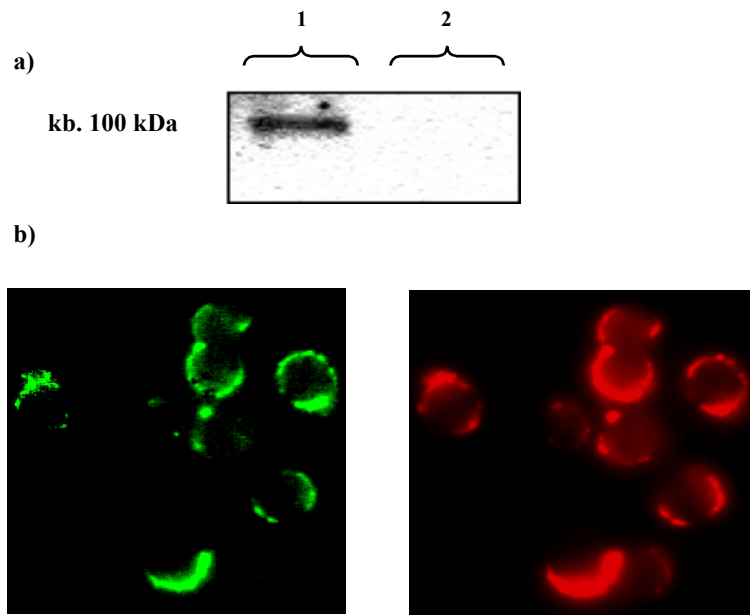
gradiens centrifugálással választottuk el. Az így kapott frakciók fehérjetartalmát SDS-PAGE gélelektroforézist követően Western-blot technikával analizáltuk (17. ábra).



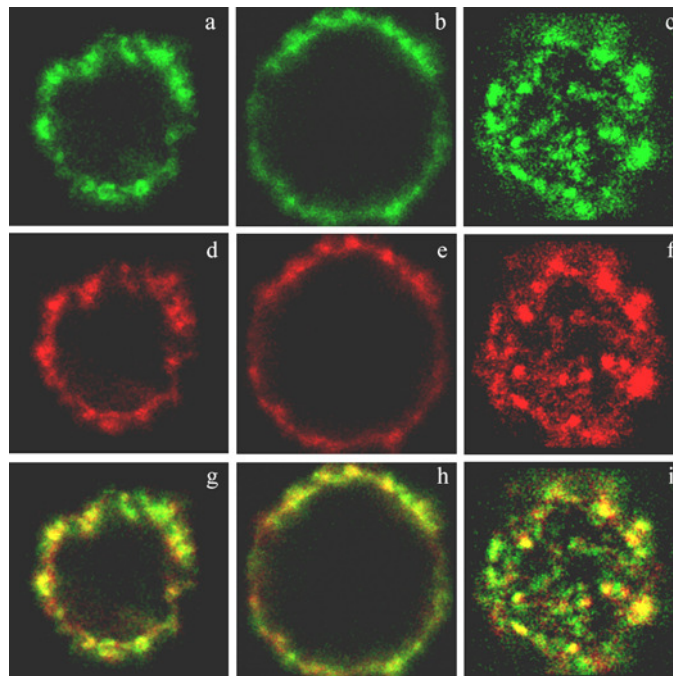
17. ábra: Az IL-2R alegységek, a transferrin receptor és a CD48 molekula detergens rezisztencia vizsgálata Kit225 K6 sejteken. Az ábra az 1%-os TX-100-zal kezelt sejtek sűrűséggradiens centrifugálásával nyert detergens rezisztens (felső panel) illetve detergens szolubilis (alsó panel) membránfrakció fehérjetartalmának Western blot analizisét mutatja IL-2-vel (+) illetve anélkül (-) tenyésztett sejteken. A feltüntetett fehérjék azonosítása a következő monoklonális antitestekkel történt: anti-Tac (IL-2R α), Mik β 1 (IL-2R β), TugH4 (IL-2R γ), MEM-75 (TrfR) és MEM-102 (CD48).

A detergens kezelés illetve az egyes membránfrakciók ezt követő szétválasztásának sikerét a lipid tutajokban koncentrálódó, GPI-horgonyzott CD48 illetve a lipid tutajokból „kizárt” (az eddigi irodalmi adatok alapján kizárólag a szolubilis membránfrakcióban megtalálható) transferrin receptor (TrfR) alkalmazásával ellenőriztük (Harder és *mtsai*, 1998; Moran & Miceli, 1998): várakozásainknak megfelelően a CD48 legnagyobb részét az alacsonyabb sűrűségű DRM frakcióban találhatók, míg a TrfR jelenlétét csak a centrifugáció alján összegyűlő, nagyobb sűrűségű membránfrakcióban sikerült kimutatnunk (17. ábra).

Mint az ábrán is látható, mind az IL-2R α láncát, mind pedig a jelátvitelért felelős β és γ_c alegységeket azonosítottuk a DRM frakcióban. Az IL-2R ligandummal való betöltöttsége nem befolyásolta lényegesen az α -láncok és a DRM frakció asszociációját: mind az IL-2-vel, mind pedig az IL-2 nélkül tenyésztett sejtekkel végzett kísérleteinkben – bár ez utóbbi esetben valamivel kisebb mennyiségben – kimutattuk a CD25 jelenlétét a DRM frakcióban.



18. ábra: A CD25 (IL-2R α) és CD48 molekulák kolokalizációja. (a) Koprecipitáció: a CD25-ellenes antitesttel (anti-Tac) immunprecipitált sejtizátum CD48 tartalmát MEM-102 antitesttel detektáltuk (1. sáv). Kontrollként a MEM-102-vel azonos izotípusú, irreleváns antitestet alkalmaztunk (2. sáv). (b) Cocapping: a MEM-102 (zöld) és anti-Tac (piros) antitestekkel duplán jelzett sejtek fluoreszcens mikroszkópos képe a capping kísérletet követően. (ld. Anyagok és módszerek)



19. ábra: A CD25 és a GM-1 gangliozid kolokalizációjának konfokális mikroszkópos vizsgálata. A felső két panel a FITC-kolera toxin B alegységgel megjelölt GM-1 (a, b, c) és a Cy3-anti-Tac-kal jelölt CD25 (d, e, f) fluoreszcenciáját mutatja a duplán jelzett sejteken. A két csatornában kapott jel egymásra helyezése eredményezi az alsó panel képeit (g, h, i). Sárga szín jelöli a zöld és a piros fluoreszcencia átfedését, azaz a két molekula kolokalizációját. A konfokális felvételek a sejt különböző mélységében kiválasztott szeletek fluoreszcenciáját mutatják (alsó részéhez közeli szelet: a, d, g; a sejt közepe: b, e, h; sejt felső része: c, f, i).

