

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A gerjesztő fényintenzitás és az antitest jelölési arányának
hatása a kvantitatív fluoreszcenciás mérésekre**

Szendi-Szatmári Tímea

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

**Az antitestek jelölési arányának és a gerjesztő fényintenzitás növelésének hatása
kvantitatív fluoreszcenciás mérésekre**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban*

Írta: Szendi-Szatmári Tímea
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László
tagok: Prof. Dr. Matkó János
Dr. Mádi András

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Élettani Intézet, I. emelet, Könyvtár
2019.06.24.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
.....
20.....

Tartalom

1. Bevezetés.....	5
1.1. FRET	5
1.1.1. FRET mérési módszerek	6
1.1.2. Fluoreszcencia intenzitás alapú mérések.....	6
1.1.3. Fluoreszcencia élettartam mérések.....	7
1.1.4. Fluoreszcencia anizotrópiamérések.....	8
1.2. Antitestek jelölési módszerei, a jelölés hatása az antitestekre.....	8
1.3. Az antitestjelölés hatása a fluorofórokra	9
2. Problémafelvetés	11
3. Célkitűzés.....	12
4. Elmélet	12
4.1. Fluorofór konjugációs és antitest affinitással kapcsolatos vizsgálatok	12
4.1.1. Különböző jelölési arányú antitestek eloszlása a sejthez kötött frakcióban.....	12
4.1.2. Az antitest oldatok anizotrópiájának függése az egyes antitest specieszek jelölési arányától a szabad és a kötött frakció esetében	14
4.2. Fluorofór szaturációs vizsgálatok.....	14
4.2.1. A donor szaturáció hatása a látszólagos FRET hatékonyságra	14
4.2.2. Donor szaturációt figyelembe vevő FRET hatékonyság meghatározása intenzitás alapú kísérletek során	15
4.2.3. Donor szaturációt és FRET frusztrációt számításba vevő FRET hatékonyság meghatározás intenzitás alapú kísérletek során.....	16
5. Anyagok és módszerek.....	17
5.1. Sejtvonalak, antitestek	17
5.2. Sejtek fluoreszcens jelölése fedőlemezen és szuszpenzióban	17
5.3. Sejtek tranziens transzfekciója és az alkalmazott plazmidok	18
5.4. Konfokális mikroszkópia.....	18

5.5.	Mobilis fluorofórok szaturációjának mérése	19
5.6.	Lézerintenzitás mérések	19
5.7.	Fluoreszcenciás képek elemzése	20
5.8.	Áramlási citometria	20
5.9.	Fluorimetria, a fluoreszcencia anizotrópia mérése	20
5.10.	Sejthez kötött antitestek izolálása immunprecipitációval	20
5.11.	Fluoreszcencia élettartam mérések	21
5.12.	Egyedi molekula fluoreszcenciás mérések	21
6.	Eredmények.....	22
6.1.	Az antitest jelölés hatása az antitestek affinitására és a festékek fotofizikai tulajdonságaira	22
6.1.1.	Jelölés hatása az antitestek affinitására	22
6.1.2.	A szabad és kötött antitest fluoreszcencia intenzitása eltérően függ a jelölési aránytól	22
6.1.3.	A szabad és kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásainak szimulálása	23
6.1.4.	A kötött antitest frakció jelölési arányának meghatározása fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel.....	24
6.1.5.	Az antitest jelölés hatása a fluoreszcencia élettartamra és a fluorofórok spektrumára	25
6.1.6.	Egyedi antitestek fluoreszcencia intenzitás eloszlása a törzsoldatban és a sejthez kötött frakcióban	26
6.2.	A fluorofór szaturáció hátrányos hatásainak csökkentése FRET mikroszkópia során	27
7.	Eredmények megbeszélése.....	30
7.1.	Az antitest jelölés hatása az antitestek és a fluorofórok tulajdonságaira.....	30
7.2.	Fluorofór szaturációs vizsgálatok	32
8.	Összefoglalás.....	34

1. Bevezetés

A fluoreszcenciás technikákat széles körben alkalmazzák különböző biokémiai és biológiai folyamatok molekuláris paramétereinek a meghatározására érzékenysége, specifikusága illetve időbeli felbontása miatt. A vizsgált biológiai molekulák fluoreszcenciás jelölésére sokféle eljárás létezik, de még mindig széleskörűen alkalmaznak ilyen célból fluoreszcensen jelzett antitesteket. A fluoreszcencia paramétereit (fluoreszcencia élettartamot és fluoreszcencia kvantumhatékonyságot) a fluorofór környezete befolyásolja. Ennek egyik megnyilvánulása a Förster típusú rezonancia energiatranszfer (FRET), ami egyedülálló abban, hogy molekulák konformációváltozásaira, asszociációira és távolságukra érzékeny fluoreszcencia jeleket generáljon. Így képes molekuláris interakciókat és konformációkat feloldani olyan térbeli felbontással, amely messze meghaladja a szokásos optikai mikroszkópia diffrakciós határát ($\sim \lambda / 2$), és kompatibilis a szuperfelbontású technikákkal. Munkám során arra kerestem választ, hogy a fluoreszcens mérések jel/zaj arányának növelésére gyakran alkalmazott két technika, az antitestek jelölési arányának növelése és az erős gerjesztő intenzitás milyen hatást gyakorol mérések kvantitatív megbízhatóságára.

1.1. FRET

A FRET egy olyan távolságfüggő folyamat, amelynek során az energia nem radiatív módon, hanem nagy hatótávolságú dipól-dipól kölcsönhatás segítségével átadódik egy donorként szolgáló gerjesztett állapotban lévő fluorofórról egy megfelelő akceptor molekulára, ami az esetek többségében szintén fluoreszcens. Ennek köszönhetően a donor molekula legerjesztődik és a megfelelő akceptor molekula egy elektronja magasabb energiaszintre kerül. Mivel FRET csak egymáshoz közel, 1-10 nm-es távolságon belül lévő molekulák között játszódik le, spektroszkópiai vonalzónak is szokták nevezni. A hagyományos hetero-FRET akkor fordul elő, amikor egy gerjesztett donor kromofór emissziós spektruma átfedésben van egy tőle kémiaiilag és spektroszkópiailag is megkülönböztethető akceptor kromofór abszorpciós spektrumával. A jelenségnek számos fotofizikai megnyilvánulása van, amelyek mindegyike megfelelő kísérleti technikát eredményez a FRET hatékonyságának kimutatására: (i) szenzitizált emisszió az akceptor fluorofórról; (ii) a donor fluoreszcencia emissziójának kioltása; (iii) a donor fluoreszcencia élettartama csökken, aminek mechanizmusa hasonló a donorkioltáséhoz; (iv) lassúbb donor fotoelhalványítás és (v) a donor fluoreszcencia polarizációjának változása. Gyakran úgy vélik, hogy FRET csak két spektroszkópiailag eltérő fluorofór között valósulhat meg. FRET

azonban spektroszkópiailag azonos molekulák között is lejátszódhat azzal a feltétellel, hogy ha kismértékű Stokes-eltolódással (kis eltolódás az excitációs és emissziós csúcsok között) rendelkeznek. Az energiaátadást azonos fluorofórok esetében homo-FRET-nek nevezzük. A homo-FRET kimutatására az egyetlen alkalmazható módszer az anizotrópia mérése. A FRET hatékonyság jellemzésére az energiatranszfer hatásfokot (E) használjuk, ami megmutatja a FRET által relaxálódott donorok arányát az összes gerjesztett donor molekulához képest. A FRET lejátszódásához az alábbi feltételeknek kell teljesülniük: 1.) a donor magas kvantumhatásfokkal rendelkezzen, 2.) a donor emissziós spektruma fedjen át az akceptor abszorpciós spektrumával 3.) a donor elektromos mezője és az akceptor abszorpciós dipólus vektora közel párhuzamos legyen. Ezt az orientációs faktorról jellemezzük 4.) A donor és akceptor közötti távolságnak 1-10 nm között kell lennie. A FRET számtalan mérőműszerrel vizsgálható, melyek közül biológiai szempontból kiemelendő a mikroszkópos képalkotás és áramlási citometria. Míg az áramlási citometriás FRET (FCET) mérések előnye az, hogy rövid idő alatt nagy sejtpopulációt tudunk megvizsgálni, addig a mikroszkópos megközelítés lehetőséget ad, hogy sejten belüli részleteket megfigyeljünk, illetve pixelenkénti elemzéssel FRET értékeket hasonlíthassunk össze más fluoreszcensen jelölt biológiai információval.

1.1.1. FRET mérési módszerek

A fluoreszcenciának számos spektroszkópiai megjelenése van, amik jó érzékenységgel detektálhatóak és szerencsére, FRET hatására ezek a spektroszkópiai tulajdonságok megváltoznak. Ezért számos módszer alkalmazható FRET mérésére. A leginkább figyelemre méltó FRET-mérések a következő három megközelítésen alapulnak: 1.) fluoreszcencia intenzitás alapú megközelítés; 2.) fluoreszcencia élettartam alapú megközelítés, 3.) fluoreszcencia anizotrópia alapú megközelítés.

