SZINTETIKUS PEPTIDEK ALKALMAZÁSA A TCR/CD3 ζ LÁNCA JELÁTVITELI FOLYAMATAINAK VIZSGÁLATÁRA ÉS AZ INFLUENZA VÍRUS HAEMAGGLUTININ IMMUNOLÓGIAI FELISMERÉSBEN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK TANULMÁNYOZÁSÁRA

Ph.D. értekezés tézisei

Váradi Györgyi

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem
Orvosi Vegytani Intézete
Szeged

SZINTETIKUS PEPTIDEK ALKALMAZÁSA A TCR/CD3 ζ LÁNCA JELÁTVITELI FOLYAMATAINAK VIZSGÁLATÁRA ÉS AZ INFLUENZA VÍRUS HAEMAGGLUTININ IMMUNOLÓGIAI FELISMERÉSBEN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK TANULMÁNYOZÁSÁRA

Ph.D. értekezés tézisei

Váradi Györgyi

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem
Orvosi Vegytani Intézete
Szeged

1999

BEVEZETÉS

A szervezet által idegennek felismert anyagok, az antigének elleni immunválasz nagyszámú sejt és fehérjemolekula szabályozott együttműködését jelenti. Az immunválasz egyik része, az ún. szerzett immunitás antigénspecifikus, így a tudományos kutatások elsősorban ennek megismerésére irányulnak. Sejtes elemei közül a T-sejtek, oldható faktorai közül pedig a B-sejtek által termelt antitestek játsszák a fő szerepet.

A T-sejtek antigénfelismerő része a T-sejt antigén receptor (TCR). Két típusa létezik. A legtöbb T-sejt felszínén TCR-2 található, amely egy α és β polipeptidlánc diszulfid híddal összekötött heterodimerje. A TCR-1 hasonló szerkezetű, de γ és δ láncokat tartalmaz. Mindkét receptor egy ezektől eltérő polipeptidláncokból (γ, δ, ε, ζ, η és ω) felépülő egységgel, a CD3 komplexszel asszociálva fordul elő a sejtek felszínén. A CD3 komplex az antigén megkötődés utáni jelátvitelért felelős. E folyamat kémiai alapja a γ és δ láncokban található szerin, valamint a ζ és η láncokban lévő tirozin oldalláncok foszforilációja, ill. defoszforilációja.

Vizsgálataink ezek közül a ζ lánc jelátvitelben betöltött szerepének tanulmányozására irányultak.

Korunk egyik népbetegsége az influenza. Az influenza vírus legfontosabb felszíni antigénje, az immunfelismerés fő célpontja a haemagglutinin nevű membránfehérje. Biológiai szerepe sokrétű: felelős a gazdasejt receptorához való kötődésért, közreműködésével játszódik le a vírus és a gazdasejt endoszomális membránjának fúziója. A haemagglutinin (HA) molekula prekurzor polipeptidlánccként szintetizálódik a gazdasejtben, majd az érési folyamat során HA1

és HA2 alegységekre hasad. A hasadás a 329-es pozícióban lévő arginin után játszódik le és gazdasejt proteázok végzik. A hasadás alapvető fontosságú a vírus fertőzőképessége szempontjából: következményeként megváltozik a HA molekula konformációja, ami HA trimerek újraképződését és az ún. fúziós peptid szabaddá válását indukálja. Ez a HA2 alegység N-terminális 14 aminosavából álló peptid felelős a vírus és a gazdasejt endoszomális membránjának fúziójáért. A fúzió eredményeként a vírus nukleinsav állománya bekerül a gazdasejt citoplazmájába, elindítva ezzel a fertőzés folyamatát és a vírus szaporodását.

Vizsgálataink a 329-es arginin környezetére, a hasadás antitest felismerésre gyakorolt hatására, a konformációváltozás szerepére irányultak.

