

ZÁRÓJELENTÉS

A pályázat címe: Az MHC I. sejtfelszíni szerveződése

OTKA ny. sz.: T43509

Témavezető: Dr. Mátyus László

Magyar nyelvű összefoglalás

A pályázat keretében tanulmányoztuk a T limfociták sejtfelszíni fehérjeinek eloszlását. Megállapítottuk, hogy a Kv1.3 K⁺ csatornák és a T sejt receptor integráns részét képző CD3 molekulák átfedő membrán doménekben helyezkednek el. Konfokális mikroszkópos eredményeinket áramlási citometriás energia transzfer mérésekkel is megerősítettük. Felismertük, hogy a CTL-target sejt kölcsönhatás során a Kv1.3 K⁺ csatornák az immunológiai szinapszisban feldúsulnak.

Megalkottuk az IL-2/IL-15R rendszer dinamikus heterotetramer modelljét: a citokin kötődése az alegységek konformációjának/közelségének megváltoztatásával kialakítja a megfelelő nagy affinitású $\alpha\beta\gamma_c$ heterotrimert.

Fluoreszcenciás festékek és arany nanorészecskék közti energia transzferen alapuló távolságmérő módszert dolgoztunk ki. Energia transzfer mérések hatékony végzésére számítógépes programokat hoztunk létre, melyek működését számos rendszeren teszteltük.

Angol nyelvű összefoglalás

In the frame of the project we studied the distribution of cell surface proteins of T lymphocytes. We proved that the Kv1.3 K⁺ channels are located in the same membrane domains as the CD3 molecules which are part of the T cell receptor. Confocal microscopic data were in good agreement with those of the flow cytometric energy transfer measurements. We showed that the Kv1.3 K⁺ channels are expressed at higher concentrations in the immunological synapse during CTL-target cell interaction.

We described the dynamic heterotetramer model of the IL-2/IL-15R system: the binding of the appropriate cytokine results in the formation of high-affinity $\alpha\beta\gamma_c$ heterotrimeric receptors.

We introduced a novel energy transfer method for measuring distances on the cell surfaces using fluorescent dyes and nanoparticles. We elaborated computer programs for determining energy transfer efficiencies and tested them on several biological systems.

Részletes jelentés

I. Receptor mintázatok a transzmembrán jelátvitel különböző szintjein

A pályázat fő célkitűzése a munkacsoportban már korábban folyó kutatások szerves folytatásaként új sejtfelszíni fehérje mintázatok azonosítása volt. Két fő területen tettünk jelentős előrelépést: a T limfociták feszültség vezérelt K^+ csatornája eloszlása és az interleukin-2 és -15 receptorok eloszlása vonatkozásában.

A T limfociták domináns, feszültség vezérelt K^+ csatornája, a Kv1.3 fontos szerepet tölt be a T sejt immunválasz kialakulásában. A Kv1.3 csatornák lokalizációját T sejtek plazma membránjában FLAG epitópot kódoló Kv1.3 csatorna gén alkalmazásával térképeztük fel. A FLAG epitóp klónozása a csatorna génbe lehetővé tette az expresszált csatornák antitestekkel történő specifikus jelölését. A csatornák membránbeli eloszlását kolloidális arannyal konjugált antitestek alkalmazását követően készített elektron mikroszkópos képek analízisével határoztuk meg. Eredményeink arra mutatnak rá, hogy a csatornák eloszlása a membránban nem véletlenszerű, karakterisztikus mintázatot mutat. Konfokális lézerpásztázó mikroszkópiás képeink azt mutatták, hogy a fluoreszcencián jelölt Kv1.3/FLAG csatornák és a T sejt receptor integráns részét képező CD3 molekulák átfedő membrán doménekben helyezkednek el, amit a keresztkorrelációs számítással is igazoltunk. A Kv1.3/FLAG és CD3 molekulák áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer méréseink szerint igen szoros kapcsolatban, molekuláris közelségben (2-10 nm) állnak egymással, amire a jelentős energia transzfer határfok utalt. (Panyi és mtsai, 2003)

A T sejtek aktivációja során a Kv1.3 expressziós szintje sokszorosára emelkedik, mely a proliferációhoz szükséges negatív membránpotenciál kialakulását eredményezi. Így a Kv1.3 funkciójában bekövetkező változások befolyásolhatják az immunválasz kialakulását. A FLAG epitópot kódoló Kv1.3 gén alkalmazásával kimutattuk a CTL-k Kv1.3 csatornáinak polarizált expresszióját a CTL-target sejt kölcsönhatás során: az esetek egy részében az immunológiai szinapszisban (IS) halmozódnak fel, máskor az IS-t övszerűen veszik körül. A kétfajta elrendeződés nagyon hasonlít az IS-t kialakító más molekuláknak az IS érése során tapasztalt dinamikus átrendeződésére. (Panyi és mtsai, 2004)

