

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Nagyné Szabó Ágnes Tímea

**Az ErbB receptorok konstitutív és ligand indukált
asszociációinak kvantitatív jellemzése**



Témavezetők:

Prof. Dr. Szöllősi János

Dr. Nagy Péter

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád	5
2.2. Az ErbB receptorok ligandjai	6
2.3. Az ErbB receptorok által indukált szignalizációs útvonalak	8
2.4. Az ErbB fehérjék kölcsönhatásai egymással	10
2.5. ErbB2 ellenes monoklonális antitestek	13
2.6. A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer elmélete	15
2.7. A fluoreszcencia anizotrópia elméleti háttere	19
2.8. FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás elmélete	22
2.9. Célkitűzés	23
3. Anyagok és módszerek	24
3.1. Sejtvonalak	24
3.2. Antitestek, festékek és növekedési faktorok	24
3.3. Sejtek kezelése és jelölése fluoreszcencia anizotrópia méréséhez	25
3.4. Sejtek jelölése FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás méréséhez	27
3.5. Fixálás hatása az ErbB1 receptorok laterális mobilitására – FRAP mérés	28
3.6. Áramlási citometria és a homo-FRET mérések kiértékelése	29
3.7. Konfokális mikroszkópia és fotoelhalványítás	32
3.8. Konfokális mikroszkóppal felvett képek elemzése	32
4. Eredmények és megbeszélésük	35
4.1. Az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homoklaszterek kvantitatív jellemzése áramlási citometriás homo-FRET mérés alapján	35
4.1.1. <i>Fluoreszcencia anizotrópia függése a jelölt antitestek koncentrációjától</i>	35
4.1.2. <i>Antitesthez kötött fluorofór határanizotrópiájának a meghatározása</i>	40
4.1.3. <i>Homoklaszterhez kötődött két antitest közötti távolság meghatározása</i>	43
4.1.4. <i>Az ErbB2 homoklaszterek mérete nyugalomban lévő és különböző módon stimulált SKBR-3 sejteken</i>	44
4.1.5. <i>Az ErbB2 klaszter méretének összefüggése az ErbB2 aktivációs állapotával</i>	49
4.1.6. <i>Szérum és EGF stimuláció hatása az ErbB1 homoklaszterek méretére</i>	51

4.1.7. <i>Az ErbB1 és az ErbB2 molekulákból felépülő homoklaszterek méretének összehasonlítása éheztetett és stimulált sejtek felszínén - Összegzés</i>	53
4.2. <i>Az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homo- és heteroklaszterek kvantitatív jellemzése konfokális mikroszkópon az FSAB módszer alkalmazásával</i>	56
4.2.1. <i>A kötött akceptor molekulák hányadának a meghatározása</i>	56
4.2.2. <i>A megfelelő donor-akceptor pár kiválasztása az FSAB kísérletekhez</i>	58
4.2.3. <i>Az FSAB módszer megbízhatósága: homoklaszterizálódott ErbB1 és ErbB2 receptorok arányainak meghatározása és összevetése korábbi homo-FRET mérésén alapuló eredményeinkkel</i>	61
4.2.4. <i>Az ErbB1 receptor mobilitásának vizsgálata FRAP méréssel</i>	65
4.2.5. <i>Az ErbB1 és az ErbB2 receptorokból felépülő heteroklaszterek kvantitatív jellemzése nyugalomban lévő és stimulált sejtek felszínén</i>	67
4.2.6. <i>Az FSAB módszerrel meghatározott ErbB1 és ErbB2 receptorokból felépülő homo- és heteroklaszterek kvantitatív jellemzése – Összegzés</i>	71
5. Összefoglalás	74
6. Summary	76
7. Irodalomjegyzék	78
7.1. <i>Hivatkozott közlemények jegyzéke</i>	78
7.2. <i>Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények</i>	85
7.3. <i>Posztterek</i>	85
8. Köszönetnyilvánítás	87
9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	88

Rövidítések jegyzéke

BCF: fotoelhalványítási korrekciós faktor (*bleaching correction factor*)

EGF: epidermális növekedési faktor (*epidermal growth factor*)

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor (*epidermal growth factor receptor*)

FRAP: fotoelhalványítást követő fluoreszcencia visszatérés (*fluorescence recovery after photobleaching*)

FRET: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (*fluorescence resonance energy transfer*)

FSAB: FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás (*FRET-sensitized acceptor bleaching*)

HRG: heregulin

PES: szenzitivitás fotokémiai megnövelése (*photochemical enhancement of sensitivity*)

1. Bevezetés

Napjainkban a kardiovaszkuláris megbetegedések mellett a rosszindulatú daganatok vezetnek a halálozási statisztikákat a fejlett országokban. Ezek közül az emlőrák a második leggyakoribb a tüdőrák után, a nők körében azonban a legelterjedtebb rákfajta. A malignus transzformációban és progresszióban az ErbB receptorcsalád (másnéven epidermális növekedési faktor receptorcsalád) tagjai kiemelt fontosságú szerepet játszanak. Az emlődaganatokban az ErbB2 különösen jelentős mind diagnosztikus, mind terápiás szempontból, hiszen az emlőkarcinómák 20-30%-ában fokozott sejtfelszíni kifejeződése (overexpresszió) figyelhető meg. Általában az ilyen, ún. ErbB2-pozitív emlőráknak sokkal rosszabb a prognózisa, gyakrabban ad áttétet és kisebb a túlélés esélye is, mint az ErbB2-t nem overexpresszáló emlőtumoroknak. Ugyanakkor az ErbB2 több, új típusú, szelektív daganatellenes szer támadáspontja, melyek enyhe mellékhatásokkal rendelkeznek, és jelentősen javítják az ErbB2-pozitív daganatok prognózisát.

Az ErbB receptor családnak 4 tagja van (ErbB1, ErbB2, ErbB3 és ErbB4), amelyeknek fiziológias expressziós szintje alacsony normál sejtekben, de fontos szerepük van a sejt növekedésének és fejlődésének szabályozásában. Az ErbB2 szervezetünk sok epidermális sejtjében megtalálható, az emlő tejtermelésért és elvezetésért felelős struktúrájának sejtjei is ilyen eredetűek.

Az ErbB fehérjék a receptor tirozinkináz családba tartoznak. Ligandkötés, onkogenikus mutáció hatására vagy extrém magas expresszió esetén az intracelluláris tirozinkináz doménjük aktiválódik, és számtalan másodlagos jelátviteli rendszert aktivál. Az ErbB fehérjék, ill. kináz doménjük aktiválódásának kulcslépése receptorok homo- és heteroasszociációja, melyek valószínűleg a receptorok stimulálatlan állapotában is léteznek, de ligand (pl. EGF, heregulin) kötődés hatására jelentős átrendeződésen mennek keresztül. Bár a ligand indukált ErbB receptor dimerizáció fenomenológiai szinten évtizedek óta ismert, a folyamat pontos részleteit máig homály fedi. Vita övezi a konstitutív, azaz ligand-független receptor asszociációk létezését és jelentőségét, továbbá a receptor klaszterek pontos sztoichiometriáját.

2. Irodalmi áttekintés

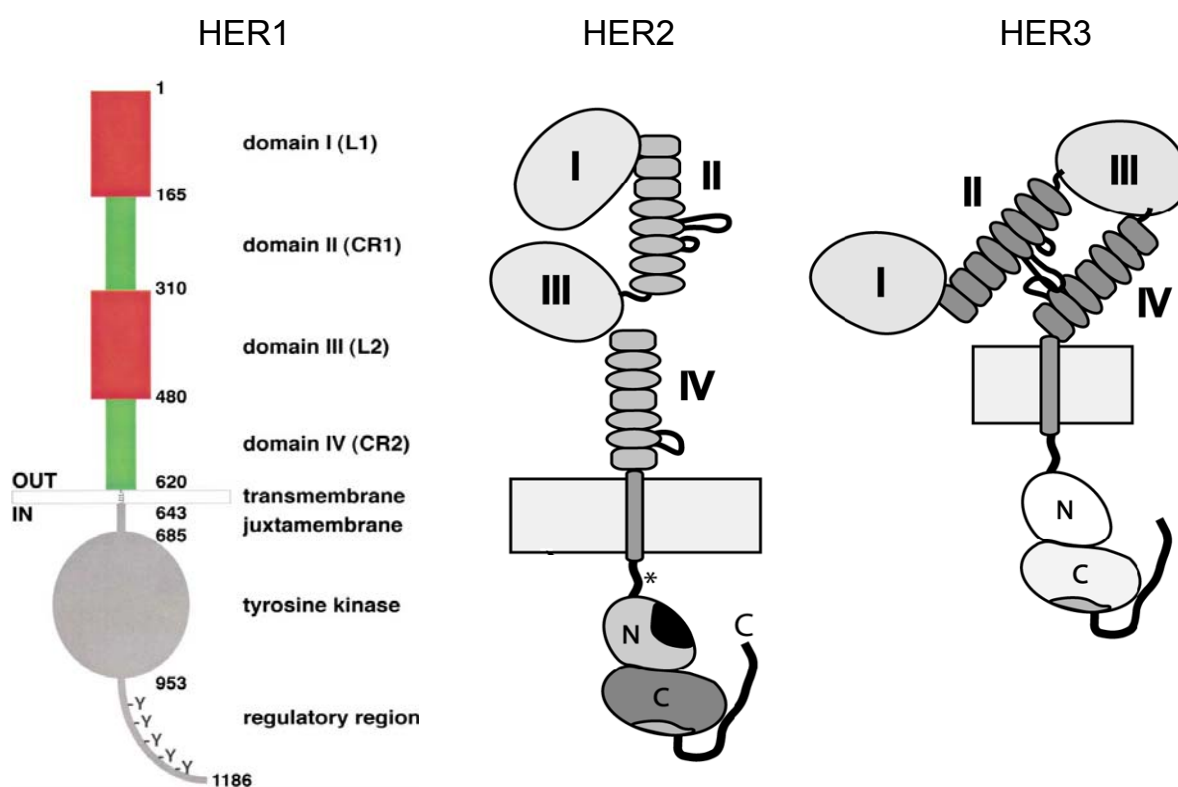
2.1. Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád

Az epidermális növekedési faktor receptor családnak négy tagja ismert: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) és ErbB4 (HER4), melyek többnyire az epiteliális sejtrétegben fejeződnek ki, így például a bőr epidermális sejtjeiben és mirigysejtekben. Fontos szerepet játszanak a korai embrionális fejlődésben, azon belül is a szívfejlődésben, hiányuk még magzati állapotban halálhoz vezet, mivel az ErbB2 és az ErbB4 a szívizomban, az ErbB3 pedig a szívbillentyűk izomsejtjeiben expresszálódik, így nélkülözhetetlenek az egészséges szív kifejlődéséhez (1). Hasonlóan létszükségesek a központi és a perifériás idegrendszer kialakulásához (2), az emlő mirigyek megfelelő működéséhez (1). Mutációjuk, sejtfelszíni túlzott kifejeződésük rákos transzformációhoz vezethet (3).

Az epidermális növekedési faktort közel 50 éve, 1962-ben Cohen fedezte fel és izolálta először egerek nyálmirigyéből (2). Nevét azért kapta, mert képes stimulálni epidermális sejtek proliferációját. Az EGF receptorát 1978-ban hozták először összefüggésbe rákos transzformációval (4), majd 1980-ban kiderült, hogy az EGFR egy ligand-függő tirozinkináz (5). Az ErbB receptor család elnevezése egy vírus nevéből származik, ugyanis néhány évvel később azonosítottak egy *v-erbB* onkogént az avian *erythroblastosis* vírusból, ami valójában a humán EGFR csonkított formája (6). Ezt követően megtalálták az analógját az emberi genomban is. 1984-ben felfedeztek egy *neu*-nak elnevezett onkogént karcinogénnel kezelt patkányokban kifejlődött *neuro*/glioblasztómában, ami nagyon hasonlított a virális *v-erbB* onkogénhez, terméke pedig az epidermális növekedési faktor receptorhoz (7). Az onkogén a *neu* mellett az ErbB2 nevet is kapta. Szintén széleskörűen használatos az ErbB receptor család HER elnevezése is (humán epidermális növekedési faktor receptor).

Mind a négy transzmembrán receptor hasonló felépítésű, az ErbB1, ErbB2 és ErbB3 fehérjék szerkezete az 1. ábrán látható. Tartalmaznak egy hosszú, 620 aminosavból felépülő extracelluláris részt, ami négy doménből épül fel. Az L1 (I) és az L2 (III) szubdomének leucinban gazdagok és képesek a ligand megkötésére, míg a ciszteinben gazdag CR1 (II, S1) és CR2 (IV, S2) szubdomének a receptor dimerizációjában játszanak fontos szerepet. A ligand kötődése utáni információátadásban a 23 aminosavas, α -helikális szerkezetű transzmembrán régióknak, és a hozzá intracellulárisan kötődő, 40 aminosavat tartalmazó juxtamembrán doménnek van szerepe. Ezt követi a foszforilálható aminosavban gazdag tirozinkináz domén,

mely különböző jelátviteli útvonalak szabályozásában játszik fontos szerepet. Végül a C-terminális végen találhatóak a foszforozint kötő effektor molekulák kötőhelyei (7, 8). Az ErbB3 receptor tirozinkináz doménje inaktív a kináz doménben lévő aminosav szubsztitúció miatt (8). Az ErbB2 fehérje extracelluláris ligand kötő doménjeinek (I és III) az összetétele eltér a család többi tagjától, valamint a két domén által képzett ligandkötő zseb túl kis méretű, ezért a mai napig nincsen ismert fiziológias ligandja, így csak heterokomplexben képes jelátviteli útvonalak aktiválására (9).



Burgess, *Molecular Cell*, 2003, 12:541

Landgraf, *Breast Cancer Research*, 2007, 9:202

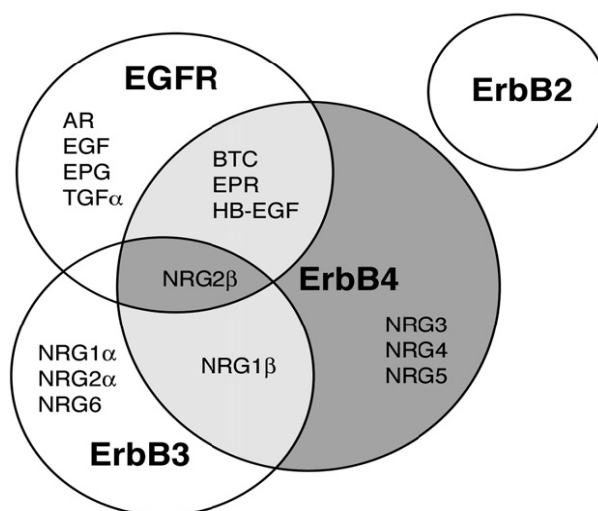
1. **ÁBRA:** Az epidermális növekedési faktor receptor család három tagjának a szerkezete.

2.2. Az ErbB receptorok ligandjai

A mesenchimális sejtek gazdag forrásai az epidermális növekedési faktor receptor család ligandjainak, melyek mindegyike I. típusú transzmembrán protein. A membránba ágyazott ligandok sejtfelszíni proteázok hatására felszabadulnak. Mindegyik érett ligand tartalmaz egy EGF-szerű szekvenciát, ami elengedhetetlen az ErbB receptorokhoz való kötődéshez. Ez a szekvencia meghatározott helyen 6 ciszteint tartalmaz, melyek egymással 3 intramolekuláris

diszulfid kötést alakítanak ki, létrehozva 3 hurkot a receptorokkal történő kölcsönhatáshoz (10). A ligandokat a receptorokhoz való affinitásuk alapján csoportosíthatjuk (2. ábra):

1. EGF-szerű ligandok, amelyek leginkább az ErbB1-hez kötődnek: EGF, TGF α (transzformáló növekedési faktor α), AR (amfiregulin), EPG (epigén)
2. Neuregulinok, más néven heregulinok, melyek a neuregulin receptorokhoz (ErbB3 és ErbB4) kötődnek: 4 neuregulin gén ismert (NRG-1=HRG, NRG-2, NRG-3, NRG-4), ezen belül a HRG és a NRG-2 rendelkezik α és β izoformával is
3. HB-EGF (heparint kötő EGF-szerű növekedési faktor), BTC (betacellulin) és EPR (epiregulin), melyek egyaránt kötődnek az ErbB1-hez és az ErbB4-hez is



Wilson, *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, 122:1

2. ÁBRA: A Venn-diagram szemlélteti a ligandok kötődési specifikitását a különböző ErbB receptorokhoz.

Különböző ligandok, melyek ugyanahhoz az ErbB receptorhoz kötődnek képesek eltérő biológiai folyamatokat aktiválni függetlenül a ligand affinitásától in vivo és in vitro körülmények között is (11).

2.2.1. Az epidermális növekedési faktor

A humán epidermális növekedési faktor egy 6 kDa molekulatömegű és 53 aminosavból felépülő egy láncú polipeptid, amely tartalmazza a három diszulfid kötésből álló EGF-szerű szekvenciát, mellyel nagy affinitással képes kötődni a sejtfelszínen lévő ErbB1 receptorokhoz. A receptor a konformációjában bekövetkező változás hatására dimerizálódik, és aktiválja a sejtek proliferációját fokozó jelátviteli útvonalakat (12).

2.2.2. Heregulin

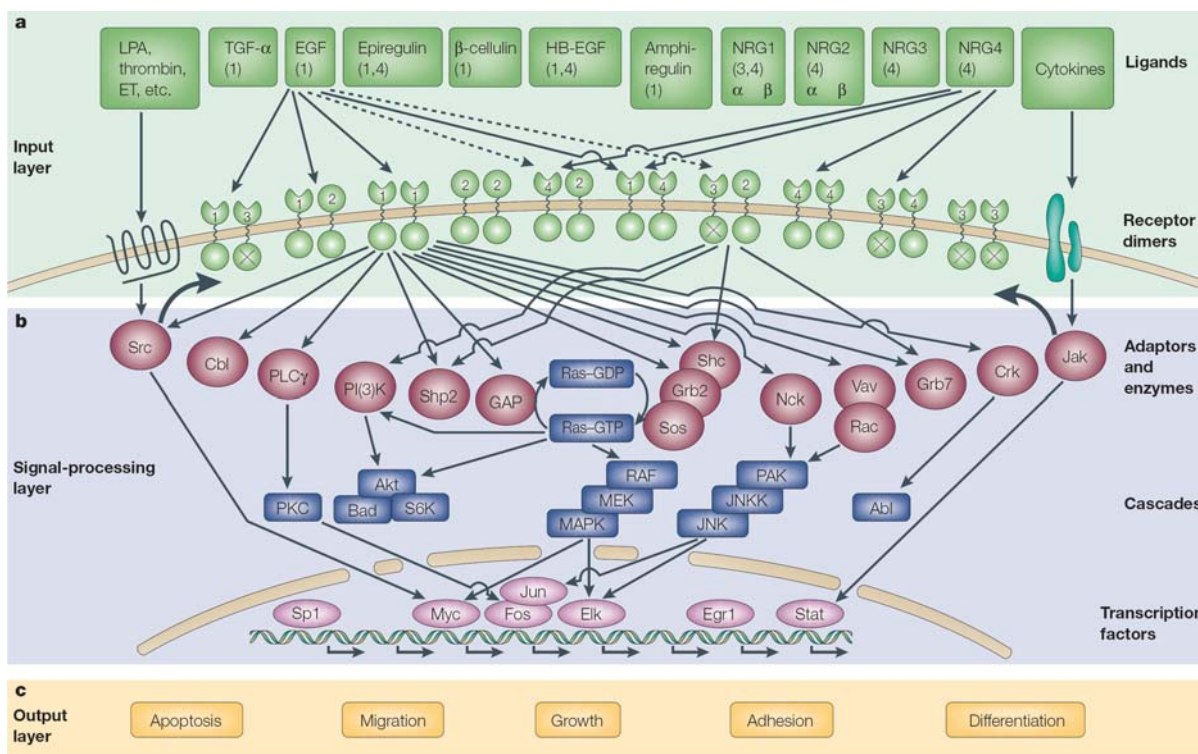
A 44 kDa molekulatömegű heregulin a neuregulinok családjába tartozik, a neuregulin-1 (NRG-1) I. típusú izoformája, amely tartalmaz immunoglobulint (Ig) és EGF-szerű domént. Ez utóbbi domén szekvenciájában jelen lévő különbség miatt több izoformája is ismert, de talán a legtöbbet említett a heregulin- α (HRG- α) és a heregulin- β (HRG- β).

A 90-es évek elején azonosították, mint lehetséges ErbB2 ellenes ligandot (13). Később kiderült, hogy valójában az ErbB2 receptort csak transzaktiválni képes az ErbB3 vagy ErbB4 receptorokhoz történő kötődése után, ugyanis nem történt tirozin foszforiláció abban az esetben, amikor *in vitro* körülmények között a sejtek csak a tirozinkináz aktivitással nem rendelkező ErbB3 receptort fejezték ki. Ellenben, ha jelen volt az ErbB3 mellett az ErbB2 is, akkor heregulin hatására mindkét receptor tirozin foszforilálódott, ugyanakkor ErbB2 ellenes monoklonális antitest kötődése gátolta a heregulin általi aktivációt valószínűleg azért, mert nem volt képes az ErbB2 heterodimerizálódni (17). Az aktivált ErbB2-komplex fokozza a sejtproliferációért, a migrációért, a differenciálódásért felelős jelátvitelt. NRG-1 fehérjét nem szekretáló (NRG-1 null) egereken végzett kísérletek bebizonyították, hogy fontos szerepet tölt be a szív korai embrionális fejlődésében, ezen kívül létfontosságú a központi és a perifériás idegrendszer kialakulásában is (14).

Annak ellenére, hogy a HRG- α és a HRG- β izoformák szerkezetüket tekintve nagyon hasonlóak, valamint mind a kettő kötődik az ErbB3 és az ErbB4 receptorokhoz is, a kötődés affinitása eltérő. A HRG- α kötődése az ErbB3 és az ErbB4 fehérjékből felépülő homodimerekhez 2 nagyságrenddel kisebb, mint HRG- β -é, ellenben mind a kettő izoforma K_d értékei jelentősen csökkentek, amikor az ErbB3 vagy az ErbB4 az ErbB2 receptorral alkotott heterodimert (15). A kísérleteim során a nagyobb affinitású HRG- β -t használtam.

2.3. Az ErbB receptorok által indukált szignalizációs útvonalak

Az ErbB fehérjék extracelluláris doménjéhez különböző ligandok, növekedési faktorok kötődhetnek, melyek hatására a receptorok konformációjában olyan változás történik, ami elősegíti a receptorok homo- és heterodimerizációját. A leggyakoribb heterodimerizációs partner az ErbB2, melynek nincsen ismert ligandja, így koreceptorként a család többi tagjával heterokomplexet alkotva képes csak részt venni jelátviteli folyamatokban, hasonlóan az ErbB3-hoz, melynek a tirozinkináz doménje nem működőképes, így önmagában nem képes jelátviteli útvonalakat aktiválni (16).



Yarden, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2:127

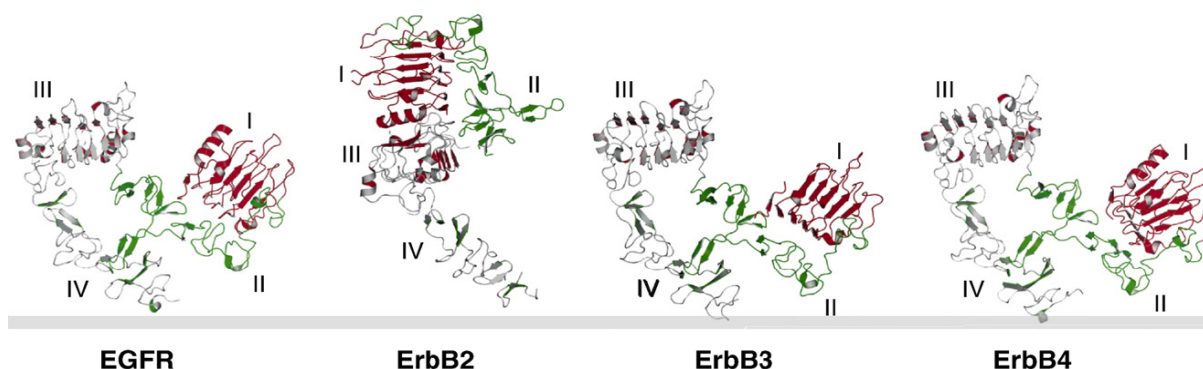
3. ÁBRA: Az ErbB receptorok és ligandjaik által aktivált jelátviteli útvonalak.

A dimerizáció a transzfoszforiláció sztérikus feltétele, ugyanis az intracelluláris oldalon található tirozinkináz régió foszforilálja a szomszédos receptor tirozin oldalláncait. Az így kialakult szignalizációs komplexben gyakran a másodlagos hírvivők is foszforilálódnak, majd a komplexről ledisszociálódnak, és a citoplazmában további fehérjéket aktiválnak, melyek másodlagos hírvivő rendszereket indítanak el. Attól függően, hogy milyen ligand mely receptorok aktivációját okozta, és azon belül is pontosan melyik tirozin foszforilálódott, eltérő jelátviteli útvonalak aktiválódnak (17). A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal számos transzkripciós faktor aktiválásán keresztül fokozza a sejtek proliferációját. A foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) által aktivált Akt kináz útvonal a sejtek túléléseért felelős, antiapoptotikus jeleket indukál, melyet elsősorban az ErbB3 receptort is tartalmazó heterodimerek aktiválnak. A foszfolipáz C- γ (PLC- γ) útvonal aktiválódását az ErbB családon belül csak az ErbB1 képes indukálni. Ilyenkor az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP3) hatására kalciumionok szabadulnak fel az intracelluláris raktárakból, melyek befolyásolják számos Ca^{2+} -függő enzim működését, valamint aktiválódik a számos transzkripciós faktor aktiválásáért is felelős protein kináz C (PKC) a diacilglicerolon (DAG) keresztül (18). Az ErbB receptorok és ligandjaik által indukált szignalizációs útvonalakat a teljesség igénye nélkül a 3. ábra szemlélteti.

Az aktivált receptor dimer gyakran endocitózist szenved, ami a receptor lizoszómális vagy proteoszómális degradációját követően a szignalizáció terminációjához vezethet, vagy az endoszómális, enyhén savas környezetben a dimer disszociálódik, és a receptorok recirkulálnak a sejt felszínére. Általában az ErbB2 receptort is tartalmazó heterodimerek stabilabbak, kevésbé internalizálódnak, de ha mégis, akkor recirkulálnak a sejt felszínére (19).