EREDMÉNYEK

I. A jelátvitel vizsgálata a TCR/CD3 komplex ζ lánca esetében

A ζ-lánc affinitástisztításához szükséges monoklonális ellenanyag termeléséhez számítógépes program segítségével kiválasztottuk a ζ-lánc várhatóan legkedvezőbb tulajdonságú epitópját. Ezt és két hosszabbított változatát szilárd fázison, Boc-kémiával előállítottuk. A peptideket fehérje hordozóhoz (marha szérum albumin) kapcsoltuk. Mivel a konjugátumok ellen nyulakban termelődött ellenanyag egyik esetben sem ismerte fel a natív ζ-láncot, ezért elágazó szerkezetű antigéneket állítottunk elő az egyik említett peptidből. Az elsőként szintetizált oktamer MAP hasonló hatású volt a peptid-fehérje konjugátumokhoz. A térgátlást, amely felelős lehet a kedvezőtlen hatásért, tetramer MAP előállításával próbáltuk csökkenteni. Elágazó szerkezetű antigénünkbe beépítettük az influenza vírus haemagglutinin

membránfehérjéje egy szakaszát, a HA alegységei kapcsolódásánál található ún. fúziós peptidet. E peptidről ismeretes, hogy jó T-sejt epitóp és hidrofób tulajdonsága révén konformáció stabilizáló hatással rendelkezik. Az így szintetizált antigén ellen termelt ellenanyag 50%-nál nagyobb gátló hatást mutatott ζ-peptid mint inhibitor alkalmazása esetén.

Az általunk kifejlesztett, fúziós peptid tartalmú tetramer konstrukciót későbbi kísérleteinkben is sikeresen alkalmaztuk. Felhasználásával három MAP-et szintetizáltunk a $p56^{lck}$, $p59^{fyn}$ és ZAP 70 kinázokat reprezentáló peptidekkel. Az elágazó szerkezetű antigénjeink ellen nyulakban termelt antitestek a $p56^{lck}$ és a ZAP 70 esetében nemcsak az immunizáló MAP-et, hanem a natív fehérje láncot is felismerték.

A ζ-lánc foszforilációjának tanulmányozásához 7 rövid peptidet szintetizáltunk a fehérje tirozinjainak környezetéből. A szintéziseket szilárd fázison, Boc-kémiával végeztük. Előállítottuk ezek foszforilált változatait is. Ez utóbbi esetben szilárd fázisú szintézist és Fmoc-kémiát alkalmaztunk. A szabad oldalláncú Fmoc-Tyr-OH beépítése után a fenolos hidroxil-csoportot di-terc.butil-N,N-dietil-foszforamidittel foszfitiláltuk, majd terc.butil-hidrogén-peroxiddal oxidáltuk. Ezután az N-terminális résszel befejeztük a peptid szintézisét.

A módszert mi alkalmaztuk először oldat fázisban. Ez olyan peptid esetén valósítható meg, amely a tirozin fenolos OH-ján kívül nem rendelkezik más reaktív funkciós csoporttal. Először a kész peptid szabad N-terminálisát Boc-csoporttal védtük, majd a foszfatálást a szilárd fázisúval analóg módon végeztük.

CD és FT-IR spektroszkópiával tanulmányoztuk a foszforiláció hatását a peptidek konformációjára. A vizsgálatok a β-szerkezetek arányának növekedését mutatták.

Immunológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a syk családba tartozó ZAP 70

nem képes foszforilálni egyik tirozint sem. A két src családba tartozó kináz, a $p56^{lck}$ és a $p59^{fyn}$ azon hat peptidet foszforilálta, amelyekben a tirozin konzervatív ITAM motívumban fordul elő. (Ez két közeli Y..L vagy Y..I elemet jelent.) Egyik sem foszforilálta az ezen a motívumon kívül elhelyezkedő Tyr^{61}-et. A foszforiláció intenzitása a két kináz esetén eltérő volt. További vizsgálatok igazolták, hogy a CD45 transzmembrán tirozin foszfatáz képes defoszforilálni az említett foszfopeptideket. Ezek alapján elmondható, hogy a ζ-lánc foszforilációjáért a $p56^{lck}$ és a $p59^{fyn}$, defoszforilációjáért pedig a CD45 lehet a felelős.