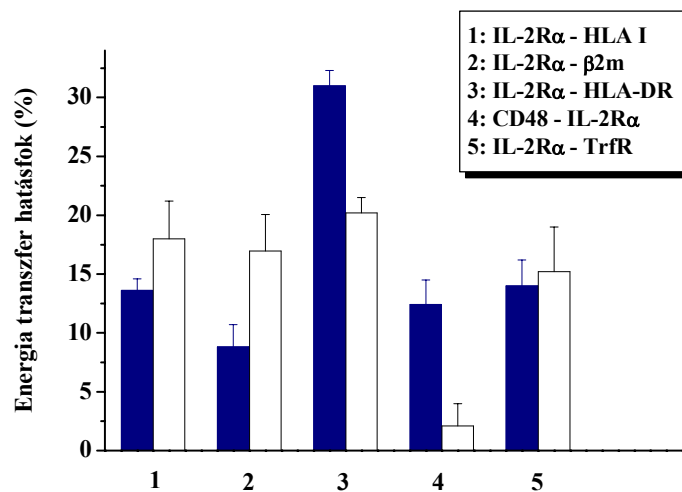
Koprecipitációs (18/a. ábra), „cocapping” (18/b. ábra) illetve FRET (20. ábra) kísérleteink további bizonyítékkal szolgáltak az IL-2R α lipid tutajokban történő lokalizációjára vonatkozóan: eredményeink alapján az IL-2R α és a CD48 a plazmamembrán szfingolipidben és koleszterinben gazdag régiókban egymás közvetlen molekuláris közelségében helyezkednek el. Konfokális mikroszkópos vizsgálataink feltárták a lipid tutajokban feldúsuló GM-1 gangliozid és az IL-2R α kolokalizációját is (19. ábra).

Vizsgálataink tehát meggyőző bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy – függetlenül az IL-2 jelenlététől – a magas affinitású IL-2R komplex mindhárom komponense a lipid tutajokban helyezkedik el. Eredményeink a korábbi FRET mérésekkel összhangban arra utalnak, hogy más növekedési faktor receptorokkal (pl. epidermális növekedési faktor receptor) ellentétben a magas affinitású IL-2R alegységeinek a vizsgált T sejtek plazmamembránjában tapasztalt együttállását nem a ligandum kötődése indukálja, hanem más tényezők (pl. a membrán mikrodomén szerkezete) alakítják ki, a ligandum kötődése csak módosítja az egyes alegységek kölcsönhatását.

FRET és biokémiai vizsgálataink egyaránt arra utalnak, hogy a K6 sejteken található CD25 molekulának csak egy része koncentráldik a lipid tutajokban: egy jelentős hányaduk a detergens szolubilis membránrégiókban található (17. ábra), ahol véletlenszerűen vagy pedig más (pl. a TrfR-t tartalmazó) membrán mikrodoménekhez kapcsolódva helyezkedhetnek el. Ez utóbbi lehetőséget valószínűsíti a TrfR és a CD25 molekulák között detektálható ~14 % FRET is (20. ábra). Korábban ugyancsak T sejteken kimutatták a TrfR és a HLA I illetve a HLA II glikoproteinek részleges asszociációját is (Mátyus és *mtsai*, 1995). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a CD25 kompartmentalizációjában a kialakuló IL-2R komplex affinitásától függően különböző membrándomének vesznek részt: míg a magas affinitású komplex (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$) a detergens rezisztens membrándoménekben helyezkedik el, addig a receptor alacsony affinitású formája (az α -lánc) ezeken kívül található. A már említett, egérsejteken végzett vizsgálatok során ugyancsak arra a következtetésre jutottak, hogy az IL-2R különböző formái más membránrégiókban találhatók (Hoessli és *mtsai*, 1990). Ismert tény, hogy az IL-2 kötődését követően a magas affinitású komplex internalizációja következik be. Ugyanakkor a három alegység sorsa ezt követően elválik egymástól: míg a β és a γ_c alegység degradálódik, addig az α -lánc, hasonlóan a transferrin receptorhoz, visszakerül a plazmamembránba (Hemar és *mtsai*, 1995). A CD25 és a TrfR⁺ mikrodomének asszociációja hatékony útvonalat biztosíthat a felesleges, a jelátvitelben nem szereplő α -láncok viszonylag gyors recirkulációjához.

Miután a lipid tutajok integritásának megszüntetése az általuk összetartott fehérje

clusterek felbomlását is maga után vonja, kísérleteink további részében FRET mérésekkel a raftok egységének szerepét tanulmányoztuk az IL-2R α részvételével kialakult mintázatok kiváltásában és fenntartásában. A sejteket metil- β -ciklodextrin kezelésnek vetettük alá, amelyről már korábban kimutatták, hogy a membrán koleszterin tartalmának szelektív és igen hatékony kivonását és így a lipid tutajok egységének felbomlását eredményezi (Varma & Mayor, 1998). A koleszterin kivonás eredményességét a már korábban említett lipid próba, a DPH fluoreszcencia anizotrópiájának mérésével ellenőriztük. Az M β CD kezelés hatására a DPH anizotrópia jelentősen csökkent (0.157 ± 0.012 -ről 0.064 ± 0.006 -ra), ami a membrán fluiditásának a koleszterin kivonását kísérő növekedését tükrözi.



20. ábra: A lipid tutajok integritásának szerepe az IL-2R α asszociációs mintázatainak fenntartásában Kit225 K6 sejtek felszínén. Az ábra a kontrol (□) illetve a M β CD-nel kezelt (■) sejteken a feltüntetett fehérjék között mért átlagos FRET hatásfokokat (%; $\pm$ SEM) tartalmazza.

Mint a 20. ábrán látható, a koleszterin kivonása jelentős hatást gyakorolt az IL-2R α és a HLA molekulák kölcsönhatására: a CD25 és a HLA-DR molekulák kolokalizációját csökkentette, a CD25-HLA I kolokalizáció mértékét pedig növelte. A koleszterin kivonása jelentősen csökkentette az IL-2R α és a T sejtek jelátviteli folyamataiban fontos szerepet betöltő raft-komponens, a GPI-horgonyzott CD48 fehérje molekuláris közelségét, ugyanakkor az IL-2R α és a raftokból „kizárt” transzferrin receptor kölcsönhatását nem befolyásolta. Sem a kontroll, sem pedig a M β CD-nel kezelt sejteken nem detektáltunk pozitív FRET-et a CD48 és a TrfR között ($E \approx 2\%$). Eredményeink arra utalnak, hogy az IL-2R α és a HLA molekulák előző részben bemutatott asszociációjának hátterében a membrán lipid-domén szerkezete áll, legalábbis a lipid tutajok integritása alapvető feltétele ezen mintázatok stabilitásának.