1.1.2. Fluoreszcencia intenzitás alapú mérések

A fluoreszcencia intenzitás alapú FRET mérések közé tartoznak a donor kioltásának, az akceptor fotoelhalványításának, a donor fotoelhalványításának, illetve az akceptor szenzitizált emissziójának mérése. A szenzitizált akceptor emisszió meghatározásán alapuló FRET módszer a legmegbízhatóbb az intenzitáson alapuló módszerek között, melyen belül a háromcsatornás FRET mérés a leggyakrabban alkalmazott FRET technikák közé tartozik. Ez a megközelítés a gerjesztési hullámhosszok és emissziós filterek három különböző kombinációját magába foglaló mérésen alapszik. Ezen típusú mérések során a donorral vagy akceptorral egyszeresen jelölt, illetve a duplán jelölt minták fluoreszcencia intenzitását három

csatornában rögzítjük: 1.) a donor csatorna (I_1): a donort abszorpciós és emissziós hullámhossz tartományában gerjesztjük és detektáljuk; 2.) a FRET csatorna (I_2) esetében a mintát a donor abszorpciós hullámhosszán gerjesztjük, és a fluoreszcenciát az akceptor emissziós hullámhosszán detektáljuk, mely az akceptor szenzitizált emisszióját jellemzi; 3.) az akceptor csatorna (I_3), ahol az abszorpciós és emissziós hullámhosszak megfelelnek az adott akceptor spektrális tulajdonságainak, mely az akceptor direkt emisszióját jellemzi. Ennél a módszernél szükséges különböző korrekciós faktorokat megállapítani, mint az egyszeresen jelölt mintákból származó átvilágítási faktorokat: a csak donorral jelölt minta esetén meghatározzuk, hogy a donor mennyire világít át a FRET, illetve akceptor csatornába (S_1, S_3), míg a csak akceptoros minta esetében mennyire világít át az akceptor a FRET, illetve donor csatornába (S_2, S_4). A FRET értékét nagymértékben befolyásoló korrekciós tényező az α faktor, melynek értéke megmutatja egy gerjesztett akceptor molekula intenzitását a FRET csatornában egy donor csatornában detektált gerjesztett donorhoz képest. Egy akceptor foton detektálási hatékonysága a FRET csatornában összehasonlítható egy donor foton detektálási hatékonyságával a donor csatornában azáltal, hogy az egyik mintát egy donorral konjugált, egy bizonyos epitópra specifikus antitesttel jelöljük, míg egy másik mintát ugyanarra az epitópra specifikus, akceptorral jelölt antitesttel jelölünk. Az α meghatározásakor figyelembe kell még venni a moláris abszorpciós koefficiens és a jelölési arányt, azaz a fluorofórok átlagos számát egy antitesten a törzsoldatban. Mindezen értékek (I_1 - I_3, S_1 - S_4, α) figyelembe vételével a FRET hatásfok meghatározható.

1.1.3. Fluoreszcencia élettartam mérések

A fluoreszcencia élettartam azt az időt jellemzi, amelyet a fluoreszcens molekulák átlagosan a gerjesztett állapotban töltenek, mielőtt alapállapotba kerülnek különböző radiatív, illetve non-radiatív mechanizmusok közreműködésével. A fluoreszcencia élettartam egyenlő azzal az idővel, amely alatt a gerjesztett molekulák populációja e -ad részére csökken. A fluoreszcencia élettartam fordítottan arányos a relaxációs folyamatok sebességi állandóinak összegével. Ha a megfelelő akceptor a potenciális donor közelében van, akkor a donor fluoreszcencia élettartama csökken a FRET miatt. A fluoreszcencia élettartam meghatározásán alapuló mikroszkópos FRET (FLIM-FRET) mérések nem igényelnek korrekciós faktorokat, mint a háromcsatornás módszer, illetve nem érzékenyek a fluorofór koncentráció változására és a megvilágító fény intenzitására, fényszórásra vagy a fotoelhalványításra.

1.1.4. Fluoreszcencia anizotrópiamérések

A fluorofórok térben és időben véletlenszerűen orientáltak. Ha polarizált fényvel világítjuk meg őket, akkor a teljes fluorofór populációból csak azon fluorofórok fognak gerjesztett állapotba kerülni, melyek abszorpciós dipólusa kellően párhuzamos a gerjesztő fotonok polarizációs síkjával. Ezt a folyamatot hívjuk fotoszelekciónak. Továbbá a gerjesztett állapotban lévő fluorofórok orientációja véletlenszerűen megváltozik, mielőtt elveszítenék az energiájukat sugárzással vagy sugárzásmentesen, például a FRET-tel. Következtésként elmondható, hogy a kibocsátott fény depolarizált a gerjesztő fényhez viszonyítva. A fluoreszcencia anizotrópia megmutatja, hogy polarizált megvilágítást követően az emittált fluoreszcencia mennyire polarizált. A fluorofórt vertikálisan polarizált fényvel megvilágítjuk, majd ezt követően mind a vertikális, mind a horizontális emissziókat össze kell gyűjteni. Az emisszió depolarizációjához vezető folyamatokat ezen két intenzitás alapján jellemezhetjük, és az anizotrópia ezek, illetve egy korrekciós faktor (G - vertikálisan és horizontálisan polarizált fény eltérő detektálási hatékonyságának az aránya) segítségével meghatározható. Az anizotrópia érzékeny a molekulák méretére és alakjára, a molekuláris környezet merevségére és folyékonyságára, a forgó mozgásra, illetve a molekuláris asszociációs eseményekre. A FRET szintén hatással van a fluorofórok anizotrópiájára. A hetero-FRET-nek köszönhetően a donor élettartalma csökken, ezáltal a donornak gerjesztett állapotban kevesebb ideje van forogni. Levonható az a következtetés, hogy a donor emissziója hiperpolarizálódik (ahhoz az esethez képest, ahol nincs hetero-FRET), ami megnövekedett anizotrópiát fog eredményezni. Homo-FRET esetében a FRET kölcsönhatás során a donor emissziós dipólusával párhuzamosan álló abszorpciós dipólussal rendelkező akceptorok preferenciálisan gerjesztődnek, mégis minden homo-FRET lépés a gerjesztett molekulapopulációt depolarizálja. Mivel a donor és az akceptor molekula spektroszkópiailag megegyezik, ezért az emisszió kevésbé polarizált, aminek köszönhetően az anizotrópia csökken.

1.2. Antitestek jelölési módszerei, a jelölés hatása az antitestekre

Az antitestek vagy ellenanyagok az adaptív immunrendszer fehérjéi, melyek effektor funkciókat látnak el, képesek specifikusan megtalálni célmolekulákat, illetve a betegséget okozó organizmusokat. Széles körben alkalmazzák őket a diagnosztikában és a kutatásban, illetve a klinikumban fontos terápiás eszközzé váltak különböző betegségek kezelésében.

Mivel az antitestek aminosav polimerek, melyek számtalan oldallánccal rendelkeznek, így ezek az oldallánccok meghatározóak a konjugációs folyamatok során. A fehérjéket általában három különböző csoporton keresztül lehet kovalensen módosítani: amino- (-NH₂) és tiol- (-SH) funkciós csoportok és szénhidrát oldallánccok felhasználásával. A legközkedveltebb reaktív csoport az amino csoport, melyek nagy mennyiségben vannak jelen az antitestek felszínén. A legszélesebb körben alkalmazott konjugációs módszer az amino csoportok konjugációja N-hidroxi-szukcinimid-észterrel, mely stabil karboxamid kötést eredményez. Az aminocsoportokon keresztüli konjugációs módszer mellett a szulfhidril csoport célzott jelölése is közkedvelt, a maleimiddel szembeni specificitása és magas reakcióképessége miatt. A legtöbb tiol csoport a ciszteinekben található kötött formában, melyek redukálását követően az antitestek tiolált fragmentjeihez tioészter kötéssel a maleimidek könnyedén kötődhetnek. Ezen módszerek mellett szintén alkalmazzák konjugációs folyamatokhoz az antitestek Fc részén elhelyezkedő szénhidrát csoportokat, melyek redukálást követően hidrazidot, vagy hidroxilamint tartalmazó reagensekkel kovalensen jelölhetők. Még akkor is, amikor a jelölt funkciós csoport az antigénköti helytől távol helyezkedik el, a jelölés jelentős hatást gyakorol az antitestek affinitására, ami a jelölés következtében bekövetkező konformáció, illetve dinamikai változásoknak tulajdonítható. Az antitest jelölési technikák közül az amino csoportokkal történő reakció a legjobban preferált konjugációs módszer az egyszerű kivitelezhetőség, a gyorsabb reakciókinetika, az olcsóság és a magas festék-antitest konjugátum kihozatal miatt.

Az antitesteken lévő fluoreszcens festékmolekulák átlagos számát a jelölési arány (DOL = Degree Of Labeling) vagy más néven az F/P (fluorofór/protein) értéke mutatja meg. Ezeket az értékeket a fluoreszcens mérések kvantitatív kiértékeléséhez gyakran szükséges megadni. Mivel az F/P értékét egy antitest törzsoldatra szokták meghatározni, ez megtévesztő lehet, mert az antitest törzsoldatban lévő egyes antitestek több, míg mások kevesebb konjugált festékkel rendelkeznek. Tehát a konjugációs eljárások során keletkező jelölt antitestpopulációban az egyes antitestek eltérő festékmolekula számmal rendelkeznek, melynek eloszlását Poisson eloszlással jellemezhetjük.

1.3. Az antitestjelölés hatása a fluorofórokra

Annak ellenére, hogy a fluoreszcens jelölés nagy népszerűségnek örvend napjainkban, mégis vannak limitációi. A fluoreszcencia önkkioltást ugyanazzal a fluorofórral többszörösen jelölt biomolekulák esetében írták le, melynek következtében a jelölt molekula fényessége nem arányos a jelölés mértékével. Ezt a fluorofórok csoportokba rendeződésének

tulajdonítják, ami a jelölés során a biomolekulához kötődő aggregátumként jelentkezik. Az aggregátumok képződése a legtöbb aromás π -konjugált szénhidrogén fluoreszcencia kioltásának fontos oka. Bizonyos fluorofórok esetében az abszorpciós és emissziós spektrumok között kicsi a Stokes-féle eltolódás, így amikor egy fehérjéhez több festékmolekula kötődik, energiatranszfer játszódhat le közöttük, ha a távolságuk a Förster távolságon belül van. A homo-FRET akkor vezet fluoreszcencia kioltáshoz, ha az energiatranszfer nem fluoreszcens fluorofórok felé zajlik.

Emellett számos más tényező is szerepet játszik a fluoreszcencia intenzitás csökkenésében túljelölés esetén, mint pl. festék molekulák dimerizációja és festék monomerek közötti ütközéses kioltás. A kioltás mechanizmusa lehet statikus és dinamikus. A két típus abban különbözik egymástól, hogy a fluoreszcencia intenzitás csökkenése a fluoreszcencia élettartam rövidülésével jár-e. Dinamikus vagy ütközési kioltás esetében a fluorofór a gerjesztett állapotában ütközik a kioltóval. Mivel ilyenkor egy újabb relaxációs folyamat jelenik meg, a folyamat a fluoreszcencia élettartam rövidülésével jár. Ezzel szemben a statikus kioltás esetén a kioltó már a fluorofór alapállapotában komplexet alkot vele, és a kialakult komplex elveszti fluoreszcens tulajdonságát. A teljes fluorofórpopulációban mérhető kioltás mértékét a fluorofór és a kioltó disszociációs egyensúlya befolyásolja. Mivel ebben az esetben a kioltóval komplexet nem képező fluorofórok „érintetlenek”, és csak ők felelősek a fluoreszcencia megmaradó részéért, a statikus kioltás nem jár a fluoreszcencia élettartam csökkenésével.