2.4. Az ErbB fehérjék kölcsönhatásai egymással

A klasszikus dogma szerint ligand kötődés hatására az ErbB receptorok egymással homo- és heterodimereket alkotnak, de a közelmúltban már kimutattak nagyobb méretű asszociátumokat is. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával és egyéb módszerekkel bizonyítékot találtak ErbB1 tetramerek és nagyobb méretű klaszterek létezésére is (20-23), míg az ErbB2 és az ErbB3 sokkal nagyobb méretű, néhány tíz, vagy akár néhány száz proteinből felépülő asszociátumokat alkot néhány tíz vagy száznanométeres skálán mérve elektron (24) és közeli-mező optikai mikroszkópiával (25).

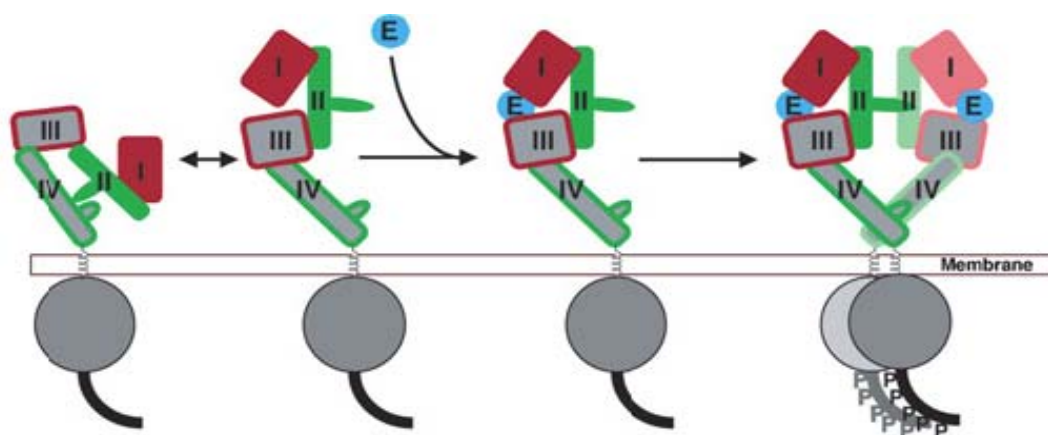


Lemmon, *Experimental Cell Research*, 2009, 315:638

4. **ÁBRA:** Az ErbB receptorok extracelluláris doménjeinek a szerkezete ligand nélkül.

A ligand kötődéséért a receptor extracelluláris részén található I és III domén felelős, míg a dimerizációban a ciszteinben gazdag II és IV domén vesz részt. A 4. ábrán jól látszik, hogy az ErbB2 kivételével a receptorok aktiválatlan állapotukban úgynevezett zárt konformációban vannak (9, 12, 26). A zárt konformációban a II domén dimerizációs karja a IV doménnel intramolekuláris kölcsönhatásban van. Ez a kapcsolat stabilizálja ezt a térszerkezetet, és megakadályozza a dimerizációt, mivel a dimerizációs kar intramolekuláris kölcsönhatása kizárja a II domének közötti intermolekuláris kapcsolódást. Zárt konformációban a ligandot

kötő domének távol vannak egymástól, de képesek ligandot kötni (27). Egyik elmélet szerint a ligand kötődés indukálja a zárt konformáció nyíltba való átmenetét. Más elképzelések szerint a receptor konformációja fluktuál a zárt és nyílt konformációk között (5. ábra), és a ligand kötődése „csak” stabilizálja a nyílt konformációt (28). Ezzel szemben az ErbB2 receptor esetében a II és a IV domének közötti intramolekuláris kölcsönhatás hiányzik, és egyfolytában aktivált, nyílt konformációban van, ezért preferált heterodimerizációs partnere a többi, ligand által aktivált ErbB receptornak. Elektrosztatikus taszítás miatt homodimerizációja csak abban az esetben figyelhető meg, ha a sejtek felszínén túlzottan kifejeződik, vagy mutáció van jelen a transzmembrán doménjében (9). Ezt a homodimerizációt egyrészt a tirozinkináz domén citoplazmatikus részén lévő hidrofób aminosavak okozzák, melyek nélkülözhetetlenek a ligand-független ErbB2 homodimerizációhoz, de nem szükségesek a ligand-függő heterodimerizációhoz (29). Az ErbB2 I és III ligand kötő doménjei közel vannak egymáshoz, valamint összehasonlítva ezeknek az összetételét a többi ErbB fehérje azonos doménjeivel kiderült, hogy mind a két doménon található aminosav szubsztitúció, ami miatt nem képes ligandot kötni (9). Az 5. ábra mutatja be az ErbB1 receptor zárt és nyílt konformációját, valamint EGF kötődés hatására kialakult homodimer szerkezetét.



Ferguson, *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32:742

5. ÁBRA: Az EGFR ligand indukált konformációs változása.

A liganddal nem rendelkező ErbB2 receptor preferált heterodimerizációs partnere a többi ErbB fehérjének, melyek egymással versengve kapcsolódnak az ErbB2-höz, de az leginkább a tirozin kináz aktivitással nem rendelkező ErbB3 receptorral alakít ki stabil komplexet (30). Ha a sejt felszínén ErbB2 molekula is kifejeződik, akkor ligand kötődés hatására az ErbB3

preferenciálisan az ErbB2-vel alkot stabil heterodimert, amely transzfoszforilálja a tirozin kináz defektív ErbB3 receptort, így a ligand nélküli ErbB2 és az inaktív ErbB3 képesek egymással jelátvitelt indukáló komplexet kialakítani (31).

Ha nincs jelen ErbB2, akkor a kevésbé stabil ErbB1-ErbB3, valamint ErbB1-ErbB4 heterokomplexek alakulnak ki. Ezek a heterodimerek akár az EGF ErbB1 receptorhoz, akár a heregulin ErbB3 vagy ErbB4 receptorokhoz való kötődésekor kialakulhatnak, de a heregulin által indukált dimerek stabilabbak (30). A heregulin képes részlegesen gátolni az EGF kötődését, ezáltal akadályozni az ErbB1 aktiválódását, de az ErbB2 túlzott sejtfelszíni kifejeződése ezt megszünteti (32). A ligandkötött ErbB1 sokkal stabilabb homodimerként vagy ErbB2-vel alkotott heterodimerben, mint az ErbB3 vagy az ErbB4 receptorokkal alkotott heterokomplexekben (30).

Az ErbB3 homodimer kisebb affinitással köt heregulinhoz, mint az ErbB4 homodimer (33). Amikor viszont ErbB2-vel alkotnak heterodimert, akkor az ErbB2-ErbB3 és az ErbB2-ErbB4 heterokomplexek heregulinhoz való affinitása megnő, de az ErbB3 receptort tartalmazó heterodimer affinitása a nagyobb. Hasonló a helyzet az ErbB1 EGF-hez történő affinitásával is, amelyet az ErbB2 overexpressziója megnövel azáltal, hogy lelassítja a ligand disszociáció mértékét (34).

Az EGF ligand hatására kialakult ErbB1 homodimerek gyorsan endocitózist szenvednek, és mivel az EGF-ErbB1 kölcsönhatás stabil az alacsony pH-jú, savas endoszómális környezetben, a receptor a ligandjával együtt a lizoszómában degradálódik, csökkentve az ErbB1 receptorok sejtfelszíni számát. Ezáltal az ErbB1 által indukált sejtosztódást kiváltó transzmembrán szignálok is csak relatíve rövid ideig vannak jelen. Ellenben koreceptor jelenlétében (ErbB2 vagy ErbB3) a heterodimerek lassabban szenvednek endocitózist, és a savas, korai endoszómában könnyebben elengedik az EGF-et, így csak az EGF degradálódik, az ErbB1 receptor recirkulál a sejtfelszínre, fokozva a sejtosztódást kiváltó jelátviteli útvonalak aktiválódását. Eközben a koreceptor vagy degradálódik, vagy szintén recirkulál a sejt felszínére (35).

Összességében elmondhatjuk, hogy az ErbB2 túlzott sejtfelszíni kifejeződése esetén az ErbB2 molekulát is tartalmazó heterodimerek nagyobb affinitással kötnek ligandot, mint a homodimerek, és az így kialakult komplexek stabilitását fokozza, kevésbé degradálódnak, ezáltal ezeknek a heterodimereknek folyamatos a tirozinkináz aktivitása, és nagyobb mértékben indukálnak olyan jelátviteli útvonalakat, melyek fokozzák a sejtek életben maradását, transzformációját és differenciációját (34).

2.5. ErbB2 ellenes monoklonális antitestek

2.5.1. Trastuzumab (Herceptin®)

Az ErbB2 gén amplifikációja és az ErbB2 receptor fokozott sejtfelszíni expressziója figyelhető meg az emlőtumорок 20-30%-ában, melyeket ErbB2-pozitív emlőráknak nevezünk. Ez általában rossz prognózissal társul, csökken a túlélés esélye és gyakrabban figyelhető meg metasztázis, mint az ErbB2-t nem overexpresszáló emlőtumорокban (36, 37). Ezért a daganatellenes kutatások egyik legfontosabb célmolekulája az ErbB2, hiszen ha sikerülne gátolni a dimerizációját és aktivációját, kevésbé lenne képes aktiválni a sejtek osztódásáért, életben maradásáért felelős szignalizációs kaszkádot.

Az első, genomiális kutatáson alapuló, az ErbB2 extracelluláris doménje elleni monoklonális antitestet, a trastuzumabot a *Genentech Inc.* Herceptin® néven hozta forgalomba. A trastuzumab a 4D5 jelű, ErbB2 ellen egérben termeltetett monoklonális antitest humanizált változata. A 4D5 variábilis régióját humán IgG konstans régiójával kapcsolták össze (38, 39). A *United States Food and Drug Administration (FDA)* 1998-ban engedélyezte a trastuzumab használatát kemoterápiával kombinálva, valamint monoterápia formájában is azoknál a pácienseknél, akiknél metasztatikus ErbB2-pozitív emlőrákot diagnosztizáltak, majd 2006 óta a korai emlőrák adjuváns kezelésére, valamint 2008-tól kezdve az ErbB2-t fokozottan kifejező, nyirokcsomó metasztázissal nem rendelkező betegeknél is, ugyanis II-es és III-as klinikai fázisban egyértelműen bebizonyosodott a trastuzumab daganatellenes hatása (40-42).

A biztató eredmények ellenére a pontos hatásmechanizmusa ma sem ismert, de irodalmi adatok alapján, *in vitro* körülmények között a következő mechanizmusok lehetségesek:

- Az ErbB2 képes aktiválni a PI3K és a MAPK jelátviteli útvonalakat, azonban trastuzumab kötődése esetén ezen útvonalak gátlása, a sejtek apoptózisa figyelhető meg. Egyik feltételezés szerint a sejtfelszínen található ErbB2 számának internalizáció és degradáció által kiváltott csökkenése okozza az útvonalak gátlását (43, 44). Másik elmélet szerint a trastuzumab aktiválja a PTEN foszfatázt, ami az Akt defoszforilációja útján megakadályozza a sejtek proliferációját (45).
- A trastuzumab csökkenti a ciklin D1 expresszióját, ami csökkenti a p27^{kip1} ciklin-függő kináz inhibitor szekvesztrációját, és lehetővé teszi a sejtciklus G1 fázisban történő leállítását a ciklin E/cdk2 komplex gátlása által (46).

- A trastuzumab gátolja az ErbB2 metalloproteázok általi proteolitikus hasítását, ami egy olyan trunkált ErbB2 receptort eredményez, ami csak az intracelluláris és a transzmembrán domént tartalmazza, és konstitutívan aktiválja a másodlagos jelátviteli rendszereket (47). Ezt támasztja alá az, hogy a trastuzumab az ErbB2 IV domén C-terminusához kötődik, közel a transzmembrán régióhoz, ahol a metalloproteázok is hasítják a fehérjét (48).

In vivo esetben a trastuzumab lehetséges hatásai:

- Állatkísérletekben kimutatták, hogy trastuzumab kezelés csökkenti néhány érképződést segítő (pl. VEGF, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor), és fokozza egyes érképződést gátló növekedési faktorok (pl. TSP-1, thrombospondin) kifejeződését (49).
- Klinikai vizsgálatok is alátámasztják, hogy a trastuzumab aktiválja az antitest-közvetítette sejtfüggő citotoxikus reakciót (ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) számos emlőtumor sejtvonalon, mely során Fc-receptorral rendelkező immunkompetens sejtek felismerik az antitesttel bevont daganatos sejtet, és elpusztítják azt (50, 51).

A monovalens trastuzumab Fab fragmentumok nem képesek olyan antiproliferatív hatás kiváltására, amelyet a teljes antitesttel történő kezelés okoz. Ez vagy arra utal, hogy a bivalens antitesttel történő keresztkötés elengedhetetlen feltétele lehet a sejtproliferáció gátlásának vagy azt, hogy az Fc rész mediálta ADCC reakció felelős az antitest hatásának jelentős részéért. In vivo körülmények között az utóbbi következtetés mellett szól az, hogy Fab₂ fragmentumok szintén hatástalannak (50) vagy csökkent hatásúak voltak (52) a teljes antitesttel végzett terápiához képest.

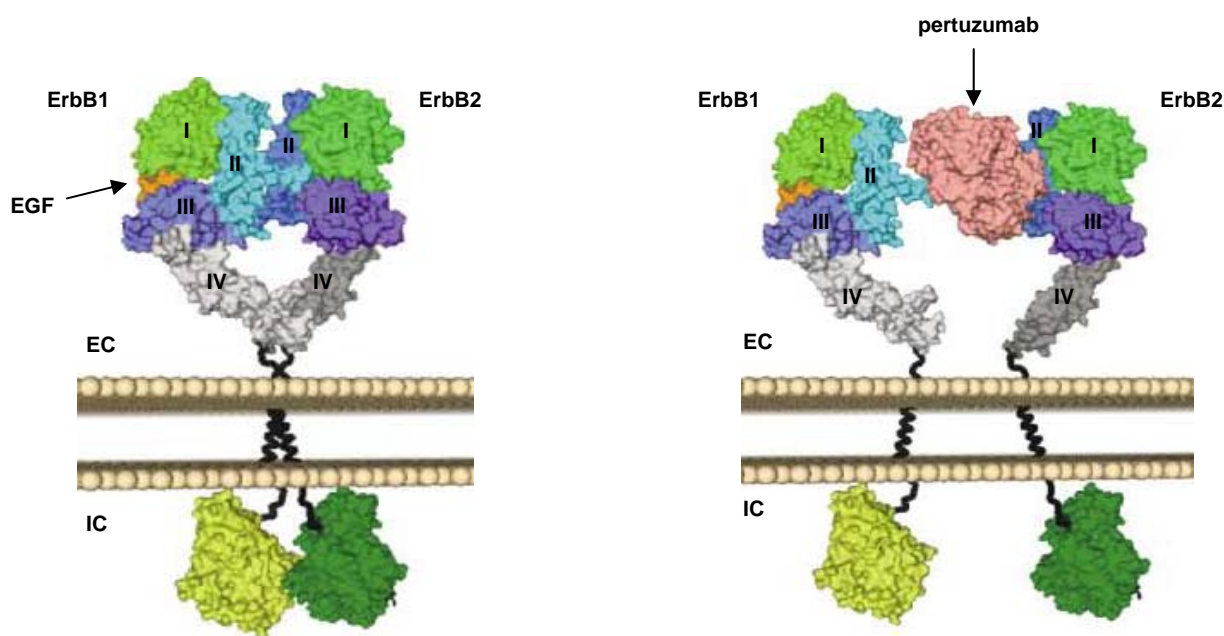
2.5.2. Pertuzumab (2C4, Omnitarg[®])

A pertuzumab olyan monoklonális antitest, amelyet egérben termeltettek az ErbB2 fehérje extracelluláris doménje ellen, majd humanizálták. A II doménhez kötődik, közel a dimerizációért felelős hurokhoz, ezért sztérikusan gátolja az ErbB2 heterodimerizációját (6. ábra). Olyan tumoros sejteken is képes ezt gátolni, amelyekben nem figyelhető meg az ErbB2 túlzott sejtfelszíni kifejeződése (53, 54).

Az ErbB2 receptort eltérő mértékben kifejező emlőtumor sejtvonalakon Agus és munkatársai kimutatták, hogy a trastuzumabbal ellentétben a pertuzumab blokkolja az ErbB2

heterodimerizációját a heregulin által aktivált ErbB3-mal vagy a TGF α által aktivált ErbB1-gyel. Ezáltal meggátolja az ErbB2 tirozin foszforilációját, a sejtproliferációért felelős MAPK, valamint a sejtek életben maradását fokozó PI3K jelátviteli útvonalak aktivációját, függetlenül az ErbB2 sejtfelszíni expressziós szintjétől. Hasonlót tapasztaltak állatkísérletekben is, az ErbB2 számtól függetlenül a pertuzumab gátolta a humán emlőtumor sejtek növekedését. Nem találtak különbséget a monovalens és a bivalens pertuzumab ErbB2 tirozin foszforilációját gátló hatásában heregulin aktivált ErbB3 jelenlétében (53).

Annak ellenére, hogy a trastuzumab és a pertuzumab az ErbB2 extracelluláris domén eltérő epitópjaihoz kötődnek (39), a pertuzumab szintén képes kiváltani ADCC-t, viszont nem képes gátolni az ErbB2 metalloproteázok általi proteolitikus hasítását (47).



Franklin, *Cancer Cell*, 2004, 5:317

6. **ÁBRA:** Bal oldalon az EGF ligand által indukált ErbB1-ErbB2 heterodimer látható, jobb oldalon az, hogy a pertuzumab Fab hogyan gátolja sztérikusan az ErbB2 heterodimerizációját.

2.6. A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer elmélete

A FRET jelenségét 1948-ban egy német tudós, Theodor Förster írta le és felfedezője után nevezték el Förster-típusú rezonancia energiatranszfernek, de gyakrabban használják a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer elnevezést annak ellenére, hogy nem fluoreszcencia által közvetítődik az energia, hanem egy gerjesztett állapotban lévő fluoreszkáló molekula (donor), valamint egy megfelelő spektroszkópai paraméterekkel

rendelkező másik molekula (akceptor) között dipol-dipol kölcsönhatás révén, sugárzás nélküli energiaátadás formájában jön létre (55). A FRET által gerjesztett akceptor molekula relaxációja közben fotonokat emittálhat, amelyet áramlási citométer, fluoreszcens mikroszkóp vagy spektrofluoriméter segítségével lehet detektálni.

Az energiaátadás feltételei a következők: (i) a donor és az akceptor megfelelő orientációban legyen, amit a κ^2 orientációs faktor fejez ki; (ii) a donor és akceptor molekulák egymástól 2-10 nm-nyi távolságra legyenek; (iii) a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumai egymással kellő mértékű átfedést mutassanak.

A FRET sebességi állandóját a következő egyenlet írja le:

$$k_{FRET} = konst \cdot J \cdot n^{-4} \cdot k_f \cdot R^{-6} \cdot \kappa^2 \quad (1)$$

ahol J a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumainak átfedési integrálja, n a közeg törésmutatója (sejtfelszíni jelölés esetén általában 1,4-nek feltételezik), k_f a fluoreszcencia átmenet sebességi állandója, R a két molekula távolsága és a κ^2 a donor és akceptor relatív orientációját leíró, már említett orientációs faktor. A FRET sebességét befolyásoló paraméterek közül általában csak a donor és az akceptor közötti távolság (R) és a relatív orientációjuk (κ^2) jön számításba. Legtöbbször a két vizsgált molekula relatív orientációja nem ismert, de a molekulák gyors forgása miatt a lehetséges irányok kiátlagolódnak, és a κ^2 értékét 2/3-nak tekintjük (56, 57). Így feltételezhetjük, hogy a FRET sebességi állandója csak a két molekula átlagos távolságának a függvénye.

A FRET (k_{FRET}) kompetál a többi relaxációs mechanizmussal, a fluoreszcenciával (k_f) és a többi, nem fluoreszcens átmenettel (k_{nf}). A FRET hatásfokkal (E) meghatározható azon gerjesztett donor molekulák aránya, melyek FRET hatására relaxálódnak:

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_f + k_{nf}} \quad (2)$$

A FRET lecsökkenti a donor fluoreszcencia élettartamát (τ_{DA}) és a fluoreszcencia kvantumhatásfokát (Q_{DA}):

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_{FRET} + k_f + k_{nf}} \quad (3)$$

$$Q_{DA} = \frac{k_f}{k_{FRET} + k_f + k_{nf}} \quad (4)$$

Ha a FRET sebességi állandója megegyezik a fluoreszcens és a nem fluoreszcens átmenetek sebességi állandóinak az összegével, akkor a FRET bekövetkezésének a valószínűsége 50%, és egy adott donor-akceptor pár esetében az ehhez tartozó távolságot kritikus Förster távolságnak nevezzük (R_0), és a következő kifejezéssel adható meg az értéke nanométerben:

$$R_0 = konst \cdot (J \cdot n^{-4} \cdot Q_D \cdot \kappa^2)^{1/6} \quad (5)$$

ahol Q_D a donor fluoreszcencia kvantumhatásfoka akceptor távollétében.

A donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumainak átfedési integrálja (58):

$$J_{DA} = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (6)$$

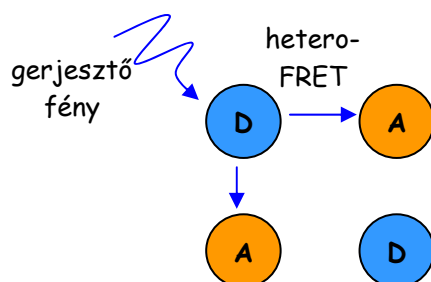
ahol f_D a donor egységre normált emissziós spektruma, és ε_A az akceptor moláris abszorpciós koefficiense.

A kritikus Förster távolság felhasználásával a FRET hatásfok távolságfüggését a következő képlet fejezi ki:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (7)$$

A 7. egyenletből látszik, hogy a FRET nagymértékben függ a donor és az akceptor közötti távolságtól, amely miatt a folyamatot spektroszkópiai vonalzonak is nevezik (59). Orvos-biológiai kutatásokban a FRET mérését felhasználják fehérjék közötti kölcsönhatások és fehérjék konformációjának a vizsgálatához.

Két, spektroszkópiailag különböző fluorofór között létrejött sugárzás nélküli energiaátadást hetero-FRET-nek nevezzük. Ebben az esetben elsősorban csak egy donorból és egy akceptorból álló molekula dimert tudunk vizsgálni (7. ábra), hiszen a hetero-FRET hatásfok relatíve érzéketlen a donort körülvevő akceptorok számára (60). A fentiek értelmében a hetero-FRET nem alkalmas nagyobb molekula klaszterek jellemzésére (21, 61, 62).



7. **ÁBRA:** Polarizált fényrel gerjesztve a donor molekulát (D), a 10 nm távolságon belül lévő, spektroszkópiailag különböző akceptor molekulával (A) hetero-FRET kölcsönhatást (*kék nyilak*) alakít ki.

A következőkben röviden összefoglalom, hogy milyen megközelítésekkel lehet a hetero-FRET hatásfokát mérni. Egyrészt meg lehet határozni a donor fluoreszcencia intenzitásának csökkenéséből (donor kioltás vagy quenching) akceptor jelenlétében:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (8)$$

ahol F_D és F_{DA} a donor akceptor nélkül és jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitása. Ehhez hasonlóan csökken a donor fluoreszcencia élettartama is akceptor jelenlétében:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (9)$$

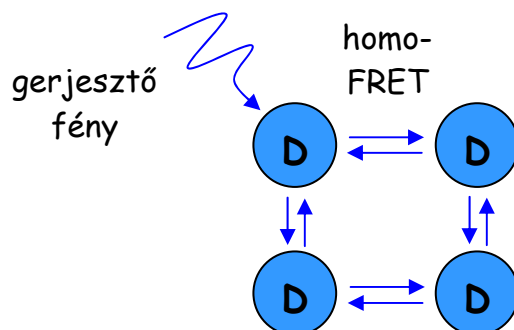
ahol τ_D és τ_{DA} a donor akceptor nélkül és jelenlétében mért fluoreszcencia élettartama. A donor élettartamának a csökkenése miatt megnő a donor fluoreszcencia anizotrópiája, mert a gerjesztett donornak kevesebb ideje van forogni:

$$E = 1 - \frac{\frac{r_0}{r_D} - 1}{\frac{r_0}{r_{DA}} - 1} \quad (10)$$

ahol r_0 a határanizotrópia, r_D és r_{DA} a donor akceptor nélkül és jelenlétében mért fluoreszcencia anizotrópiája. Egy másik módszer az akceptor fotoelhalványításán (photobleaching) alapuló megközelítés. Ennek során megméri a donor fluoreszcencia intenzitását akceptor jelenlétében (F_{DA}), majd az akceptort magas intenzitású gerjesztő

fénnyel kiégetik. Mivel ezáltal megszűnik az akceptor abszorpciós képessége, az akceptor kiégetés után mért donor intenzitás megfelel az akceptorral nem jelölt minta fluoreszcencia intenzitásának (F_D).

A FRET jelenség egy másik variánsa a homo-FRET, amikor a donor és az akceptor molekulák spektroszkópiailag azonosak, így első lépésben a donor egy másik, akceptorként viselkedő, de a donorral azonos molekulával lép kölcsönhatásba, majd ez a molekula a következő lépésben már donorként fog viselkedni. Így az energia szétszlik a donorokból álló populációban (8. ábra). A fentiek értelmében a homo-FRET mérésével kvantitatívan lehet elemezni nagyobb méretű asszociátumokat is. A homo-FRET egyetlen megnyilvánulása a donor fluoreszcencia anizotrópiájának a csökkenése.



8. ÁBRA: Polarizált fénnel történő gerjesztés hatására kialakult homo-FRET spektroszkópiailag azonos molekulák között. Két molekula közötti maximális távolság 10 nm. A kettős nyilak reprezentálják az oda-vissza is lejátszódó homo-FRET kölcsönhatást (D = donor).