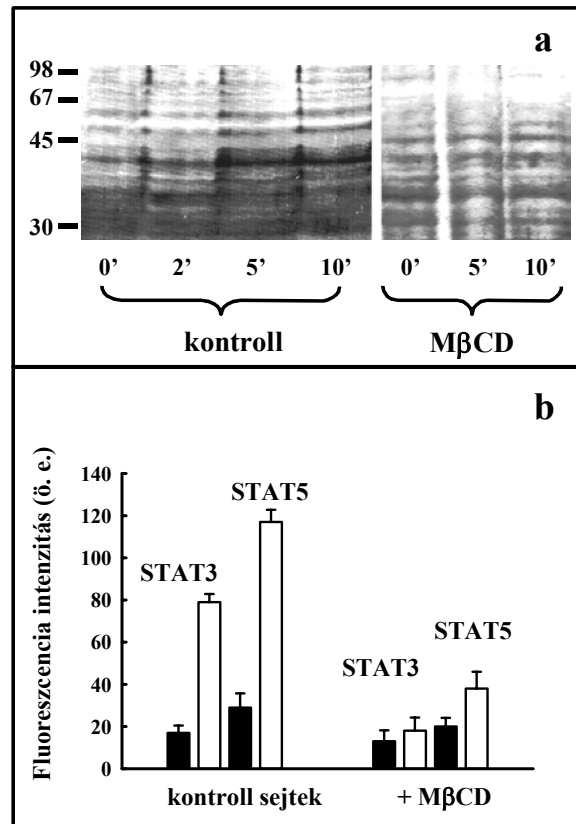
A lipid tutajok az IL-2R α magasabb (szubmikrométeres) hierarchikus szinten történő szerveződésének kialakításában is fontos szerepet játszanak (Vereb és mtsai, 2000).

A CD25 és a CD48 M β CD-nel módosítható asszociációja nemcsak egy újabb bizonyíték az IL-2R α és a lipid tutajok asszociációjára vonatkozóan, de felveti egy, a két fehérje részvételével kialakult és a T sejtek fiziológiájában fontos szabályozó szerepet betöltő jelátviteli platform létezését is. Erre utal az a nemrégiben megjelent közlemény is, amely szerint a CD48, a Thy1 illetve a Ly6A/E GPI-horgonyzott fehérjék antitesttel történő keresztkötése és ennek következtében kialakuló immobilizációja gátolja a T sejtek növekedését, ugyanakkor nincs hatással a T sejtek effektor funkciójára (Marmor és *mtsai*, 1999).

Az IL-2 biológiai hatását legtöbb esetben a mindhárom alegységet tartalmazó magas affinitású receptor komplexen keresztül fejtí ki. Detergens rezisztencia vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a magas affinitású IL-2R komplex a lipid tutajokban található, hiszen az α -láncsal ellentétben a β és γ_c alegység jelenlétét csak a detergens rezisztens membránfrakcióban tudtuk kimutatni (17. ábra). Felmerül a kérdés, hogy vajon a lipid tutajok integritása befolyásolja-e az IL-2 által stimulált jelátviteli folyamatok hatékonyságát. A 21/a. ábra az IL-2 által kiváltott teljes tirozin foszforilációs mintázat kialakulását mutatja kontroll illetve metil- β -ciklodextrinnel előkezelt sejtek esetén. Mint az immunoblotból kitűnik, a tirozin foszforiláció mértéke az IL-2 stimulációt követően időben növekszik és kb. 15 perc múlva éri el a maximumot. A fő tirozin foszforilációs sávok a 35–60 kDa molekulatömeg tartományban találhatók. A sejtek M β CD-nel történő előkezeltése nagymértékben és viszonylag egyenletesen csökkentette a foszforiláció mértékét.

A citokin stimulációt követően lezajló tirozin foszforilációs folyamatok nagyrésze nem specifikus az adott citokinre, ugyanakkor a STAT3/STAT5 transzkripció aktiváló faktorok foszforilációját eddigi ismereteink alapján csak az IL-2 (és az IL-15) stimulációja váltja ki (Johnston és *mtsai*, 1995). A lipid tutajok integritásának a STAT3/STAT5 foszforilációjában betöltött szerepét a tirozin-foszforilált STAT3-ra illetve STAT5-re specifikus monoklonális antitestek kötődésének áramlási citometriás vizsgálatával tanulmányoztuk (Fleisher és *mtsai*, 1999). Mint a 21/b. ábrán látható, IL-2 stimuláció hatására mindkét antitest kötődése (azaz a transzkripció faktorok foszforilációja) jelentősen megnőtt az alapszinthez képest. A sejtek ciklodextrinnel történő előkezeltése ugyanakkor nagymértékben gátolta a STAT3 illetve a STAT5 foszforilációját. A koleszterin kivonása tehát jelentős mértékben csökkentette az IL-2 által kiváltott jelátviteli folyamatok hatékonyságát. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a lipid tutajok egységének megbontása az IL-2R alegységek laterális diszperzióját és így a β és a γ_c láncok intracelluláris részéhez kapcsolódó Jak kinázok közötti kölcsönhatások szétkapcsolását eredményezte. Ezek a

kölcsönhatások kulcsszerepet töltenek be a további jelátvivő molekulák (pl. STAT) kapcsolódási helyeinek kialakításában (Nelson & Willerford, 1998).



21. ábra: A lipid tutajok egységének szerepe az IL-2 által kiváltott tirozin foszforilációs folyamatokban. (A) MβCD kezelés (7 mM) hatása az IL-2 által kiváltott teljes tirozin foszforilációs mintázatra. Az IL-2 stimulációt (1000 U/ml) követően a jelzett időpontokban vett mintákat Western blot technikával, torma-peroxidázzal konjugált anti-foszfortirozin antitest alkalmazásával analizáltuk. (B) A koleszterin kivonás hatása a STAT3/STAT5 foszforilációjára. Az oszlopok az anti-foszfortirozin-STAT3 illetve STAT5 elsődleges és FITC-jelzett másodlagos antitesttel megjelölt sejtek közepes fluoreszcencia intenzitását ($\pm$ SEM) mutatják stimulálatlan (■) illetve IL-2-vel 15 percig stimulált (□) sejtek esetén. A mért intenzitásokat az izotípus kontroll antitest illetve a másodlagos antitest aspecifikus kötődéséből adódó háttérrel korrigáltuk.

Nemrégiben egérsejteken végzett vizsgálatok szintén az IL-2R α részleges raft-asszociációját tárták fel, ugyanakkor a β és γ_c alegység jelenlétét kizárólag a detergens szolubilis membránrégiókban mutatták ki. Ennek megfelelően ezeken a sejteken a lipid tutajok az α -lánc szegregációja/elkülönítése révén gátolják a β és a γ_c alegységgel való kölcsönhatások és így a magas affinitású receptor komplex kialakulását (Marmor & Julius, 2001). Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy a lipid tutajoknak az IL-2R komplex alegységek kompartmentalizációjában és így az IL-2 által kiváltott jelátviteli folyamatok szabályozásában betöltött szerepe faj- illetve sejtfüggő lehet.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a vizsgált limfóma/leukémia eredetű T sejtek plazmamembránjában az IL-2R α (CD25) részben a glikoszfingolipidben és koleszterinben