2. Problémafelvetés

Mikroszkópos mérések során a jobb jel-zaj arány érdekében gyakran megnövelt gerjesztő intenzitást alkalmazunk, hogy fényesebb képeket kaphassunk. A fényes képek előnyei közé tartozik, hogy a háttértől jól megkülönböztethetőek a jelölt komponensek, de ennek ellenére nem mindig adnak tudományosan értékelhető eredményt. A képalkotás azon általános feltételezéseken alapul, hogy a fluoreszcens jel elhelyezkedése megegyezik a jelölt molekula biológiai rendeltetésének megfelelő helyével, illetve intenzitása arányos a kísérlet során használt jelölt antitestek koncentrációjával és a mintát megvilágító fény intenzitásával. Sajnos a szaturáció jelensége miatt ezek a feltételezések gyakran nem teljesülnek.

A szaturáció forrásai különbözőek lehetnek. 1.) Biológiai szaturáció: ez a jelenség, ami fehérjék fokozott kifejeződésekor lép fel. Az extrém fehérje kifejeződésnek köszönhetően a transzfektált sejt fehérjeszintetizáló és szortírozó mechanizmusai telítődnek, ezért fehérjeaggregátumok, módosult sejtalkotók jelennek meg a mikroszkópos felvételeken, és a transzfektált fehérjék nem a fiziológias helyzetnek megfelelő helyen találhatóak 2.) Detektor szaturáció: ebben az esetben a detektor feszültségét, vagy a gerjesztő fény intenzitását növeljük túlságosan. A detektálási határ fölé eső fluoreszcencia intenzitások nem megkülönböztethetőek egymástól. 3.) Fluorofór szaturáció: ilyenkor a legtöbb fluorofór gerjesztett állapotban van. A magas intenzitású gerjesztő fénynek köszönhetően a fluorofórok relaxációjukat követően azonnal újragerjesztődnek. 4.) Antitestek túljelölése: a jelölési arány növelésével a jelölésre használt antitestek több fluoreszcens molekulát tartalmaznak. Közvetett bizonyítékok arra utalnak, hogy a festék kvantumhatékonysága és az antitest affinitása csökken a jelölési arány növekedésével.

3. Célkitűzés

A szaturációs jelenségeknek a problémafelvetés első két pontjában említett két forrása könnyen felismerhető, látható problémát okoz, melyek kezelése, illetve korrekciója egyszerűen lehetséges. Azonban az utóbbi két esetben ezek a problémák rejtve maradnak, amik méréseink során téves számításokhoz, félrebecsült eredményekhez vezethetnek. Dolgozatomban éppen ezért az antitestek túljelölésének problémájával, illetve a fluorofór szaturáció hetero-FRET-re gyakorolt negatív hatásával fogok foglalkozni.

Az antitestek fluoreszcens festékekkel történő jelölése esetében szeretnénk meghatározni:

- a) különböző jelölési arányú antitestek affinitását,
- b) a sejthez kötött antitestfrakció jelölési arányát,
- c) a jelölési arány hatását a festékek fluoreszcencia élettartamára,
- d) egyedi antitest molekulák fluoreszcencia intenzitás eloszlását a törzsoldatban és a kötődött antitest frakcióban.

Fluorofór szaturációs vizsgálatok során céljaink a következők voltak:

- a) a megvilágító fény intenzitása milyen módon befolyásolja a hagyományos képlettel számolt FRET értékeket.
- b) Amennyiben befolyásolja, olyan képletet szeretnénk volna meghatározni, ami a fluorofór szaturációt és FRET frusztrációt figyelembe veszi.

4. Elmélet

4.1. Fluorofór konjugációs és antitest affinitással kapcsolatos vizsgálatok

4.1.1. Különböző jelölési arányú antitestek eloszlása a sejthez kötött frakcióban

Egy adott jelölési aránnyal rendelkező antitest törzsoldatban a különböző jelölési arányú antitest specieszek eloszlása egy adott antitest populációban a Poisson eloszlással közelíthető:

$$f_k = c_{tot} \frac{DOL^k}{k!} e^{-DOL} \quad (1)$$

ahol az f_k a k jelölési aránnyal rendelkező antitest specieszek koncentrációja, a DOL és a c_{tot} egy antitest törzsoldat átlagos jelölési aránya és koncentrációja. Az egyes, k jelölési arányú, kötött antitest specieszek koncentrációja a következő kötődési egyenletek felírásával meghatározható, feltéve hogy nincs jelen ligand depléció, azaz $f_k = f_{k,tot}$.

$$\begin{aligned}
 K_{d0} f b_0 &= f_0 s_{unbound} \\
 K_{d1} f b_1 &= f_1 s_{unbound} \\
 K_{d2} f b_2 &= f_2 s_{unbound} \\
 &\dots \\
 K_{dn} f b_n &= f_n s_{unbound} \\
 f b_0 + f b_1 + f b_2 + \dots + f b_n + s_{unbound} &= s_{tot}
 \end{aligned} \tag{2}$$

ahol a $K_{d0}, K_{d1}, K_{d2}, \dots$ a jelöletlen illetve 1, 2, ... jelölési aránnyal rendelkező antitest specieszek disszociációs állandója, az s_{tot} és az $s_{unbound}$ a kötőhely (epitóp) teljes koncentrációja, ill. az antitestet nem kötött epitóp koncentrációja. Az egyenletrendszer analitikus megoldása, megadta a különböző jelölési arányú kötött antitest specieszek koncentrációit ($f b_n$).

Az antitest törzsoldat összes fluoreszcencia intenzitását a különböző specieszek teljes fluoreszcencia intenzitása adja:

$$F_{szabad} = \sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f_k k Q_k \tag{3}$$

ahol a Q_k a fluorofórok kvantumhatásfoka egy k számú fluorofórral jelölt antitest esetében.

A kötött antitestfrakció teljes fluoreszcencia intenzitása ezen alapelveket alkalmazva a következőképpen határozható meg.

$$F_{kötött} = \sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f b_k k Q_k \tag{4}$$

4.1.2. Az antitest oldatok anizotrópiájának függése az egyes antitest specieszek jelölési arányától a szabad és a kötött frakció esetében

Különböző jelölési arányú antitestek keverékének anizotrópiája a benne lévő különböző specieszek intenzitás súlyozott anizotrópiájának átlagolásával megadható. Az antitest törzsoldat anizotrópiája a következő egyenlettel adható meg:

$$r_{szabad} = \frac{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f_k k Q_k r_k}{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} f_k k Q_k} \quad (5)$$

ahol Q_k egy k jelölési arányú antitesten jelenlévő festékek fluoreszcens kvantumhatékonysága. A kötött antitest frakció anizotrópiája a következő egyenlettel meghatározható.

$$r_{kötött} = \frac{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} fb_k k Q_k r_k}{\sum_{k=1}^{legmagasabb\ DOL} fb_k k Q_k} \quad (6)$$

4.2. Fluorofór szaturációs vizsgálatok

4.2.1. A donor szaturáció hatása a látszólagos FRET hatékonyságra

Vizsgáljuk meg a fluorofór szaturáció jelenségét FRET hiányában. Egy pillanatra feltételezzük, hogy egy fluorofórnak csak alap, illetve gerjesztett szingulett állapota van. Egyensúlyban az alapállapotból gerjesztődő fluorofórok száma megegyezik az éppen relaxálódó gerjesztett fluorofórok számával. Ezt az állapotot a következő mátrix egyenlet foglalja össze:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ D_{all} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Phi_D \sigma_D & \frac{1}{\tau_D} \\ \Phi_D \sigma_D & -\frac{1}{\tau_D} \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} D \\ D^* \end{pmatrix} \quad (7)$$

ahol a Φ_D a donor-gerjesztő lézer foton-fluxusa, σ_D és τ_D a donor abszorpciós keresztmetszete illetve fluoreszcencia élettartama. A D és D^* az alap és gerjesztett állapotban lévő donorok koncentrációja, míg a D_{all} jelöli a donorok teljes koncentrációját. A mátrix egyenlet megoldását D és D^* -ra a következő egyenletek mutatják.

$$D = \frac{D_{all}}{1 + \sigma_D \tau_D \Phi_D}, D^* = \frac{D_{all} \sigma_D \tau_D \Phi_D}{1 + \sigma_D \tau_D \Phi_D} \quad (8)$$

A fluorofór szaturáció az a jelenség, amikor a gerjesztett fluorofórok fluoreszcencia intenzitása nem egyenesen arányos a megvilágító fény intenzitásával. Ilyenkor a legtöbb fluorofór gerjesztett állapotban van. A fluorofór szaturációt, azaz a gerjesztett állapotban levő fluorofórok arányát (D_{sat}) a következő egyenlet segítségével lehet meghatározni:

$$D_{sat} = \frac{\sigma_D \tau_D \Phi_D}{1 + \sigma_D \tau_D \Phi_D} \Rightarrow D^* = D_{all} D_{sat} \quad (9)$$

Mivel a donor fluoreszcencia intenzitása arányos a gerjesztett állapotban lévő donorok intenzitásával, ezért a donor kioltásból számolt látszólagos FRET hatékonyság a következőképpen határozható meg:

$$E_{látszólagos} = 1 - \frac{D_A^*}{D_{no A}^*} = \frac{E}{1 + (1 - E) \sigma_D \tau_D \Phi_D} = \frac{(1 - D_{sat}) E}{1 - D_{sat} E} \quad (10)$$

ahol E az elméleti FRET hatékonyság, ami alacsony gerjesztő intenzitásnál mérhető. A fenti egyenlet egyértelmű lehetőséget nyújt a számolt, látszólagos FRET hatékonyság donor szaturációra történő korrekciójára:

$$E = \frac{E_{látszólagos}}{1 + D_{sat} (E_{látszólagos} - 1)} \quad (11)$$

4.2.2. Donor szaturációt figyelembe vevő FRET hatékonyság meghatározása intenzitás alapú kísérletek során

Készítettünk egy olyan modellrendszert, amely a fluorofór szaturáció hatását vizsgálja a donor és akceptor vonatkozásában. Az így létre jött egyenletek a donor és az akceptor

szaturációt is figyelembe veszi, de a FRET frusztrációt nem. Az egyenletek túl hosszúak ahhoz, hogy a tézisben bemutatásra kerüljenek.