2.7. A fluoreszcencia anizotrópia elméleti háttere

A fluoreszcencia anizotrópia a tér három irányába emittáló fluorofórt jellemzi, vagyis az emissziós polarizáció mértéke, mellyel a molekulák rotációját lehet kimutatni. Ha a fluorofórokat x irányban terjedő, x - z síkban vertikálisan polarizált fénnel világítjuk meg, a fotoszelekció következtében preferenciálisan a vertikálisan elhelyezkedő fluorofór molekulák gerjesztődnek, és a gerjesztett állapotú fluorofórok a rotációjuk következtében a z -tengely köré rajzolható forgáskúpon belül helyezkednek el. Ha a rendszer nem $T=0$ K-en van, ahol mozdulatlanok a fluorofórok, akkor a molekulák rotációs diffúziós mozgást végeznek, és az emissziós vektorok iránya random módon szétszóródik, a forgáskúp kiszélesedik. Ez azzal jár, hogy az y tengely mentén detektált fluoreszcencia anizotrópiája csökken. A V térfogatú fluorofór η viszkozitású közegben történő rotációját a Stokes-egyenlet írja le:

$$\tau_{rot} = \frac{V\eta}{kT} \quad (11)$$

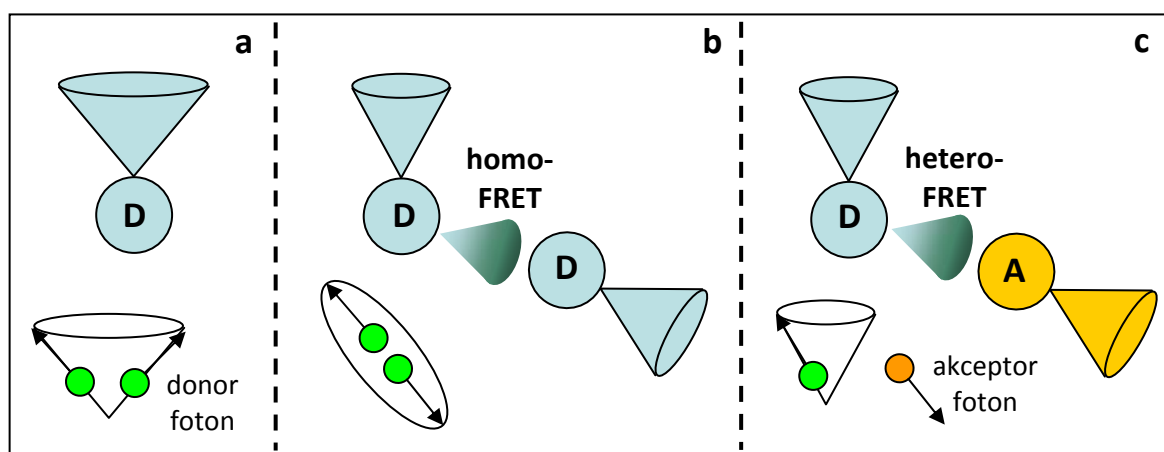
ahol τ_{rot} a fluorofór rotációs korrelációs ideje, k a Boltzmann-állandó és a T az abszolút hőmérséklet.

A fluoreszcencia anizotrópiát (r) először Perrin írta le 1926-ban. A róla elnevezett egyenlet leírja, hogy függ az anizotrópia a fluorofór rotációs korrelációs idejétől és a fluoreszcencia élettartamától (63):

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau_{fl}}{\tau_{rot}} \right) \quad (12)$$

ahol r_0 a mozdulatlan fluorofórra jellemző határanizotrópia és τ_{fl} a fluorofór gerjesztett állapotának az élettartama. Látható, hogy ha nagyon lassan forog a molekula ($\tau_{rot} \rightarrow \infty$) vagy a gerjesztett állapot élettartama infinitezimálisan rövid ($\tau_{fl} \rightarrow 0$), akkor $\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0}$. Az ekkor mért

anizotrópia megegyezik a mozdulatlan fluorofórra jellemző maximális anizotrópiával, a határanizotrópiával, melynek maximális értéke 0,4 lehet. Ha ennél nagyobb értéket mérünk, akkor a fluoreszcencia mellett szórt fényt is tartalmaz az emittált fény. Mivel a fluorofór gerjesztett állapotának élettartama általában néhány nanosecundum ($\tau_{fl} \neq 0$), a fluoreszcencia anizotrópia kisebb a határanizotrópiánál, ha a molekula rotációs korrelációs ideje a fluoreszcencia élettartam idejével összemérhető vagy annál kisebb.



9. **ÁBRA:** A fluoreszcencia anizotrópia változása FRET jelenléte nélkül (a), homo-FRET (b) és hetero-FRET (c) jelenlétében. A donor (D) forgáskúpjának szélessége arányosan változik a molekula rotációs diffúziós mozgásával. (A = akceptor)

Ha a gerjesztett fluorofór (donor) közelében található egy másik, spektroszkópiailag különböző fluorofór (akceptor), amivel hetero-FRET kölcsönhatást tud kialakítani, akkor a donor fluoreszcencia anizotrópiája nagyobb lesz, mint FRET jelenléte nélkül, mert a donor rövidebb ideig van gerjesztett állapotban, ezáltal kevesebbet forog és kevésbé depolarizálódik (9.c. ábra). Ezzel szemben, ha a közelben lévő molekula spektroszkópiailag megegyezik a gerjesztett donorral, akkor homo-FRET jöhet létre közöttük, ami a donor fluoreszcencia anizotrópiájának a csökkenéséhez vezet, mert az akceptorként viselkedő másik molekula random módon, azaz nem polarizáltan van orientálódva, és az általa emittált foton is depolarizálatlan (9.b. ábra). Az anizotrópia csökkenés mértékéből lehet következtetni a klaszter méretére.

Runnels és Scarlata szerint, egy k számú fluorofórt tartalmazó klaszter egyensúlyi (steady-state) anizotrópiája fordítottan arányos a fluorofórok számával (64):

$$r_k = r_1 \frac{(1+d^6)}{1+kd^6} + r_{FRET} \frac{(k-1)d^6}{1+kd^6} \quad (13)$$

ahol r_k a klaszter, r_1 az elsődlegesen gerjesztett molekula, r_{FRET} a homo-FRET által gerjesztett molekula anizotrópiája, d a fluorofórok közötti távolság a klaszterben $\frac{R_0}{R}$ egységben kifejezve.

Természetesen a fluoreszcencia anizotrópiát nemcsak az energiatranszfer befolyásolhatja, hanem a fluorofór gerjesztett állapotának az élettartama, vagy a rotációs korrelációs ideje is (12. egyenlet). Ezért az időfüggő anizotrópia fluoriméteren vagy fluoreszcens mikroszkópon történő mérésével a molekulák rotációs diffúziós mozgásáról kaphatunk felvilágosítást (62). A fluorofórok sűrűségétől függő anizotrópia mérésével az egymással kölcsönhatásban lévő molekulák számát tudjuk megbecsülni. Ezt az elvet használják ki olyan mérések esetében, amikor az anizotrópia növekedését mérik az akceptor fotoelhalványításának a függvényében (65-67). Mivel mikroszkópos méréseknél mindössze néhány tíz vagy néhány száz sejtet tudunk egyszerre vizsgálni, statisztikailag kevésbé megbízhatóak. Ezzel szemben áramlási citométeren több százezer sejtet lehet rövid idő alatt lemérni. Mivel a fluorimetriával szemben az áramlási citometria nem az egész populáció átlagáról, hanem egyedi sejtekről ad felvilágosítást, ezért statisztikailag sokkal megbízhatóbb mind a mikroszkópos, mind a fluoriméteres mérésekhez képest. Ezért kifejlesztettünk egy áramlási citométeren alkalmazható módszert, amellyel az anizotrópia fluoreszcensen jelölt antitest

koncentrációjától való függését vizsgáltuk, mellyel kvantitatívan lehet jellemezni nagy méretű ErbB proteinekből felépülő homoklasztereket. A módszert részletesen a 3.6 és 4.1.1-4.1.3. fejezetek ismertetik.

2.8. FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás elmélete

Mekler és munkatársai leírtak egy általuk PES-nek nevezett technikát, mellyel alacsony FRET hatásfokot is pontosan tudtak mérni. A módszer lényege az, hogy a FRET hatásfokot annak a fotokémiai reakciónak a kinetikájából határozták meg, amelyben az akceptor szenzitizálódott a donortól származó FRET által. Ha a vizsgált fotokémiai reakció az akceptor fotoelhalványítása (photobleaching), akkor a szenzitizáció során a donor gerjesztésének hatására az akceptor fluoreszcenciájának fokozatos csökkenése figyelhető meg a molekula lassú kiégése miatt (68, 69).

Az általunk FSAB-nak nevezett módszer szerint a tanulmányozni kívánt proteineket megjelöljük fotostabil donorral és fotolabilis akceptorral, majd a donor molekulát gerjesztve csak azok a fotolabilis akceptor molekulák égnek ki, melyek elég közel vannak a donorhoz, hogy közöttük hetero-FRET kölcsönhatás jöhessen létre. Az akceptor intenzitásának a csökkenését az akceptor emissziós hullámhosszán vizsgáljuk. Így meghatározható az akceptor molekulák azon aránya, melyek a donorral egy klaszterben vannak.

Fontos követelmény, hogy olyan hullámhosszúságú fényel világítsuk meg a mintát, ahol a donor jelentős abszorpciót mutat, míg az akceptor közvetlen gerjesztése elhanyagolható. Még így is megfigyelhető a hetero-FRET okozta fotoelhalványítás mellett az akceptor molekulák direkt gerjesztés hatására bekövetkező kiégése. Ezért úgy kell kiválasztani a fotostabil donor és fotolabilis akceptor párt, hogy az akceptor extinkciós koefficiense a megvilágítás hullámhosszán sokkal kisebb legyen, mint a donoré.

Kísérleti körülmények között a legtöbb fotolabilis akceptor molekula kiégése viszonylag lassú folyamat, ami a módszert praktikus szempontból használhatatlanná teszi. Azonban a cianin alapú fluorofórok (pl. Cy5) fotoelhalványítási kinetikája szén-tetrabromiddal (CBr₄) jelentősen gyorsítható, ugyanis a CBr₄ töltésátviteli komplexet képes alkotni aromás vegyületekkel (68).

2.9. Célkitűzés

Az ErbB receptoreszalád fontos szerepet tölt be a rákkutatásban, hiszen overexpressziójuk esetén az aktiválódásuk kóros sejtburjánzáshoz vezethet. Aktivációjuk kulcslépése a dimerizációjuk, illetve magasabb rendű oligomerizációjuk, melyek tanulmányozására számtalan módszer áll rendelkezésre, azonban ezek legtöbbje csak kvalitatív vagy szemikvantitatív jellemzést biztosít. Különösen limitáltak a lehetőségek a nagyméretű (azaz dimernél nagyobb) klaszterek jellemzésére, ill. a heteroklaszterek összetételének pontos leírására. Az ErbB homo- és heteroklaszterek méretének, összetételének kvantitatív meghatározása kulcsfontosságú lehet az aktivációs útvonalak gátlásában, ezáltal a sejtosztódás megállításában.

Ezért célul tűztük ki

- egy olyan, áramlási citométeren alkalmazható, statisztikailag megbízható, homo-FRET és fluoreszcencia anizotrópia mérésén alapuló módszer kidolgozását, mellyel kvantitatívan tudunk jellemezni homoklasztereket és meg tudjuk határozni a monomer formában lévő receptorok arányát is.
- az ErbB1 és az ErbB2 molekulák nagyméretű homoasszociátumainak tanulmányozását nyugalomban lévő és stimulált humán tumorsejteken a fenti módszer alkalmazásával.
- a heteroklaszterek kvantitatív meghatározásához egy konfokális mikroszkópon alkalmazható eljárás megalkotását, mely egy fotolabilis akceptor molekula hetero-FRET általi fotoelhalványításán alapul (FSAB).
- a heteroklaszterekben jelen lévő ErbB1 és ErbB2 receptorok arányának meghatározását nyugalomban lévő és EGF által stimulált humán emlőtumor sejtvonalon az FSAB módszerrel.
- az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homoklaszterek kvantitatív jellemzését az FSAB módszerrel is nyugalomban lévő és EGF stimulált humán tumorsejteken.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtvonalak

Az ErbB2 homoklaszterek és az ErbB1-ErbB2 heteroklaszterek kvantitatív jellemzését az SKBR-3 humán emlőtumor sejtvonalon végeztük, amely $\sim 2 \times 10^5$ ErbB1 és $\sim 10^6$ ErbB2 fehérjét fejez ki. Az ErbB1 homoasszociátumok kvantitatív jellemzéséhez az A431 humán epiteliális karcinóma sejtvonalat használtuk, amely sejtfelszínén $\sim 2 \times 10^6$ ErbB1 és $\sim 2 \times 10^4$ ErbB2 fehérje expresszálódik. A fentebb említett sejtvonalakat az *American Type Culture Collection*-től (ATCC, Manassas, VA) vásároltuk meg és 10% fetális borjú szérumot (FCS), gentamicint (50 $\mu\text{g/ml}$) és L-glutamint (2 mmol/l) tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük.

A sejtek felszínén kifejeződő ErbB1 és ErbB2 fehérjék számát Qifikit-tel határoztuk meg, melyet a *Dako*-tól (Hamburg, Németország) rendeltünk meg.

Áramlási citometriás mérésekhez a sejteket tripszin-EDTA (0,05% tripszin, 0,02% EDTA) kezeléssel vettük fel, míg a mikroszkópos kísérleteknél a sejteket 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában tenyésztettük, melyet a *Nalge Nunc International*-től (Rochester, NY) vásároltunk.

3.2. Antitestek, festékek és növekedési faktorok

Az EGFR455 (IgG1) nevű, kizárólag az A431 sejtvonalon található ErbB1 receptort felismerő egér monoklonális antitestet a 455-jelű hibridóma termelte, amit a *European Collection of Cell Cultures*-től (Wiltshire, UK) vásároltunk meg. Az EGFR455 antitest nem gátolja az EGF kötődését az ErbB1-hez. Az Mab528 (IgG2a) elnevezésű, bármely sejten jelen lévő ErbB1-et felismerő, az EGF kötődésével kompetáló egér monoklonális antitestet a HB-8509-jelű hibridóma termelte (ATCC). Az antitesteket hibridómájuk felülúszójából tisztítottuk affinitás kromatográfiával protein A oszlopon.

Az ErbB2 receptor ellenes humanizált monoklonális antitestet, a trastuzumabot (Herceptin[®], IgG1) a *Roche Magyarország Kft*-től vettük. Az ErbB2 heterodimerizációját sztérikusan gátló, humanizált monoklonális antitest, a pertuzumab (Omnitarg[®], 2C4) a *Genentech Inc.* (South San Francisco, CA) ajándéka volt. Az OP15 nevű, az ErbB2 intracelluláris doménje elleni monoklonális antitestet a *Calbiochem-Merck Biosciences*-től (Schwalbach, Németország) vásároltuk. Az Ab-18 elnevezésű monoklonális antitestet, ami a tirozin-foszforilált ErbB2 receptort ismeri fel, a *Lab Vision*-től (Fremont, CA) rendeltük meg.

Az antitestek amino csoportjaihoz AlexaFluor488 (Alexa488), AlexaFluor546 (Alexa546, *Molecular Probes*), Cy3 vagy Cy5 (*GE HealthCare*, Freiburg, Németország) fluoreszcens festékek szukcinimidil-észter származékait konjugáltuk, majd az antitesthez nem kötődött festéket Sephadex G-50 oszlopon választottuk el. A festék-protein arányt (egy antitesthez kötődő fluorofórok átlagos száma) spektrofotometriásan határoztuk meg, ami általában 1-2 körüli érték volt. A Qdot605 nanokristállyal konjugált trastuzumabot az *Invitrogen* (Karlsruhe, Németország) Qdot-antitest konjugáló kitje (Qdot605 Antibody Conjugation Kit-tel, Q22001MP) segítségével állítottuk elő. A Qdot-tal való konjugáció az antitesten jelen lévő tiol-csoportok és a nanokristályokon megtalálható maleimid-csoportok reakcióján alapszik. Átlagosan egy antitesthez egy Qdot605 molekula kötődött.

Az Alexa488 vagy Alexa546 festékekkel konjugált GAMIG F(ab)₂-t (goat anti-mouse immunoglobulin G, kecskében termeltetett egér IgG ellenes antitest) és a Cy3-mal jelölt GAHIG F(ab)₂-t (goat anti-human IgG, kecskében termeltetett humán IgG ellenes antitest) a *Molecular Probes*-tól (Eugene, OR) vásároltuk meg.

Az ErbB1 receptor ligandját, az epidermális növekedési faktort, és az ErbB3, valamint az ErbB4 receptorok ligandját, a heregulin- β 1-et az *R&D Systems*-tól (Minneapolis, MN) rendeltük meg.

A fotoelhalványítás sebességének a fokozásához használt CBr₄-ot a *Sigma-Aldrich*-tól (Schnelldorf, Németország) vásároltuk meg por formájában, melyből 2×10^{-2} M törzsoldatot készítettünk 70%-os etanolban feloldva.

3.3. Sejtek kezelése és jelölése fluoreszcencia anizotrópia méréséhez

Növekedési faktorról történő stimulálás előtt a sejteket 24 óráig 0,1% szérumot (FCS) tartalmazó médiumban éhezettük. Ezt követően a frissen feltripszinezett A431 vagy SKBR-3 sejteket kétszer mostuk jéghideg, fiziológias só-tartalmazó foszfát pufferben (PBS, pH 7,4), majd mintánként ~1-1 millió sejtet felfuszpendáltunk 100 μ l Hanks-pufferben, ami 1 mg/ml marha szérum albumint (BSA) is tartalmazott, hogy csökkentsük az antitestek aspecifikus kötődését.

Az éhezettett SKBR-3 sejtek 20 μ g/ml pertuzumabbal történő előkezelését 37°C-on végeztük 15 percen keresztül, majd a kontrol és az előkezelt sejteket stimuláltuk 600 ng/ml EGF-fel vagy 50 ng/ml heregulinnal 15 percig 37°C-on. Az éhezettett A431 sejteket csak 600 ng/ml EGF-fel stimuláltuk. A kezeléseket követően folytattuk a sejtek jelölését a homo-FRET

méréséhez az alábbiak szerint.

Homo-FRET mérésekor az adott receptort (ErbB1-et vagy ErbB2-öt) megjelöltük Alexa488-cal konjugált és jelöletlen antitestek különböző arányú keverékével, majd a mintákat 30 percig inkubáltuk jégen, a közvetlen fénytől védve. Az ErbB1 receptort Mab528 vagy EGFR455 antitesttel jelöltük, míg az ErbB2 molekulákat trastuzumabbal. A jelölt és a jelöletlen antitestek teljes koncentrációja mindig 50 µg/ml volt, de a jelölt antitest arányát folyamatosan növeltük 0%-tól 100%-ig 10%-os lépésekkel. A jelölt sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben, majd fixáltuk 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben. A mérésig a mintákat 4°C-on tartottuk, hogy megakadályozzuk az antitest által indukált receptor asszociációt és internalizációt.

Az Alexa488 fluoreszcens festékekkel konjugált antitestek határanizotrópiáinak meghatározásához az adott receptort megjelöltük 50 µg/ml donor-konjugált antitesttel (Alexa488-trastuzumab, Alexa488-Mab528 vagy Alexa488-EGFR455) 30 percen keresztül jégen és sötétben. Hideg PBS-ben történő mosást követően a mintákat 5 részre osztottuk, melyeket különböző koncentrációjú (0,5 µg/ml-től 9 µg/ml-ig) akceptor-konjugált másodlagos antitesttel jelöltünk meg (Cy3-GAHIG F(ab)₂-vel az Alexa488-trastuzumab esetében, Alexa546-GAMIG F(ab)₂-vel az Alexa488-Mab528 és az Alexa488-EGFR455 esetében) 30 percig jégen és fénytől védve. A jelölést követően a sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben, majd lefixáltuk 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben.

Az ErbB2 tirozin-foszforilációjának mértékét nyugalomban lévő és stimulált SKBR-3 sejteken határoztuk meg úgy, hogy 3,7% formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk a sejteket 30 percen keresztül jégen, majd kétszer mostuk hideg Tris-pufferrel (100 mM Tris + 100 mM NaCl; pH 7,4) azért, hogy a felesleges formaldehiddel a Tris elreagáljon. Ezt követően minden mintát két részre osztottunk. Az egyikben az ErbB2 intracelluláris doménjét jelöltük meg 10 µg/ml OP15 antitesttel, míg a másikban a tirozin-foszforilált, aktivált ErbB2 receptorokhoz (p-ErbB2) kötöttünk Ab18 antitestet 10 µg/ml-es koncentrációban. Az inkubálást PBS-BSA-TX permeabilizáló pufferben (0,1 (v/v)% Triton X-100 + 1 mg/ml BSA PBS-ben, pH 7,4) végeztük 30 percig jégen. A jelölést követően a mintákat kétszer mostuk hideg PBS-BSA-TX-ben, majd a sejteket megjelöltük 20 µg/ml Alexa488-GAMIG F(ab)₂ másodlagos antitesttel 30 percen keresztül jégen és fénytől védve. A végén kétszer mostuk a mintákat hideg PBS-BSA-TX-ben, majd felszuszpendáltuk a sejteket 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben.

3.4. Sejtek jelölése FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás méréséhez

A FSAB mérések kivitelezéséhez első lépésben találni kellett egy donornak alkalmas fotostabil és egy akzeptorként használható fotolabilis fluoreszcens molekulát, amelyek CBr_4 jelenlétében is megőrzik ezen tulajdonságaikat. Fotolabilis molekulaként a Cy5 festéket használtuk, míg fotostabil molekulaként kipróbáltuk az Alexa546 mellett a quantum dot nanokristályokat is, amelyekről köztudott, hogy fotostabil molekulák. A 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában növesztett SKBR-3 sejteket kétszer mostuk hideg PBS-sel, majd megjelöltük 5 $\mu\text{g/ml}$ Qdot605-trastuzumabbal vagy 20 $\mu\text{g/ml}$ Alexa546-trastuzumabbal vagy 20 $\mu\text{g/ml}$ Cy5-Mab528 antitesttel 30 percen keresztül jégen, sötétben. A kétszeri hideg PBS-sel történő mosást követően a sejteket fixáltuk 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben. Konfokális mikroszkópon vizsgáltuk a fluorofórok fotoelhalványítási kinetikáját 8×10^{-4} M CBr_4 jelenlétében és hiányában.

A heteroklaszterek meghatározásához a sejteket 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában növesztettük, és a kísérlet előtt 24 órával éhezettük őket 0,1% FCS-t tartalmazó DMEM-ben. Kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd egy részüket stimuláltuk 600 ng/ml epidermális növekedési faktort tartalmazó Hanks-puffer-BSA-val (1 mg/ml BSA PBS-ben) 15 percen keresztül 37°C -on. Hideg PBS-sel történő kétszeri mosást követően a homoklaszterek vizsgálatához megjelöltük a nyugalomban lévő és stimulált receptorokat (ErbB1 receptorokat az A431 sejteken, ErbB2 receptorokat az SKBR-3 sejteken) 20-20 $\mu\text{g/ml}$ fotostabil donor festékekkel (Alexa546) és fotolabilis akceptor festékekkel (Cy5) konjugált antitestekkel (Mab528 az ErbB1 fehérje esetén, trastuzumab az ErbB2 protein esetén). A heteroklaszterek tanulmányozásához SKBR-3 sejteket jelöltünk meg 20 $\mu\text{g/ml}$ Alexa546-trastuzumab vagy Cy5-trastuzumab és 20 $\mu\text{g/ml}$ Cy5-Mab528 vagy Alexa546-Mab528 antitestek keverékével. A jelölést 1 mg/ml BSA-t tartalmazó Hanks-pufferben végeztük jégen, 30 percig, sötétben. A nem kötődött antitesteket hideg PBS-sel történő kétszeri mosással távolítottuk el, majd fixáltuk a sejteket 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben. Közvetlenül a fotoelhalványítás elindítása előtt adtunk a sejtekhez 8×10^{-4} M CBr_4 -ot a Cy5 fotoelhalványításának a sebességének a fokozásához.

A mintákat konfokális mikroszkópon tanulmányoztuk.

3.5. Fixálás hatása az ErbB1 receptorok laterális mobilitására – FRAP mérés

A kísérlethez használt A4erbB1 sejtvonalat kollaborációs intézetünkben (Thomas Jovin laboratóriuma, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Németország) hozták létre úgy, hogy az A431 epiteliális karcinóma sejtvonalat stabilan transzfektálták ErbB1-eGFP fluoreszcens plazmival (70, 71). Az A4erbB1 sejtvonalt $\sim 2 \times 10^6$ endogén ErbB1 fehérjét és $\sim 10^6$ ErbB1-eGFP molekulát fejez ki a sejtfelszínén, melyet áramlási citométeren a Qifikit-tel (*Dako*) határoztunk meg. A FRAP mérésekhez a sejteket 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában tenyésztettük (*Nalge Nunc International*) 10% FCS-t tartalmazó DMEM médiumban, melyet lecseréltünk 0,1% szérumot (FCS) tartalmazó médiumra a kísérlet előtt 24 órával. A mérés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-ben, majd a minták egy részét fixáltuk 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben, míg a többi sejtre csak Hanks-puffer-BSA oldatot tettünk. A fixált minták egy részéhez közvetlenül a kiégetés előtt 8×10^{-4} M CBr_4 -ot adtunk.

A FRAP méréseket a Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (*Carl Zeiss AG*, Jena, Németország) végeztük úgy, hogy képek felvételénél az argon ion lézer 488 nm-es vonalán a teljesítményt 5 %-ra állítottuk be, és az eGFP fluoreszcenciáját 505 nm-es felüláteresztő szűrővel detektáltuk. A kiégetéshez a sejtmembránon kijelöltünk egy közelítőleg 2×2 μm -es területet, melyet 100 %-os lézer teljesítmény mellett fotoelhalványítottunk az argon ion lézer 488 nm-es vonalával. A fluoreszcencia visszatérését úgy kísértük figyelemmel, hogy 150 másodpercen keresztül minden másodpercben képet vettünk fel 5 %-os teljesítményű, 488 nm-es gerjesztő fénnel.