Új eljárást dolgoztunk ki egy savérzékeny, így foszfopeptidek szintézisére is használható polimer, a Rink-féle 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoximetil-polisztirol előállítására. Módszerünk lényege, hogy először a kész linkert állítjuk elő és ezt kapcsoljuk polimerre. Optimalizáltuk a szintézis lépései közt szereplő redukció reakciókörülményeit, és az eredeti eljárás szerinti drága cézium-karbonátot a megfelelő kálium-sóval helyettesítettük.

II. Az influenza vírus haemagglutinin immunológiai felismerésben betöltött szerepének tanulmányozása

Az influenza vírus haemagglutinin hasítási helyének környezetéből hat peptidet szintetizáltunk. Egy 25 aminosavból álló peptid az ép haemagglutinin molekulát jelképezte (H1IP). Előállítottuk ennek $D\text{-}Arg^{329}$-es változatát. Szintetizáltuk a HA2 alegység N-terminális részét, az ún. fúziós peptidet argininnel és anélkül az N– és C-terminálisain. Továbbá elkészítettünk egy, a HA1 alegység C-terminálisát reprezentáló peptidet ($H1_{317\text{-}329}$).

A peptideket szilárd fázisú szintézissel, Boc-kémiával állítottuk elő.

Vizsgálva szintetikus peptidjeink és influenza vírussal fertőzött egérből nyert monoklonális ellenanyag reaktivitását kiderült, hogy a HA1 alegység C-terminális részén, (a 317-329-es szakaszon), B-sejt epitóp található. Hasonló vizsgálatok történtek peptidjeinkkel termelt antitestekkel is. Ezen antitestek reagáltak H1IP-vel és D-Arg-analógjával, de nem ismerték fel $H1_{317-329}$-et. A kísérletek eredményei T-sejt epitóp jelenlétét mutatják a haemagglutinin e szakaszán és azt jelzik, hogy a fúziós peptid létfontosságú az antitest felismeréshez.

CD és FT-IR vizsgálatok változó másodlagos szerkezetet mutattak peptidjeink esetében. Ez arra utal, hogy a HA1 és HA2 alegységek különböző konformációt vehetnek fel vizes oldatban, így célpontjai lehetnek mind B-, mind T-sejtek általi felismerésnek.

Előállítottuk a $H1_{317-329}$ arginin nélküli változatát ($H1_{317-328}$) is. Nem tapasztaltunk különbséget a peptidek T-sejtek általi felismerése között. Eredményünk összhangban van azzal a ténnyel, hogy a 329-es arginin fiziológiás körülmények között lehasad egy gazdasejtből származó karboxipeptidáz hatására.

További öt peptidet szintetizáltunk annak érdekében, hogy lokalizáljuk a T-sejt epitópot a HA1 C-terminális részén. Ezek a $H1_{317-328}$ néhány aminosavval rövidített változatai voltak. Egyikük sem rendelkezett T-sejt aktiváló hatással, így megállapítható, hogy a keresett epitóp a HA1 alegység 317-328-as szakasza.

Peptidjeink immunogenitásának növelése érdekében előállítottunk két elágazó antigént. A MAP-6 a $H1_{317-329}$ tetramerje volt, a MAP-7 ettől abban különbözött, hogy tartalmazta a fúziós peptidet is.

A MAP-6 - a $H1_{317-329}$-cel összehasonlítva - megnövekedett reaktivitást mutatott a már említett, influenza vírussal fertőzött egérből nyert monoklonális ellenanyaggal szemben. Túlélési kísérletben a MAP-6 20%-kal nagyobb védettséget idézett elő a H1IP-nél egerekben, ötszörös letális dózisú influenza vírussal szemben.

(A halálozási arány a MAP-6 esetén 60%, a H1IP-nél 80% volt.)

A fúziós peptidet is tartalmazó MAP-7 még kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezett. Az ellene termelődött ellenanyag nemcsak ismételt MAP-7 kezelés után volt kimutatható, hanem újabb vírus támadás után is megtalálható volt minden túlélőben. A MAP-7-tel immunizált egerek 60%-a teljes védettségre tett szert ötszörös letális dózisú influenza vírussal szemben. Ez az arány a $H1_{317-329}$ esetén 40% volt.