4.2.3. Donor szaturációt és FRET frusztrációt számításba vevő FRET hatékonyság meghatározás intenzitás alapú kísérletek során

Egy gerjesztett akceptor nem tud akceptorként szolgálni egy gerjesztett donor számára. Ezt a jelenséget általában FRET frusztrációnak nevezzük, melyet figyelembe vettünk egy olyan rendszer esetén, mely egy donort, illetve egy akceptort tartalmaz. Azért, hogy ez a modell ne csak 1:1 arányban jelen lévő donorra és akceptorra legyen használható, szabad akceptorokat feltételeztünk a rendszerben. A rendszert leíró egyenletek numerikus megoldását Matlabban számítottuk ki.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Sejtvonalak, antitestek

Kísérleteinket SKBR-3, A431 és JY sejtvonalakon végeztük. Az SKBR-3 egy ErbB2-t fokozottan kifejező trastuzumab-szenzitív humán emlő tumor sejtvonal, az A431 egy ErbB1-et fokozottan kifejező humán epiteliális karcinóma sejtvonal, még a JY egy Epstein-Barr vírus transzformált B-limfóma sejtvonal, melyeket a specifikációjuknak megfelelően tenyésztettünk. Mikroszkópos mérésekhez a sejteket 8 lyukú kamrában növesztettük 80%-os konfluenciáig. Szuszpenzióban történő mérésekhez a sejteket tripszin-EDTA-PBS oldat segítségével távolítottuk el a flaska aljáról. Az ErbB2 fehérjét trastuzumabbal és pertuzumabbal jelöltük, melyek az ErbB2 két különböző, nem átfedő epitópjára specifikus humanizált monoklonális antitestek. ErbB1 receptorok jelölésére Mab528 antitestet használtunk, amit a HB-8509 egér hibridóma sejtek felülúszójából nyertünk. Szintén egér hibridóma sejtek segítségével állítottuk elő a W6/32, MHC-I nehézláncára specifikus monoklonális antitestet, a β -2-microglobulinhoz kötődő L368 és az MHC-II-t felismerő L243 antitesteket. AlexaFluor488, AlexaFluor546 és AlexaFluor647 festékek N-hidroxiszukcinimidil észtereit tisztított monoklonális antitestek amino csoportjához konjugáltuk a gyártó utasításai szerint. A festék/fehérje jelölési arányt (DOL, hány festékmolekula kötődik egy antitesthez) spektrofotometriával határoztuk meg, melynek értéke 0,5 és 6 között változott az egyes antitest törzsoldatok esetében.

5.2. Sejtek fluoreszcens jelölése fedőlemezen és szuszpenzióban

A fluorofór szaturációs mérések kivitelezéséhez SKBR-3 sejteket 8 lyukú fedőlemez aljú kamrában növesztettünk 80%-os konfluenciáig. Kétszeri, PBS-sel való mosást követően a sejteket fluoreszcens antitestekkel jégen jelöltük 20 μ g/ml-es koncentrációban, 150 μ l, 1% (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben, 30 percig fénytől védve. FRET mérésekhez a mintákat olyan antitest oldat keverékkel jelöltük, ami tartalmazott donor festékekkel, illetve akceptor festékekkel jelölt antitesteket. Az α faktor és az átvilágítási faktorok kiszámításhoz szükség volt még donorral vagy akceptorral egyszeresen jelölt mintákra is. A mintákat kétszer mostuk PBS-sel, majd 1%-os formaldehiddel fixáltuk őket. A folyamatot végig jégen végeztük.

A fluorofór konjugációs vizsgálatokhoz A431 és SKBR-3 sejteket használtunk, melyeken Mab528-cal és trastuzumabbal jelöltük az ErbB1 és ErbB2 sejt felszíni fehérjét, illetve JY sejteken az MHC-I, MHC-II, és β -2-microglobulin jelölésére W6/32, L243 és L368

monoklonális antitesteket alkalmaztunk. A fluorofórral konjugált antitestek egyensúlyi kötődésének meghatározására a frissen begyűjtött, illetve tripszinnel kezelt sejteket kétszer mostuk hideg PBS-sel, majd 10^5 sejtet jégen jelöltünk 30 percig sötétben, AlexaFluor546-tal vagy AlexaFluor647-tel jelölt antitestek koncentrációsorozatával 100 μ l, 1 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben. A nem kötődött antitesteket kétszeri, PBS-es mosással távolítottuk el, majd fixáltuk a sejteket 1%-os formaldehiddel. A jelöletlen antitestek kötődési affinitásának a meghatározásához a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, ezt követően 10^5 sejtet jégen jelöltünk 30 percig, fénytől védve a jelöletlen antitest koncentrációsorozatával, állandó koncentrációjú, ugyanarra az epitóra specifikus jelölt antitest jelenléte mellett 100 μ l, 1 mg/ml BSA tartalmú PBS-ben. Ezt követően kétszer mostuk a sejteket, majd fixáltuk 1%-os formaldehiddel. A fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométerrel mértük meg. A mért adatokra a jelölt antitestek esetében kötődési görbét, míg a jelöletlen antitestek esetében kompetitív kötődési görbét illesztettünk, hogy meghatározzuk a jelölt és jelöletlen antitestek K_d értékét.

5.3. Sejtek tranziens transzfekciója és az alkalmazott plazmidok

Két fluoreszcens fehérje közötti FRET mérése céljából SKBR-3 sejteket tranziensen transzfektáltunk fúziós plazmiddal, ami tartalmazott egy linkerrel (RDPPV) összekötött donor EGFP-t és akceptor mCherry-t kódoló fluoreszcens fehérje szekvenciát. A FRET számításokhoz szükséges átvilágítási faktorok meghatározásához pEGFP-C3-mal, illetve pmCherry-C3-mal transzfektált sejteket használtunk. Az SKBR-3 sejteket nyolc-lyukú kamrában növesztettük, és 0,5 μ g plazmidot adtunk hozzá lyukanként. A transzfektált sejteket 2:1 (v/w) lipid/DNS aránnyal, Lipofectamine 2000-rel állítottuk elő a gyártói útmutató alapján.

5.4. Konfokális mikroszkópia

A fluoreszcensen jelölt sejtekről Zeiss LSM 880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettünk felvételeket. AlexaFluor488-trastuzumab és AlexaFluor546-pertuzumab közötti FRET mérések során a donor molekulát argonion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük a donor és FRET csatornában, majd az emisszió detektálása 500-530 nm és 550-610 nm között történt a donor, illetve a transzfer csatornában. Az akceptort 543 nm-es HeNe lézerrel gerjesztettük, melynek emisszióját 550-610 nm-es tartományban detektáltuk. Szintén FRET méréseket végeztünk AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-pertuzumab között, ahol 543 nm-es lézernyalábbal gerjesztettük az AlexaFluor546 festékmolekulát, melynek emisszióját 550-610 nm között detektáltuk a donor

csatornában, míg a FRET-szenzitizált akceptor fluoreszcenciát 635-755 nm között mértük. Az AlexaFluor647-pertuzumabot 633 nm-es hullámhosszon gerjesztettük, és az általa emittált fluoreszcenciát 635 nm és 755 nm között detektáltuk. Azért, hogy meghatározzuk a FRET hatásfokot transzfektált sejteken, a donort (EGFP) 488 nm-es lézerrel gerjesztettük, és az emisszióját a donor csatornában 495-575 nm között mértük, és a FRET-szenzitizált akceptor emissziót 580-670 nm között detektáltuk. Az akceptort (mCherry) 543 nm-es lézervonallal gerjesztettük, melynek emisszióját 575-695 nm közötti hullámhossz tartományban detektáltuk. A fluoreszcens képeket 63X (NA=1,4) olaj immerziós objektívvel készítettük. Egy látómezőről képeket rögzítettünk növekvő lézerintenzitás mellett (1-5-10-15%). A különböző lézerintenzitással felvett képek ugyanarról a látómezőről készültek. Ezt követően egy másik területről vettünk fel képeket csökkenő (15-10-5-1%) gerjesztési intenzitás mellett.

5.5. Mobilis fluorofórok szaturációjának mérése

Mobilis fluorofórok szaturációjának mérésére az antitest törzsoldatokat PBS-ben 200 nM-os koncentrációjúra hígítottuk. Mivel az oldatban a fluorofórok mobilisak, a fotoelhalványítás (photobleaching) elhanyagolható. Ebből a hígított antitest oldatból egy viszonylag nagyobb mennyiséget (200 μ l) adtunk 8-lyukú fedőlemez aljú kamrához, hogy elkerüljük a nem kívánatos visszaverődést. A mérés során a fluoreszcencia intenzitást olyan közel mértük a kamra aljához, amilyen közel lehetett az előző pontban említett excitációs és emissziós beállítási paraméterek mellett. A gerjesztő lézerintenzitást először lépésenként növeltük (1-5-10-15%), majd fokozatosan, lépésenként csökkentettük (15-10-5-1%). A két mérést ugyanolyan körülmények között végeztünk, ugyanolyan mérési hibával. A mért fluoreszcencia intenzitásokat a legalacsonyabb gerjesztési intenzitás mellett mért fluoreszcencia intenzitásokra normalizáltuk.

5.6. Lézerintenzitás mérések

A lézerteljesítmény méréseket Thorlabs optikai teljesítménymérővel végeztük, ami egy 350-1100 nm-es spektrális érzékenységi tartománnyal rendelkező szenzorral rendelkezik. A mikroszkópon a különböző lézerintenzitásokat (488, 543 és 633nm) százalékos skálán változtattuk, és a beállított lézerteljesítményt az optikai teljesítménymérővel megmértük. Ezt követően a mért értékeket a fókuszpont méretének, és az egyes fotonok energiájának figyelembe vételével átkonvertáltuk foton-fluxussá.

5.7. Fluoreszcenciás képek elemzése

A mikroszkóppal felvett fluoreszcens képek elemzésére Matlab szoftver alatt futó DipImage programot használtunk. A képek szegmentálására, a membrán pixelek azonosítására egy egyedileg írt programot használtunk, amely a kézzel kijelölt vízfeltöltéses algoritmuson alapszik. A FRET hatásfokot és a meghatározásához szükséges minden korrekciós paramétert a Matlabban futó rFRET program segítségével határoztuk meg.

5.8. Áramlási citometria

Az áramlási citometriás méréseket FACS Aria III áramlási citométeren hajtottuk végre. Az AlexaFluor546 festéket 561 nm-es lézersugárral gerjesztettük, és emisszióját 595 ± 25 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk, míg az AlexaFluor647-et 633 nm-en gerjesztettük, és az általa kibocsátott fényt 635 nm-es felületeszűrő szűrő segítségével rögzítettük. A sejtek átlag fluoreszcencia intenzitását egy egyedileg írt programmal (ReFlex) elemeztük, miután az előre és oldal irányú fényszórás adatait tartalmazó pontábrákon kikapuztuk az élő sejtek populációját. Az így kapott átlag fluoreszcencia intenzitásokat a további analízis előtt háttér korrigáltuk.