gazdag membrándoménokban helyezkedik el. Az α -lánc és a lipid tutajok asszociációja több funkcionális következménnyel járhat a vizsgált T sejtekre nézve: (1) Az α -láncoknak a jelátvitelért felelős másik két alegység közelében történő koncentrálásával a lipid tutajok elősegíthetik a magas affinitású receptor komplex alegységeinek a citokin stimulációtól független csoportosulását. Ez a „fókuszáló” hatás felgyorsíthatja a receptor komplex végső formájának az IL-2 kötődés hatására bekövetkező kialakulását (Grant és *mtsai*, 1992; Roessler és *mtsai*, 1994), és így részben felelős lehet a leukémia/limfóma eredetű sejteknek a normál limfocitákhoz viszonyított megnövekedett proliferációs sebességéért. A lipid tutajok elősegíthetik a heterotrimer receptor komplex megfelelő konformációjának kialakítását és a különböző intracelluláris (illetve raft-asszociált) jelátvivő molekulák kapcsolódását. (2) Bár az ezzel kapcsolatos vizsgálatok még folyamatban vannak, feltehető, hogy a lipid tutajok részt vesznek más citokin receptorok privát α alegységeinek kompartmentalizációjában is, így téve lehetővé a közös γ_c (illetve β) alegységek különböző citokinek által történő használatát. (3) A lipid tutajok egysége több, az IL-2R α részvételével kialakuló asszociációs mintázat stabilitásának is feltétele, így ezen mintázatok eddig még fel nem tárt funkciójának szabályozásában is szerepük lehet.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám célja az antigének bemutatásában kulcsszerepet játszó HLA I molekulák valamint a T sejtek antigén-specifikus stimulációt követő proliferációjában esszenciális IL-2 receptor sejt felszíni szerveződésének kialakításában, fenntartásában és szabályozásában szerepet játszó tényezők feltárása volt. A különböző humán B illetve T limfóma sejteken végzett vizsgálataink eredményei a következők:

- (1) Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer méréseinkkel kimutattuk, hogy a plazmamembrán koleszterin szintje (a membrán mikrodomén struktúrája) szerepet játszik a HLA I molekulák oligomerizációjának szabályozásában humán B limfoblaszt sejteken.
- (2) Áramlási citometriás illetve pásztázó közeli mező mikroszkópiás méréseink szerint a szabad (β 2-mikroglobulint nem tartalmazó) HLA I nehézláncok, illetve az intakt HLA I heterodimerek, legalábbis részben, azonos fehérjemintázatok kialakításában vesznek részt a JY sejtek felszínén. FRET méréseink alapján a sejt felszínen elérhető β 2-mikroglobulin szint – feltehetően a nehézlánc különböző megjelenési formái közötti egyensúly módosításán keresztül – fontos szerepet tölt be a HLA I oligomerizáció mértékének szabályozásában.
- (3) Allospecifikus citotoxikus T limfociták alkalmazásával kimutattuk, hogy az antigén prezentáló sejt felszínén elérhető β 2-mikroglobulin szint – feltehetően a HLA I oligomerizáció mértékének módosításán keresztül (ld.előző pont) – fontos szerepet tölt be a T sejt aktiváció illetve effektor funkció hatékonyságának szabályozásában is.
- (4) T limfóma/leukémia eredetű sejteken végzett FRET méréseink több, az IL-2R komplex és a HLA molekulák részvételével kialakuló „konzervatív” asszociációs motívum jelenlétét tárták fel a vizsgált sejtek plazmamembránjában. Az IL-2R α sejt-specifikus oligomerizációjának kivételével ezen asszociációs motívumok előfordulását sem a vizsgált T sejt típusa, sem az IL-2R citokin-kötése nem befolyásolta lényegesen.
- (5) Fizikai és biokémiai módszerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a Kit225 K6 limfóma/leukémia eredetű T sejtek plazmamembránjában az IL-2R α (CD25) részben a glikoszfingolipidben és koleszterinben gazdag membrandoménekben (lipid tutajokban) helyezkedik el. FRET méréseink szerint a lipid tutajok egysége több, az IL-2R α részvételével kialakuló asszociációs mintázat stabilitásának feltétele.

A lipid tutajok egységének megbontása csökkentette az IL-2 stimulációt követő jelátviteli lépések hatékonyságát, amely arra utal, hogy ezek a membrán

mikrodomének kulcsszerepet játszanak a magas affinitású IL-2R komplex kialakulásában. Ezt az elképzelést a sejtek detergens rezisztens membránfrakciójának biokémiai analízise is alátámasztotta: az IL-2R α lánc mellett a jelátvitelért felelős β és γ_c alegységeket is sikerült azonosítanunk a DRM frakcióban.

- (6) FRET és biokémiai vizsgálataink egyaránt arra utalnak, hogy a K6 sejteken található CD25 molekuláknak csak egy része koncentráldik a lipid tutajokban: jelentős hányaduk a detergens szolubilis membránrégiókban található, ahol véletlenszerűen vagy pedig más (pl. a transzferrin receptort tartalmazó) membrán mikrodoménekhez kapcsolódva helyezkedhetnek el.

7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Eredményeink hozzájárulhatnak az adaptív immunválasz, ezen belül is az antigénprezentáció és a T sejt aktiváció folyamatának mélyebb megértéséhez.

Az általunk feltárt fehérje mintázatok egy része az aktivált perifériás T illetve B limfociták felszínén is megtalálható, míg más részük – legalábbis az eddig rendelkezésre álló adatok alapján – csak a vizsgált limfóma/leukémia eredetű sejtekre jellemző. A különböző eredetű limfociták sejtfelszíni mintázatainak összehasonlítása, az egészséges illetve beteg egyedekből, esetleg más fajból származó sejtek közötti hasonlóságok és különbségek feltárása elősegítheti a mintázatok funkcionális jelentőségének illetve a normális valamint a kóros sejtműködés (pl. aktiváció, sejttranszformáció stb.) molekuláris részleteinek megértését, így mind az alapkutatásban mind pedig a különféle betegségek diagnosztikájában illetve terápiájában jelentőséggel bírhat.

A monoklonális antitesteken alapuló, napjainkban egyre szélesebb körben sikerrel kipróbált, ún. célpont orientált diagnosztikus illetve terápiás eljárások egy potenciális klinikai alkalmazási területet is jelenthetnek. Miután ezen eljárások kézenfekvő célpontja a sejtfelszín, a plazmamembrán és a benne elhelyezkedő molekuláris struktúrák, fehérjemintázatok valamint az azokat szabályozó tényezők feltárása jelentős előrelépést hozhat ezen a területen is. Különösen érdekes lehet ez az IL-2R α esetében, amely az ilyen jellegű beavatkozások gyakori célpontja: a CD25 ellenes anti-Tac humanizált változatát már eddig is sikerrel alkalmazták a különböző leukémiás illetve autoimmun megbetegedések kezelésében valamint az allograft kilökődés megakadályozásában (Waldmann és *mtsai*, 2000).