A képfeldolgozáshoz a Matlab (*Mathworks Inc.*, Natick, MA) alatt futó DipImage programot (*Delft University of Technology*, Delft, Hollandia) használtuk. A felvett képek elcsúszását a DipImage „correctshift” parancsának alkalmazásával korrigáltuk, majd kiszámoltuk a kiégetett területen az átlagos fluoreszcencia intenzitást. A Matlab program segítségével a 14. egyenletet illesztettük a normalizált fluoreszcencia visszatérés pontjaihoz:

$$a + (1 - a - b) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (14)$$

ahol a és b konstans, τ az empirikus fluoreszcencia visszatérési idő állandó és t az idő. A fluoreszcens molekulák mozdulatlan arányát a 15. kifejezéssel határozhatjuk meg:

$$\frac{b}{1-a} \quad (15)$$

3.6. Áramlási citometria és a homo-FRET mérések kiértékelése

A sejtenkénti fluoreszcencia anizotrópia méréseket L-formátumú, DiVa opcióval felszerelt FACSVantage SE citométeren (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) végeztük. Az Alexa488 festéket az argon-ion lézer 488 nm-es, lineárisan polarizált vonalával gerjesztettük. Az anizotrópia méréséhez a lézerfény polarizációját vertikális irányba forgattuk félhullám-lemez (half-wave plate retarder, model 481AS, Newport, Irvine, CA) felhasználásával. A félhullám-lemez kettőtörő kristályból készül, és a benne szétváló vertikális és horizontális fénykomponensek között $\lambda/2$ útkülönbséget hoz létre, ezáltal a bemenő lineárisan poláros fény síkját képes elfordítani. Megkerestük a félhullám-lemez azon állását, amelynél a szórt fény (melyet 488 ± 10 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltunk) vertikális komponense maximális, horizontális komponense minimális volt. Ez a pozíció felelt meg a vertikálisan polarizált gerjesztő fénynek. A fluoreszcencia anizotrópia mérésekor az emittált fotonok először egy 530 ± 15 nm-es sávszűrőn haladtak keresztül, majd a detektorok elé helyezett szélessávú polarizációs nyalábosztó kockával (polarizing beam-splitter cube, model 10FC16PB.3, Newport) szétválasztottuk a nyalábot vertikálisan és horizontálisan polarizált összetevőkre. Kétféle polarizált fluoreszcencia intenzitást mértünk, az I_{vv} -t és az I_{vh} -t, ahol az első index a gerjesztő fény, a második index az emittált fény polarizáltságának irányát adja meg. Az anizotrópiát (r) a következő egyenletek segítségével határoztuk meg:

$$I_{tot} = I_{vv} + a \times G \times I_{vh} \quad (16)$$

$$r = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{tot}} \quad (17)$$

ahol I_{tot} a teljes fluoreszcencia intenzitás. A citométer lencsájének nem-zéró numerikus apertúrája torzítja az anizotrópia értékeket, ezt az a korrekciós faktorról vettük figyelembe. G a detektorok és az optikai rendszer vertikális és horizontális irányban polarizált fényre vonatkozó eltérő érzékenységét kifejező paraméter. A G -faktor meghatározásához a sejteket horizontálisan polarizált fényrel gerjesztettük, amit úgy állítottunk elő, hogy a félhullám-

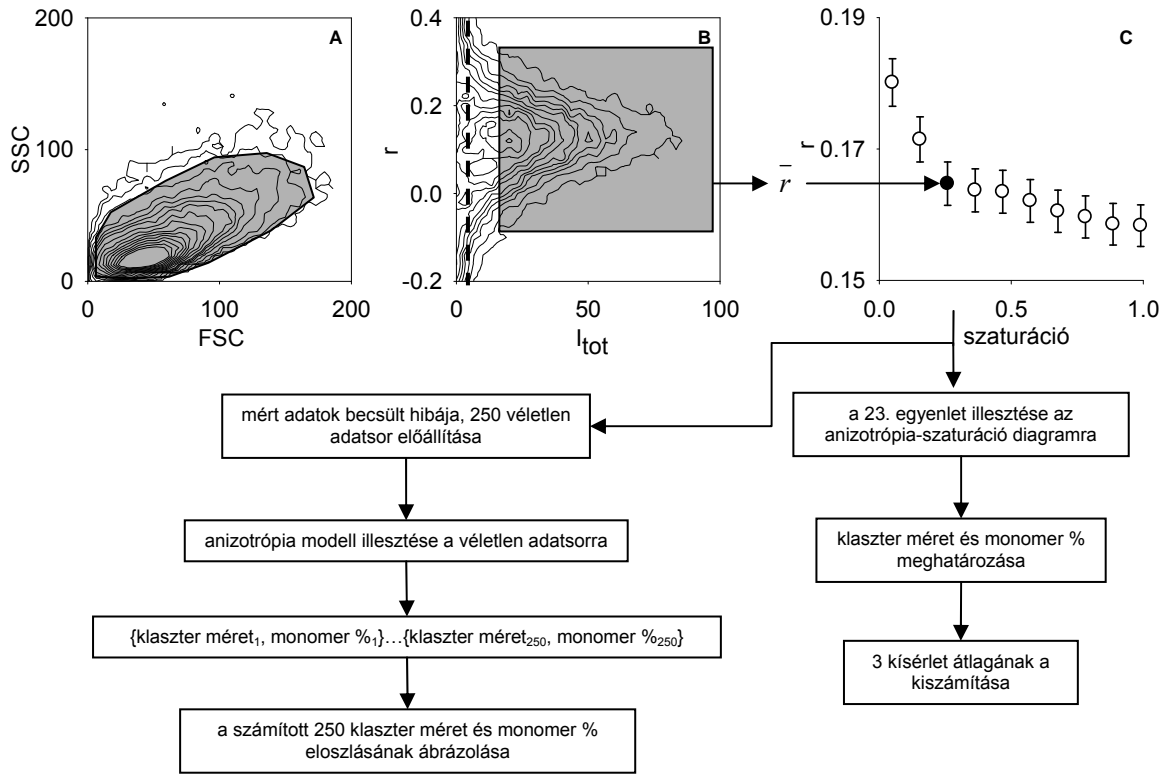
lemezt 45°-al elforgattuk a vertikális pozíciójához képest. Kétféle polarizált fluoreszcencia intenzitást detektáltunk horizontális gerjesztés mellett, az emittált fény vertikális (I_{hv}) és horizontális (I_{hh}) összetevőjét. A polarizált intenzitásokat korrigáltuk a jelöletlen sejtek autofluoreszcenciájával, majd a 18-as egyenletnek megfelelően kiszámoltuk a G korrekciós faktort:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (18)$$

Minden jelölt és jelöletlen antitestek keverékével jelölt mintából 50.000 sejtet mértünk le, majd kiszámoltuk a sejtenkénti anizotrópiát a 17. képlet alapján. A kiértékeléshez a ReFlex programot használtuk, amellyel első lépésben kikapuztunk ~30.000-40.000 sejtet az előre irányuló (FSC = forward scatter) és oldalszórás (SSC = side scatter), valamint a totál fluoreszcencia intenzitás és anizotrópia pontábrákon (dot plot). A kikapuzott alpopulációnak kiszámoltuk az átlagos totál fluoreszcencia intenzitását és az átlag anizotrópiáját (10. ábra). Az egyes minták anizotrópia értékeit ábrázoltuk a jelölt antitest kötődésének szaturációjának függvényében, majd a grafikonra a 23. egyenletet illesztettük, melyből meghatároztuk a klaszter méretet és a monomer %-ot, majd három független kísérlet eredményeit átlagoltuk. A mért adatok becsült hibáit is kiszámítottuk, és feltételezve, hogy az anizotrópia normális eloszlást követ, felhasználtuk a Monte Carlo szimulációt, mellyel 250 véletlenszerű anizotrópia-szaturáció adatpárt állítottuk elő. Minden adatsorra illesztettük az anizotrópia modellt, és hisztogramon ábrázoltuk az illesztett klaszterméret és a monomer % eloszlását. A hisztogram szélességek valójában az illesztett paraméterek konfidencia intervallumával ekvivalens információt mutatnak be, azonban az illesztett paraméterek eloszlása nemcsak az illesztés hibáját tartalmazza, hanem a mérési hibát és a biológiai variabilitást is, melyek pontos hozzájárulásáról nincsen információnk. Az illesztéshez és a Monte Carlo szimulációhoz, melynek részleteit a 4.1.1 fejezet tárgyalja, a Mathematica programot (Wolfram Research, Champaign, IL) használtuk.

A hetero-FRET hatékonyság mérését is ezen a citométeren végeztük 488 és 532 nm-es gerjesztés mellett. Az Alexa488 festéket (donor) az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük és a donor csatornában detektáltuk 530±15 nm-es sávszűrőn keresztül. Az Alexa546 és a Cy3 fluorofórokat (akceptor) a dióda pumpált szilárdtest lézer 532 nm-es vonalával gerjesztettük és 585±21 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk az akceptor csatornában. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfert a FRET csatornában detektáltuk

585±21 nm-es sávszűrőn keresztül az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával történő gerjesztést követően. A sejtenkénti FRET hatékonyságot a ReFlex programmal határoztuk meg.



10. ÁBRA: Adatok gyűjtése, kapuzás, és a számolás menete a klaszter méret és a monomer % meghatározásához fluoreszcencia anizotrópia mérés során. Minden mérésnél 50.000, különböző arányban összekevert jelöletlen és Alexa488 festékkel konjugált antitesttel megjelölt sejtet mértünk le áramlási citométeren. A sejteket először az előre irányuló (FSC) és oldalszórás (SSC) pontábrán kikapuztuk (A), majd a totál fluoreszcencia intenzitás (I_{tot}) és anizotrópia (r) pontábrára helyezett kapu segítségével csak a nagy intenzitású sejteket analizáltuk tovább (B). A pontábrákon egy pont felel meg egy sejtnak. A citométeren rögzített adatok felbontása 18-bit volt, de a pontábrákhoz az adatokat átskáláztuk. A B. ábrán lévő vastag szaggatott vonal a jelöletlen sejtek fluoreszcencia intenzitását mutatja. Az ábrán a kapukat árnyékos sokszögekkel tüntettük fel. Ugyanazon a napon lemert, különböző koncentrációjú jelölt antitesttel megjelölt mintákon a kapuk helyzete azonos volt. A totál fluoreszcencia intenzitás alsó határértékét vizuálisan kapuztuk ki úgy, hogy a halvány sejtek széles tartományban változó anizotrópiáit nem vettük figyelembe. Ezt a határértéket minden mintánál állandónak tekintettük. Minden mintára kiszámoltuk az átlag anizotrópiát (\bar{r}) és a totál intenzitás átlagát (\bar{I}_{tot}), melyek egy-egy adatpontot jelölnek a C. ábrán, ahol az anizotrópia értékek jelölt antitest koncentrációjától (szaturáció) való függése látszik. A 23. egyenletet illesztettük az anizotrópia-szaturáció diagramra, melyből meghatároztuk a klaszter méretet és monomer %-ot, majd három független kísérlet eredményeit átlagoltuk. Feltételeztük, hogy az anizotrópia normális eloszlást követ, és kiszámoltuk a mért adatok becsült hibáját. Monte Carlo szimulációt felhasználva, az átlagok és a becsült hibák ismeretében 250 véletlenszerű adatsort állítottunk elő, amely a C. ábrához hasonló grafikonokat eredményezett. Minden egyes adatsorra az anizotrópia modellt illesztettük, és az így kapott 250 klaszter méret és monomer % adatpárból hisztogramot szerkesztettünk.

3.7. Konfokális mikroszkópia és fotoelhalványítás

A kamrában megjelölt sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (*Carl Zeiss AG*) készítettünk felvételeket egy 63-szoros nagyítású (numerikus apertúra: 1,4) olajimmerziós objektívvel úgy, hogy a pinhole 2 Airy egység volt. A fotostabil donorként használt Alexa546 fluoreszcens festéket a He-Ne lézer 543 nm-es vonalával gerjesztettük, emisszióját pedig az 560-615 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk a donor csatornában. A fotolabilis akceptorként alkalmazott Cy5 festéket a He-Ne lézer 633 nm-es vonalával gerjesztettük, és 650 nm-es felüláteresztő szűrőn keresztül detektáltuk az emisszióját az akceptor csatornában. Az Alexa546 és a Cy5 fluorofórok között létrejött fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérésekor a FRET csatornában is vettünk fel képet úgy, hogy a donor molekulát 543 nm-en gerjesztettük és az akceptor emisszióját 650 nm felett detektáltuk. A Qdot605 nanokristályt az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük és az emisszióját 585-615 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk.

A Z-tengely mentén a sejtek közepére történő fókuszálás után egy optikai szeletet vettünk fel. A rögzített képek 512×512 pixelesek voltak, melyekben egy pixel X és Y irányú kiterjedése 400 nm volt.

A Cy5 FRET hatására bekövetkező elhalványításának a fokozására a mintákat a fotoelhalványítás idején 543 nm-en világítottuk meg úgy, hogy a lézer teljesítményét 100%-ra állítottuk. Minden 100. másodpercben képeket vettünk fel mind a három csatornában gyengébb, mindössze 5%-os lézer teljesítmény mellett. A fotoelhalványítás minden esetben 8×10^{-4} M CBr_4 jelenlétében történt.

3.8. Konfokális mikroszkóppal felvett képek elemzése

A képek kiértékeléséhez a Matlab alatt futó DipImage programot használtuk. A képek membrán és nem-membrán pixelekre való szegmentálásához a kézzel kijelölt vízfeltöltéses algoritmust (manually seeded watershed segmentation algorithm) megvalósító, általunk írt Matlab programot alkalmaztuk. A fotoelhalványítás során felvett képek elcsúszását a DipImage „correctshift” parancsának alkalmazásával korrigáltuk. A FRET hatékonyságot egy korábban, a munkacsoportunk által közölt publikáció alapján (72) úgy határoztuk meg, hogy a donor és az akceptor intenzitását korrigáltuk a spektrális átfedésekre, majd a fotoelhalványítás során felvett képsorozatok kiértékelésével kiszámítottuk a hetero-FRET hatékonyságot olyan sejtek membránfluoreszcenciájából, amelyek donorral és akceptorral konjugált antitestekkel

voltak jelölve (11. ábra). A fotoelhalványított akceptor molekulák hányadát ($F_{bleached}$) abban az időpillanatban számítottuk ki, amikor a FRET hatékonyság nullára csökkent. A donor gerjesztési hullámhosszán közvetlenül fotoelhalványított akceptor molekulák hányadát (BCF) a csak akceptorral jelölt mintából határoztuk meg (részletesen l. 4.2.1 fejezetben).

A donor és az akceptor intenzitások arányosak a jelölt receptorok számával, de a receptorszám kvantitatív meghatározásához az intenzitásokat kalibrálni kellett. Ezért SKBR-3 sejteken megjelöltük ugyanazt az epitópot vagy donorral vagy akceptorral konjugált antitesttel. Átlagosan 100 sejten meghatároztuk a háttérrel korrigált átlag fluoreszcencia intenzitásokat külön a csak donorral ($\langle I_d \rangle$), és külön a csak akceptorral ($\langle I_a \rangle$) jelölt minták esetén, figyelembe véve az antitestek festék/protein (L_d, L_a) arányát. Mivel mind a kettő mintában átlagosan ugyanannyi antitest kötődött egy sejthez, így az átlagos fluoreszcencia intenzitások aránya ($R_{a/d}$) megegyezik azoknak a fluoreszcencia intenzitásoknak az arányával, amit az azonos számú fluorofór molekulák emittálnak a donor és az akceptor csatornában:

$$R_{a/d} = \frac{\langle I_a \rangle L_d}{\langle I_d \rangle L_a} \quad (19)$$

Ahhoz, hogy a donor és az akceptor fluoreszcencia intenzitásai azonos skálán legyenek, a donorral és az akceptorral is megjelölt mintánál megszoroztuk a donor csatornában mért intenzitást az $R_{a/d}$ értékével.

A fluoreszcencia intenzitás receptor szám szerinti kalibrálásához meghatároztuk az adott antitest kötőhelyeinek a számát Qifikit (*Dako*) használatával áramlási citométeren.

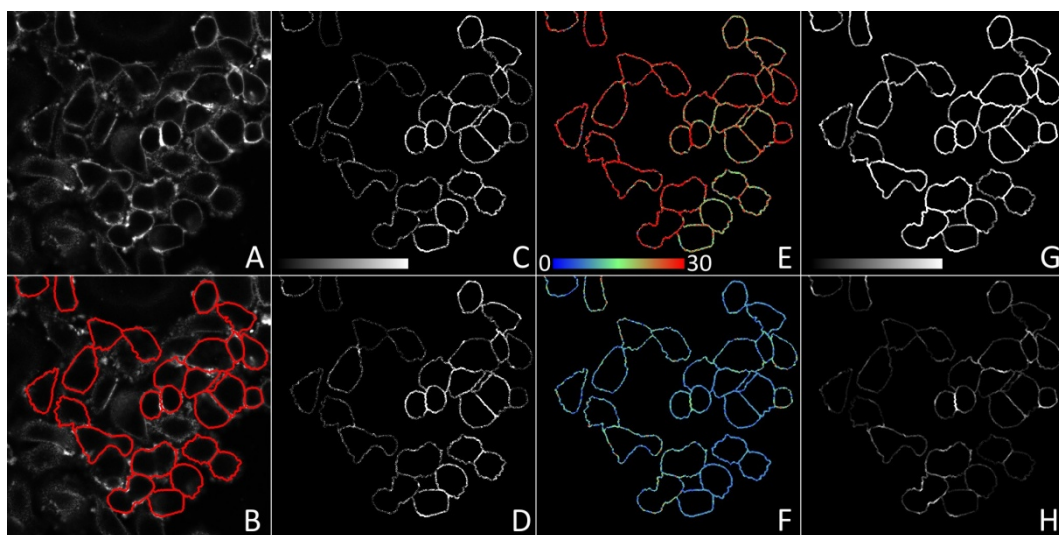
A mikroszkópos képek kiértékelésekor az egy sejten jelen lévő receptorok számát az alábbi képlet segítségével határoztuk meg:

$$N_i = \frac{I_i}{\langle I \rangle} N_{Qifit} \quad (20)$$

ahol N_i egy adott sejten vagy pixelben lévő molekulák száma, I_i egy adott sejt vagy pixel fluoreszcencia intenzitása, $\langle I \rangle$ pedig annak a sejtpopulációnak az átlagos, $R_{a/d}$ -vel korrigált fluoreszcencia intenzitása, melyen az átlagos, Qifikit-tel meghatározott receptorszám N_{Qifit} .

A 11. ábra mutatja be az FSAB mérés során felvett képek kiértékelésének a menetét. A kísérletekhez használt SKBR-3 sejteken megjelöltük az ErbB1 receptorokat donor festékkel

konjugált antitesttel (Alexa546-Mab528), és az ErbB2 fehérjét akceptorral konjugált antitesttel (Cy5-trastuzumab), majd képeket vettünk fel a donor, az akceptor és a FRET csatornában a kiégetés előtt, majd minden kiégetési ciklust követően mindaddig, amíg már nem tapasztaltunk változást az akceptor fluoreszcencia intenzitásában. Ezt követően folytattuk a képek kiértékelését a már korábban leírt módon.



11. ÁBRA: Reprezentatív képek mutatják be a kötött akceptor molekulák arányának meghatározását az FSAB módszerrel. SKBR-3 sejteket megjelöltünk Alexa546-Mab528 és Cy5-trastuzumab antitestek keverékével. **A.** Az akceptor csatornában felvett képen a membrán és nem-membrán pixelek szétválasztásához a kézzel kijelölhető vízfeltöltéssel algoritmust alkalmaztunk. **B.** Az **A.** fluoreszcencia képre ráhelyeztük a sejtmembránt kijelölő piros membrán maszkot. **C-D.** A kioltatlan donor fluoreszcencia intenzitása, melyet csak a membrán pixelekre számoltunk a kiégetés előtt (**C**) és a második kiégetési ciklus után, ami nagyjából 200 másodperces fotoelhalványítást jelent (**D**). **E-F.** A számított hetero-FRET hatékonyság a kiégetés előtt (**E**) és a második kiégetési lépést követően (**F**). A képpontok szinkódoltak a FRET hatékonyság nagyságától függően, amely 0% és 30% között változik. **G-H.** A számolt direkt akceptor intenzitás a kiégetés előtt (**G**) és a második kiégetési ciklus után (**H**). A fluoreszcencia képek (**C, D, G, H**) kontrasztját fokoztuk (contrast stretching), ezért a donor (**C, D**) és az akceptor (**G, H**) fluoreszcencia intenzitásai nem összehasonlíthatóak.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. Az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homoklaszterek kvantitatív jellemzése áramlási citometriás homo-FRET mérés alapján

Kevés olyan széleskörűen alkalmazható módszer létezik, amellyel vizsgálni lehet kettőnél több fehérjékből felépülő asszociátumokat. Az egyik ilyen eljárás, melyet sejtbiológiai kutatásokban is alkalmaznak, homo-FRET mérésén alapszik, mellyel azonos fehérjékből felépülő homoklaszterek méretét lehet meghatározni (65, 67, 73). A fluoreszcencia anizotrópia és a homoasszociátumok mérete közötti összefüggés nem egyértelmű és bonyolult volta szükségessé teszi egyszerűbb feltételezéseken alapuló modellek megalkotását.

Az általunk kifejlesztett, áramlási citométeren alkalmazható módszerrel kvantitatívan lehet jellemezni proteinekből felépülő homoklasztereket. A modell a fluoreszcencia anizotrópia és a fluorofórok helyi sűrűségének a viszonyát veszi figyelembe, és ebben az értelemben hasonló Yeow és Clayton fluoreszcens mikroszkópon kivitelezhető eljárásához (67). Modellünkben feltételeztük, hogy a vizsgált fehérje egy része monomert alkot, míg a maradék egy bizonyos méretű homoasszociátumot hoz létre. Ez nyilvánvalóan nem igaz, de mivel a biológiai rendszereken végrehajtott anizotrópia méréseknél kevés mérési pont áll rendelkezésünkre, szükség volt erre a feltételezésre, hogy az egyszerűsítés miatt kevesebb paraméterrel leírható modellünket illeszteni tudjuk a mért adatokra.

4.1.1. Fluoreszcencia anizotrópia függése a jelölt antitestek koncentrációjától

A homo-FRET hatékonyság a fluorofórok sűrűségének függvényében változik. Ha a sejtfelszíni fehérjék egy epitópját megjelöljük fluorofórral jelölt és jelöletlen antitest keverékével olyan koncentrációban, hogy telítse a lehetséges kötőhelyeket, akkor a fluoreszcensen jelölt epitópok hányada (s -szaturáció) arányos lesz a jelölt antitestek arányával a keverékben. A szaturáció mértékének becsléséhez minden egyes minta fluoreszcencia intenzitását elosztjuk a legfényesebb minta intenzitásával, ahol a sejteket csak fluorofórral jelölt antitesttel jelöltük. Feltételezzük, hogy a fehérjék egy része monomer (mon) állapotban van jelen, míg másik része nagyobb méretű klasztert, úgynevezett N -mert alkot ($1-mon$). Számításaink során azokat a fehérjéket tekintjük monomernek, amelyek nem képesek homo-FRET kölcsönhatást kialakítani. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a protein ténylegesen

monomer formában van, hiszen egy heterodimerben sincs a fehérjéknek homo-FRET kialakítására képes párja.

Bár a modellben csak monomerek és N -merek vannak, a szaturációtól függően az N -merek között lesz olyan, amely $0,1,\dots,N$ darab jelölt antitestet tartalmaz. Binomiális eloszlással adjuk meg annak a valószínűségét ($P_{s,k,N}$), hogy az N számú proteinből felépülő N -merben pontosan k darab fehérje van fluoreszcens antitesttel jelölve abban az esetben, ha a jelölt fehérjék hányada s :

$$P_{s,k,N} = \binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \quad (21)$$

A monomerekből és az N -merekből álló keverék anizotrópiáját ($r_{s,N}$) az egyes anizotrópiák intenzitással súlyozott átlagából határozhatjuk meg (74):

$$r_{s,N} = \frac{(1-mon) \sum_{k=0}^N P_{s,k,N} I_k r_k + mon \cdot I_{mon} \cdot r_{mon}}{(1-mon) \sum_{k=0}^N P_{s,k,N} I_k + mon \cdot I_{mon}} \quad (22)$$

ahol mon a monomerek hányada a keverékben, r_{mon} a monomerek, r_k a k jelölt antitestet tartalmazó N -mer anizotrópiája. I_k és I_{mon} a k jelölt antitestet tartalmazó N -mer és a monomerek fluoreszcencia intenzitása.

Runnels és Scarlata szerint a 13. egyenlet írja le egy k fluorofórt tartalmazó homoklaszter anizotrópiáját (64). A kifejezésben szereplő, homo-FRET által gerjesztett molekula anizotrópiáját (r_{FRET}) nullának feltételezzük, mivel ezek a fluorofórok nem preferenciálisan párhuzamosan orientáltak a donorral, ezáltal az általuk emittált fotonok is depolarizáltak lesznek. Bár megjegyzendő, hogy a κ^2 orientációs faktor miatt némi előnyt élveznek a homo-FRET során azok a molekulák, melyek a donorhoz hasonlóan orientáltak, de ezt a legtöbb esetben elhanyagolják (64). Ha feltételezésünk mégsem helyes, akkor a klaszter méretét alábecsüljük, vagy a monomer százalékot túlbecsüljük. Felhasználva a 13. és a 21-22. egyenleteket kifejezhetjük a monomerekből és az N -merekből felépülő klaszter fluoreszcencia intenzitással súlyozott teljes anizotrópiáját:

$$r_{s,N} = \frac{(1-mon) \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \frac{k}{N} \left(r_1 \frac{(1+d^6)}{1+kd^6} + r_{FRET} \frac{(k-1)d^6}{1+kd^6} \right) \right] + s \cdot mon \cdot r_1}{(1-mon) \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \frac{k}{N} \right] + s \cdot mon} \quad (23)$$

A képletben az $\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k}$ binomiális tag a k jelölt antitestet tartalmazó N -mer relatív gyakorisága ($P_{s,k,N}$). A 22-es egyenletben szereplő monomer fluoreszcencia intenzitást (I_{mon}) a szaturációval (s) helyettesítettük, hiszen a monomerek intenzitása a jelölt antitestek hányadával arányos. A k jelölt antitestet tartalmazó klaszter fluoreszcencia intenzitását (I_k a 22-es egyenletben) k/N -nel fejeztük ki. A k -val való szorzásra azért van szükség, mert a k jelölt antitestet tartalmazó klaszter intenzitása a jelölt antitestek számával arányos. Az N -nel való osztásra azért van szükség, mert ennek hiányában a klaszterek fluoreszcencia intenzitása túl lenne súlyozva, ui. ha pl. csak monomerek és $k=N$ db jelölt antitestet tartalmazó klaszter van jelen ($s=1$ miatt), akkor a mon arányban jelen levő monomerek fluoreszcencia intenzitása mon -nal egyenlő, az N -merek intenzitása pedig $(1-mon) \times N$ lenne az N -nel való korrekció hiányában.