CD és FT-IR spektroszkópiás vizsgálatok mindkét elágazó polipeptid esetén alacsony - 20% körüli - α-hélix tartalmat mutattak. Mindkettő felvehet ezenkívül hidrogén kötésekkel stabilizált, tíztagú, β-turn-szerű konformációt is, melyekben a lizinek α-amid- és ε-amino-csoportjai szerepelnek mint hidrogén-kötés akceptorok ill. donorok.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a SZOTE Orvosi Vegytani Intézetéből témavezetőmnek, **Dr. Tóth Gábor**nak munkám irányításáért, elméleti és gyakorlati segítségéért, hasznos tanácsaiért, **Prof. Dr. Penke Botond**nak azért, hogy lehetőséget biztosított az általa vezetett Intézetben disszertációm elkészítésére és munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, **Ferenci Richárd**nak a peptidek hidrogén-fluoridos hasításának kivitelezéséért és a disszertáció ábráinak elkészítésében nyújtott segítségéért, **Dr. Janáky Tamás**nak az aminosav analízisek elvégzéséért, **Dósai Molnár Évá**nak és **Nagy Katalin**nak a kísérleti munkában nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Mák Mariann**ak a Központi Kémiai Kutatóintézetből a

tömegspektrometriás és **Prof. Dr. Dombi Györgynek** a SZOTE Gyógyszerésztudományi Karáról az NMR vizsgálatok elvégzését.

Köszönettel tartozom **Dr. Monostori Évának** és **Dr. Hegedűs Zoltánnak**, az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete munkatársainak és **Dr. Rajnavölgyi Évának** és **Dr. Nagy Zoltánnak**, az ELTE Immunológiai Tanszéke dolgozóinak az immunológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Megköszönöm **Prof. Dr. Hollósi Miklósnak** és munkatársainak peptidjeink konformációs vizsgálatát.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Hollósi, M., Ismail, A. A., Mantsch, H. H., Penke, B., **Váradi, G.**: Conformational and Functional Properties of Peptides Covering the Intersubunit Region of Influenza Virus Hemagglutinin, *Eur. J. Biochem.* **206**, 421-425 (1992)

2. Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Nagy, Z., Monostori, É., Penke, B., Hegedűs, Z., Andó, I., Fazekas, G., Kurucz, I., Mák, M., Rajnavölgyi, É.: Branched Polypeptides as Antigens for Influenza Virus Hemagglutinin and T-Cell Receptor Subunits, *Peptide Research* **6**, 272-280 (1993)

3. Holly, S., Majer, Z., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Rajnavölgyi, É., Laczkó, I., Hollósi, M.: Circular Dichroism and Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Studies on T-Cell Epitopic Peptide Fragments of Influenza Virus Hemagglutinin, *BBRC* **193**, 1247-1254 (1993)

4. **Váradi, G.**, Tóth, G. K., Penke, B.: A New Synthesis of Rink's Polymer, 4-(2',4'-Dimethoxyphenylhydroxymethyl)phenoxymethylpolystyrene, *Int. J. of Peptide and Protein Res.* **43**, 29-30 (1994)

5. Nagy, Z., Rajnavölgyi, É., Hollósi, M., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Penke, B., Tóth, I., Horváth, A., Gergely, J., Kurucz, I.: The Intersubunit Region of the Influenza Virus Haemagglutinin is Recognized by Antibodies During Infection, *Scand. J. Immunol.* **40**, 281-291 (1994)

6. Rajnavölgyi, É., Nagy, Z., Kurucz, I., Gogolák, P., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Penke, B., Tigyi, Z., Hollósi, M., Gergely, J.: T Cell Recognition of the Posttranslationally Cleaved Intersubunit Region of Influenza Virus Hemagglutinin, *Mol. Immunol.* **31**, 1403-1414 (1994)

7. Hegedűs, Z., Andó, I., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Monostori, É.: Application of Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Analysis of Oligopeptide Phosphorylation *In Vitro*, *BioTechniques* **18**, 3-4 (1995)