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Acuto,O. & Cantrell,D. (2000) T cell activation and the cytoskeleton. *Annu.Rev.Immunol.*, **18**, 165-184.
- Alam,S.M., Davies,G.M., Lin,C.M., Zal,T., Nasholds,W., Jameson,S.C., Hogquist,K.A., Gascoigne,N.R., & Travers,P.J. (1999) Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity*, **10**, 227-237.
- Allen,H., Fraser,J., Flyer,D., Calvin,S., & Flavell,R. (1986) β 2-microglobulin is not required for cell surface expression of the murine class I histocompatibility antigen H-2D^b or of a truncated H-2D^b. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7447.
- Anderson,H.A., Hiltbold,E.M., & Roche,P.A. (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat.Immunol.*, **1**, 156-162.
- Bacsó,Z., Bene,L., Bodnár,A., Matkó,J., & Damjanovich,S. (1996a) A photobleaching energy transfer analysis of CD8/MHC-I and LFA-1/ICAM-1 interactions in CTL-target cell conjugates. *Immunol Lett*, **54**, 151-156.
- Bacsó,Z., Matkó,J., Szöllősi,J., Gaspar,R.J., & Damjanovich,S. (1996b) Changes in membrane potential of target cells promotes cytotoxic activity of effector T lymphocytes. *Immunol Lett*, **51**, 175-180.
- Balasubramanian,S., Chernov-Rogan,T., Davis,A.M., Whitehorn,E., Tate,E., Bell,M.P., Zurawski,G., & Barrett,R.W. (1995) Ligand binding kinetics of IL-2 and IL-15 to heteromers formed by extracellular domains of the three IL-2 receptor subunits. *Int Immunol*, **7**, 1839-1849.
- Bene,L., Balazs,M., Matkó,J., Most,J., Dierich,M.P., Szöllősi,J., & Damjanovich,S. (1994) 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*, **24**, 2115-2123.
- Bethea,M. & Forman,D.T. (1990) Beta 2-microglobulin: its significance and clinical usefulness. *Ann.Clin.Lab Sci.*, **20**, 163-168.
- Bix,M. & Raulet,D. (1992) Functionally conformed free class I heavy chains exist on the surface of beta 2 microglobulin negative cells. *J Exp Med*, **176**, 829-834.
- Boniface,J., Rabinowitz,J., Wülfing,C., Hampl,J., Reich,Z., Altman,J., Kantor,R., Beeson,C., McConnell,H., & Davis,M. (1998) Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity*, **9**, 459-466.
- Breitfeld,O., Kuhlcke,K., Lothar,H., Hohenberg,H., Mannweiler,K., & Rutter,G. (1996) Detection and spatial distribution of IL-2 receptors on mouse T-lymphocytes by immunogold-labeled ligands. *J.Histochem.Cytochem.*, **44**, 605-613.

- Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., & Dustin, M.L. (2001) The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.*, **19**, 375-396.
- Brown, D.A. & London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.*, **164**, 103-114.
- Brown, D.A. & London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17221-17224.
- Brown, R.E. (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.*, **111** (Pt 1), 1-9.
- Bushkin, Y., Demaria, S., Le, J., & Schwab, R. (1988) Physical association between the CD8 and HLA class I molecules on the surface of activated human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3985-3989.
- Cantrell, D. (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 259-274.
- Carbone, E., Stuber, G., Andree, S., Franksson, L., Klein, E., Beretta, A., Siccardi, A., & Karre, K. (1993) Reduced expression of major histocompatibility complex class I free heavy chains and enhanced sensitivity to natural killer cells after incubation of human lymphoid lines with beta 2-microglobulin. *Eur J Immunol*, **23**, 1752-1756.
- Carreno, B. & Hansen, T. (1994) Exogenous peptide ligand influences the expression and half-life of free HLA class I heavy chains ubiquitously detected at the cell surface. *Eur J Immunol*, **24**, 1285-1292.
- Chakrabarti, A., Matkó, J., Rahman, N.A., Barisas, B.G., & Edidin, M. (1992) Self-association of class I major histocompatibility complex molecules in liposome and cell surface membranes. *Biochemistry*, **31**, 7182-7189.
- Cheng, P.C., Cherukuri, A., Dykstra, M., Malapati, S., Sproul, T., Chen, M.R., & Pierce, S.K. (2001) Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin. Immunol.*, **13**, 107-114.
- Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., & Rothblat, G.H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, **38**, 2264-2272.
- Clegg, R.M. (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 103-110.
- Cochran, J., Cameron, T., & Stern, L. (2000) The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity*, **12**, 241-250.
- Damjanovich, S., Bene, L., Matkó, J., Alileche, A., Goldman, C.K., Sharrow, S., & Waldmann, T.A. (1997a) 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*, **94**, 13134-13139.

- Damjanovich,S., Gaspar,R.J., & Pieri,C. (1997b) Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane. *Q Rev Biophys*, **30**, 67-106.
- Damjanovich,S., Trón,L., & Somogyi,B. (1981) Structure and dynamics at molecular and cellular level. pp. 285-299. IUPS, Akadémiai Kiadó - Pergamon Press, Budapest.
- Damjanovich,S., Vereb,G., Schaper,A., Jenei,A., Matkó,J., Starink,J.P., Fox,G.Q., Arndt-Jovin,D.J., & Jovin,T.M. (1995) 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*, **92**, 1122-1126.
- Daniels,M.A. & Jameson,S.C. (2000) Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J Exp Med*, **191**, 335-345.
- De Felice,M., Turco,M.C., Costanzo,F., Corbo,L., Ferrone,S., & Venuta,S. (1990) Inhibition by anti-HLA class I mAb of IL-2 and IL-2 receptor synthesis in lymphocytes stimulated with PHA-P. *Cell Immunol*, **126**, 420-427.
- Demaria,S. & Bushkin,Y. (1993) CD8 and beta 2-microglobulin-free MHC class I molecules in T cell immunoregulation. *Int J Clin Lab Res*, **23**, 61-69.
- Demaria,S., Schwab,R., & Bushkin,Y. (1992) The origin and fate of beta 2m-free MHC class I molecules induced on activated T cells. *Cell Immunol*, **142**, 103-113.
- Demaria,S., Schwab,R., Gottesman,S., & Bushkin,Y. (1994) Soluble β 2-microglobulin-free class I heavy chains are released from the surface of activated and leukemia cells by a metalloprotease. *J Biol Chem*, **269**, 6689-6694.
- DiSanto,J.P. (1997) Cytokines: shared receptors, distinct functions. *Curr Biol*, **7**, R424-R426.
- Dustin,M.L. (2001) Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *J.Clin.Immunol.*, **21**, 258-263.
- Dustin,M.L. (2002) Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *J.Clin.Invest*, **109**, 155-160.
- Dustin,M.L. & Chan,A.C. (2000) Signaling takes shape in the immune system. *Cell*, **103**, 283-294.
- Dustin,M.L. & Cooper,J.A. (2000) The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat.Immunol.*, **1**, 23-29.
- Dustin,M.L. & Shaw,A.S. (1999) Costimulation: building an immunological synapse. *Science*, **283**, 649-650.
- Edidin,M. (2001) Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.*, **11**, 492-496.
- Erdei,A., Gergely,J., Rajnavölgyi,É., László,G., & Sármay,G. (1998) *Imunbiológia*, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest.