5.9. Fluorimetria, a fluoreszcencia anizotrópia mérése

A fluoreszcencia intenzitás és anizotrópia mérésekre Fluorolog-3 spektrofluorimétert használtunk. Az AlexaFluor546 festéket 550 nm-en gerjesztettük, és a fluoreszcencia intenzitását 590 nm detektáltuk, míg az AlexaFluor647 gerjesztése 650 nm-en történt és az általa emittált fényt 675 nm-en rögzítettük. 20 nM-os antitest törzsoldatokat készítettünk, majd megmértük a törzsoldatok intenzitását és anizotrópiáját. Az antitest oldatok és a sejthez kötött antitest frakció fluoreszcencia intenzitásának jelölési aránytól való függésére a 3. és 4. egyenlet illesztettük Matlabban.

5.10. Sejthez kötött antitestek izolálása immunprecipitációval

Öt millió sejtet jelöltünk szuszpenzióban AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel jelölt IgG-vel, majd a sejteket kétszer mostuk PBS-sel. Ezt követően a sejteket lízis pufferrel jégen lizáltuk 10 percig, amit 5 perces 600 g-s centrifugálás követett, majd a kapott felülúszót immunprecipitáltuk protein G-vel 4°C -on egy órán keresztül. A mintákat 3-szor mostuk lízis pufferrel, majd 100 mM glicin-HCl oldattal eltávolítottuk a protein-G-hez kötődött antitesteket. Az eluált antitesteket a felülúszóból nyertük ki, centrifugálást majd foszfát

pufferes neutralizálást követően. Kontrollként hígított, 100 nM-os antitest törzsoldatot immunprecipitáltunk, és az előbbieken említett minden lépést végrehajtottunk rajta. Az immunprecipitált minták fluoreszcencia anizotrópiáját párhuzamosan mértük fluoriméteren a nem immunprecipitált mintákkal.

5.11. Fluoreszcencia élettartam mérések

A fluoreszcencia élettartam mérésekre Lambert Instruments LIFA fluoreszcencia élettartam képalkotó modullal és 405-640 nm hullámhossz tartomány közötti modulált LED fényforrással felszerelt inverz, IX81 fluoreszcenciás mikroszkópot alkalmaztunk. Az AlexaFluor546 gerjesztésére 527 nm-es LED fényt és 510-552nm-es sávszűrőt alkalmaztunk, majd az általa emittált fény szeparálására 570 nm-es dikroikus tükröt és 590 nm-es felüláteresztő szűrőt használtunk. Az AlexaFluor647 festéket pedig 639 nm-es LED-del gerjesztettük ZET642/20 sávszűrőn keresztül, emisszióját ZT647rdc-UF2 dikroikus tükrö, ET665 felüláteresztő szűrő és ET700/75m sávszűrű segítségével rögzítettük. Különböző jelölési arányú, 20 µg/ml (~133 nM) koncentrációjú antitest törzsoldatok fluoreszcencia élettartamát a frekvencia doménben határoztuk meg. Kalibráláshoz nem konjugált festékoldatokat használtunk, és így az AlexaFluor546 és az AlexaFluor647 festékek élettartamát az irodalomból ismert 4,1, illetve 1 ns-os értékre állítottuk.

5.12. Egyedi molekula fluoreszcenciás mérések

Azért, hogy a sejthez kötött antitesteken egyedi molekula méréseket végezzünk, SKBR-3 sejteket 8-lyukú, kamrában növesztettünk, és 10 µg/ml, AlexaFluor546-tal vagy AlexaFluor647-tel jelölt trastuzumabbal jelöltük jégen, 30 percig, jelöletlen antitest 500-1000x-es moláris feleslege jelenlétében. A nem kötődött antitesteket kétszeres, PBS-es mosással eltávolítottuk, majd 1%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket. Az egyedi molekula szinten vizsgálni kívánt antitest törzsoldatok esetében az antitesteket immobilizáltuk epoxi funkcionizált fedőlemezek felszínén 0,1 és 0,05 µg/ml-es koncentrációban. A felvételeket a fedőlemez felszínének közvetlen szomszédságában levő rétegekről készítettük fotonszámláló módban LSM880 konfokális mikroszkóp segítségével. Az AlexaFluor546-ot és az AlexaFluor647-et 546 nm, illetve 633 nm-es lézersugárral gerjesztettük, és az emissziójukat 575-680, illetve 638-755 nm-en detektáltuk. A képek analizésére Matlab programot használtunk.

6. Eredmények

6.1. Az antitest jelölés hatása az antitestek affinitására és a festékek fotofizikai tulajdonságaira

6.1.1. Jelölés hatása az antitestek affinitására

A fluoreszcens jelölés antitestek affinitására gyakorolt hatását két különböző fluoreszcens festék (AlexaFluor546 és AlexaFluor647) és öt különböző IgG esetben (trastuzumab, Mab528, W6/32, L368 és L243) vizsgáltuk. A sejtek jelölésére viszonylag magas DOL-lal rendelkező antitest törzsoldatokat választottunk, és áramlási citométerrel határoztuk meg telítési kötődésüket. Kompetitív kötődési kísérleteket is végeztünk, hogy fényt derítsünk a jelöletlen antitestek kötődési affinitására. A megvizsgált antitestek közül egy, az Mab528 antitest nem mutatott különösebb változást AlexaFluor festékekkel történő konjugáció esetében, míg a másik 4 antitest esetében a disszociációs állandó értéke jelentősen nőtt a jelöléssel. Adataink megerősítik a korábbi bizonyítékokat, melyek azt mutatják, hogy a legtöbb esetben a fluoreszcens festékekkel történő konjugáció esetén csökken az antitestek affinitása. Ezenkívül még arra is fényt derítenek, hogy AlexaFluor647-tel történő konjugáció jobban befolyásolja az antitestek affinitását, mint az AlexaFluor546-tal történő jelölés.

6.1.2. A szabad és kötött antitest fluoreszcencia intenzitása eltérően függ a jelölési aránytól

Egy bizonyos átlagos jelölési aránnyal jellemezhető antitest törzsoldat különböző számú fluorofórral rendelkező antitest specieszeket tartalmaz, melyek eloszlása az oldatban közelítőleg Poisson eloszlást követ. Tekintettel arra, hogy a fluoreszcens jelölés negatívan befolyásolja az antitestek affinitását, várható, hogy az egyes antitest specieszek disszociációs állandója nő a DOL függvényében ugyanabban a törzsoldatban. Így azok az antitestek, melyek affinitása alacsony, alulreprezentáltak lesznek a sejthez kötött frakcióban. Azért, hogy megvizsgáljuk ezt a felvetést, összehasonlítottuk az antitest törzsoldatok és sejthez kötött antitestek fluoreszcencia intenzitás növekedését a jelölési arány függvényében. A nem kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásainak DOL szerinti ábrázolása során az eredmények azt mutatták, hogy ezek az intenzitásnövekedések elmaradtak attól a lineáris növekedéstől, amit akkor várnánk, ha nem lenne önkioltás (self-quenching). A vizsgált antitestek ebben a tekintetben jelentősen különböztek egymástól. Mindezek mellett a kötött frakció

fluoreszcencia intenzitásait is meghatároztuk jelölt sejtek segítségével áramlási citometriával. A sejteket olyan antitest törzsoldatokkal jelöltük, melyek fluoreszcencia intenzitását előzőleg már meghatároztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a sejthez kötött antitestek intenzitása nem csak elmarad a lineáristól a DOL függvényében, de különbözik is a törzsoldatok görbájától a legtöbb esetben. Szisztematikus különbséget is megfigyeltünk a két vizsgált fluorofór esetében. Míg a sejthez kötött, AlexaFluor546-tal jelölt antitestek legkisebb DOL-ra normalizált fluoreszcencia intenzitása magasabb volt, mint ugyanezen festékkel jelölt antitest törzsoldatok intenzitása, addig AlexaFluor647-tel konjugált antitestek esetében éppen az ellenkezőjét kaptuk. A mért adatokra 3. és 4. egyenlet illesztettük. Az illesztés reprodukálta a mért értékek fő tendenciáját, és megmutatta azt is, hogy az antitest jelölés az AlexaFluor546 festék kvantumhatékonyságát nagymértékben befolyásolja, míg az AlexaFluor647 elsődlegesen az antitest affinitására gyakorol hatást. Levonható az a következtetés, hogy a kötött és a szabad antitestek fluoreszcenciája eltérően függ a jelölési aránytól. Ez az eredmény alátámasztja azt a hipotézisünket, miszerint ugyanabban a törzsoldatban lévő, különböző DOL-lal rendelkező antitest specieszek eltérő affinitással rendelkeznek. Továbbá még az is nyilvánvalóvá vált, hogy a kötött és nem kötött antitestfrakciók jelölési aránya eltérő.