A 23. egyenletet egyszerűbb alakra lehet hozni, ugyanis a nevezőben szereplő

$$\sum_{k=0}^N \binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} k \quad (24)$$

tag nem más, mint a binomiális eloszlás várható értéke, ami Ns az adott paraméterek mellett. Ezt felhasználva a nevező értéke egyszerűen a jelölt fehérjék s hányadával egyezik meg, és a 23. egyenlet a következő alakra hozható:

$$r_{s,N} = \frac{(1-mon)}{Ns} \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} k \left(r_1 \frac{1+d^6}{1+kd^6} + r_{FRET} \frac{(k-1)d^6}{1+kd^6} \right) \right] + mon \cdot r_1 \quad (25)$$

Mivel az r_{FRET} értékét nullának feltételezzük, az előző egyenletet tovább egyszerűsíthetjük:

$$r_{s,N} = \frac{(1-mon)}{Ns} \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} k \left(r_1 \frac{1+d^6}{1+kd^6} \right) \right] + mon \cdot r_1 \quad (26)$$

Abban az esetben, ha a szaturáció egyhez tart ($s \rightarrow 1$), a fenti képletben a binomiális tagokból az utolsó kivételével mindegyik elhanyagolható, és a következő egyenletet kapjuk:

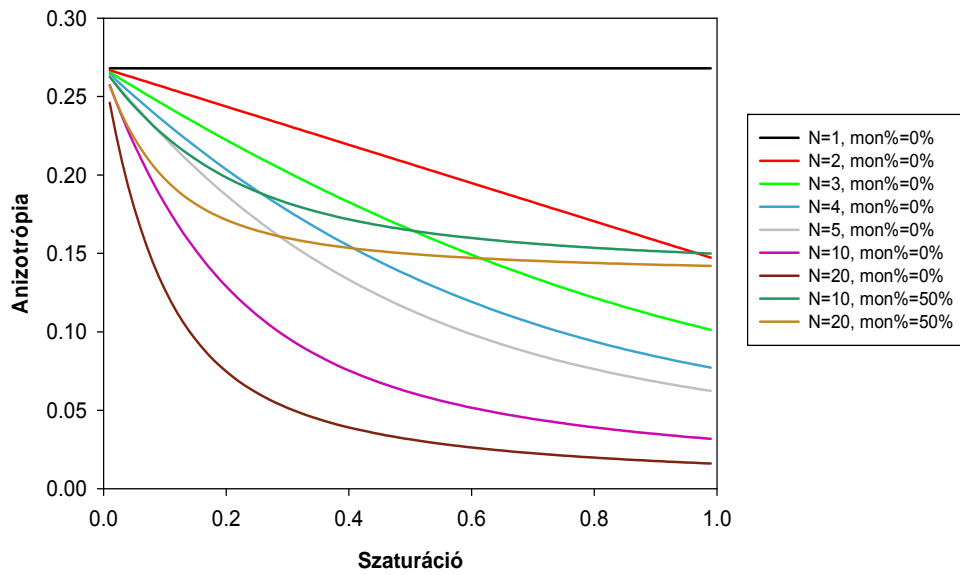
$$r_{1,N} = r_1 \frac{1+d^6}{1+Nd^6} + mon \cdot r_1 \frac{(N-1)d^6}{1+Nd^6} \quad (27)$$

Ha $N \gg 1$ (vagy $Nd^6 \gg 1$), akkor még tovább egyszerűsödik a képlet:

$$r_{1,N} \approx \frac{r_1}{N} + mon \cdot r_1 \quad (28)$$

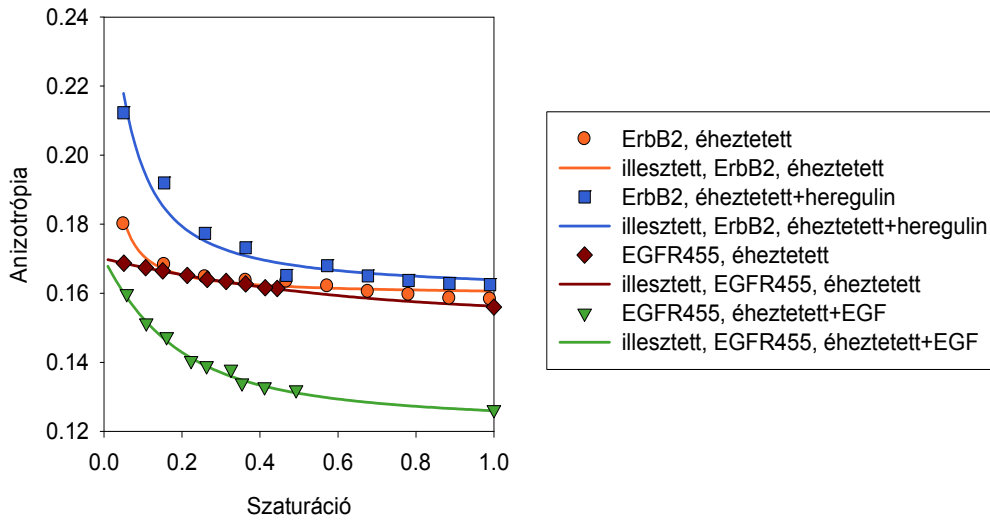
Tehát, ha a fehérje nem alkot monomert ($mon = 0$), akkor az anizotrópia megközelítően a határanizotrópia N -ed része. Ha $mon > 0$, akkor pedig az előző érték $mon \times r_1$ -gyel növekszik.

A 23. egyenletből következik, hogy a totál anizotrópia független a szaturációtól abban az esetben, ha csak monomerek vannak jelen, és az anizotrópia a szaturáció lineáris függvénye, ha a homoklaszterben csak dimerek találhatóak. A 12. ábrán látható, hogy minél nagyobb számú fehérjéből épül fel egy homoklaszter, annál meredekebben csökken az anizotrópia alacsony szaturáció értékeknél. Az anizotrópia görbék alakja és az anizotrópia értékek alacsony telítettség esetén lényegesen különböznek egymástól eltérő klaszter méretek esetén. Ez lehetőséget ad arra, hogy meghatározzuk az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homoklaszterek méretét, valamint kimutassuk a különböző stimulálások hatására bekövetkező változásokat a klaszter méretében.



12. ÁBRA: Elméleti görbék mutatják a fluoreszcencia anizotrópia függését a kötőhelyek szaturációjától különböző klaszter méret és a monomer % esetében. A 23. egyenlet alapján meghatároztuk a fluoreszcensen jelölt antitest anizotrópiáját a kötőhelyek telítettségének a függvényében úgy, hogy a határanizotrópiát 0,27-nek, a d értékét 1-nek feltételeztük. A görbék nagyobb részénél feltételeztük, hogy nincs jelen monomer ($mon\%=0$), és csak a proteinek számát (N) növeltük a klaszterben, míg a másik részüknél feltételeztük, hogy a fehérjék fele monomert alkot ($mon\%=50\%$). Ha csak monomerek vannak jelen ($N=1$), az anizotrópia konstans, míg dimerek esetén ($N=2$) a telítettség lineáris függvénye.

A kísérleti eredmények alapján megszerkesztett mért anizotrópia-szaturáció ($r-I_{tot}$) diagramra a 23. egyenletnek megfelelően görbét illesztettünk. A 13. ábrán látható, hogy mennyire jól illeszkedik modellünk a mért adatokra. Ezt követően kiszámoltuk az anizotrópia értékek standard deviációját, majd a becsült hibák és az anizotrópia átlag értékeinek az ismeretében 250 véletlenszerű adatsort állítottunk elő Monte Carlo szimuláció felhasználásával, majd mind a 250 adatsorra görbét illesztettünk a 23. egyenlet alapján. A számított 250 klaszterméret (N) és monomer százalék (mon) eloszlásának az ábrázolásával jellemeztük az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homoklasztereket és a mérési hibákat eltérő körülmények között.



13. ÁBRA: Az anizotrópia modell illesztése az ErbB1 és az ErbB2 anizotrópia adataira. Éhezettett (●) és heregulinnal stimulált (■) SKBR-3 sejteket megjelöltünk jelöletlen és Alexa488 festékkel jelölt ErbB2 ellenes antitestek keverékével (trastuzumab). Az ErbB1 receptorokat jelöletlen és Alexa488 festékkel jelölt EGFR455 antitestek keverékével jelöltük meg éhezettett (◆) és EGF stimulált (▼) A431 sejteken. Meghatároztuk a minták anizotrópiáját és ábráztuk a kötőhelyek telítettségének a függvényében. A folytonos vonalak mutatják a 23. egyenlet illesztésével kapott eredményeket.

4.1.2. Antitesthez kötött fluorofór határanizotrópiájának a meghatározása

A modellszámításokhoz meg kellett határozni a kiindulási, nem homo-FRET által gerjesztett, elszigetelt fluorofór anizotrópiáját (r_l). Feltételeztük, hogy az antitesthez kötött fluorofór határanizotrópiájának (r_0) Perrin-grafikon általi meghatározása jó közelítése lehet az r_l értékének. A dolgozatomban ezt az r_l értéket is határanizotrópiának nevezem, bár ebben az esetben a fluorofór nem mozdulatlan, így valójában az irodalmi határanizotrópiánál kisebb lesz az értéke.

A Perrin-egyenlet (12. egyenlet) fejezi ki a fluorofór emissziós anizotrópiájának (r) változását a rotációs korrelációs idejének (τ_{rot}) és a fluoreszcencia élettartamának (τ_f) függvényében. Mivel hetero-FRET jelenlétében csökken a fluorofór fluoreszcencia élettartama, a Perrin-grafikont meg lehet úgy szerkeszteni, hogy változtatjuk a hetero-FRET hatékonyságot (E) (75). A 9. egyenlet átrendezésével kifejezhetjük a donor fluoreszcencia élettartamát akceptor jelenlétében:

$$\tau_{DA} = (1 - E) \tau_D \quad (29)$$

A 29. egyenletet behelyettesítve a Perrin-egyenletbe a következő kifejezést kapjuk:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{(1-E)\tau_D}{\tau_{rot}} \right) \quad (30)$$

A határanizotrópia ($r_0 = r_I$) meghatározásához ábrázoljuk az $\left(\frac{1}{r}\right)$ értékeket az $(1-E)$ függvényében, majd egyenest illesztünk a pontokra, melynek az y -tengely metszete megegyezik a határanizotrópia reciprokával $\left(\frac{1}{r_0}\right)$.

Ahhoz, hogy mérni tudjuk az anizotrópia változását a fluorofór fluoreszcencia élettartamának a függvényében a hetero-FRET hatékonyság modulációjával, olyan mintákat készítettünk, melyekben változtattuk a donor közelében lévő akceptor molekulák számát. Ehhez a sejteket megjelöltük telítési koncentrációban donor festékkel konjugált elsődleges antitesttel, majd különböző koncentrációban akceptort tartalmazó másodlagos antitestet konjugáltunk az elsődleges antitesthez. A donor és az akceptor között kialakult hetero-FRET hatékonyságokat, valamint a donor fluoreszcencia anizotrópiáit mértük, majd a 14. ábrán látható Perrin-grafikonon ábrázoltuk, és meghatároztuk minden egyes IgG és Fab fragmentum határanizotrópiáját:

- Alexa488-trastuzumab (●), ErbB2 ellenes humanizált monoklonális antitest:

$$\frac{1}{r_0} = 3,73 \rightarrow r_0 = r_{1,A488-trastuzumab} = 0,268$$

- Alexa488-trastuzumab Fab:

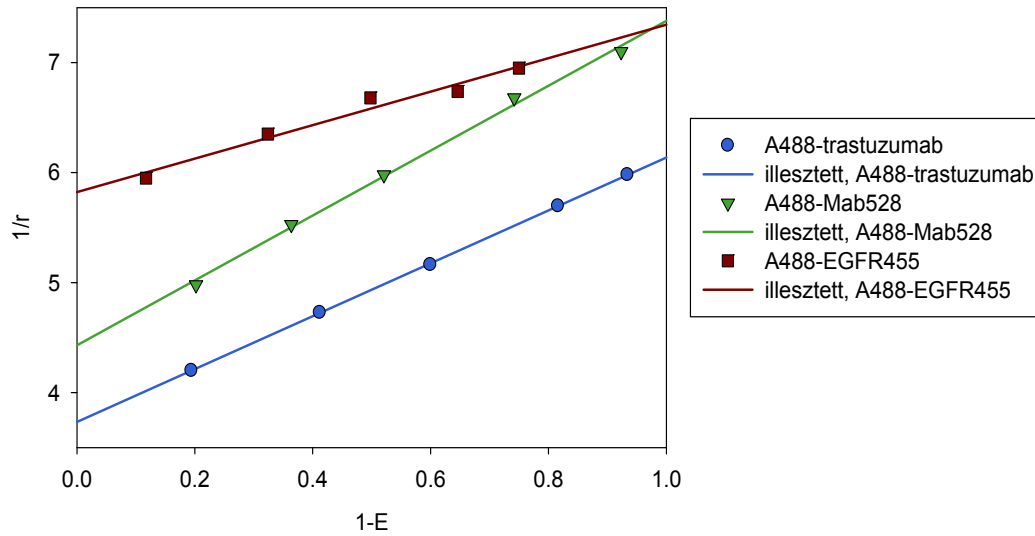
$$\frac{1}{r_0} = 3,46 \rightarrow r_0 = r_{1,A488-trastuzumab\ Fab} = 0,289$$

- Alexa488-Mab528 (▼), ErbB1 ellenes egér monoklonális antitest, amely gátolja az EGF kötődését:

$$\frac{1}{r_0} = 4,43 \rightarrow r_0 = r_{1,A488-Mab528} = 0,226$$

- Alexa488-EGFR455 (■), ErbB1 ellenes egér monoklonális antitest, amely nem gátolja az EGF kötődését:

$$\frac{1}{r_0} = 5,88 \rightarrow r_0 = r_{1,A488-EGFR455} = 0,170$$



14. ÁBRA: Határanizotrópia meghatározása. A sejteket megjelöltük elsődleges antitesttel telítési koncentrációban (Alexa488 festékkel konjugált trastuzumab (●), EGFR455 (■) vagy Mab528 (▼)), majd különböző koncentrációban másodlagos antitestet konjugáltunk az elsődleges antitesthez (Cy3-anti-human F(ab')₂ vagy Alexa546-anti-mouse F(ab')₂). Minden mintára kiszámoltuk a fluoreszcencia anizotrópia és a hetero-FRET hatékonyság értékeit, majd a Perrin-grafikonra illesztett egyenes y-tengely metszete megadta a határanizotrópia reciprokát.

A 14. ábrán jól látszik, hogy mennyire pontosan lehet egyenest illeszteni a mérési pontokra, ami azt bizonyítja, hogy az antitesthez kötött fluorofór határanizotrópiáját megbízhatóan ki lehet fejezni modellünk alkalmazásával. Nyilvánvalóan az így meghatározott egyetlen, elszigetelt antitesthez kötött fluorofór anizotrópiája a gátolt gyors rotációk miatt kisebb, mint az önmagában álló, mozdulatlan fluorofór határanizotrópiája, ezért az általunk kiszámolt határanizotrópia értékek ($r_0 = r_{1,A488-trastuzumab/Mab528/EGFR455}$) kisebbek, mint az irodalmi határanizotrópia. Ezek a rotációk a Perrin-grafikon bal oldalán jelennének meg, ahol nagyon rövid a fluorofórok élettartama, mert a hetero-FRET hatékonyság 100%-hoz közeli érték, de ezek nem láthatóak a 14. ábrán. Azonban ahhoz, hogy a 23. egyenlet alapján ki tudjuk fejezni egy homoklaszter anizotrópiáját, az egyedül álló, fluoreszcensen jelölt antitest anizotrópiájára (r_1) van szükségünk, és nem az irodalmi határanizotrópiára, ezért a Perrin-grafikon illesztése során fellépő hibák inkább hasznunkra vannak.

A méréseink során olyan antitesteket használtunk, ahol átlagosan egy fluorofór molekula kötődött egy antitesthez (festék/protein arány ~1), ezért elhanyagoltuk azt a homo-FRET kölcsönhatást, ami két olyan fluorofór között jönne létre, melyek ugyanahhoz az antitesthez kötődnek.

4.1.3. Homoklaszterhez kötődött két antitest közötti távolság meghatározása

Egy homoklaszterhez kötődő két antitest közötti távolságot R_0 egységekben adjuk meg. R_0 a kritikus Förster távolság, amelynél a donor és az akceptor közötti FRET hatékonyság 50%. Először meghatároztuk az antitestekhez konjugált festékek közötti távolságot nanométerben az 5. *egyenlet* alapján, mely homo-FRET mérések esetén két Alexa488 festék közötti távolságot jelenti ($R_{0,A488-A488}$). Ehhez kiszámoltuk az Alexa488 átfedési integrálját (J_{A488}) az *Invitrogen* honlapján található abszorpciós és emissziós spektrumok felhasználásával a 6. *egyenlet* alapján. A fluoreszcencia kvantumhatásfokát (Q_{A488}) korábban már meghatározták (76), és a számolásainkhoz ezt a 0,6 értéket használtuk fel. A közeg törésmutatóját (n) 1,4-nek, az orientációs faktort (κ^2) pedig 2/3-nak feltételezve, két, egymással homo-FRET kölcsönhatást kialakító Alexa488 festék közötti kritikus Förster távolság ($R_{0,A488-A488}$) 4,8 nm-nek adódott.

Munkacsoportunk korábban már vizsgálta az ErbB2 homodimerizációját, és meghatározták, hogy a Cy3-trastuzumab és a Cy5-trastuzumab antitestek közötti hetero-FRET hatékonyság (E) 20%, valamint a Cy3 és a Cy5 festékek közötti kritikus Förster távolság ($R_{0,Cy3-Cy5}$) 5 nm (77). Ezeket az adatokat behelyettesítve a 7. *egyenlet* átrendezésével kapott 31. *egyenletbe*, meghatároztuk két trastuzumab molekula közötti átlagos távolságot:

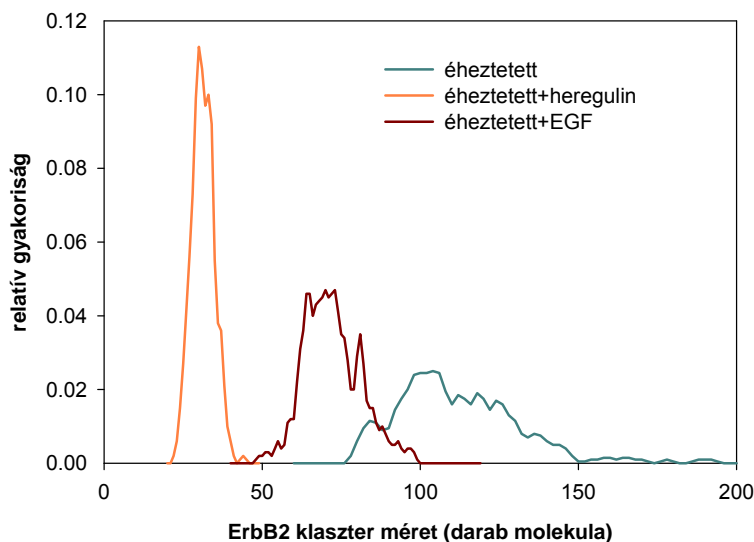
$$R_{trastuzumab} = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} = 5 \text{ nm} \times \sqrt[6]{\frac{1-0,2}{0,2}} = 6,29 \text{ nm} \quad (31)$$

Mivel két Alexa488 fluorofór közötti kritikus Förster távolság 4,8 nm ($R_{0,A488-A488}$), és két trastuzumab közötti távolság 6,29 nm ($R_{trastuzumab}$), két Alexa488-trastuzumab közötti átlagos távolság $R_{0,A488-A488}$ egységekben $\frac{6,29 \text{ nm}}{4,8 \text{ nm}} = 1,3 \times R_{0,A488-A488}$, melynek a reciprokát helyettesítettük be a 23. *egyenletben* szereplő d helyére. Hasonló elv alapján határoztuk meg az átlagos távolságot két Alexa488-EGFR455 antitest között, aminek az értéke $1,1 \times R_{0,A488-A488}$, valamint két Alexa488-Mab528 antitest között, amely értéke $1,4 \times R_{0,A488-A488}$.

4.1.4. Az ErbB2 homoklaszterek mérete nyugalomban lévő és különböző módon stimulált SKBR-3 sejteken

Az ErbB2 homoklaszterizáció vizsgálatát SKBR-3 humán emlőtumor sejtvonalon végeztük, amely közelítőleg egymillió ErbB2 receptort, és mindössze $\sim 2 \times 10^5$ ErbB1 fehérjét fejez ki a sejt felszínén. Meghatároztuk a monomer formában jelen lévő ErbB2 fehérjék arányát, valamint az ErbB2 molekulákból felépülő homoasszociátumok méretét stimulálatlan sejteken és különböző kezelések hatására a 4.1.1. pontban leírt módon, felhasználva a Monte Carlo szimulációt és a 23. egyenletet, majd megszerkesztettük a hisztogramokat.

Amikor a sejteket a kísérlet előtt 24 órán keresztül 0,1% szérumot (FCS) tartalmazó médiumban éhezettük, azaz a receptorok nem voltak aktiválva, a sejt felszínén lévő ErbB2 fehérjéknek $\sim 60\%$ -a monomert alkotott, míg a többi nagy méretű, közel 110 molekulából felépülő homoklaszterben volt jelen. Az éheztetett sejtek epidermális növekedési faktorról vagy heregulinnal történő stimulálása nem befolyásolta számottevően az ErbB2 monomerek arányát (16. ábra), ellenben jelentős mértékben csökkentette a homoasszociátumok méretét (15. ábra).



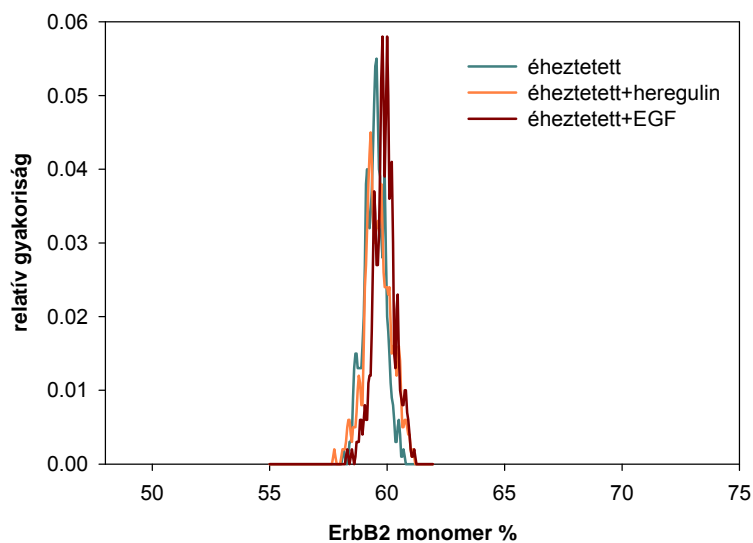
15. ÁBRA: Az ErbB2 homoklaszterek méretének a változása éheztetett és stimulált SKBR-3 sejtek felszínén. A kísérlet előtt 24 órán keresztül 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban éhezettük a sejteket (—), majd stimuláltuk heregulinnal (—) vagy EGF-fel (—). A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott klaszter méretek eloszlását mutatják.

Mivel az ErbB2 receptornak nincsen ismert ligandja, csak úgy képes aktiválódni, hogy a ligandot kötött ErbB1 vagy ErbB3 receptorokkal heterodimerizálódik. Az EGF az ErbB1, a heregulin az ErbB3 és az ErbB4 ligandja, így feltételezzük, hogy a ligandok által aktivált

ErbB1, illetve ErbB3 receptorok ErbB2 molekulákat szakítanak ki a nagy méretű homoklaszterekből azért, hogy ErbB1-ErbB2, illetve ErbB3-ErbB2 heterodimereket alkossanak. Emiatt tapasztaljuk EGF és heregulin stimulálás hatására a homoklaszterek méretének jelentős csökkenését (15. ábra). Az SKBR-3 sejtek felszínén nincsenek ErbB4 receptorok, így a heregulin stimuláció csak az ErbB3 fehérjét aktiválta. Már korábban is leírták az EGF és a heregulin által indukált ErbB2 heterodimerek jelenlétét (24).

A 15. ábrán látható, hogy a heregulin klaszterméretet csökkentő hatása jelentősebb volt, mint az EGF-é, hiszen heregulin stimuláció után mindössze 30 ErbB2 receptort tartalmaznak a homoklaszterek, míg EGF hatására ~70 fehérjét. Ez a különbség azzal magyarázható, hogy az EGF az ErbB1-ErbB2 heterodimerizáció mellett elősegíti az ErbB1 homodimerizációját is, így az egyébként is kevésbé kifejeződő ErbB1 fehérjéknek mindössze egy része fog ErbB2 receptorokat kiszakítani a homoklaszterükből azért, hogy ErbB1-ErbB2 heterodimereket alkossanak (78). Ezzel szemben a heregulin leginkább az ErbB2-ErbB3 heterodimerizációját fokozza, hiszen az ErbB2 előnyben részesíti heterodimerizációs partnerként az ErbB3 receptort (30). Irodalmi adatok alapján az ErbB3 stimulálatlanul homoaggregátumokat alkot, melyeket a heregulin szétszakít (79). Eredményeink szerint a heregulin stimuláció a nagyméretű ErbB2 homoklasztereket is szétbontja. Tehát stimulálatlan állapotban mind az ErbB2, mind az ErbB3 nagyméretű homoaggregátumokat alkot, melyekből a heregulin ErbB3 monomereket hasít ki, amelyek viszont az ErbB2 homoklaszterekből távolítanak el ErbB2 molekulákat azért, hogy ErbB2-3 heterodimerek jöhessenek létre.

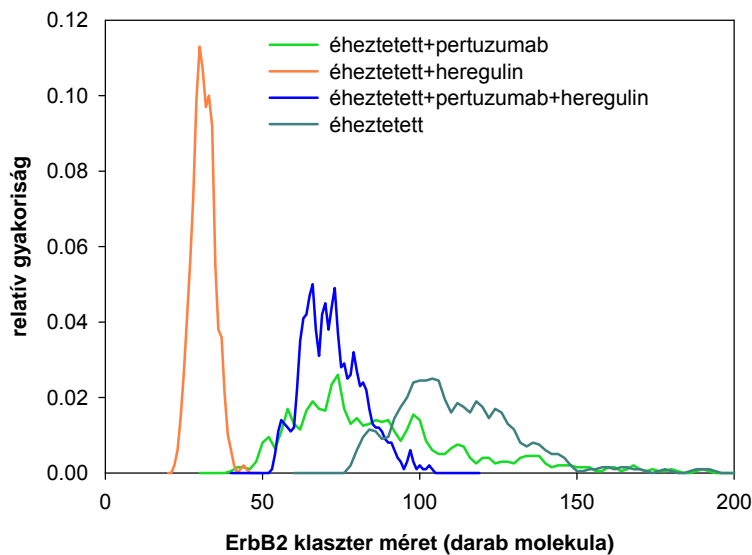
A 16. ábra azt mutatja, hogy sem az EGF, sem a heregulin stimulálás nem változtatta



16. ÁBRA: Az ErbB2 monomer százalékanak a változása éheztetett és stimulált SKBR-3 sejtek felszínén. A kísérlet előtt 24 órán keresztül 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban éheztetjük a sejteket (—), majd stimuláltuk heregulinnal (—) vagy EGF-fel (—). A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott monomer százalékok eloszlását mutatják.