- Fahmy,T.M., Bieler,J.G., Edidin,M., & Schneck,J.P. (2001) Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity*, **14**, 135-143.
- Fleisher,T.A., Dorman,S.E., Anderson,J.A., Vail,M., Brown,M.R., & Holland,S.M. (1999) Detection of intracellular phosphorylated STAT-1 by flow cytometry. *Clin Immunol*, **90**, 425-430.
- Gadella,T.W., Jr. & Jovin,T.M. (1995) Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J.Cell Biol.*, **129**, 1543-1558.
- Germain,R.N. (1994) MHC dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, **76**, 287-299.
- Gheber,L.A. & Edidin,M. (1999) A model for membrane patchiness: lateral diffusion in the presence of barriers and vesicle traffic. *Biophys.J.*, **77**, 3163-3175.
- Goldstein,B., Jones,D., Kevrekidis,I.G., & Perelson,A.S. (1992) Evidence for p55-p75 heterodimers in the absence of IL-2 from Scatchard plot analysis. *Int.Immunol.*, **4**, 23-32.
- Grakoui,A., Bromley,S.K., Sumen,C., Davis,M.M., Shaw,A.S., Allen,P.M., & Dustin,M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, **285**, 221-227.
- Grant,A.J., Roessler,E., Ju,G., Tsudo,M., Sugamura,K., & Waldmann,T.A. (1992) The interleukin 2 receptor (IL-2R): the IL-2R alpha subunit alters the function of the IL-2R beta subunit to enhance IL-2 binding and signaling by mechanisms that do not require binding of IL-2 to IL-2R alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2165-2169.
- Harder,T., Scheiffele,P., Verkade,P., & Simons,K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J.Cell Biol.*, **141**, 929-942.
- Harel-Bellan,A., Krief,P., Rimsky,L., Farrar,W.L., & Mishal,Z. (1990) Flow cytometry resonance energy transfer suggests an association between low-affinity interleukin 2 binding sites and HLA class I molecules. *Biochem J*, **268**, 35-40.
- Hauser T.A., Malyguine A.M., & Dawson J.R. (1998) Conformation dependence of MHC class I in the modulation of target cell sensitivity to natural killing. *Hum Immunol*, **59**, 71-76.
- Hemar,A., Subtil,A., Lieb,M., Morelon,E., Hellio,R., & Dautry-Varsat,A. (1995) Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *J Cell Biol*, **129**, 55-64.
- Hoessli,D.C., Poincelet,M., & Rungger-Brandle,E. (1990) Isolation of high-affinity murine interleukin 2 receptors as detergent-resistant membrane complexes. *Eur J Immunol*, **20** , 1497-1503.
- Holowka,D. & Baird,B. (2001) Fc(epsilon)RI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. *Semin.Immunol.*, **13**, 99-105.

- Hooper,N.M. (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol.Membr.Biol.*, **16**, 145-156.
- Horejsi,V., Drbal,K., Cebecauer,M., Cerny,J., Brdicka,T., Angelisova,P., & Stockinger,H. (1999) GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today*, **20**, 356-361.
- Huby,R.D., Dearman,R.J., & Kimber,I. (1999) Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J.Biol.Chem.*, **274**, 22591-22596.
- Iezzi,G., Karjalainen,K., & Lanzavecchia,A. (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity.*, **8**, 89-95.
- Ikonen,E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 470-477.
- Ilangumaran,S., Arni,S., van Echten-Deckert,G., Borisch,B., & Hoessli,D.C. (1999) Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell*, **10**, 891-905.
- Jacobson,K. & Dietrich,C. (1999) Looking at lipid rafts? *Trends in Cell Biol*, **9**, 87-91.
- Janes,P.W., Ley,S.C., Magee,A.I., & Kabouridis,P.S. (2000) The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin.Immunol.*, **12**, 23-34.
- Janeway,C.A. & Travers,P. (1997) *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 3rd edn, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc, London, San Francisco, New York.
- Jenei,A., Varga,S., Bene,L., Mátyus,L., Bodnár,A., Bacsó,Z., Pieri,C., Gaspar,R.J., Farkas,T., & Damjanovich,S. (1997) 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*, **94**, 7269-7274.
- Johnston,J.A., Bacon,C.M., Finbloom,D.S., Rees,R.C., Kaplan,D., Shibuya,K., Ortaldo,J.R., Gupta,S., Chen,Y.Q., & Giri,J.D. (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8705-8709.
- Jovin,T.M. & Arndt-Jovin,D.J. (1989) FRET microscopy: Digital imaging of fluorescence resonance energy transfer. Applications in cell biology. Cell structure and function by microspectrofluorimetry (ed. by E. Kohen & J. G. Hirschberg), pp. 99-115. Academic Press, San Diego CA.
- Kondo,S., Shimizu,A., Saito,Y., Kinoshita,M., & Honjo,T. (1986) Molecular basis for two different affinity states of the interleukin 2 receptor: affinity conversion model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9026-9029.
- Krummel,M.F. & Davis,M.M. (2002) Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol*, **14**, 66-74.

- Kusumi,A. & Sako,Y. (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 566-574.
- Lagaudriere-Gesbert C, Lebel-Binay S, Wiertz E, Ploegh HL, Fradelizi D, & Conjeaud H (1997) The tetraspanin protein CD82 associates with both free HLA class I heavy chain and heterodimeric beta 2-microglobulin complexes. *J Immunol*, **158**, 2790-2797.
- Langlet,C., Bernard,A.M., Drevot,P., & He,H.T. (2000) Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol*, **12**, 250-255.
- Leonard,W.J. & O'Shea,J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, **16**, 293-322.
- Lin,J.X. & Leonard,W.J. (1997) Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev*, **8**, 313-332.
- Lin,J.X. & Leonard,W.J. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, **19**, 2566-2576.
- Little,A.M., Nossner,E., & Parham,P. (1995) Dissociation of beta 2-microglobulin from HLA class I heavy chains correlates with acquisition of epitopes in the cytoplasmic tail. *J.Immunol.*, **154**, 5205-5215.
- Madden,D.R. (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu.Rev.Immunol.*, **13**, 587-622.
- Madrigal,J., Belich,M., Benjamin,R., Little,A., Hildebrand,W., Mann,D., & Parham,P. (1991) Molecular definition of a polymorphic antigen (LA45) of free HLA-A and-B heavy chains found on the surfaces of activated B and T cells. *J Exp Med*, **174**, 1085.
- Marmor,M.D., Bachmann,M.F., Ohashi,P.S., Malek,T.R., & Julius,M. (1999) Immobilization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins inhibits T cell growth but not function. *Int Immunol*, **11**, 1381-1393.
- Marmor,M.D. & Julius,M. (2001) Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood*, **98**, 1489-1497.
- Marozzi,A., Meneveri,R., Bunone,G., De Santis,C., Lopalco,L., Beretta,A., Agresti,A., Siccardi,A., Della Valle,G., & Ginelli,E. (1993) Expression of beta 2m-free HLA class I heavy chains in neuroblastoma cell lines. *Scand J Immunol*, **37**, 661-667.
- Matkó,J., Bushkin,Y., Wei,T., & Edidin,M. (1994) Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J Immunol*, **152**, 3353-3360.
- Matkó,J. & Edidin,M. (1997) Energy transfer methods for detecting molecular clusters on cell surfaces. *Methods Enzymol.*, **278**, 444-462.
- Mátyus,L., Bene,L., Heiligen,H., Rausch,J., & Damjanovich,S. (1995) Distinct association of transferrin receptor with HLA class I molecules on HUT-102B and JY cells. *Immunol Lett*, **44**, 203-208.