6.1.3. A szabad és kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásainak szimulálása

Az előző fejezetben bemutatott eredményeink értelmezése arra utal, hogy fluorofórfüggő változások történnek a kvantumhatékonyságban, és az antitestek affinitásában a jelölés hatására. A továbbiakban szeretnénk volna kvantitatív magyarázatot adni a két különböző AlexaFluor festék eltérő viselkedésére. Azt feltételezzük, hogy egy antitest törzsoldat különböző jelölési arányú antitest specieszeket tartalmaz. Ezek a fluoreszcensen jelölt IgG specieszek más-más affinitással és kvantumhatékonysággal rendelkeznek, és versenyeznek ugyanazon epitóp kötéséért. A törzsoldat és a kötött frakció jóslott fluoreszcencia intenzitását a 3. és 4. egyenlet alapján határoztuk meg, négy különböző esetben. Ha a fluoreszcens jelölés nem befolyásolja az antitest affinitását, akkor a törzsoldat és a kötött frakció normalizált fluoreszcencia intenzitása teljesen átfedne annak ellenére, hogy a kvantumhatékonyság csökkenne a DOL növekedésével. Ha a kvantumhatékonyság állandó, de az antitestek affinitása csökken magas DOL hatására, akkor a törzsoldat fluoreszcenciája lineárisan nőne, míg a kötött antitestek normalizált fluoreszcencia intenzitása kevésbé meredeken emelkedne. A továbbiakban két összetett modellt elemeztünk, ahol a jelölés mind az antitest affinitását, mind a festék kvantumhatékonyságát befolyásolja. Az 1. modell esetében az antitest affinitás romlása a hangsúlyosabb, míg a 2. modellben a

kvantumhatékonyság érzékenyebb a jelölésre. Az 1. és 2. modell visszaadja a két AlexaFluor festék eltérő viselkedését. A 2. modellnél a kötött antitestek normalizált fluoreszcencia intenzitása magasabb, míg az 1. modellt vizsgálva ez fordított, az antitest törzsoldatok intenzitása volt magasabb. Ha a fluoreszcens jelölés sokkal inkább a kvantumhatékonyságot befolyásolja, mint az antitest affinitást, akkor a kötött frakció normalizált intenzitása várhatóan nagyobb lesz, ami az AlexaFluor546 esetére volt jellemző. Másrészt, ha az antitest affinitás sokkal érzékenyebb a fluoreszcens jelölésre, mint a kvantumhatékonyság, akkor a törzsoldatok normalizált intenzitása lesz magasabb. Ez jellemzi az AlexaFluor647 esetét. Annak ellenére, hogy a törzsoldatok akár 5-ös F/P-vel is rendelkeznek, a kötött antitestek jelölési aránya mégis ~3-4 körül maradt. Ez arra enged következtetni, hogy a kötött frakció jóvolt átlagos fluoreszcencia intenzitása kisebb, mint a törzsoldatoké mindkét modell esetében.

6.1.4. A kötött antitest frakció jelölési arányának meghatározása fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel

Habár az előző fejezetekben bemutatott kísérletes eredményeink és a modellezés rámutatott a kötött és nem kötött antitest frakciók jelölési arányainak különbségére, próbáltunk egy független módszert találni, ezen eredmények megerősítésére. Mivel a homo-FRET érzékeny mérési lehetőséget nyújt arra, hogy meghatározzuk, hány spektroszkópiailag azonos molekula van Förster távolságon belül, ezért fluoreszcencia anizotrópia méréseket végeztünk. A sejteket különböző F/P-jű antitest törzsoldatokkal jelöltük, majd lizálást és immunprecipitációt követően visszanyertük a sejtekhez kötött antitest frakciót. Ezt követően megmértük az izolált antitestek és a törzsoldatok anizotrópiáját egyaránt. Azért, hogy megvizsgáljuk, van-e az immunprecipitációnak bármilyen hatása az antitestekre, illetve méréseinkre, az alkalmazott antitest oldatokat ugyanúgy immunprecipitáltuk, mint ahogyan a sejtes mintákat. A törzsoldat fluoreszcencia anizotrópiája csökken a jelölési arány függvényében. A kezeletlen és immunprecipitált antitest törzsoldatok anizotrópiája nem különbözik egymástól, ami arra enged következtetni, hogy a sejteken alkalmazott immunprecipitációnak nincs jelentős hatása az anizotrópiára. Másrészt a sejthez kötött antitestek anizotrópiája jellemzően magasabb volt, mint a törzsoldatoké mind a két AlexaFluor festék esetében. Ez arra utal, hogy a sejthez kötött antitestek jelölési aránya alacsonyabb. Bizonyos esetekben a sejthez kötött antitestek anizotrópiája alig csökkent, annak ellenére, hogy a sejteket egyre magasabb F/P-jű oldatokkal jelöltük meg. Ez arra enged

következtetni, hogy szinte csak alacsony jelölési aránnyal rendelkező egyedi antitest molekulák kötődtek a sejtekhez. Habár úgy látszik, az AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel történő konjugáció eltérő módon befolyásolja az antitestek affinitását, az anizotrópia mérések ugyanazt a tendenciát mutatják mind a két festék tekintetében. A továbbiakban az előző fejezetben bemutatott modellt alkalmaztuk, melyet kibővítettük úgy, hogy vegye figyelembe a fluorofórok között lejátszódó homo-FRET függő anizotrópiát a törzsoldatok, illetve a kötött frakció esetében. A számítások eredménye megjósolja, hogy a kötött antitestfrakció magasabb fluoreszcencia anizotrópiával jellemezhető függetlenül attól, hogy a festékekkel történő konjugáció hogyan befolyásolja az antitest affinitását. A kísérletes eredményeink és a modellszámítások arra engedtek következtetni, hogy a sejthez kötött antitest átlagos jelölési aránya jellemzően alacsonyabb, mint a törzsoldatok jelölési aránya.

6.1.5. Az antitest jelölés hatása a fluoreszcencia élettartamra és a fluorofórok spektrumára

Az előző fejezetekben bemutatott eredmények arra engednek következtetni, hogy egy többszörösen jelölt fluoreszcens antitest csökkent fényességgel rendelkezik. Kíváncsiak voltunk arra, hogy statikus vagy dinamikus kioltás áll-e a jelenség hátterében, ezért fluoreszcencia élettartam méréseket végeztünk a frekvencia doménben antitest törzsoldatok híg oldatával. Meghatároztuk az AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel jelölt antitestek látszólagos fázis és modulációs élettartamát, majd az eredményeket normalizáltuk a legkisebb DOL-lal rendelkező antitest esetében mért élettartamra. Ugyanazon antitest törzsoldatok fluoreszcencia intenzitását külön-külön meghatároztuk fluoriméterrel, majd szintén normalizáltuk a legalacsonyabb DOL-lal rendelkező antitest fluoreszcencia intenzitására, és a normalizált élettartam mellett a DOL függvényében ábráztuk. Noha a normalizált fluoreszcencia élettartam csökkent a növekvő DOL-lal, ezen változás mértéke mégis sokkal kisebb volt, mint a normalizált fluoreszcencia intenzitás változása, ami azt jelenti, hogy a csökkent kvantumhatékonyság részben statikus kioltásnak köszönhető. Azért, hogy kiderítsük, hogy a nem fluoreszcens dimerek, másnéven H-aggregátumok hozzájárulnak-e a kioltás folyamatához, felvettük a fluorofórral konjugált antitestek abszorpciós és gerjesztési spektrumát. Az abszorpciós spektrumokban a fő abszorpciós sávhoz képest kék irányban eltolódott csúcs megjelenése és DOL-függő növekedése, és ennek a sávnak a hiánya az excitációs spektrumokban azt jelenti, hogy nem fluoreszcens festék aggregátumok vannak jelen. A szabad, nem konjugált festékek abszorpciós spektruma monomer specieszek

spektrumát jelenti. AlexaFluor647 festék esetében az antitesthez kötött festékek gerjesztési spektruma eltér a szabad festékétől, míg AlexaFluor546 esetében a görbék átfednek egymással. A cianin festékekről ismert, hogy cisz- és transz-izomereket képeznek, melyek spektrószkópiailag kissé különböznek egymástól. Ez okozhatta a különbséget AlexaFluor647 festékekkel történő konjugáció esetében a szabad festékekhez képest. Összegzőként elmondható, hogy az élettartam mérések és a spektrális adatok összhangban vannak: a fluoreszcencia kioltáshoz a festék aggregátumok jelentősen hozzájárulnak.

6.1.6. Egyedi antitestek fluoreszcencia intenzitás eloszlása a törzsoldatban és a sejthez kötött frakcióban

Az összes előző kísérletes és elméleti eredményünk arra enged következtetni, hogy a sejthez kötött antitestek jelölési aránya alacsonyabb, mint a jelölésre használt antitest oldatoké, mivel a többszörösen jelölt antitestek alacsony affinitásuk miatt alulreprezentáltak a kötött frakcióban. Annak érdekében, hogy még jobban megbizonyosodhassunk arról, hogy a fenti következtetéseink helyesek, egyedi molekula méréseket végeztünk AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tel jelölt antitest törzsoldatokkal, illetve azok sejthez kötött frakcióival. Kellően hígított antitest oldatokat immobilizáltunk epoxival kezelt fedőlemezen azért, hogy egy detektált fluoreszcens folt valóban egyetlen antitesttől származzon. Ugyanebből az okból a sejteket is kellően híg antitest oldatokkal jelöltük meg, és mindkét típusú minta esetében a fedőlemezhez közeli síkról vettünk fel képeket. A háttér meghatározásához fedőlemezhez-, illetve sejthez kötött AlexaFluor488 festéket használtunk. Az AlexaFluor488 jel segítségével megkerestük a fedőlemezhez közeli síkot, majd a képeket az AlexaFluor546 vagy AlexaFluor647 csatornában rögzítettük. Az AlexaFluor488-cal jelölt minták azért használhatóak negatív kontrollként, mert az AlexaFluor488 átvilágítása elhanyagolható az AlexaFluor546 és AlexaFluor647 csatornába. Ezek a mérések bizonyították továbbá, hogy az AlexaFluor546- és AlexaFluor647-konjugált antitestek jele erősebb, mint az autofluoreszcencia. Megvizsgáltuk a fluoreszcens foltok intenzitáseloszlását a törzsoldatok és a sejthez kötött frakció esetében is, melyhez nagy jelölési arányú (DOL=3,8) AlexaFluor647-trastuzumab antitestet használtunk. Az ilyen magas F/P-jű antitest oldatoknál azt várjuk, hogy számos, 3-4 fluorofórral konjugált antitestet tartalmaz, és a benne lévő antitest specieszek eloszlása Poisson eloszlást követ. Meglepő módon a törzsoldat vizsgálatok az alacsony intenzitással rendelkező foltok fordultak elő a leggyakrabban, ami ellentétes a Poisson eloszlással. Ezt a jelenséget a magas jelölési arány és a kvantumhatékonyság közötti fordított

arányosságnak tulajdonítottuk. Az antitestek átlagos intenzitását minden egyes folt fotonszámából számoltuk ki, ami 3,8 F/P-jű antitest esetében csak ~25%-kal volt magasabb, mint a 0,9 DOL-lal rendelkező antitest intenzitása, ami összhangban volt előző eredményeinkkel. Az antitest törzsoldatok és a sejthez kötött antitestek intenzitáseloszlásának összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy egy magasabb jelölési aránnyal (DOL=3,8) rendelkező AlexaFluor647-trastuzumab esetén a magas DOL-lal rendelkező molekula specieszek egyértelműen alulreprezentáltak a sejthez kötött frakcióban. AlexaFluor647-trastuzumab egy alacsonyabb jelölési arányú (DOL=0,9) antitest oldatát vizsgálva nem találtunk jelentős különbséget a kötött antitestek és a törzsoldat intenzitáseloszlásában. Amikor megfigyeltük az AlexaFluor647-trastuzumab kötött frakciójának intenzitáseloszlát 3,8-as DOL, illetve 0,9-es DOL esetén, azt láttuk, hogy a görbék tulajdonképpen azonosak voltak. Megvizsgáltuk az AlexaFluor546-jelölt trastuzumab-ot (DOL=1.9) is, ahol szintén azt tapasztaltuk a magas DOL-lal rendelkező egyedi molekulák kevésbé voltak jelen a sejthez kötött frakcióban, habár ez a hatás nem volt akkora mértékű, mint a nagy F/P-jű AlexaFluor647-trastuzumab estében. Ezek az eredmények összhangban vannak az előző fejezetekben bemutatott eredményekkel is. Levonható az a következtetés, hogy az egyedi molekula mérések megerősítik az áramlási citometriás és fluoriméteres intenzitás, illetve anizotrópiás kísérletek eredményeit, melyek szerint egy antitest törzsoldaton belül az alacsonyabb jelölési aránnyal rendelkező antitestek a legtöbb esetben jobban kötődnek antigénjeikhez.