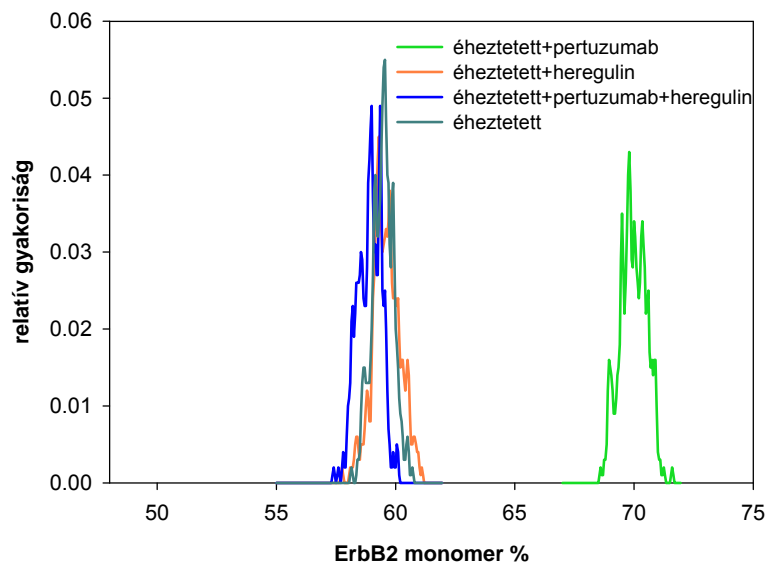
meg jelentős mértékben az ErbB2 monomer százalékát éheztetett SKBR-3 sejteken. Stimulálás hatására az ErbB2 homoklaszterekből kiszabadulnak a receptorok, és ErbB1-ErbB2, valamint ErbB3-ErbB2 heterodimerek keletkeznek. Modellünk szerint a heterodimerben jelen lévő ErbB2 receptorok is monomernek tekinthetők, hiszen azok nem képesek homo-FRET kölcsönhatást kialakítani másik ErbB2 fehérjével. Ez alapján azonban növekednie kellene az ErbB2 monomer százalékának. Ellenben tudjuk, hogy az ErbB2 molekulát is tartalmazó heterodimerek endocitózisa, ha lassan is, de végbe megy (71), ezáltal ha az ErbB2-t tartalmazó heterodimerek kialakulásának üteme összehasonlítható az endocitózis sebességével, akkor az ErbB2 monomerek hányada állandó marad.

Ha az éheztetett sejteket egy ErbB2 ellenes monoklonális antitesttel, a pertuzumabbal előkezeltük, akkor a homoklaszterek mérete jelentősen lecsökkent a nem előkezelt, éheztetett SKBR-3 sejtekhez viszonyítva (—, 17. ábra), míg a monomer formában jelen lévő ErbB2 receptorok aránya csak kis mértékben növekedett ~60%-ról közelítőleg 70%-ra (18. ábra). Korábbi, nem publikált hetero-FRET kísérleteink alapján feltételezzük, hogy a pertuzumab az ErbB2 dimerizációért felelős doménjéhez kötődve nemcsak az ErbB2 heterodimerizációját, hanem homodimerizációját is képes gátolni, ezért csökken a homoasszociátumok mérete, és növekszik a monomerek aránya.



17. ÁBRA: Pertuzumab előkezelés hatása az ErbB2 homoklaszterek méretére éheztetett és heregulinval stimulált SKBR-3 sejteken. A kísérlet előtt 24 órán keresztül 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban éheztetjük a sejteket (—), majd előkezeltük pertuzumabbal (—), és stimuláltuk heregulinval (—), vagy előkezelés nélkül stimuláltuk heregulinval (—). A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott klaszter méretek eloszlását mutatják.

Azt is megfigyeltük, hogy a pertuzumabbal történő előkezelés gátolja az ErbB2 homoklaszter méretének heregulin által kiváltott csökkenését, ugyanis ebben az esetben nagyjából 70 receptor alkotott egy homoklasztert (—, 17. ábra), szemben azzal a ~30 molekulával, melyet a heregulin stimulálás önmagában előidézett (—, 17. ábra). A pertuzumab olyan monoklonális antitest, amely az ErbB2 II doménjéhez kötődve sztérikusan gátolja a heterodimerizációját (54). Emiatt csökken kevésbé a homoklaszterek mérete heregulin hatására, ha a stimulálás előtt a sejteket előkezeltük pertuzumabbal, hiszen az ErbB2 kevésbé tud heterodimerizálódni a heregulin által aktivált ErbB3 receptorokkal. Ellenben a pertuzumab előkezelés nem befolyásolta a heregulin stimuláció után mérhető ~60%-os monomer arányt (18. ábra).

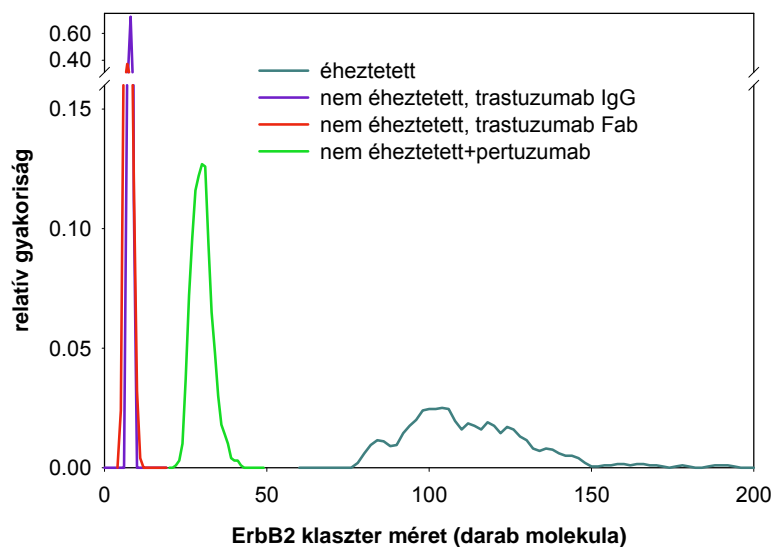


18. ÁBRA: Pertuzumab előkezelés hatása az ErbB2 monomer százalékra éheztetett és heregulinral stimulált SKBR-3 sejteken. A kísérlet előtt 24 órán keresztül 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban éhezettük a sejteket (—), majd előkezeltük pertuzumabbal (—), és stimuláltuk heregulinral (—), vagy előkezelés nélkül stimuláltuk heregulinral (—). A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott monomer százalékok eloszlását mutatják.

Ha a sejteket normál körülmények között, 10% szérumot tartalmazó médiumban növesztettük, akkor a monomerek aránya kicsit alacsonyabb volt, mint éheztetett sejtek esetén, nagyjából 53%. A homoklaszterek mérete a nem éheztetett sejteken volt a legalacsonyabb, mindössze közel 10 ErbB2 molekula alkotott egy homoklasztert (19-20. ábra), ugyanis ilyenkor a receptorok aktiválva voltak a szérumban található különböző növekedési faktorok által, melyek egy része az ErbB fehérjéknek a ligandja. A ligandot kötött ErbB1 vagy ErbB3 molekulák kiszakítanak ErbB2 receptorokat a nagy méretű homoklaszterekből azért, hogy heterodimereket alkossanak, ezért található kevés ErbB2 a

homoklaszterekben.

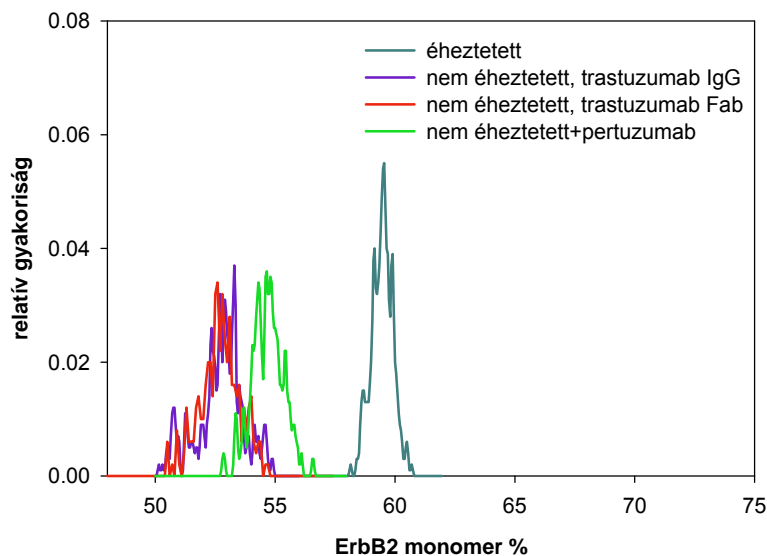
Ha a nem éheztetett sejteket pertuzumabbal kezeltük, növekedett a homoklaszterek mérete, hozzávetőleg egy homoklaszterben 30 ErbB2 fehérje volt (—, 19. ábra), de a monomer százalék szinte változatlan maradt (—, 20. ábra). A növekedési faktorokkal teli szérumban a receptorok aktiválva voltak, heterodimereket alkottak, emiatt kevés ErbB2 fehérje volt a homoklaszterekben. A pertuzumab, hozzákötődve az ErbB2 heterodimerizációért felelős doménjéhez, gátolta a heterodimerizációját, ezáltal több ErbB2 molekula maradt a homoklaszterekben.



19. ÁBRA: A teljes antitesttel és az Fab fragmentummal történő jelölés összehasonlítása szérumban stimulált SKBR-3 sejteken, és az ErbB2 receptorok homoklaszter méretének meghatározása pertuzumab előkezelés hatására. Az éheztetett SKBR-3 sejteken a kísérlet előtt 24 órával lecseréltük a tápfolyadékot 0,1% szérumban tartalmazó médiumra (—). A sejtek normál körülmények között, 10% szérumban tartalmazó médiumban növekedtek (—), majd pertuzumab előkezelést követően Alexa488-trastuzumab IgG és jelöletlen trastuzumab IgG teljes antitestek keverékével lettek megjelölve (—). A nem éheztetett SKBR-3 sejteket megjelöltük Alexa488-trastuzumab Fab és jelöletlen trastuzumab Fab antitestek keverékével is (—). A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott klaszter méretek eloszlását mutatják.

A kísérletekben bivalens antitesteket alkalmaztunk, és mivel a két Fab rész két azonos epitóphoz kapcsolódik, előfordulhat, hogy egymástól távolabb lévő epitópok keresztkötődnek, ezért a sejtek jelölését mindig jégen végeztük, ahol minimális az esélye a keresztkötődésnek. Annak ellenére, hogy az antitesteket a telítési koncentráció tartományában használtuk, ahol valószínűleg monovalensen kötődnek, egy kontroll mérést is elvégeztünk, ahol összehasonlítottuk a teljes antitesttel és az Fab fragmentummal történő jelölést. Nem éheztetett SKBR-3 sejteken megjelöltük az ErbB2 receptorokat Alexa488 festékkel jelölt és jelöletlen trastuzumab IgG teljes antitestek keverékével (—, 19-20. ábra), valamint Alexa488

fluorofórral konjugált és jelöletlen trastuzumab Fab elegyével (—, 19-20. ábra). Az anizotrópia értékek ismeretében, a Monte Carlo szimuláció felhasználásával megszerkesztettük a klaszter méretek és a monomer százalékok eloszlását. A 19-20. ábrákon látható, hogy a görbék teljesen átfednek egymással, nem függ sem a klaszter mérete, sem a receptor monomer százaléka attól, hogy teljes antitesttel vagy Fab fragmentummal végezzük a jelölést. Ez azt bizonyítja, hogy az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a bivalens antitest nem változtatja meg az ErbB2 fehérjék klaszterizációját.

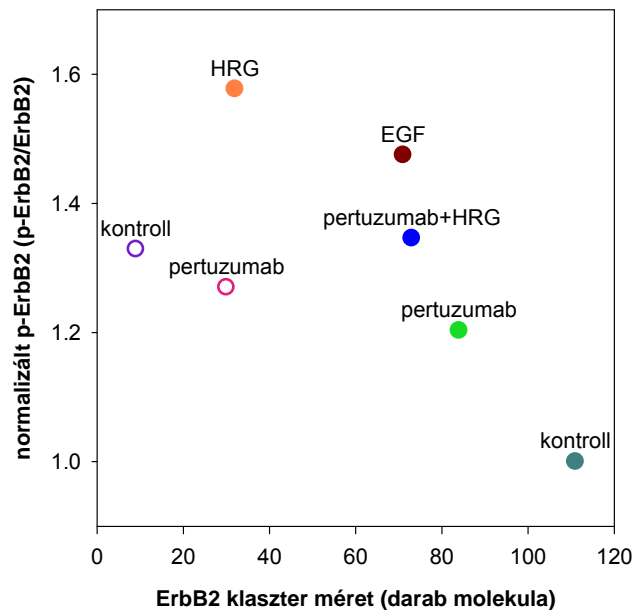


20. ÁBRA: A teljes antitesttel és az Fab fragmentummal történő jelölés összehasonlítása szérumban stimulált SKBR-3 sejteken, és az ErbB2 receptorok monomer százalékának a meghatározása pertuzumab előkezelés hatására. Az éheztetett SKBR-3 sejteken a kísérlet előtt 24 órával lecseréltük a tápfolyadékot 0,1% szérumban tartalmazó médiumra (—). A sejtek normál körülmények között, 10% szérumban tartalmazó médiumban növekedtek (—), majd pertuzumab előkezelést követően Alexa488-trastuzumab IgG és jelöletlen trastuzumab IgG teljes antitestek keverékével lettek megjelölve (—). A nem éheztetett SKBR-3 sejteket megjelöltük Alexa488-trastuzumab Fab és jelöletlen trastuzumab Fab antitestek keverékével is (—). A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott monomer százalékok eloszlását mutatják.

4.1.5. Az ErbB2 klaszter méretének összefüggése az ErbB2 aktivációs állapotával

Különböző növekedési faktorok (EGF, heregulin, szérumban) képesek fokozni az ErbB2 aktivációját, és méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a stimulációk hatására csökkent az ErbB2 homoklaszterek mérete (15. és 19. ábrák). Ezért megvizsgáltuk az összefüggést az ErbB2 tirozin-foszforiláltsági állapota és a homoasszociátumok mérete között. Fixált és permeabilizált sejteken megjelöltük az összes és a stimulált (tirozin foszforilált) ErbB2 molekulákat. Ezzel párhuzamosan a klaszter méreteket is meghatároztuk homo-FRET mérések segítségével. Az ErbB2 tirozin-foszforilációjának relatív szintjét úgy számoltuk ki,

hogyan normalizáltuk a foszforilált ErbB2 ellenes antitest intenzitását az összes ErbB2 receptort megjelölt antitest intenzitására. A 21. ábrán látható, hogy az ErbB2 aktivációs állapota és a homoklaszterek nagysága között fordított arányosság áll fenn: minél kisebb az ErbB2 homoklaszterek mérete, annál nagyobb mértékben van az ErbB2 tirozin-foszforilálva éhezettett és nem éhezettett sejteken is.

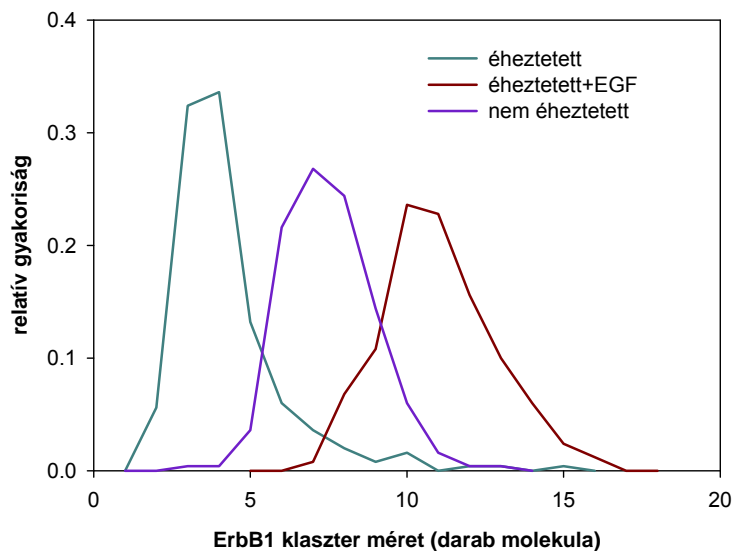


21. ÁBRA: Összefüggés az ErbB2 aktivációs állapota és a homoklaszterek mérete között. Meghatároztuk az ErbB2 normalizált tirozin-foszforiláció szintjét éhezettett (tömör karikák, ● kontroll) és nem éhezettett (üres karikák, ○ kontroll) SKBR-3 sejteken különböző kezelések hatására (● heregulin, ● epidermális növekedési faktor, ● és ○ pertuzumab, ● pertuzumab előkezelést követő heregulin stimulálás), és ábrázoltuk az ErbB2 homoklaszter méretének a függvényében.

A pertuzumab előkezelés csekély mértékben megnövelte éhezettett sejteken az ErbB2 tirozin-foszforilációját, miközben lecsökkentette a homoklaszter méretét (●, 21. ábra). Ez a fordított arányosság várható volt a köztük lévő negatív korreláció miatt. Ez alapján azt mondhatjuk, hogy éhezettett sejteken az ErbB2 receptorok többsége inaktív állapotban van és nagy méretű homoklasztereket alkot, melyeket a pertuzumab szétszakít. Ellenben meglepő, hogy a pertuzumab megnövelte az ErbB2 aktivációját. Úgy feltételezzük, hogy a pertuzumab által a homoklaszterből kiszakított inaktív receptor heterodimerizálódik más membrán proteinnel, ami az ErbB2 heteroaktivációjához vezet.

4.1.6. Szérum és EGF stimuláció hatása az ErbB1 homoklaszterek méretére

Az ErbB1 homoklaszterek kvantitatív jellemzését A431 humán epiteliális karcinóma sejtvonalon végeztük, amely sejtfelszínén megközelítőleg 2 millió ErbB1 receptort, és csupán $\sim 2 \times 10^4$ ErbB2 fehérjét expresszál. Két különböző ErbB1 ellenes antitestet használtunk a jelölésekhez. Az egyik az EGFR455 antitest, amely fontos jellemzője, hogy nem verseng az ErbB1 receptor ligandjával, az epidermális növekedési faktorral, ezzel szemben az Mab528 antitest sztérikusán gátolja az EGF kötődését, így ezt az antitestet csak az éheztetett és a szérum stimulált sejteken alkalmaztuk, míg az EGFR455 antitestet minden kísérlethez használtuk.

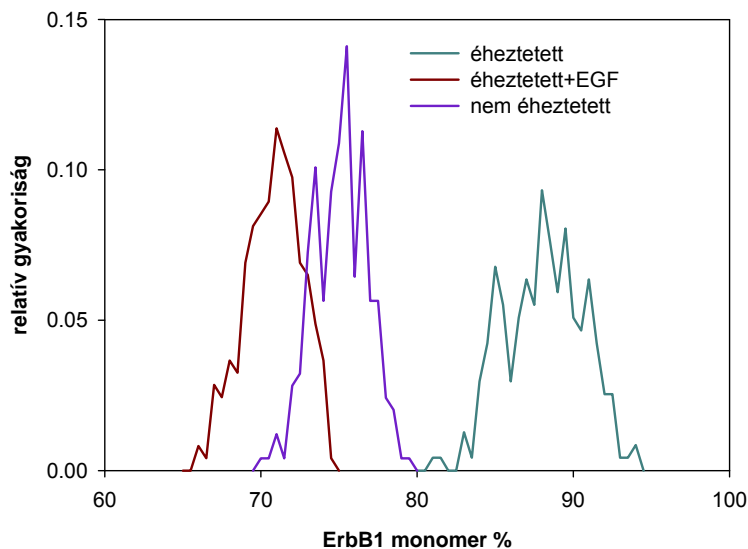


22. ÁBRA: Az ErbB1 homoklaszterek méretének változása stimulálás hatására A431 sejteken. A kísérlet előtt 24 órával az éheztetett sejteken lecseréltük a tápfolyadékot 0,1% szérumot tartalmazó médiumra (—), majd stimuláltuk a sejteket epidermális növekedési faktorral (—). A nem éheztetett sejtek 10% szérumot tartalmazó médiumban növekedtek (—). Az ErbB1 receptorokat Alexa488-EGFR455 és jelöletlen EGFR455 antitestek keverékével jelöltük meg. A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott klaszter méretek eloszlását mutatják.

A kísérletek egy részében a sejteket éhezítettük a kísérletek előtt: a tápfolyadékot lecseréltük 0,1% szérumot tartalmazó médiumra a kísérlet előtt 24 órával, ezáltal jelöléskor a receptorok inaktívak voltak. Azt tapasztaltuk, hogy az ErbB1 fehérjék legnagyobb része, közel 90%-a monomer formában van jelen (—, 23. ábra), míg a maradék 10% olyan homoklasztereket alkot, amelyekben átlagosan 4 ErbB1 molekula található (—, 22. ábra). Ha a sejteket nem éhezítettük, akkor a receptorokat a szérumban jelen lévő növekedési faktorok aktiválták. Ebben az esetben az ErbB1 homoklaszterek mérete kicsit nagyobb volt,

hozzávetőleg 7 receptort tartalmaztak (—, 22. ábra), míg a monomerek aránya lecsökkent 75%-ra (—, 23. ábra). Ezeket a változásokat a szérum által aktivált ErbB1 receptorok homoklaszterizációja okozta. Gyakorlatilag hasonló eredményeket kaptunk a homoklaszter méretére és a monomer százalékra mind a két antitesttel történő jelölés esetén.

Ha az éheztetett sejteket epidermális növekedési faktorról stimuláltuk, akkor a kontroll sejtekhez viszonyítva kevesebb ErbB1 molekula alkotott monomert, közelítőleg a 70%-uk (—, 23. ábra), míg az egy homoklasztert alkotó receptorok száma nagyjából 10-re növekedett (—, 22. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy az EGF az ErbB1 receptor ligandja, és fokozza az ErbB1 homoasszociációját, ami a homoklaszterek méretének a növekedésében manifesztálódik. De a ligand által előidézett változásokat az ErbB1 homoklaszter méretében mindig a többi ErbB fehérje sejtfelszíni kifejeződésének az ismeretében kell értelmezni. Ugyanis az ErbB2 receptor preferált heterodimerizációs partnere más ErbB molekuláknak (30), így versenyez velük asszociációs partnerért. Mivel az általunk tanulmányozott sejtvonalon hozzávetőleg 100-szor több ErbB1 receptor található, mint ErbB2, így az ErbB1 ligand indukált homodimerizációját, ill. homoklaszterizációját nem tudja az ErbB2 visszaszorítani.



23. ÁBRA: Az ErbB1 monomer százalékanak változása stimulálás hatására A431 sejteken. A kísérlet előtt 24 órával az éheztetett sejteken lecseréltük a tápfolyadékot 0,1% szérumot tartalmazó médiumra (—), majd stimuláltuk a sejteket epidermális növekedési faktorról (—). A nem éheztetett sejtek 10% szérumot tartalmazó médiumban növekedtek (—). Az ErbB1 receptorokat Alexa488-EGFR455 és jelöletlen EGFR455 antitestek keverékével jelöltük meg. A hisztogramok a Monte Carlo szimuláció alkalmazásával meghatározott monomer százalékok eloszlását mutatják.

Az ErbB1 kristályszerkezetének vizsgálata alapján a klasszikus dogma szerint úgy vélik, hogy ligand kötődés hatására az ErbB1 receptor monomerből dimer formába alakul át (12). Ellenben számos olyan tanulmány létezik, amelyek FRET módszert, korrelációs spektroszkópiát vagy egyéb egyedi molekula technikákat alkalmazva magasabb rendű ErbB1 oligomerekről számol be stimulálatlan sejtek felszínén, melyek mérete ligand hatására növekszik (20-23). Ezeket figyelembe véve azt mondhatjuk, hogy az általunk meghatározott ErbB1 klaszterek mérete nyugalomban lévő és stimulált sejteken összhangban van a korábbi eredményekkel.

4.1.7. Az ErbB1 és az ErbB2 molekulákból felépülő homoklaszterek méretének összehasonlítása éheztetett és stimulált sejtek felszínén - Összegzés

Az ErbB1 homoklaszterek kvantitatív jellemzését a megközelítőleg 2 millió ErbB1 receptort kifejező A431 humán epiteliális karcinóma sejtvonalon végeztük, míg az ErbB2 homoasszociátumok vizsgálatát SKBR-3 humán emlőtumor sejtvonalon, amely hozzávetőleg 1 millió ErbB2 fehérjét expresszál. Az 1. táblázat foglalja össze az ErbB1 és az ErbB2 molekulákból felépülő homoklaszterek méretváltozását különböző kezelések hatására, valamint áttekinti a monomer százalékok alakulását is.

		ErbB1		ErbB2	
		klaszter méret	monomer %	klaszter méret	monomer %
éheztetett	kontroll	4 ± 1	88 ± 4	111 ± 12	60 ± 5
	EGF	11 ± 2	71 ± 3	71 ± 6	61 ± 4
	heregulin	–	–	32 ± 4	59 ± 5
	pertuzumab	–	–	84 ± 7	70 ± 4
	pertuzumab + heregulin	–	–	73 ± 6	58 ± 3
nem éheztetett	kontroll	7 ± 1	75 ± 4	9 ± 2	53 ± 3
	pertuzumab	–	–	30 ± 4	55 ± 3

1. TÁBLÁZAT: Az ErbB1 és az ErbB2 homoklaszterek méretének és monomer százalékanak változása éheztetett, előkezelt és stimulált sejtek felszínén. Az ErbB1 receptorokat Alexa488-EGFR455 és jelöletlen EGFR455 antitestek keverékével jelöltük meg A431 sejteken. Az ErbB2 fehérjéket Alexa488-trastuzumab IgG és jelöletlen trastuzumab IgG antitestek elegyével jelöltük SKBR-3 sejteken. Az átlagokat (± SE) három független kísérlet során illesztett klaszterméret és monomer százalék értékekből határoztuk meg. A klaszterméret az ErbB1 vagy az ErbB2 fehérjék átlagos számát adja meg egy homoklaszterben. A monomer százalék a receptorok homoklaszteren kívüli arányát fejezi ki, amelyek vagy monomerként vagy más fehérjével alkotott heterodimereként fordulnak elő.

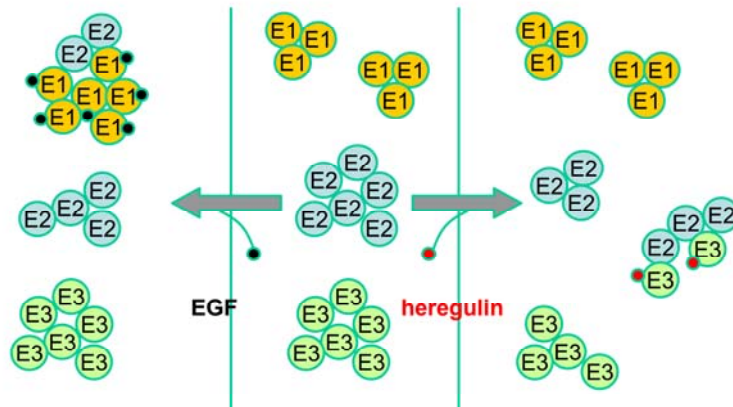
Eredményeink szerint stimulálatlan sejtek felszínén az ErbB2 több mint 100 molekulát tartalmazó homoklaszterei lényegesen nagyobbak, mint az átlagosan 4 ErbB1 fehérjéből felépülő homoasszociátumok. Az ErbB2 receptoroknak nagyjából 60%-a van jelen monomer formában, míg az ErbB1 fehérjék legnagyobb része, közel 90%-a, monomert alkot. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ErbB2-nek sokkal nagyobb hajlama van homoklaszterizálódni, mint az ErbB1-nek, és ezt az elméletet támasztják alá korábbi, klasszikus biokémiai (80, 81) és FRET módszerekkel (78, 82) végzett tanulmányok is.