- Melkonian,K.A., Ostermeyer,A.G., Chen,J.Z., Roth,M.G., & Brown,D.A. (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J.Biol.Chem.*, **274**, 3910-3917.
- Monks,C., Freiberg,B., Kupfer,H., Sciaky,N., & Kupfer,A. (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**, 82-86.
- Moran,M. & Miceli,M.C. (1998) Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity*, **9**, 787-796.
- Morris,J.C. & Waldmann,T.A. (2000) Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann Rheum Dis*, **59 Suppl 1**, i109-i114.
- Muller,C.P. & Krueger,G.R. (1986) Modulation of membrane proteins by vertical phase separation and membrane lipid fluidity. Basis for a new approach to tumor immunotherapy. *Anticancer Res.*, **6**, 1181-1193.
- Muller,C.P., Stephany,D.A., Shinitzky,M., & Wunderlich,J.R. (1983) Changes in cell-surface expression of MHC and Thy-1.2 determinants following treatment with lipid modulating agents. *J.Immunol.*, **131**, 1356-1362.
- Nagy,P., Jenei,A., Kirsch,A.K., Szöllösi,J., Damjanovich,S., & Jovin,T.M. (1999) Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J Cell Sci*, **112 (Pt 11)**, 1733-1741.
- Nagy,P., Mátyus,L., Jenei,A., Panyi,G., Varga,S., Matkó,J., Szöllösi,J., Gaspar,R., Jovin,T.M., & Damjanovich,S. (2001) Cell fusion experiments reveal distinctly different association characteristics of cell-surface receptors. *J Cell Sci*, **114**, 4063-4071.
- Nagy,P., Vámosi,G., Bodnár,A., Lockett,S.J., & Szöllösi,J. (1998) Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy. *Eur.Biophys.J.*, **27**, 377-389.
- Nakamura,Y., Russell,S.M., Mess,S.A., Friedmann,M., Erdos,M., Francois,C., Jacques,Y., Adelstein,S., & Leonard,W.J. (1994) Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*, **369**, 330-333.
- Nelson,B.H. & Willerford,D.M. (1998) Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol*, **70**, 1-81.
- Ostermeyer,A.G., Beckrich,B.T., Ivarson,K.A., Grove,K.E., & Brown,D.A. (1999) Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. *J Biol Chem*, **274**, 34459-34466.
- Otten,G., Bikoff,E., Ribaud,K., Kozlowski,S., Margulies,D., & Ghio M (1992) Peptide and β 2-microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression. *J Immunol*, **148**, 3723.
- Perosa,F., Luccarelli,G., Prete,M., Ferrone,S., & Dammacco,F. (1999) Increased serum levels of beta2m-free HLA class I heavy chain in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.*, **106**, 987-994.

- Pickl,W., Holter,W., Stöckl,J., Majdic,O., & Knapp,W. (1996) Expression of LA45 reactive β 2-microglobulin free HLA class I α -chains on activated T cells is regulated by internalization, constitutive and protein kinase C inducible release. *Tissue Antigens*, **48**, 15-21.
- Pickl,W., Holter,W., Stöckl,J., Majdic,O., & Knapp,W. (1998) Expression of β 2-microglobulin-free HLA class I α -chain on activated T cells requires internalization of HLA class I heterodimers. *Immunology*, **88**, 104-109.
- Pralle,A., Keller,P., Florin,E.-L., Simons,K., & Hörber,J.K.H. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol*, **148**, 997-1007.
- Puppo,F., Brenci,S., Contini,P., Bignardi,D., Hamby,C.V., Filaci,G., Ghio,M., Scudeletti,M., Picciotto,A., Indiveri,F., & Ferrone,S. (2000) Increased beta2-microglobulin-free HLA class I heavy chain serum levels in the course of immune responses to viral antigens and to mismatched HLA antigens. *Tissue Antigens*, **55**, 333-341.
- Ramalingam,T.S., Chakrabarti,A., & Edidin,M. (1997) Interaction of class I human leukocyte antigen (HLA-I) molecules with insulin receptors and its effect on the insulin-signaling cascade. *Mol Biol Cell*, **8**, 2463-2474.
- Reiland,J. & Edidin,M. (1993) Chemical cross-linking detects association of insulin receptors with four different class I human leukocyte antigen molecules on cell surfaces. *Diabetes*, **42**, 619-625.
- Rock,K., Gamble,S., Rothstein,L., Gramm,C., & Benacerraf,B. (1991) Dissociation of β 2-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell*, **65**, 611.
- Roessler,E., Grant,A., Ju,G., Tsudo,M., Sugamura,K., & Waldmann,T.A. (1994) Cooperative interactions between the interleukin 2 receptor alpha and beta chains alter the interleukin 2-binding affinity of the receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3344-3347.
- Roozemon,R.C. & Bonavida,B. (1985) Effect of altered membrane fluidity on NK cell-mediated cytotoxicity. I. Selective inhibition of the recognition or post recognition events in the cytolytic pathway of NK cells. *J.Immunol.*, **134**, 2209-2214.
- Saragovi,H. & Malek,T.R. (1988) Direct identification of the murine IL-2 receptor p55-p75 heterodimer in the absence of IL-2. *J.Immunol.*, **141**, 476-482.
- Schnabl,E., Stockinger,H., Majdic,O., Gaugitsch,H., Lindley,J., Maurer,D., Hajek-Rosenmayr,A., & Knapp,W. (1990) Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with β 2-microglobulin. *J Exp Med*, **171**, 1431.
- Schreiber,A., Schlessinger,J., & Edidin,M. (1984) Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells. *J Cell Biol*, **98**, 725.

- Schutz,G.J., Kada,G., Pastushenko,V.P., & Schindler,H. (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.*, **19**, 892-901.
- Sedwick,C.E. & Altman,A. (2002) Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. *Sci.STKE.*, **2002**, RE2.
- Selvin,P.R. (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat.Struct.Biol.*, **7**, 730-734.
- Seong,R.H., Clayberger,C.A., Krensky,A.M., & Parnes,J.R. (1988) Rescue of Daudi cell HLA expression by transfection of the mouse β_2 -microglobulin gene. *J Exp Med*, **167**, 288-299.
- Sharon,M., Gnarr,J., Baniyash,M., & Leonard,W. (1988) Possible association between IL-2 receptors and class I HLA molecules on T cells. *J Immunol*, **141**, 3512.
- Sheets,E.D., Holowka,D., & Baird,B. (1999) Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 95-99.
- Sheets,E.D., Lee,G.M., Simson,R., & Jacobson,K. (1997) Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry*, **36**, 12449-12458.
- Shinitzky,M. & Henkart,P. (1979) Fluidity of cell membranes--current concepts and trends. *Int.Rev.Cytol.*, **60**, 121-147.
- Simons,K. & Ikonen,E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Smith,P., Morrison,I., Wilson,K., Fernandez,N., & Cherry,R. (1999) Anomalous diffusion of major histocompatibility complex class I molecules on HeLa cells determined by single particle tracking. *Biophys J*, **76**, 3331-3344.
- Stryer,L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu.Rev.Biochem.*, **47**, 819-846.
- Suzuki,K., Sterba,R.E., & Sheetz,M.P. (2000) Outer membrane monolayer domains from two-dimensional surface scanning resistance measurements. *Biophys.J.*, **79**, 448-459.
- Szekeres-Bartho,J., Nemeth,A., Varga,P., Csernus,V., Koszegi,T., & Paal,M. (1989) Membrane fluidity of trophoblast cells and susceptibility to natural cytotoxicity. *Am.J.Reprod.Immunol.*, **19**, 92-98.
- Szöllősi,J. (1994) Fluidity/viscosity of biological membranes. Mobility and proximity in biological membranes (ed. by S. Damjanovich, M. Edidin, J. Szöllősi, & L. Trón), pp. 137-208. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Szöllősi,J., Damjanovich,S., Balazs,M., Nagy,P., Trón,L., Fulwyler,M.J., & Brodsky,F.M. (1989) Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. *J Immunol*, **143**, 208-213.