6.2. A fluorofór szaturáció hátrányos hatásainak csökkentése FRET mikroszkópia során

Magas gerjesztési foton-fluxus esetén elméleti megfontolások miatt csökken a FRET indukálta donor fluoreszcencia kioltás, mert ilyenkor az energiatranszfer által relaxálódott donor szinte azonnal újra gerjesztett állapotba kerül. A jelenség kvantitatív átgondolását a disszertáció „Elmélet” című fejezetében ismertettem, ami megjósolja, hogy a donor kioltásából számolt FRET hatékonyság csökken a szaturálódott donorok függvényében. Ezt a jelenséget leíró képlet átrendezése lehetőséget nyújt arra, hogy a FRET hatékonyságot donor szaturációra korigáljuk. Mivel a konfokális mikroszkópiában általánosan használt gerjesztő foton-fluxus gyakran esik olyan tartományba, ahol a szaturáció jelensége jelen van, úgy véltük, hogy ezt a problémát érdemes tovább vizsgálni. A fluorofór szaturációt a tiltott átmenet jelentősen befolyásolja, mivel a festék populációk akár 50-80%-a is felhalmozódhat

triplet állapotban, ami a látszólagos FRET hatékonyságra is hatással lehet. A disszertáció elméleti részében leírtak szerint a donorkioltásból származó látszólagos FRET hatékonyság a szaturálódott donorok arányával csökken, még akkor is, ha triplet állapotban halmozódnak fel. Két fontos következtetést vonhatunk le: (i) nem a gerjesztett állapotban lévő donorok, hanem az S1 állapot normalizált, szaturálódott hányada határozza meg a donor kioltás alapján számolt FRET hatékonyság csökkenését. (ii) Ha a gerjesztett molekulák triplet állapotban felhalmozódnak, akkor a FRET hatékonyság látszólagos hanyatlása még nagyobb mértékű lesz. A fentebb említett megfigyelések lehetővé teszik azt, hogy korrigáljuk a látszólagos FRET hatékonyságot a donor szaturációra. Az eredmények részben eddig tárgyalt egyenletek nem vették figyelembe a FRET frusztráció jelenségét, mely akkor jön létre, amikor az akceptor gerjesztett állapotban van, és emiatt a donor nem tud FRET által relaxálódni. Egy másik egyenletrendszer is létrehoztunk, mely figyelembe vesz a fluorofór szaturációt és a FRET frusztrációt egyaránt. AlexaFluor488-AlexaFluor546 donor-akceptor pár esetében a FRET értékek meghatározására a fentiekben említett alapelveket alkalmaztuk. Várakozásainknak megfelelően a FRET hatékonyság csökken, még az α értéke meredeken nő a donort gerjesztő lézerintenzitás növelésével. Az α faktor fluorofór szaturációra történő korrigálását követően függetlenné vált a foton-fluxustól. A FRET hatékonyságot három különböző módon korrigáltuk: (i) a hagyományos egyenletet korrigáltuk a 11. egyenlet szerint; (ii) a fluorofór szaturációval számoló, de FRET frusztrációt mellőző; (iii) fluorofór szaturációt és FRET frusztrációt egyaránt figyelembe vevő egyenleteket használva. Az első két esetben megegyező eredményeket kaptunk, a FRET hatékonyság kevésbé függött a foton-fluxustól. A harmadik korrekciós módszer szinte teljesen megszünteti a FRET hatásfok gerjesztő foton-fluxustól való függését.

Megvizsgáltuk, hogy a FRET értékek hogyan változnak, ha csak a donor-, csak az akceptor-, vagy mindkét gerjesztő lézer intenzitást változtatjuk, és eredményeinkből az derül ki, hogy a donort gerjesztő foton-fluxus számít a leginkább.

A módszereinket kipróbáltuk fluoreszcens proteinek által alkotott donor-akceptor (GFP + mCherry) pár esetében is. Az egyenletrendszer kicsit módosítottuk azért, hogy az α és FRET értékeket ugyanabból a mérésből meghatározhassuk. Ezek a mérések szintén megerősítették azt, hogy a fluorofór szaturációt figyelembe vevő egyenlet alkalmazása sikeresen megszünteti a FRET hatékonyság függését a gerjesztési foton-fluxustól.

A fent említett módszerek érvényességét és alkalmazhatóságát megerősíti az, hogy sikerült a számolt FRET értékeket a megvilágító foton-fluxustól függetleníteni. Egy fluorofórnak számos deexcitációs útvonala létezik, melyek közül a fotoelhalványítás és a

szingulett-szingulett annihiláció befolyásolhatja a FRET számításokat. A modell kidolgozása során egyiket sem vettük figyelembe a következő okok miatt. A szingulett-szingulett annihiláció előfordulása nem valószínű az általunk felállított kísérletes rendszerben, mivel: (i) bemutattuk, hogy a látszólagos FRET hatékonyságot függetlenítettük a megvilágító lézer teljesítményétől. Már maga ez az alapjelenség, a foton-fluxustól függő FRET hatékonyság csökkenése arra utal, hogy a szingulett-szingulett annihiláció nincs jelen a vizsgált kísérleti rendszerünkben. (ii) Egy donort és egy akceptort tartalmazó komplexben szingulett-szingulett annihiláció akkor történik, amikor mind a két fluorofór gerjesztett állapotban van (D^*A^*). Számításaink alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy csak a magas FRET értékeknél fordulnak elő a D^*A^* komplexek jelentős mértékben. Mivel sejtes FRET mérések esetében a FRET értékek ritkán magasabbak 0,3-0,4-nél, ezért a szingulett-szingulett annihiláció figyelmen kívül hagyása ésszerű feltételezés az ilyen jellegű kísérletek során.

A fotoelhalványítás szintén egy olyan jelenség, ami befolyásolni képes a FRET méréseket azáltal, hogy csökkenti a donorok és akceptorok mennyiségét és sűrűségét, illetve megváltoztatja a donorok és akceptorok egymáshoz viszonyított arányát. Bár az általunk vizsgált három kísérleti rendszerben a festékek intenzitása ~30%-kal csökkent a kísérlet során a fotoelhalványítás miatt, ez a jelenség a számolt FRET hatékonyságra nem gyakorolt jelentős hatást, hiszen a FRET értékekre nem volt hatással a gerjesztő fényvel történő előző megvilágítás időtárama. Ha hagyományos vagy bármelyik fent említett módszerrel meghatározott FRET értékekről kiderült volna, hogy érzékenyek a fotoelhalványításra, akkor az egyenletek erre a jelenségre történő korrekciója is szükséges lenne.

7. Eredmények megbeszélése

7.1. Az antitest jelölés hatása az antitestek és a fluorofórok tulajdonságaira

Korábbi eredmények már beszámoltak arról, hogy az antitestek fluorofórokkal történő konjugációja negatívan befolyásolja az antitestek affinitását, illetve azt is kijelentették, hogy az antitestekhez kötött fluorofórok kvantumhatékonysága alacsonyabb, mint a szabad fluorofóroké.

Az antitestek affinitásával és kvantumhatékonyságával foglalkozó témában bemutatott kísérletes eredményeink fő megállapításai a következők: (i) az antitesthez konjugált fluorofórok csökkent kvantumhatékonyságot mutatnak, amiben mind a dinamikus, mind a statikus kioltás szerepet játszik. Fluoreszcencia élettartam méréseink alapján a statikus kioltás dominál. (ii) Csökken az antitestek epitóp iránti affinitása a jelölési arány növelésével, ami az antitest törzsoldatnál kisebb DOL-lal rendelkező antitestek preferenciális kötődését eredményezi. (iii) Modellszámításaink és kísérleti eredményeink alapján a különböző festékekkel történő jelölés más-más módon hat az antitestek affinitására és kvantumhatékonyságára, amit az AlexaFluor647-tel, illetve AlexaFluor546-tal végzett vizsgálataink bizonyítottak.

Megállapítottuk, hogy a többszörösen jelölt antitestek esetében a fluoreszcencia kioltásban főleg a statikus kioltás dominál, de a dinamikus hatások is érvényesülnek. Az önkkioltás során fontos szerepet játszik a festék aggregátumok kialakulása, illetve olyan FRET folyamatok, melyek során az energia nem-fluoreszcens klaszterekre vagy dimerekre tevődik át. Az abszorpciós és gerjesztési spektrumok összehasonlításának köszönhetően kiderült, hogy ezek a nem-fluoreszcens aggregátumok jelen vannak mindkét AlexaFluor festéknél.