Az interleukin-2 és -15 receptor saját α alegységgel, de közös jelátvivő β és γ alegységekkel rendelkezik, így a két citokin a T sejtek működésében mind közös, mind egymással ellentétes funkciókat is ellát. Vizsgálataink célja az IL-2R és IL-15R alegységek sejtfelszíni eloszlásának és kölcsönhatásainak feltérképezése, a receptorok összeszerelődésének és végső soron az IL-2/IL-15 receptor-rendszerek jelátviteli folyamatainak, a két citokin közös és eltérő hatásainak hátterében álló ok-okozati összefüggéseknek a megértése. Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

- Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérésekkel kimutattuk, hogy a Kit225 FT7.10 humán T limfóma sejtek plazmamembránjában a magas affinitású IL-15R (IL-15R $\alpha\beta\gamma$) előre összeszerelt állapotban van jelen.
- Konfokális mikroszkópiás és FRET méréseink alapján az FT7.10 sejteken az IL-15R α és az IL-2R α közös membrán doménekben (ún. lipid tutajokban), egymás közvetlen molekuláris közelségében helyezkedik el.

- Kimutattuk az IL-15R α és a HLA I ill. HLA-DR molekulák lipid tutajokban megvalósuló molekuláris asszociációját.
- Fluoreszcencia kereszt-korrelációs mérésekkel igazoltuk az IL-15R α és az az IL-2R α ill a HLA I ko-mobilitását.
- Korábbi és jelen eredményeink alapján megalkottuk az IL-2/IL-15R rendszer dinamikus heterotetramer modelljét: a citokin kötődése az alegységek konformációjának/közelségének megváltoztatásával kialakítja a megfelelő nagy affinitású $\alpha\beta\gamma\epsilon$ heterotrimert. Az IL-2/IL-15R rendszer a HLA I és HLA-DR glikoproteinekkal (és az ICAM-1 adhéziós fehérjékkel) együtt receptor szuperklasztereket alkot a T sejtek speciális membrán mikrodoménjeiben (lipid tutajok). (Vámosi és mtsai 2004)

II. Membránfehérje-asszociátumok dinamikus tulajdonságainak jellemzése

A Singer-Nicolson-féle membránmodell értelmében a membránfehérjék szabadon mozognak a plazmamembránban. Az utóbbi néhány évben azonosított membránfehérje-asszociátumokról azonban nem ismert, hogy ezek a membrán egészéhez hasonlóan dinamikus viselkednek-e. Fluoreszcens képalkotó mikroszkópiás FRET illetve a nagyméretű asszociátumok vizsgálatára alkalmas közeli mező optikai mikroszkópia (NSOM) alkalmazásával tanulmányoztuk a sejtfelszíni fehérjemintázatok dinamikus sajátosságait különböző humán eredetű B illetve T limfóma sejtek felszínén. Fluoreszcens Fab fragmentummal jelölt sejteket fuzionáltattunk egymással, és nyomon követtük, hogy a kisméretű- (pl. dimerek), ill. nagyméretű fehérje asszociátumok képesek-e fehérje komponenseket cserélni egymással. A kisméretű asszociátumok újraozslását fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET), míg a nagyméretű asszociátumok (klaszterek) újraozslását közeli mező optikai mikroszkópia, konfokális és elektronmikroszkópia segítségével mértük. Eredményeink szerint a vizsgált membránfehérjék (MHC-I, MHC-II, CD48, transzferrin receptor, IL2R α) nagyméretű asszociátumai dinamikusak, tehát képesek egy másik hasonló membránfehérje asszociátummal fehérje komponenseket cserélni. A raft fehérje CD48 és a nem-raft fehérje transzferrin receptor klaszterek azonban nem keverednek egymással. A kisméretű asszociátumok esetében a legtöbb vizsgált fehérje asszociátumai dinamikus viselkedtek (MHC-I, CD48, transzferrin receptor, IL2R α), azonban az MHC-II kisméretű asszociátumai nem cseréltek fehérjét egymás között. Az asszociátumok közötti fehérjekicserélést nem lehetett az endocitózis-recirkuláció blokkolásával meggátolni. Eredményeink lehetővé teszik a transzmembrán jelátvitel és a T sejtek antigén felismerési folyamatai során lejátszóó nagyfokú membránfehérje-átrendeződések értelmezését. A nagyméretű klaszterizációra vonatkozó méréseket megismételtük kolloidális arannyal jelölt minták elektronmikroszkópos vizsgálatával is. Ezen kísérletek eredményei megerősítették, hogy a vizsgált molekulák nagyméretű asszociátumai dinamikus tulajdonságúak. (Vereb és mtsai, 2003)