A nagy méretű ErbB2 homoklaszterek inaktív ErbB2 molekulákat tartalmaznak (21. *ábra*), melyek egy részét a ligand által aktivált ErbB1 vagy ErbB3 receptorok kiszakítják azért, hogy heterodimer komplexeket alkossanak. Ezt bizonyítja, hogy éheztetett sejteken EGF és heregulin stimulálás hatására csökkent az ErbB2 homoklaszterek mérete (15. *ábra*).

Mivel az ErbB1 teljes értékű tirozin kináz receptor, ami azt jelenti, hogy képes ligandot kötni, és van saját tirozin kináz aktivitása, EGF kötődésekor nemcsak ErbB1-ErbB2 heterodimerek keletkeznek, hanem ErbB1-ErbB1 homodimerek is, ami megmagyarázza az ErbB1 homoklaszterek méretének a növekedését EGF stimuláció hatására (22. *ábra*).

Azonban sem az ErbB2, sem az ErbB3 nem teljes értékű receptor kináz, ugyanis az ErbB2 nem képes ligandot kötni, míg az ErbB3 nem rendelkezik saját kináz aktivitással, ezért Citri és munkatársai süketnek és némának nevezték el ezeket a receptorokat (83). Landgraf és Eisenberg kimutatták, hogy a ligandot nem kötött ErbB3 homoklasztereket alkot, melyeket a heregulin szétbont (79). Ezt összevetve eredményeinkkel azt feltételezhetjük, hogy nyugalomban lévő sejteken nemcsak az ErbB2, hanem az ErbB3 is nagy méretű homoklasztereket alkot, melyekben inaktív receptorok találhatóak, és a heregulin ErbB3 molekulákat szakít ki ezekből homoasszociátumokból. A ligand által aktivált ErbB3 ErbB2 fehérjéket toboroz az inaktív ErbB2 receptorokat tartalmazó homoklaszterekből, és tirozin kináz aktivitással rendelkező ErbB2-ErbB3 heterodimereket alkotnak. Mivel a heregulin kizárólag csak az ErbB2-ErbB3 heterodimerizációt idézi elő, ellentétben az epidermális növekedési faktoral, amely az ErbB1-ErbB2 heterodimereken kívül fokozza az ErbB1 homodimerek kialakulását is, érthető, hogy miért okoz nagyobb homoklaszter méret csökkenést a heregulin az ErbB2 receptor esetében.

A 24. *ábra* összefoglalja az ErbB1 (E1), ErbB2 (E2) és ErbB3 (E3) receptorok eredményeink alapján valószínűsíthető klaszterizációját.



24. ÁBRA: Az ErbB1 (E1), az ErbB2 (E2) és az ErbB3 (E3) receptorok asszociációi nyugalomban lévő (középen), EGF stimulált (bal oldalon) és heregulin stimulált (jobb oldalon) sejteken.

4.2. Az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő homo- és heteroklaszterek kvantitatív jellemzése konfokális mikroszkópon az FSAB módszer alkalmazásával

Eddigi munkánk során az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépült homoklasztereket jellemeztük nyugalomban lévő és stimulált sejtek felszínén, de felmerült bennünk a kérdés, hogy az általunk tett feltételezések a heteroklaszterek jelenlétére igazak-e. Mivel homo-FRET mérése során csak azonos molekulákból felépülő asszociátumokat tudunk vizsgálni, más módszert kellett alkalmazni. A heteroasszociátumokat számos molekuláris biológiai módszerrel ki lehet mutatni, de széleskörűen elterjedtek a fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer mérésén alapuló eljárások is (84-86). Azonban a hetero-FRET határfok csak kevésbé érzékeny a donort körülvevő akceptorok számára, tehát a klaszter méretére (60). Továbbá a hetero-FRET határfok meghatározása nem ad felvilágosítást a heteroasszociációban részt vevő kötött és a nem heteroasszociáló szabad receptorok arányára. Mivel a molekuláris biológiai módszerek általában kvalitatív vagy szemikvantitatívak, úgy ítéltük meg, hogy szükséges egy új eljárás kifejlesztése.

Munkám során kidolgoztunk egy módszert, a FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítást, melyet eredetileg Mekler és munkatársai javasoltak (68, 69), és az eljárás alkalmazásával kvantitatívan jellemeztük az ErbB1 és az ErbB2 fehérjékből felépülő heteroklaszterek összetételét.

4.2.1. A kötött akceptor molekulák hányadának a meghatározása

Ha adott egy fotostabil FRET donor és egy olyan akceptor, ami egy bizonyos fotokémiai reakcióban vesz részt, akkor az akceptor fotokémiai reakciójának donor által fokozott sebességéből meg lehet határozni a FRET hatékonyságot (68). Mekler és munkatársai azt állítják (69), hogy az alacsony FRET határfokok is pontosan meghatározhatóak ezzel a módszerrel, ami megmagyarázza, miért hívják a technikát az érzékenység fotokémiai növelésének (PES). Ha az akceptor fotokémiai reakciója visszafordíthatatlan fotoelhalványítás, akkor a FRET az akceptor fotoelhalványítás gyorsított ütemét eredményezi.

Módszerünknek a hetero-FRET által kiváltott fokozott mértékű akceptor fotoelhalványítás a lényege, ezért neveztük el a technikát FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványításnak. Ha megjelölünk egy sejt felszíni fehérjét fotostabil donorral konjugált antitesttel, míg egy másik fehérjét fotolabilis akceptorral konjugált antitesttel, és a donor abszorpciós hullámhosszán gerjesztjük a donor fluorofórokat, akkor a hetero-FRET

távolságon belül lévő fotolabilis akceptor molekulák kiégnek, ezért meg lehet határozni a donorral heteroasszociáló akceptor molekulák arányát. Mivel elsősorban a FRET kölcsönhatásban részt vevő akceptor molekulák égnak ki, ki lehet számítani a fotoelhalványodott akceptor molekulák alpopulációjának relatív hozzájárulását a teljes FRET hatékonysághoz úgy, hogy megvizsgáljuk a kapcsolatot a FRET hatékonyság csökkenése és az akceptor szenzitizált emissziója között (69).

Minket az FSAB elméleti végpontja érdekelt, az a pont, ahol az összes akceptor kiég, amely FRET távolságon belül van a donortól. Feltételeztük, hogy két csoportja létezik az akceptor molekuláknak a donorokkal történő asszociáció tekintetében. Az egyik osztályba a donorokhoz kötött akceptorok tartoznak, amelyek FRET távolságon belül vannak a donortól (A_{bound}), a másik csoportot a szabad akceptor molekulák alkotják (A_{free}). Amikor az összes kötött akceptor kiég, a FRET hatékonyságnak nullára kell lecsökkennie. Ha összehasonlítjuk az akceptor intenzitását olyankor, amikor a FRET hatékonyság nullára csökken az összes akceptor molekula kiindulási intenzitásával kiégetés előtt (A_0), akkor meghatározhatjuk a kötött akceptor molekulák arányát (A_{bound} / A_0), ugyanis az akceptor intenzitása arányos az akceptor molekulák számával. Azonban vannak olyan szabad akceptor molekulák, amelyek a donor gerjesztési hullámhosszán történő közvetlen gerjesztés következtében égnak ki, nem pedig a hetero-FRET kölcsönhatás miatt. A fotoelhalványítási korrekciós faktor (BCF) veszi figyelembe a direkt gerjesztés hatására elhalványított szabad akceptor molekulák arányát abban a pillanatban, amikor a kötött akceptor molekulák teljesen kiégnek, vagyis a FRET hatékonyság nullára csökken. A kiégett ($F_{bleached}$) és a kötött (A_{bound}) akceptor molekulák közötti összefüggést a 32-34. egyenletek írják le:

$$F_{bleached} = \frac{A_{free} BCF + A_{bound}}{A_{free} + A_{bound}} \quad (32)$$

$$A_0 = A_{bound} + A_{free} \quad (33)$$

A 32-33. egyenletek összevonásával kifejezhetjük a kötött akceptor molekulák arányát (A_{bound}):

$$A_{bound} = A_0 \frac{F_{bleached} - BCF}{1 - BCF} \quad (34)$$

Mivel a BCF értéke eltérő volt különböző antitestek esetén, meg kellett határozni minden egyes akceptor konjugált antitest esetén, melyeket az FSAB kísérletek során használtunk. A 32-34. *egyenletekben* feltételeztük, hogy a kötött akceptor populáció 100%-a kiégett. Azonban az akceptorként használt Cy5 fluorofór kiégése nem volt minden esetben teljes (27. *ábra*). Ha a BCF_{FRET} jelenti azon kötött akceptor molekulák arányát, amelyek kiégtek, akkor a 34. *egyenlet* helyett a 35. *egyenlettel* lehet meghatározni a kötött akceptor molekulák arányát:

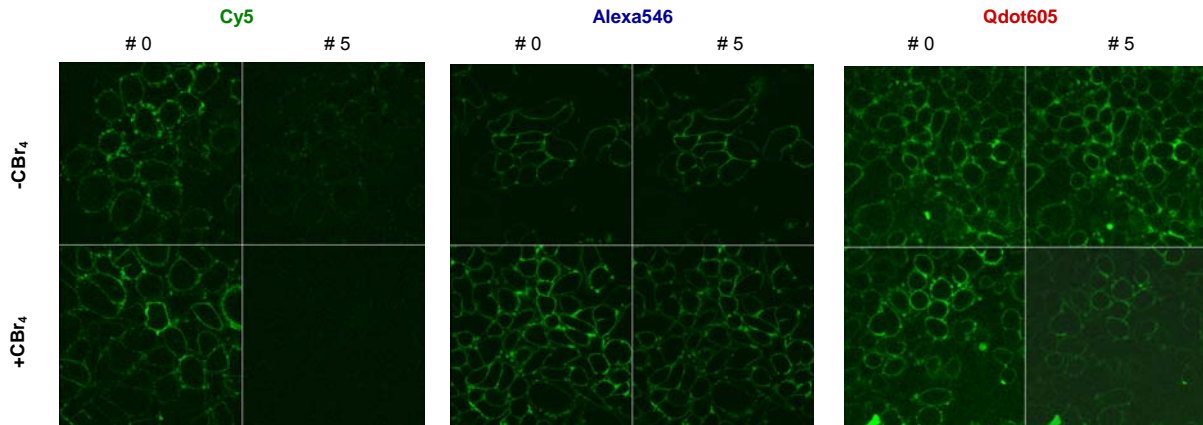
$$F_{bleached} = \frac{A_{free} BCF + A_{bound} BCF_{FRET}}{A_{free} + A_{bound}} \Rightarrow A_{bound} = A_0 \frac{F_{bleached} - BCF}{BCF_{FRET} - BCF} \quad (35)$$

A BCF_{FRET} meghatározható olyan mintából, amelyet Cy5 festékkel konjugált elsődleges antitesttel és Alexa546 fluorofórral konjugált másodlagos antitesttel jelöltünk meg.

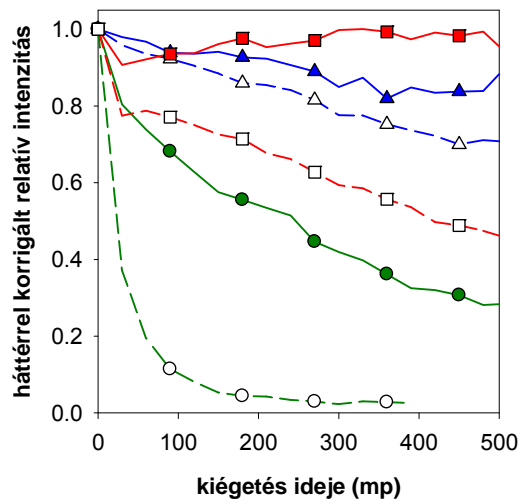
4.2.2. A megfelelő donor-akceptor pár kiválasztása az FSAB kísérletekhez

Az FSAB sikeres alkalmazásának előfeltétele egy olyan ideális donor-akceptor pár, amelyben a donor fotostabil, az akceptor pedig fotolabilis. Bár a Cy5 fluorofór konfokális mikroszkópiában fotolabilisnak tekinthető, meglehetősen hosszú idő szükséges a teljes kiégéséhez. Mekler és munkatársai eredményeivel (68, 69) összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy a CBr_4 jelentősen képes felgyorsítani a Cy5 kiégésének sebességét (25-26. *ábra*), így kísérleteink során fotolabilis akceptorként a Cy5 festéket használtuk CBr_4 jelenlétében.

Ezt követően olyan donort kellett találnunk, amely CBr_4 jelenlétében is fotostabil marad. Kézenfekvő jelöltnek tűntek a quantum dot nanokristályok, melyek köztudottan fotostabil anyagok, azonban a CBr_4 jelentősen fokozta a kiégésük sebességét (25-26. *ábra*). Így választásunk az Alexa546 festékre esett, amely megtartotta fotostabilitását CBr_4 mellett is, ezért ezt a fluorofórt használtuk fotostabil donorként méréseink során. Azonban felmerült még az Alexa555 fluorofór is, mely közel tízszer fotostabilabb, mint az Alexa546 (87), viszont a fluoreszcencia kvantumhatásfoka alacsony, és túl kicsi a kritikus Förster távolság (R_0) az Alexa555 – Cy5 festékpár esetén ($R_{0,A555-Cy5} = 4,9$ nm, $R_{0,A546-Cy5} = 6,8$ nm).



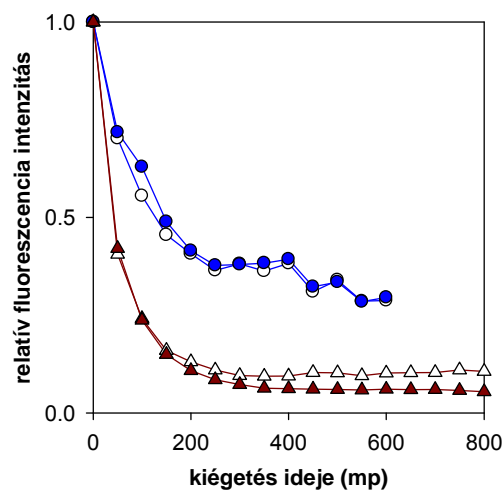
25. ÁBRA: CBr₄ hatása a Cy5, az Alexa546 és a Qdot605 fluorofórok kiégésének sebességére. SKBR-3 sejteket megjelöltük Cy5-, Alexa546- vagy Qdot605-trastuzumab antitestekkel. Képeket vettünk fel a kiégetés előtt (#0), majd öt, egymás utáni, 543 nm-en (Alexa546, Qdot605) vagy 633 nm-en (Cy5) végrehajtott kiégetési ciklus után (#5) a kiégetés hullámhosszán gyengített lézersugarat használva, CBr₄ hiányában (-CBr₄) vagy jelenlétében (+CBr₄).



26. ÁBRA: CBr₄ hatása a Cy5, az Alexa546 és a Qdot605 kiégésének sebességére. SKBR-3 sejteket megjelöltünk Alexa546 (—, ---), Qdot605 (—, ---) vagy Cy5 (—, ---) festékkel konjugált trastuzumab antitesttel, majd megvilágítottuk a mintákat 543 nm-en (Alexa546, Qdot605) vagy 633 nm-en (Cy5). Minden ~30. másodpercben megszakítottuk az erős kiégetési megvilágítást, és azonos hullámhosszon, de gyengébb megvilágítás mellett képeket vettünk fel. A fotoelhalványítást CBr₄ hiányában (folytonos vonalak) vagy jelenlétében (szaggatott vonalak) végeztük. Az átláthatóság kedvéért csak minden 3. mérési pontot ábrázoltunk szimbólumokkal.

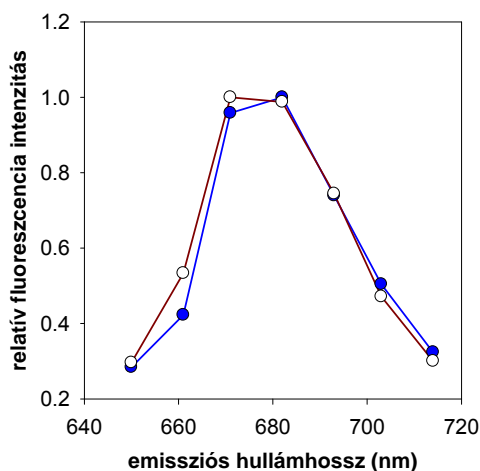
Megvizsgáltuk a Cy5 fluorofór kiégésének kinetikáját 633 nm-en, a Cy5 gerjesztési hullámhosszán, valamint 543 nm-en, az Alexa546 gerjesztési hullámhosszán. Minden esetben a kiégetés során erős gerjesztő fényt használtunk, míg a képek felvételénél gyengébb

intenzitását. Azt tapasztaltuk, hogy a Cy5 fotoelhalványítása 543 nm-en nem volt teljes, hozzávetőleg a kiindulási intenzitás 20-40%-a ellenállt a kiégésnek akár 543 nm-en, akár 633 nm-en gerjesztettük a fluorofórt a képek felvételénél (—, 27. ábra). Azonban 633 nm-en a Cy5 fluorofór teljesen kiégett függetlenül attól, hogy 543 nm-en vagy 633 nm-en gerjesztve vettük fel a képeket (—, 27. ábra). A 27. ábrán feltüntetett Cy5 festék fotoelhalványítási görbéi irreverzibilis kiégést mutatnak, ugyanis az 543 nm-en történő megvilágítás hatására sem tért vissza a Cy5 fluoreszcenciája.



27. ÁBRA: SKBR-3 sejteket megjelöltünk Cy5-trastuzumab antitesttel, melyeket 543 nm-en (—) fotoelhalványítottunk, és minden kiégetési ciklus után, gyengébb megvilágítással képeket vettünk fel 543 nm-es (○) vagy 633 nm-es (●) gerjesztő fény mellett. A Cy5-trastuzumab antitesttel megjelölt SKBR-3 sejteket 633 nm-en (—) kiégettük, majd minden kiégetési ciklus után rögzítettük az intenzitását 543 nm-es (△) vagy 633 nm-es (▲) gerjesztő megvilágítást alkalmazva. A Cy5 fluorofór emisszióját minden esetben 650 nm-es felüláteresztő szűrőn keresztül mértük.

Eggeling és munkatársai megállapításaival (88) ellentétben, akik a Cy5 gyors és teljes kiégését tapasztalták az abszorpciós spektrumának alacsony hullámhosszúságú tartományában történő gerjesztés hatására, mi csak a részleges kiégését tapasztaltuk 543 nm-es megvilágítást alkalmazva. A fenti ellentmondás oka ismeretlen. Megvizsgáltuk az 543 nm-en végrehajtott kiégetés előtt és után az 543 nm-es és a 633 nm-es gerjesztés hatására emittált fluoreszcencia intenzitások arányát, és azok teljesen azonosak voltak. Ezen kívül nem találtunk különbséget az 543 nm-en kiégetett és a nem kiégetett Cy5 emissziós spektrumai között sem (28. ábra).

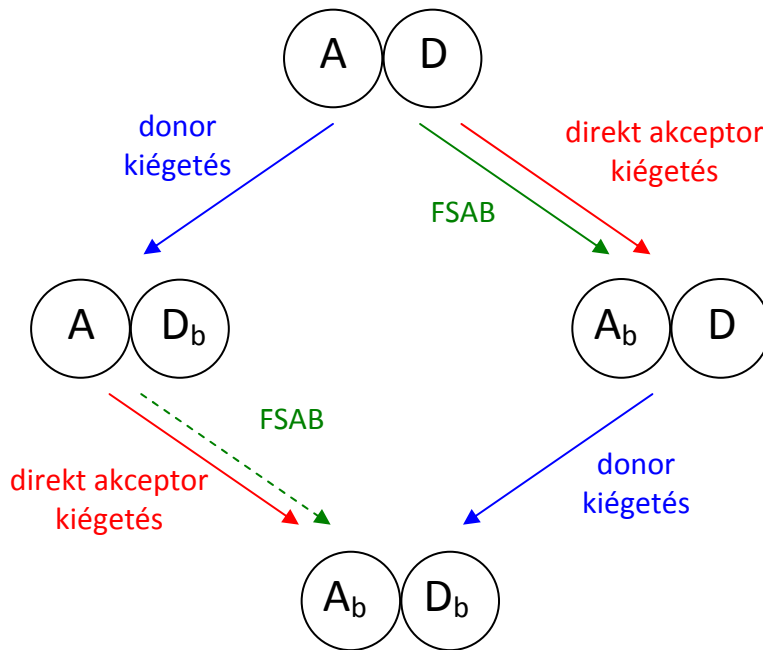


28. ÁBRA: A Cy5 fluorofór emissziós spektruma 633 nm-en gerjesztve nem fotoelhalványított (●) és 543 nm-en kiegészített (○) minták esetén. Üveg fedőlemezre növesztett SKBR-3 sejteket megjelöltünk Cy5-trasztuzumab antitesttel, majd 10 nm-es felbontással mértük az emisszióját Zeiss LSM510 konfokális mikroszkóp Meta egységével.

A Cy5 festék fotofizikája meglehetősen bonyolult, sokféle átmenetet foglal magába, mint például cisz-transz izomerizáció, reverzibilis fotoindukált átmenet fluoreszcens és nem fluoreszcens állapotok között, triplett és magasabb gerjesztett állapotok gerjesztése, szomszédos fluorofórok közötti kölcsönhatás (88-91). Oxigén és CBr_4 hiányában a Cy5 100.000 – 200.000 fotont emittál mielőtt irreverzibilisen kiég (89). Azonban oxigén jelenlétében a rövid fluoreszcencia élettartama, a nagy moláris abszorpciós együtthatója és a folyamatos, gyors átmenet az alap és a gerjesztett állapotok között csökkenti a Cy5 fotostabilitását konfokális mikroszkópiában (92).

4.2.3. Az FSAB módszer megbízhatósága: homoklaszterizálódott ErbB1 és ErbB2 receptorok arányainak meghatározása és összevetése korábbi homo-FRET mérésén alapuló eredményeinkkel

Az FSAB folyamatot a 29. ábrán látható elképzelés szerint vizsgáltuk. Az egyszerűség kedvéért a donor – akceptor komplexeket dimereknek feltételeztük, és ilyenkor négy különböző molekula asszociátum létezhet: DA , D_bA , DA_b , D_bA_b , ahol A és D az akceptor, ill. donor molekulákat jelöli, a b alsóindex pedig a kiegészített molekulákat.



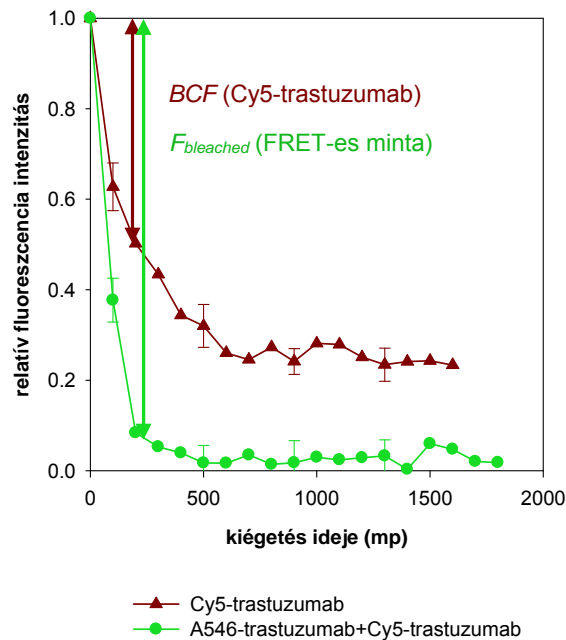
29. ÁBRA: A FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás hatása egy donor – akceptor dimerre. Ha a heterodimerben a donor az akceptornál hamarabb kiég, akkor az akceptort nem lehet FSAB által kiégetni (--->).
A és *D* – akceptor és donor; *b* alsóindex – kiégetett molekula.

Három különböző átmenet okozhatja az akceptor és a donor kiégetését. A 29. ábrán látható, hogy az akceptort ki lehet égetni közvetlenül (\rightarrow) vagy hetero-FRET által (FSAB, \rightarrow), de a donort csak közvetlen gerjesztéssel (\rightarrow) lehet fotoelhalványítani. Ha túl sok donor ég ki közvetlen gerjesztés hatására, akkor azokat az akceptor molekulákat, melyek a kiégetett donorral egy komplexet alkotnak, nem lehet FSAB által fotoelhalványítani. Azonban matematikai módszerekkel bebizonyítottuk¹, hogy elhanyagolható a fotostabil Alexa546 fluorofórok közvetlen kiégetése, és annak ellenére, hogy a fotolabilis Cy5 molekulák kiéghetnek az FSAB által és közvetlen gerjesztés hatására is, a kötött akceptor molekulák aránya megbízhatóan meghatározható módszerünkkel.

Ahhoz, hogy biztosak lehessünk abban, hogy az FSAB valóban jól használható molekula asszociátumok kvantitatív jellemzésére, meghatároztuk az ErbB1 és az ErbB2 receptorok homoklaszterizálódott arányát SKBR-3 és A431 sejtek felszínén. Korábban már fluoreszcencia anizotrópia méréseink során megállapítottuk, hogy az ErbB1 fehérjék legnagyobb része monomer formában van jelen stimulálatlan A431 sejteken, és csak kis hányada alkot kisméretű homoasszociátumot. Ezzel szemben az ErbB2 nagyméretű homoklasztereket alkot nyugalomban lévő SKBR-3 sejteken.

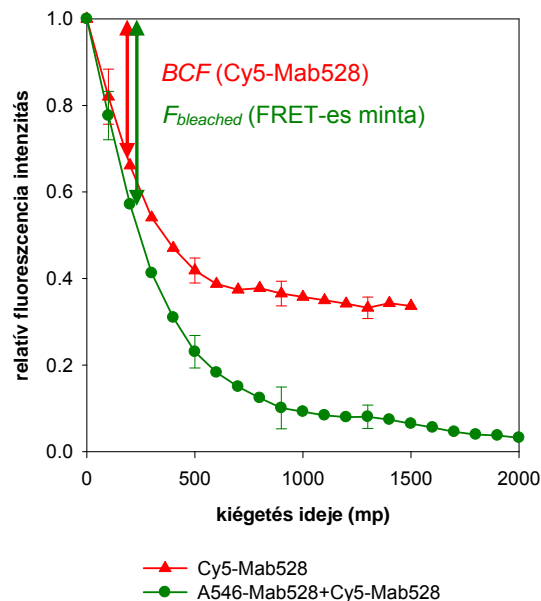
¹ A bizonyítást nem én végeztem, ezért nem szerepelnek a levezetés részletei a dolgozatomban.