- Szöllősi,J., Damjanovich,S., & Mátyus,L. (1998) Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry*, **34**, 159-179.
- Szöllősi,J., Horejsi,V., Bene,L., Angelisova,P., & Damjanovich,S. (1996) 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*, **157**, 2939-2946.
- Szöllősi,J., Trón,L., Damjanovich,S., Helliwell,S.H., Arndt-Jovin,D., & Jovin,T.M. (1984) Fluorescence energy transfer measurements on cell surfaces: a critical comparison of steady-state fluorimetric and flow cytometric methods. *Cytometry*, **5**, 210-216.
- Testi,R., D'Ambrosio,D., De Maria,R., & Santoni,A. (1994) The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, **15**, 479-483.
- Thor,G., Sepulveda,H., Chada,S., & Dutton,R.W. (1993) Monoclonal antibody that distinguishes between a phosphorylated, beta 2-microglobulin-associated, and a free, nonphosphorylated, chain of MHC class I. *J.Immunol.*, **151**, 211-224.
- Townsend,A., Elliott,T., Cerundolo,V., Foster,L., Barber,B., & Tse,A. (1990) Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell*, **62**, 285-295.
- Townsend,A., Öhlen,C., Bastin,J., Ljunggren,H.-G., Foster,L., & Kärre,K. (1989) Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*, **340**, 443-448.
- Trón,L. (1994) Experimental methods to measure fluorescence resonance energy transfer processes. Mobility and proximity in biological membranes (ed. by S. Damjanovich, M. Edidin, J. Szöllősi, & L. Trón), pp. 1-47. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Trón,L., Szöllősi,J., Damjanovich,S., Helliwell,S.H., Arndt-Jovin,D.J., & Jovin,T.M. (1984) 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*, **45**, 939-946.
- Tscherning,T. & Claësson,M.H. (1994) Signal transduction via MHC class-I molecules in T cells. *Scand J Immunol*, **39**, 117-121.
- Vainio,S., Heino,S., Mansson,J.E., Fredman,P., Kuismanen,E., Vaarala,O., & Ikonen,E. (2002) Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Rep.*, **3**, 95-100.
- Valitutti,S., Muller,S., Cella,M., Padovan,E., & Lanzavecchia,A. (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*, **375**, 148-151.
- Varma,R. & Mayor,S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, **394**, 798-801.
- Vereb,G., Matkó,J., Vámosi,G., Ibrahim,S.M., Magyar,E., Varga,S., Szöllősi,J., Jenei,A., Gaspar,R.J., Waldmann,T.A., & Damjanovich,S. (2000) 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*, **97**, 6013-6018.

- Waldmann,T.A. (1991) The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem*, **266**, 2681-2684.
- Waldmann,T.A., Levy,R., & Coller,B.S. (2000) Emerging therapies: spectrum of applications of monoclonal antibody therapy. *Hematology*, 394-408.
- Williams,D., Barber,B., Flavell,R., & Allen,H. (1989) Role of β 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. *J Immunol*, **142**, 2796.
- Xavier,R. & Seed,B. (1999) Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol*, **11**, 265-269.

9. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Bodnár A.**, Jenei A., Bene L., Damjanovich S., Matkó J.: 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: 221-226.
2. *Matkó J., ***Bodnár A.**, Vereb G., Bene L., Vámosi G., Szentesi G., Szöllősi J., Gáspár R. Jr., Horejsi V., Waldmann T. A. and 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.
*Matkó J. és Bodnár A. megosztott első szerzők.
3. **Bodnár A.**, Kwik J., Bacsó Z., Jenei A., Jovin T. M., Edidin M., Damjanovich S. and Matkó J.: Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous β 2-microglobulin: implications in activation of cytotoxic effector T cells. 2002 (közlésre beküldve)

Egyéb közlemények:

1. Damjanovich S., Vámosi G., **Bodnár A.** and Bene L.: New trends in studying structure and function of biological membranes. (review) *Acta Physiol. Hung.* 2002, 89: 415-425.
2. Penyige A., Matkó J., Deák E., **Bodnár A.** and Barabás G.: Depolarization of the membrane potential by beta-lactams as a signal to induce autolysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002, 290: 1169-1175.
3. Dornan S., Sebestyén Z., Gamble J., Nagy P., **Bodnár A.**, Alldridge L., Doe S., Holmes N., Goff L. K., Beverley P., Szöllősi J. and Alexander D. R.: Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 1912-1918.
4. Pfeiffer A., Bottcher A., Orsó E., Kapinsky M., Nagy P., **Bodnár A.**, Spreitzer I., Liebisch G., Drobnik W., Gempel K., Horn M., Holmer S., Hartung T., Multhoff G., Schutz G., Schindler H., Ulmer A. J., Heine H., Stelter F., Schutt C., Rothe G., Szöllősi J., Damjanovich S. and Schmitz G.: Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur. J. Immunol.* 2001, 31: 3153-3164.
5. Nagy P., Vámosi G., **Bodnár A.**, Lockett S. J., Szöllősi J.: Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy. *Eur. Biophys. J.* 1998, 27: 377-389.
6. Salga P., **Bodnár A.**, Damjanovich S. and Mátyus L.: Distance calibration of fluorescence energy transfer values on cell surfaces. *SPIE*, 1998, 3261: 244- 249.

7. Matkó J., Vereb G. and **Bodnár A.**: Lipid and protein mobility in the plasma membrane of cells: studies by fluorescence anisotropy and fluorescence photobleaching recovery (FPR). In: Practical guide to physical analysis of cell surface receptors. (ed. Krasznai Z. and Mátyus L.) Debrecen, 1998, pp. 92-109.
8. Jenei A., Varga S., Bene L., Mátyus L., **Bodnár A.**, Bacsó Z., Pieri C., Gáspár R. jr, Farkas T. and Damjanovich S.: HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 7269-7274.
9. Bacsó Z., Bene L., **Bodnár A.**, Matkó J. and Damjanovich S.: A photobleaching energy transfer analysis of CD8/MHC-I and LFA-1/ICAM-1 interactions in CTL-target cell conjugates. *Immunol. Lett.* 1996, 54: 151-156.
10. Matkó J., Mátyus L., Szöllősi J., Bene L., Jenei A., Nagy P., **Bodnár A.** and Damjanovich S.: Analysis of cell surface molecular distributions and cellular signaling by flow cytometry. *J. Fluoresc.* 1994, 4: 303-314.