Három különböző kísérletünk bizonyítja, hogy a többszörösen jelölt antitestek alulreprezentáltak a sejthez kötött antitestfrakcióban: (i) Összehasonlítottuk az antitest törzsoldat és a sejthez kötött antitestek fluoreszcencia intenzitásait a jelölési arány függvényében. (ii) Összehasonlítottuk az antitest törzsoldatok és azok kötött frakcióinak anizotrópiáját. (iii) Közvetlenül megmértük a kötött frakcióban és az antitest törzsoldatban lévő egyedi antitest molekulák intenzitáseloszlását. A kötött frakció anizotrópiájának jóslására olyan modellszámításokat végeztünk, ami megállapította, hogy az antitest törzsoldatok DOL függvényében mért anizotrópiájára illesztett görbe kalibrációs görbéként használható a kötött frakció jelölési arányának meghatározására. Az antitest csökkent affinitását a molekula konjugáció hatására megváltozó vagy gátolt belső flexibilitása magyarázhatja. Habár az

antitestek és a fluorofórok a fluoreszcens jelöléssel szembeni érzékenységükben jelentős különbségeket mutatnak, a kötött frakció átlagos jelölési aránya szinte mindig alacsonyabb, mint a sejtek jelölésére használt antitest törzsoldatok F/P-je. Az egyedi molekulák fluoreszcencia intenzitás eloszlása a törzsoldatokban nem mindig volt összhangban várakozásainkkal, pl.: magas jelölési arányú AlexaFluor647-tel konjugált trastuzumab antitest esetében a legalacsonyabb intenzitás értékekhez tartozó csúcs tartalmazta a legnagyobb számú molekulát. Ezt a jelenséget nagy F/P-jű antitestek esetében az önkiooltásnak, illetve az ebből adódó nem lineáris intenzitásváltozásnak tulajdonítottuk. Másrészt fontolóra kell venni, hogy a különböző jelölési arányú antitest molekulák eloszlása egy törzsoldatban nem Poisson eloszlást követ, ami szintén magyarázná ezt a jelenséget. Azért, hogy a fluorofórokkal jelölt antitestekre a Poisson eloszlás feltételezése valóban helyes megközelítés legyen, a következő feltételeknek kell teljesednie: (i) minden lizin maradéknak azonos valószínűséggel kell a konjugációs reakcióban részt vennie; (ii) az egyes lizin oldalláncok jelölésének egymástól függetlennek kell lennie. Mivel az antitestek fluoreszcens jelölése során valószínűleg egyik feltétel sem teljesül, ezért a Poisson eloszlást csak egy egyszerűsítő, praktikus megközelítésként lehet használni.

Összegzésként elmondható, hogy egy olyan kísérletes megközelítést hoztunk létre, amely jellemzi a fluoreszcens jelölés hatását az antitestek affinitására, illetve a fluorofórok kvantumhatékonyságára. Sikeresen kimutattuk azt, hogy a jelölés folyamata mind az antitest, mind a fluorofór tulajdonságait negatívan befolyásolja. A festékaggregátumok kialakulásának, illetve a nem-fluoreszcens dimerek felé történő energiatranszfernek köszönhetően a festékek kvantumhatékonysága csökken. Másrészt egy törzsoldatban lévő, többszörösen jelölt antitestspeciesszek affinitása csökken, ezért az antigénhez kötött frakcióban a magas jelölési arányú antitestek alulreprezentáltak lesznek. A bemutatott eredmények jelentősége olyan kísérletek során fontos, ahol szükséges az antigénhez kötött antitestek fluoreszcenciáját meghatározni. A kvantitatív, intenzitás alapú vagy ratiometrikus FRET méréseknél a számítások során bizonyos állandók (α faktor) szükségesek, amik a gerjesztett donort, illetve akceptort detektáló rendszer érzékenységét jellemzik. Az állandók meghatározásához használt fluoreszcens antitestek fluoreszcencia intenzitását normalizálni kell az antitest jelölési arányával, amihez az antitest törzsoldat DOL értékét használjuk. Mivel eredményeink azt mutatták, hogy a kötött antitestek és az antitest oldatok jelölési aránya jelentősen eltér egymástól, ezért ezek a számítások helytelenek lesznek, és a használt korrekciós faktorok torzított becslését fogják eredményezni. Az antitestek jelölési aránya szintén fontos szuper-

felbontású lokalizációs képalkotás során, ahol statisztikai számításokat használnak, és az antitest jelölési arányával korrigálnak. Ha a számítások során az antitest törzsoldat DOL-jára korrigálnak, a lokalizációk számát tévesen fogják meghatározni. Levonható az a következtetés, hogy a kvantitatív fluoreszcenciás mérések során célszerű alacsony jelölési arányú antitesteket választani.

7.2. Fluorofór szaturációs vizsgálatok

A Förster-típusú rezonancia energiáttranszfer (FRET) népszerű lehetőséget biztosít fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára fiziológias és patológias körülmények között, amit rugalmasságának és viszonylagos könnyen használhatóságának köszönhet. Annak ellenére, hogy számos mérési formája létezik, a legszélesebb körben elterjedt mégis az intenzitás alapú vagy ratiometrikus megközelítés, ahol vizsgálják a donor kioltását, illetve mérik a szenzitizált és közvetlenül gerjesztett akceptor fluoreszcenciáját. Méréseink során a jobb jel-zaj arány elérése érdekében gyakran alkalmazunk erős gerjesztő intenzitást, ami fluorofór szaturációhoz vezet. Ilyen körülmények között a kibocsátott fluoreszcencia többé már nem egyenesen arányos a megvilágító foton-fluxussal, mely a kiértékelések során megtévesztő lehet. Ezzel a problémával leginkább a mikroszkópos mérések során kell számolni, fluoriméteres és áramlási citometriás méréseknél, a gyenge gerjesztő intenzitásnak és az alacsony numerikus apertúrájú objektívnek (vagy az objektív hiányának) köszönhetően ez a jelenség nem áll fent. Habár a konfokális mikroszkópozás során gyakran alkalmazott lézerintenzitások mellett jelen van a szaturáció jelensége, mégsem veszik figyelembe az intenzitás alapú FRET számításakor.

Kísérleteink és modellrendszerünk alapján elmondható, hogy a FRET hatékonyság és annak meghatározásához szükséges α faktor nagymértékben függ a megvilágító fény intenzitásától. Minél magasabb a gerjesztő foton-fluxus, annál jobban csökken a hagyományos képlettel számított FRET hatékonyság. Megvizsgáltuk a jelenséget csak szingulett állapotot, illetve szingulett és triplet állapotot egyaránt feltételezve. Azzal a modellel, ahol kizárólag $S1 \rightarrow S0$ átmenetet feltételeztünk, hibát vétünk, mivel a triplet állapotot figyelmen kívül hagyjuk. Ezért számításba vettünk olyan rendszert is, ahol a fluorofórok triplet állapotban felhalmozódnak, de ezen modell gyakorlati alkalmazásához ismerni kellene az $S1 \rightarrow T1$ és $T1 \rightarrow S0$ átmenetek sebességi állandóit. Mivel ezek a paraméterek általában nem elérhetőek és kísérletesen nehezen határozhatóak meg, ezért az egyszerűbb, a triplet állapotot elhanyagoló modellel végeztük a FRET mérések kiértékelését. A triplet állapot elhanyagolásából eredő hibát

kompenzálta az, hogy a valós foton-fluxust túlbecslő látszólagos foton-fluxust használtuk a kiértékelés során. Vizsgálataink kiterjedtek arra is, hogy bizonyítottuk, hogy valóban a donor szaturáció okozta a csökkenő FRET hatékonyságot a megvilágító fény intenzitásának függvényében. Számításaink során létrehoztunk három különböző, szaturációt figyelembe vevő FRET hatékonyság meghatározására szolgáló képletet: (i) hagyományos módszer donor szaturációra korrigált változata (l. 11. egyenlet), (ii) donor szaturációval számoló, (iii) donor szaturációt és FRET frusztrációt egyaránt figyelembe vevő képletek. Három különböző donor-akceptor pár mérési eredményei alapján látható, hogy az általunk alkalmazott módszerek nagymértékben eliminálták a FRET hatékonyság gerjesztő foton-fluxustól való függését, és sokkal megbízhatóbb eredményeket adtak. A fentebb említett módszereket a Matlabon belül futó rFRET programban lehet használni. Alkalmazásakor jelentősen csökkenthető az energiatranszfer gerjesztőfény intenzitásától való függése. Hangsúlyozandó, hogy a szaturáció valós probléma a mikroszkópos mérések során, amit számításba kell venni a kvantitatívabb és eszközfüggetlen mérések érdekében.

8. Összefoglalás

A fluoreszcens vizsgálatok, mérések során a minél jobb jel-zaj arány elérése érdekében a két leggyakrabban alkalmazott módszer az antitestek jelölési arányának növelése, illetve a gerjesztési fény intenzitásának fokozása. Azonban ezek nem kívánatos módon befolyásolják méréseinket, ezzel téves számításokat eredményezve. Kísérleteink során kiderült, hogy az antitestek fluoreszcens festékekkel történő jelölése negatívan befolyásolja az antitestek affinitását és a fluoreszcens festékek kvantumhatékonyságát. A magas jelölési aránnyal rendelkező antitestek alulreprezentáltak lesznek a sejthez kötött frakcióban a csökkent affinitás miatt. Továbbá a fluorofórok között lejátszódó energiatranszfer, illetve kioltásos folyamatok csökkent fényességet fognak eredményezni. Mindezek mellett mikroszkópos mérések során a nagy numerikus apertúrájú objektív fókuszpontjában a megvilágító fény intenzitása olyan nagy, hogy a fluorofórok szaturálódnak. Modellszámításokkal és kísérletes mérésekkel is alátámasztottuk, hogy a hagyományos képlettel számolt FRET hatékonyság nagymértékben csökken a gerjesztő foton-fluxus függvényében. Sikeresen létrehoztunk olyan egyenleteket, melyek figyelembe veszik a donor szaturációt és a FRET frusztrációt is. Alkalmazásuknak köszönhetően a FRET hatékonyság és annak kiszámolásához szükséges α faktor szinte teljesen függetleníthető a megvilágító lézer intenzitásától. Összefoglalásként elmondható, hogy mindezen mérések, modellek, számítások nagymértékben hozzájárulnak a kvantitatívabb, pontosabb és eszközfüggetlen fluoreszcens mérések kivitelezéséhez.

A PhD munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs hivatal támogatásával valósult meg (GINOP-2.3.2-15-2016-00044).



Nyilvántartási szám: DEENK/186/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szendi-Szalmári Tímea
Neptun kód: IN6E7N
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szendi-Szalmári, T.**, Nagyné Szabó, Á. T., Szöllősi, J., Nagy, P.: Reducing the Detrimental Effects of Saturation Phenomena in FRET Microscopy.
Anal. Chem. 91 (9), 6378-6382, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01504>
IF: 6.35 (2018)
2. Nagyné Szabó, Á. T., **Szendi-Szalmári, T.**, Ujlaky-Nagy, L., Rádi, I., Vereb, G., Szöllősi, J., Nagy, P.: The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes.
Biophys. J. 114 (3), 688-700, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.011>
IF: 3.665

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,015

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,015

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

Debrecen, 2020.06.11.