III. Energiatranszfer mérések hatékony végzése

Intézetünkben két évtizede végzünk fluoreszcencia energia transzfer méréseket sejtfelszíni fehérjék távolság viszonyainak feltérképezésére. Számos olyan technikai újítást dolgoztunk ki, amelyek megkönnyítik a mérések elvégzését, vagy más elven is lehetővé teszik az energia transzfer hatékonyság meghatározását.

Az áramlási citométerrel történő energia transzfer mérés során sejtenként határozhatunk meg transzfer hatékonyság értéket. A meghatározáshoz három egymástól független adatra mért van szükség, melyekből a megfelelő matematikai eljárással kiszámítható a transzfer érték. Sem az adatok mennyisége, sem a matematikai formulák összetett mivolta nem teszi lehetővé az energia transzfer értékek meghatározását táblázat-adat kezelő szoftver segítségével. A mérés során nagyszámú sejttel dolgozunk, valamint a minta több egymástól eltérő tulajdonsággal rendelkező sejtpopulációt is tartalmazhat. Az egyes populációk a mért adatok alapján történő elkülönítéséhez szükség van egy grafikus felületre, amelyen a sejteken mért adatok alapján az egyes populációk elkülöníthetők. Kifejlesztettünk egy olyan szoftvert, mely a fent leírt problémákat orvosolja. A programot több sejtrendszeren is teszteltük. Eredményeinket és a program működésének leírását egy közleményben foglaltuk össze. (Szentesi és mtsai 2004)

Az áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérések előnye, hogy rövid idő alatt nagyszámú sejt vizsgálható, jó statisztikával, azonban ebben rejlik hátránya is, hiszen a nyerhető információ felbontása sejtszintű, azaz minden sejtről egy átlagos paraméterrel jellemezhető információ nyerhető. Amennyiben nagyobb felbontást kívánunk elérni az egyik lehetséges megoldás a fotonalványodáson alapuló rezonancia energiáttranszfer módszer (pbFRET), mely a FRET technika egyik mikroszkópos adaptációja.

Célunk volt az esetleges sejtfelszíni heterogenitások, mikrokolóniák tanulmányozása, a lehető legjobb felbontással kellett a fotonalványodási időállandókat meghatározni. Ez azt jelenti, hogy képpontonként (pixel) kellett a fotonalványodási időállandókat meghatározni. Egy kép általában 512x512 pixelből áll, azaz 262144 fotonalványodási görbét kell kétszeresen exponenciális görbével illeszteni. Ennek a feladatnak az elvégzése kereskedelmi forgalomban kapható programmal lehetetlen. Ezért létrehoztunk egy olyan szoftvert, mely alkalmas a pbFRET mérés során felvett képszekvenciák analizésére. Annak érdekében, hogy a szoftver független legyen a mérőműszer és a vele generált képfájlok típusától, a program csak a raw képformátumot támogatja, melyet minden kereskedelmi szoftver ismer. Továbbá olyan felülettel láttuk el, hogy alkalmas legyen több mérés képszekvenciáinak egymást követő automatikus analizésére, valamint az eredmények statisztikai feldolgozására. A méréseket Zeiss LSM 510 mikroszkópon végeztük el (lézerek: Ar ion lézer, 488 nm, donorgerjesztés; He-Ne lézer, 543 nm, akceptor gerjesztés). Minden mintáról négy képszekvenciát (mindegyiken 2-3 sejt, mintánként kb. 10 sejt) vettünk fel. Sejtenként, a sejt méretétől függően 600-1500 fotonalványodási időállandót határoztunk meg, amely azt jelenti, hogy mintánként átlagosan 6000 fotonalványodási időállandó értéket kaptunk. Az MHC I könnyű- és nehéz lánc közötti energia transzfer hatásfok mérésével demonstráltuk a módszer hatékonyságát. (Szentesi és mtsai 2005)