8. Majer, Z., Holly, S., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Nagy, Z., Horváth, A., Rajnavölgyi, É., Laczkó, I., Hollósi, M.: Mapping the Intersubunit Region of Influenza Virus Hemagglutinin: Comparative CD and FTIR Spectroscopic Studies on Multiple Antigenic Peptides, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **322**, 112-118 (1995)

9. Hegedűs, Z., Chitu, V., Tóth, G. K., Finta, C., **Váradi, G.**, Andó, I., Monostori, É.: Contribution of Kinases and the CD45 Phosphatase to the Generation of Tyrosine Phosphorylation Patterns in the T-Cell Receptor Complex ζ Chain, *Immunology Letters* **67**, 31-39 (1999)

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. Tóth K. G., **Váradi Gy.**, Penke B., Gibbons, W. A.: HIV-1 Aszpartil proteáz kémiai szintézise szilárd fázison, fragmens-kondenzációval, *Magyar Endokrin és Anyagcsere Társaság Kongresszusa* (Szeged, 1990. augusztus)

2. **Váradi Gy.**, Tóth K. G., Rajnavölgyi É., Penke B.: Az influenza vírus hemagglutinin membrán fehérjéje fragmenseinek szintézise és kémiai, valamint immunológiai jellemzése, *MKE Csongrád Megyei Csoport Előadói Napok* (Szeged, 1990. október 30- november 1.)

3. **Váradi Gy.**, Monostori É., Tóth K. G., Andó I., Penke B.: Szintetikus oligopeptidek alkalmazása sejtfelszíni receptorokkal reagáló ellenanyagok előállítására, *Peptidkémiai Munkabizottság Ülése* (Budapest, 1991. január 15-16.)

4. Rajnavölgyi É., Tóth K. G., Kurucz I., **Váradi Gy.**, Nagy Z., Hollósi M., Penke B.: Az influenza vírus hemagglutinin fehérjéje aktív fragmenseinek szerepe a T-sejt felismerésben - szintézis, immunológiai vizsgálatok, *Peptidkémiai Munkabizottság Ülése* (Budapest, 1991. január 15-16.)

5. Tóth K. G., **Váradi Gy.**, Rajnavölgyi É., Penke B.: Az influenza vírus hemagglutinin fehérjéje aktív fragmenseinek szerepe a T-sejt felismerésben: antigének szintézise és immunológiai vizsgálatok, *SZOTE Tudományos Ülése* (Szeged, 1991. május 28.)

6. Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Monostori, É., Kurucz, I., Andó, I., Penke, B.: Antibodies against cell-surface receptors, peptide synthesis and antibody production, *12th American Peptide Symphosium* (Boston, Jun 16-21 1991)

7. **Váradi Gy.**, Tóth K. G., Monostori É., Kurucz I., Andó I., Penke B.: Sejtfelszíni receptorokkal reagáló ellenanyagok előállítása szintetikus peptidek segítségével, *Vegyészkonferencia* (Szombathely, 1991.)

8. Tóth K. G., **Váradi Gy.**, Rajnavölgyi É., Kurucz I., Nagy Z., Hollósi M., Penke B.: Az influenza vírus hemagglutinin fehérjéje aktív fragmenseinek szerepe a T-sejt felismerésben - szintézis, immunológiai vizsgálatok, *Vegyészkonferencia* (Szombathely, 1991.)

9. **Váradi Gy.**, Tóth K. G., Penke B.: A trimetoxi-benzhidrol polimer új szintézise, *Peptidkémiai Munkabizottság Ülése* (Budapest, 1992. január 14-15.)

10. Tóth K. G., **Váradi Gy.**, Rajnavölgyi É., Monostori É.: Elágazó polipeptidek szintézise, *Peptidkémiai Munkabizottság Ülése* (Budapest, 1992. január 14-15.)

11. Nagy Z., Tóth K. G., **Váradi Gy.**, Penke B., Kurucz I., Rajnavölgyi É.: Influenza vírus specifikus ellenanyagok előállítása kis molekulasúlyú szintetikus peptidekkel, hordozó felhasználása nélkül, *Peptidkémiai Munkabizottság Ülése* (Budapest, 1992. január 14-15.)

12. Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Penke, B., Monostori, É., Hegedűs, Z., Nagy, Z., Kurucz, I., Rajnavölgyi, É.: Branched polypeptides as antigens for influenza virus hemagglutinin and T-cell receptor subunits, *"Prediction and Recognition of Antigenic Determinants" satellite meeting of the 8th International Congress of Immunology* (Budapest, August 29-31 1992)

13. **Váradi, G.**, Tóth, G. K., Szabó, A., Nyerges, L., Penke, B.: Substituted benzhydrol derivatives as linkers for solid-phase peptide synthesis, *22nd European Peptide Symphosium* (Interlaken, Switzerland, September 13-19 1992)

14. Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Penke, B., Monostori, É., Hegedűs, Z., Nagy, Z., Kurucz, I., Rajnavölgyi, É.: Synthesis of branched polypeptides as antigens for influenza virus hemagglutinin and T-cell receptor subunits, *22nd European Peptide Symphosium* (Interlaken, Switzerland, September 13-19, 1992)

15. **Váradi Gy.**, Tóth K. G., Penke B.: A 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoximetil-polisztirol új szintézise, *MKE Csongrád Megyei Csoport Előadói Napok* (Szeged, 1992. október 26-28.)

16. Nagy Z., Rajnavölgyi É., Kurucz I., Hollósi M., **Váradi Gy.**, Penke B., Tóth K. G., Gergely J.: Az influenza vírus HA-szekvenciát tartalmazó peptidek mint vakcinák, *MIT XXIII. Kongresszusa* (Lillafüred, 1993. október 27-29.)

17. Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Janáky, T., Penke, B., Mák, M., Láng, E., Ötvös, L., Hegedűs, Z., Monostori, É.: Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides - comparison of different methods and their use to investigate cell signalling via the T-cell receptor, *23rd European Peptide Symphosium* (Braga, Portugal, Sept 4-10 1994)

18. Majer, Z., Holly, S., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Laczkó, I., Rajnavölgyi, É., Hollósi, M.: Conformational mapping of the antigenic intersubunit region of influenza virus hemagglutinin: CD and FT-IR spectroscopic studies, *23rd European Peptide Symphosium* (Braga, Portugal, Sept 4-10 1994)

19. Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Janáky, T., Penke, B., Laczkó, I., Hegedűs, Z., Monostori, É.: Synthesis of phosphotyrosine-containing T-cell receptor ζ subunit peptides, *Peptides in Immunology* (Interlaken, Switzerland, April 1995)

20. Hegedűs Z., Andó I., Tóth K. G., **Váradi Gy.**, Monostori É.: T-sejt receptor ζ láncából származó oligopeptidek *in vitro* foszforilációs vizsgálata, *A Magyar Immunológiai Társaság XXV. Kongresszusa* (Debrecen, 1995)

21. Tóth, G. K., Hegedűs, Z., Laczkó, I., Vass, E., Hollósi, M., **Váradi, G.**, Janáky, T., Penke, B., Monostori, É.: Synthesis of phosphotyrosine-containing T-cell receptor ζ subunit peptides - conformational and immunological studies, *14th American Peptide Symphosium* (Columbus, 1995)

22. Hegedűs, Z., Andó, I., Tóth, G. K., **Váradi, G.**, Monostori, É.: Kinase specific tyrosine phosphorylation of synthetic peptides derived from the zeta chain of the T-cell receptor complex, *9th International Congress of Immunology* (San Francisco, 1995)

23. Hegedűs, Z., Chitu, V., Tóth, G. K., Finta, C., **Váradi, G.**, Andó, I., Monostori, É.: Contribution of kinases and CD45 phosphatase to generation of tyrosine phosphorylation patterns in the TcR ζ-chain, *Israeli-Hungarian Workshop on Molecular Immunogenetics* (Szeged, Sept 28-30 1997)