Nanorészecskék jelenlétében távolságfüggő módon megváltozik a fluoreszcens festékek számos spektroszkópiai sajátága. Olyan, a fluoreszcenciás festékek és arany nanorészecskék közti energia transzferen alapuló távolságmérő módszert dolgoztunk ki, mely lehetővé teszi a 10 nm-nél, azaz a hagyományos Förster típusú energia transzfer hatótávolságánál nagyobb távolságra lévő receptorok proximitás viszonyainak a vizsgálatát is. A sejtek oldalszórása a felkötődött aranyrészecskék miatt szintén növekedést mutat, ami felhasználható az arany nanorészecskék

kötődésének áramlási citométerrel történő gyors kvantitatív analízisére. Amellett, hogy a nanorészecske energia transzfer módszerünk lehetővé teszi a receptor asszociációk nagyobb távolság skálán történő vizsgálatát, a bioszenzorok fejlesztése területén is alkalmazásra kerülhet. (Bene és mtsai 2005)

Több könyvfejezetet is írtunk, amelyekben összefoglaltuk a sejtfelszíni fehérjék nem véletlenszerű eloszlásának a szerepét a membránon keresztüli jelátvitel folyamatában, (Bodnár és mtsai 2005) illetve technikai útmutatókat készítettünk a sejtfelszíni fehérjék közötti energia transzfer mérések kivitelezéséhez (Szöllősi és mtsai 2006, és Nagy és mtsai 2006).

Az eredmények hasznosítása

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, sejtttranszformáció stb.) molekuláris részleteinek megértését, így mind az alap kutatásban mind pedig a különféle betegségek diagnosztikájában illetve terápiájában jelentőséggel bírhat.

Közlemények:

1. Damjanovich, S., Gáspár Jr, R., Bene, L., Jenei, A. and **Mátyus, L.**: Signal transduction in T lymphocytes and aging. *Experimental Gerontology* **38** 230-236 (2003)
2. Panyi, G., Bagdány, M, Bodnár, A, Vámosi, G, Szentesi, G, Jenei, A, **Mátyus, L.**, Varga, S., Waldmann, T.A., Gáspár, R., Damjanovich, S.: Co-localization and non-random distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 2592-2597 (2003)
3. Vereb, G., Szöllősi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vígh, L., **Mátyus, L.**, Waldmann, T.A. and Damjanovich, S.: Dynamic, yet structured: the cell membrane 30 years after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 8053-8058 (2003)
4. Panyi, G., Vámosi, G., Bacsó, Z., Bagdány, M., Bodnár, A., Varga, Z., Gáspár, R., **Mátyus, L.**, Damjanovich, S.: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** 1285-1290 (2004)
5. Szentesi, G., Horváth, G., Bori, I., Vámosi, G., Szöllősi, J., Gáspár, R., Damjanovich, S., Jenei, A. and **Mátyus, L.**: Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comp. Meth. Prog. Biomed.* **75** 201-211 (2004)

6. Vámosi, G., Bodnár, A., Vereb, G., Jenei, A., Goldman, C.K., Langowski, J., Tóth, K., **Mátyus, L.**, Szöllősi, J., Waldmann, T.A., Damjanovich, S.: Interleukin-2 and -15 receptor alpha subunits are co-expressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T-cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 11082-11087 (2004)
7. Bene, L., Szentesi, G., **Mátyus, L.**, Gáspár, R. and Damjanovich, S.: Nanoparticle energy transfer on the cell surface.
J. Mol. Recognit. 18 236-253 (2005)
8. Bodnár, A., Vámosi, Gy., Tóth, K., Jenei, A., **Mátyus, L.**, Damjanovich, S.: Non-random patterns of membrane proteins and their roles in transmembrane signalling. in: Biophysical aspects of transmembrane signalling (Damjanovich, S. ed.) Springer Verlag, pp. 71-95 (2005)
9. Szentesi, G., Vereb, G., Horváth, G., Bodnár, A., Fábrián, Á., Matkó, J., Gáspár, R., Damjanovich, S., **Mátyus, L.**, Jenei, A.: Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series.
Cytometry 67A 119-128 (2005)
10. **Mátyus, L.**, Szöllősi, J., Jenei, A.: Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics.
J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 83 223-236 (2006)
11. Szöllősi, J., Damjanovich, S., Nagy P., Vereb, G., and **Mátyus, L.**: Principles of Resonance Energy Transfer.
Current Protocols in Cytometry 1.12.1-1.12.16 (2006)
12. Nagy P., Vereb, G., Damjanovich, S., **Mátyus, L.**, and Szöllősi, J.: Measuring FRET in flow cytometry and microscopy.
Current Protocols in Cytometry 12.8.1-12.8.13 (2006)