SKBR-3 sejteken az ErbB2-t 1:1 arányban összekevert Cy5-trastuzumab és jelöletlen trastuzumab antitestekkel vagy Alexa546-trastuzumab és Cy5-trastuzumab antitestek 1:1 arányú keverékével jelöltük meg. A Cy5 molekulák közötti kölcsönhatás befolyásolja a fotoelhalványítás kinetikáját. Ezért a jelöletlen antitest alkalmazásával a Cy5 koncentrációját az akceptorral nem jelölt mintában olyan szintre csökkentettük, mint a donorral és akceptorral megjelölt mintában. A 27. ábrán látottakkal összhangban az 543 nm-en végrehajtott kiégetéskor a csak akceptorral konjugált és jelöletlen antitestek keverékével megjelölt sejteken a Cy5 fluorofór kiégése nem volt teljes. Ugyanakkor, ha FRET donor is jelen volt, már a második kiégetési lépésben teljesen kiégett a Cy5 festék és a hetero-FRET hatékonyság nullára csökkent. Felhasználva az akceptor második kiégetési lépés utáni fluoreszcencia intenzitását a 34. egyenlettel meghatároztuk, hogy az ErbB2 molekulák 83%-a alkot homoasszociátumot éhezett SKBR-3 sejtek felszínén (32. ábra). A 30. ábrán is látszik, hogy nagy a különbség a csak akceptorral jelölt mintáknál a direkt gerjesztés hatására kiégett akceptor molekulák aránya (BCF), és a donor – akceptor párral megjelölt FRET-es mintáknál kiégett akceptor molekulák aránya ($F_{bleached}$) között, ami azt jelenti, hogy az ErbB2 receptor nagymértékben homoklaszterizálódik.



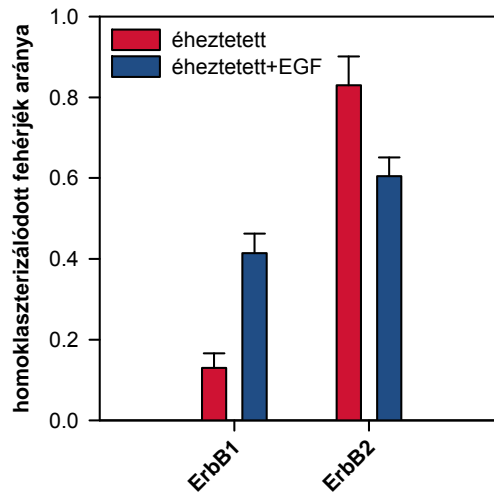
30. ÁBRA: Az ErbB2 receptorok homoklaszterizálódott frakciójának meghatározása FSAB módszerrel. Éhezett SKBR-3 sejteket 1:1 arányban megjelöltük jelöletlen és Cy5 festékekkel konjugált trastuzumab antitestek keverékével (\blacktriangle), vagy Alexa546-trastuzumab és Cy5-trastuzumab 1:1 arányú elegyével (\bullet), és a mintákat 543 nm-en kiégettük CBr_4 jelenlétében. A görbéken minden 4. mérési ponton feltüntettük a középérték közepes hibáját (SEM). A csak akceptorral megjelölt mintánál jelöltük a fotoelhalványítási korrekciós faktort (BCF), míg a donor – akceptor párral megjelölt FRET-es mintáknál a kiégett akceptor molekulák arányát ($F_{bleached}$).

Mivel SKBR-3 sejtek felszínén csak néhány százezer ErbB1 receptor fejeződik ki, az ErbB1 homoklasztereket A431 sejteken vizsgáltuk. Az ErbB1 receptorokat megjelöltük 1:1 arányban összekevert, Cy5 festékkel jelölt és jelöletlen Mab528 antitestekkel, vagy Cy5-Mab528 és Alexa546-Mab528 antitestek 1:1 arányú elegyével. A Cy5 ebben az esetben sem égett ki teljesen 543 nm-en történő megvilágítás hatására, azonban ha donor is volt jelen, akkor már a második kiégetési ciklus után teljesen fotoelhalványodott, a hetero-FRET hatékonyság pedig nullára csökkent. A 31. ábrán látszik, hogy alig van különbség a csak akceptorral megjelölt minták esetén a direkt gerjesztés hatására kiégett akceptor molekulák aránya (BCF), és a donor – akceptor párral megjelölt mintáknál kiégett akceptor molekulák aránya között ($F_{bleached}$), ami arra utal, hogy az ErbB1 receptorok többsége nem alkot homoklasztert. A 34. egyenlettel meghatároztuk, hogy az ErbB1 molekuláknak mindössze 13%-a van jelen homoasszociátumokban nem stimulált A431 sejtek felszínén (32. ábra), ami teljesen összhangban van az előző eredményeinkkel, ahol a fluoreszcencia anizotrópia csökkenéséből 88%-nak adódott a monomer formában lévő ErbB1 fehérjék aránya.



31. ÁBRA: Az ErbB1 receptorok homoklaszterizálódott frakciójának meghatározása FSAB módszerrel. Éheztetett A431 sejteket megjelöltünk 1:1 arányban jelöletlen és Cy5 festékkel konjugált Mab528 antitestek keverékével (\blacktriangle), vagy Alexa546-Mab528 és Cy5-Mab528 1:1 arányú elegyével (\bullet), és a mintákat 543 nm-en kiégettünk CBr_4 jelenlétében. A görbéken minden 4. mérési ponton feltüntettük a középérték közepes hibáját (SEM). A csak akceptorral megjelölt mintánál jelöltük a fotoelhalványítási korrekciós faktort (BCF), míg a donor – akceptor párral megjelölt FRET-es mintáknál a kiégett akceptor molekulák arányát ($F_{bleached}$).

Ha az éheztetett sejteket epidermális növekedési faktorról stimuláltuk, akkor az ErbB1 receptor hozzávetőleg háromszor nagyobb arányban alkotott homoklasztert, mint éheztetett A431 sejteken, míg az ErbB2 homoklaszterizálódott aránya nagyjából 61%-ra csökkent SKBR-3 sejtek felszínén (32. ábra). Ez összhangban van korábban ismertetett homo-FRET eredményeinkkel.

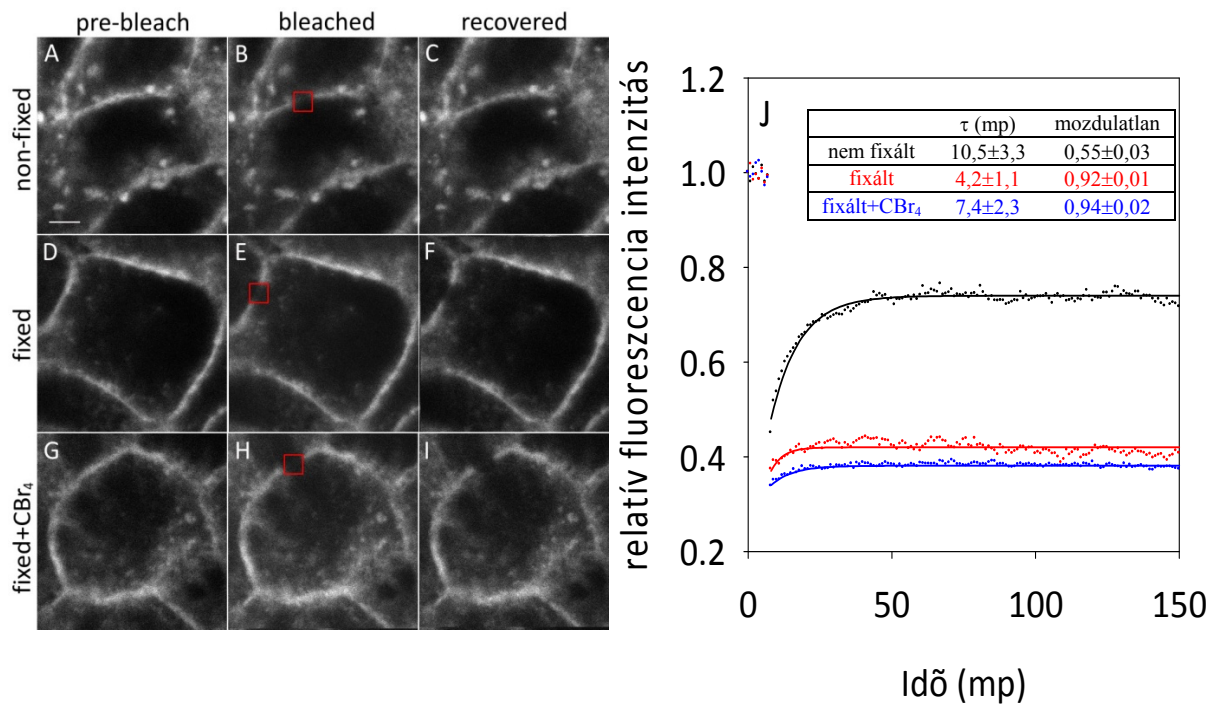


32. ÁBRA: Az ErbB1 és az ErbB2 receptorok homoklaszterizálódott aránya nyugalomban lévő és EGF stimulált sejtek felszínén. Nyugalomban lévő (■) és EGF stimulált (■) A431 sejtek felszínén az ErbB1 receptorokat jelöltük, míg nyugalomban lévő (■) és EGF stimulált (■) SKBR-3 sejteken az ErbB2 receptorokat vizsgáltuk. Mindkét sejtvonalon meghatároztuk a homoklaszterizálódott akceptor molekulák arányát az FSAB módszerrel. Átlagosan 100 sejtre kiszámoltuk a középérték közepes hibáit.

4.2.4. Az ErbB1 receptor mobilitásának vizsgálata FRAP mérésel

Mivel az FSAB kísérletekben a fotoelhalványítás időtartama elég hosszú, hozzávetőleg 200 másodperc, megvizsgáltuk, hogy a sejt felszíni fehérjék mobilitása mennyire befolyásolja mérési eredményeinket. Az ErbB1 receptorok laterális mobilitását megvizsgáltuk fixált és nem fixált A4erbB1 sejtvonalon FRAP mérésel. A FRAP mérés során kiégettük a sejtmembrán egy kis területén lévő zöld fluoreszcens proteint (eGFP) 488 nm-es erős gerjesztő fényt alkalmazva, és konfokális mikroszkópon folyamatosan képet felvéve nyomon követtük a fluoreszcencia visszatérését a kiégett területre.

A 33. ábrán látható, hogy nem fixált sejteken a fluoreszcencia visszatérési időállandó ~10 másodperc és közelítőleg az ErbB1-eGFP fehérjék 55%-a mozdulatlan. Azonban 1% formaldehiddel történő fixálás esetén az ErbB1-eGFP proteineknek több, mint 90%-a mozdulatlaná vált, és hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor a fixált sejteket CBr₄-dal



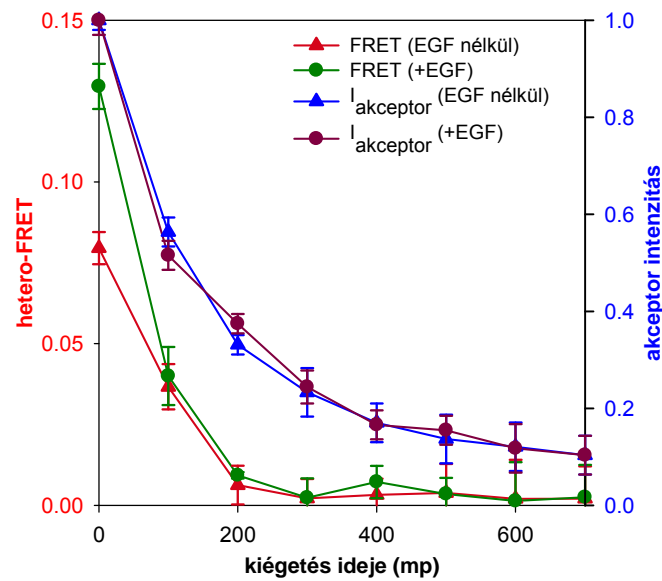
33. ÁBRA: Formaldehid fixálás hatása az ErbB1 mobilitására. **A-I.** A sejtmembránon a piros négyzet által határolt területet kiégettük 488 nm-es erős gerjesztő fényvel, majd figyelemmel kísértük a fluoreszcencia intenzitás visszatérését konfokális mikroszkópon. A kísérleteket nem fixált (**A-C**, — a **J.** ábrán), 1 % formaldehiddel fixált (**D-F**, — a **J.** ábrán), és 1 % formaldehiddel fixált, majd CBr_4 -dal kezelt (**G-I**, — a **J.** ábrán) A4erbB1 sejteken végeztük. A „pre-bleach” képeket a kiégetés előtt, a „bleached” felvételeket közvetlenül a fotoelhalványítás után, és a „recovered” fotókat 150 másodperccel a kiégetés után készítettük. Az **A.** képen a lépték 5 μm . **J.** Reprezentatív FRAP görbék nem fixált (—), fixált (—) és CBr_4 -dal kezelt fixált (—) A4erbB1 sejteken. A pontozott vonalak a mért fluoreszcencia intenzitás értékei, a folytonos vonalak a mérési eredményekre a 14. egyenlet szerint illesztett görbék. A táblázat öt független mérésből számolt és illesztett fluoreszcencia visszatérési időállandók átlagát (τ), a középérték közepes hibáit (\pm SEM), valamint a mozdulatlan ErbB1-eGFP fehérjék arányát tartalmazza.

kezeltük, akár csak az FSAB mérések során. Jóllehet, számos publikáció arról számol be, hogy transzmembrán fehérjék laterális mobilitását 1%-os formaldehiddel történő fixálás csak kismértékben gátolja (93, 94), a mi FRAP méréseink egyértelműen azt bizonyítják, hogy az ErbB1-eGFP fehérje laterális diffúziója szinte teljesen gátolt a fotoelhalványítás ideje alatt 1%-os formaldehidben fixált sejteken. Ebből az következik, hogy az FSAB módszerrel csak a fixálás pillanatában jelen lévő molekula asszociátumokat lehet detektálni.

4.2.5. Az ErbB1 és az ErbB2 receptorokból felépülő heteroklaszterek kvantitatív jellemzése nyugalomban lévő és stimulált sejtek felszínén

Kísérleteink során az SKBR-3 humán emlőtumor sejt vonalat használtuk, amely mindkét receptort viszonylag nagyobb számban kifejezi. A kísérlet előtt 24 órával a sejteket éhezettük 0,1% szérumban tartalmazó médiumban, majd az egyik receptort Alexa546 festékkel (donor) konjugált antitesttel jelöltük, míg a másik receptort Cy5 fluorofórral (akceptor) jelölt antitesttel. Minden esetben a donor gerjesztési hullámhosszán, 543 nm-en végeztük a kiégetést, melyet 100 másodpercenként megszakítottunk, és képeket vettünk fel a donor, az akceptor és a FRET csatornában, melyekből kiszámoltuk a közvetlenül gerjesztett akceptor molekulák fluoreszcenciáját és a hetero-FRET hatékonyság értékeit. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy már a második kiégetési ciklus után a FRET hatékonyság nullára csökkent, ami arra utal, hogy az összes olyan akceptor molekula kiégett, ami hetero-FRET távolságon belül volt a donortól (34-35. ábrák).

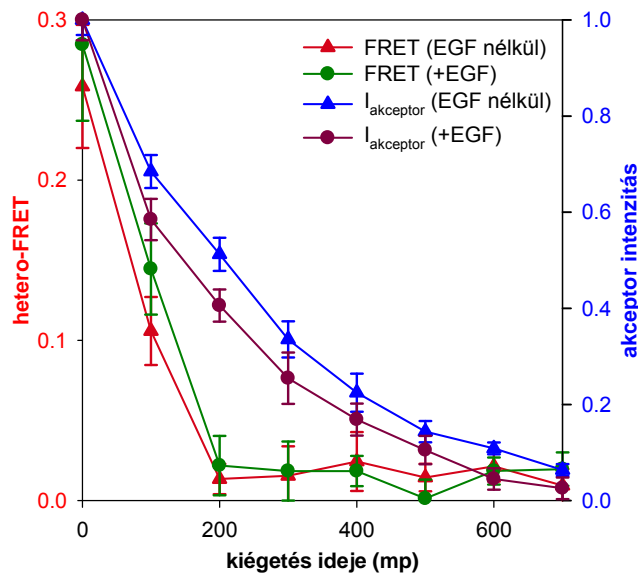
Először meghatároztuk, hogy az ErbB1 receptorok hány százaléka alkot heteroklasztert az ErbB2 molekulákkal nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejtek felszínén. Ehhez az ErbB2 fehérjét Alexa546-trastuzumabbal (donor), az ErbB1 receptort Cy5-Mab528 (akceptor) antitesttel jelöltük meg. A 34. egyenlettel meghatároztuk, hogy nyugalomban lévő sejteken az ErbB1 molekuláknak majdnem a fele, közel 40%-a alkot heteroklasztert az ErbB2 fehérjével, és ez az arány EGF stimulálás hatására 33%-ra lecsökkent (34. és 36. ábrák). Az EGF az ErbB1-ErbB2 heterodimerizáció mellett elősegíti az ErbB1 receptorok homoasszociációját is, ezért csökken kismértékben az ErbB1 heteroklaszterizálódott aránya EGF stimulálás hatására. A 34. ábrán látható, hogy alig van különbség a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitások között nyugalomban lévő és EGF stimulált sejteken (▲ és ●), ami arra utal, hogy az EGF nem változtatta meg szignifikánsan az ErbB1 heteroklaszterizálódott arányát.



34. ÁBRA: Az ErbB1 receptor heteroklaszterizálódott arányának meghatározása nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejteken. Az ErbB2 receptorokat megjelöltük AlexaF546-trastuzumabbal, az ErbB1 fehérjét Cy5-Mab528 antitesttel. A donor gerjesztési hullámhosszán (543 nm) alkalmazott kiégetést ~100 másodpercenként megszakítottuk, és képeket vettünk fel a donor, a FRET és az akceptor csatornában, melyekből kiszámítottuk a közvetlenül gerjesztett akceptor molekulák intenzitását és a hetero-FRET hatékonyságokat (▲ nyugalomban lévő sejteken a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitása, ▲ hetero-FRET hatékonyság nyugalomban lévő sejteken, ● a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitása EGF stimulált sejteken, ● hetero-FRET hatékonyság EGF stimulált sejteken). A fotoelhalványítást CBr_4 jelenlétében végeztük. Átlagosan 100 sejtre kiszámoltuk a középérték közepes hibáit.

Az ErbB2 receptorok heteroklaszterizálódott arányának meghatározásához az ErbB1 molekulákat megjelöltük nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejteken Alexa546-Mab528 (donor) antitesttel, az ErbB2 fehérjét Cy5-trastuzumabbal (akceptor). A 34. egyenlet segítségével meghatároztuk, hogy nyugalomban lévő sejtek felszínén az ErbB2 molekuláknak mindössze 10%-a alkot heteroklasztert az ErbB1 receptorokkal, és ez az arány EGF stimulálás hatására megduplázódik (35-36. ábrák). Erre utal az is, hogy nagyobb mértékben csökkent a közvetlenül gerjesztett akceptor molekulák fluoreszcenciája EGF stimulálás hatására (●, 35. ábra), mint nyugalomban lévő sejteken (▲, 35. ábra). Az a tény, hogy az ErbB2 receptorok legnagyobb része nem alkot heteroasszociátumot az ErbB1 fehérjével azzal lehet összefüggésben, hogy SKBR-3 sejteken hozzávetőleg ötször több ErbB2 fejeződik ki, mint ErbB1. Másrészt fluoreszcencia anizotrópia mérésekből tudjuk, hogy az ErbB2 nyugalomban lévő sejtek felszínén elsősorban nagyméretű homoklasztereket alkot, amelyek mérete lecsökken EGF stimulálás hatására. Homo-FRET méréseink során feltételeztük, hogy emögött az EGF indukált ErbB1-ErbB2 heterodimerek képződése áll. Mivel FSAB kísérleteink közvetlenül bizonyították, hogy EGF hatására növekszik az ErbB2

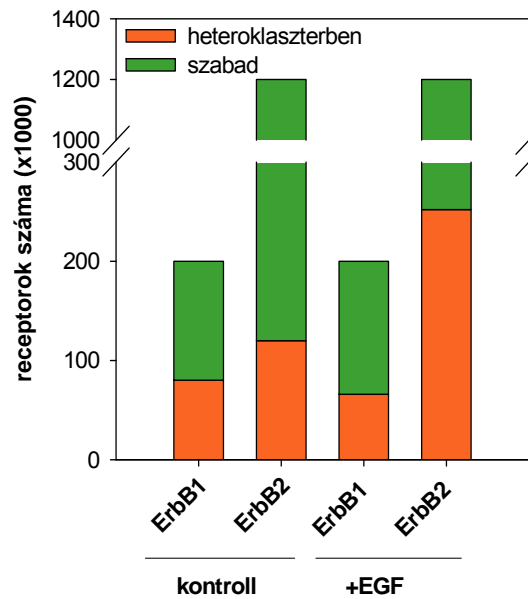
ErbB1-gyel heteroasszociáló hányada, a homo-FRET mérések értelmezésekor tett feltevésünk igaznak bizonyult.



35. ÁBRA: Az ErbB2 heteroklaszterizálódott arányának meghatározása nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejteken. Az ErbB1 receptorokat megjelöltük Alexa546-Mab528 antitesttel, az ErbB2 fehérjéket Cy5-trastuzumabbal. A kísérleti körülmények és a jelölések ugyanazok, mint a 34. ábrán.

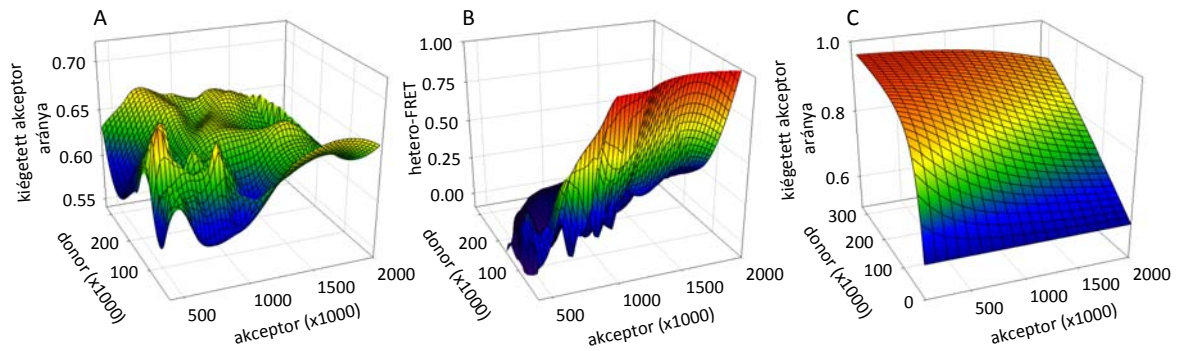
Nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejteken kiszámoltuk a szabad és a kötött állapotban lévő ErbB1 és ErbB2 receptorok abszolút számát úgy, hogy áramlási citométeren meghatároztuk a fehérjék expressziós szintjét (36. ábra). A szabad akceptor azt jelenti, hogy nem alkot heteroklasztert a donorral, ezáltal vagy homoasszociátumban van jelen, vagy más membrán molekulával van egy klaszterben. A kötött akceptor heteroklasztert alkot a donorral.

A 36. ábrán is jól látszik, hogy nyugalomban lévő SKBR-3 sejteken az ErbB1 receptoroknak közel a fele, ~80.000 fehérje alkot heteroklasztert az ErbB2 molekulákkal, míg az ErbB2 receptoroknak mindössze 10%-a, nagyjából 120.000 fehérje van heteroklaszterben az ErbB1 molekulákkal. EGF stimulálás hatására kis mértékben lecsökken a heteroklaszterizálódott ErbB1 receptorok száma hozzávetőleg 66.000-re, azonban az ErbB2 fehérjéknek a duplája, közelítőleg 250.000 alkot heteroasszociátumot az ErbB1 molekulákkal. Az epidermális növekedési faktor az ErbB1 ligandjaként aktiválja a receptorát, amely ezáltal heterodimerizálódik az ErbB2 fehérjével, megduplázva az ErbB2 molekulák számát, amelyek heteroasszociátumot alkotnak az ErbB1 receptorral. Ezen kívül fokozódik az ErbB1 homodimerizációja is, ezért csökken kismértékben a heteroklaszterizálódott ErbB1 fehérjék száma.



36. ÁBRA: Az ErbB1 és az ErbB2 heteroklaszterizálódott arányának és a receptorok számának meghatározása nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejtek felszínén. A receptorokat a 34. és a 35. ábránál leírt módon jelöltük, majd a szabad / homoklaszterizálódott és a heteroklaszterizálódott molekulák arányát átalakítottuk abszolút fehérje számokká, miután meghatároztuk az ErbB1 és az ErbB2 expressziós szintjét. Nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejteken a szabad (■) és a heteroklaszterben lévő (■) receptorok számát oszlop diagrammokon ábrázoltuk. Az FSAB módszer csak azt mutatja meg, hogy az akceptor heteroklaszterben van-e a donorral, ezáltal a szabad akceptor lehet valóban monomer vagy alkothat homoklasztert vagy heteroklasztert más molekulákkal.

Az ErbB2 receptorok heteroklaszterizálódott arányát sejtenként is meghatároztuk, és függetlennek találtuk az ErbB1 és az ErbB2 fehérjék sejt felszíni expressziós szintjétől (37/A. ábra). Ezzel szemben a hetero-FRET hatékonyság várakozásunknak megfelelően függött a donor és az akceptor denzitásától (37/B. ábra). Abban az esetben, ha a szabad és a kötött állapotban lévő ErbB2 molekulák a tömeghatás törvényének megfelelően egyensúlyban lennének, az ErbB2 heteroklaszterizálódott aránya függene az ErbB1 és az ErbB2 receptorok sejt felszíni számától (37/C. ábra). Azonban az a tény, hogy a kötött ErbB2 aránya független volt az ErbB1 és az ErbB2 expressziós szintjétől azt jelenti, hogy az FSAB módszerrel detektált klaszterizációra nem érvényes a tömeghatás törvénye. Úgy véljük, hogy a klaszterek összetétele már a sejtmembrán irányába történő vezikuláris transzport folyamán kialakul, és a vezikulák membránjában a fehérjék sűrűsége többé-kevésbé állandó és független a sejtmembránban található fehérjék számától.



37. ÁBRA: A hetero-FRET hatékonyság és a heteroklaszterizálódott akceptor molekulák arányának mért és számított függése a donor és az akceptor expressziós szintjétől. **A-B.** SKBR-3 sejteken megjelöltük az ErbB1 receptorokat Alexa546-Mab528 (donor) antitesttel, míg az ErbB2 fehérjéket Cy5-trastuzumabbal (akceptor). Az ErbB2 ErbB1 molekulákkal heteroklaszterizálódó arányát (kiégetett akceptor aránya) meghatároztuk az FSAB módszerrel (**A**), és a hetero-FRET hatékonyságot ábrázoltuk a donor és az akceptor expressziós szintjének a függvényében egyedi sejteken (**B**). Az eredményeket hozzávetőleg 100 sejt vizsgálatából határoztuk meg. **C.** A tömeghatás törvényét felhasználva kiszámítottuk a kiégetett akceptor molekulák várható arányát, feltételezve, hogy hat akceptor kötődik egy donorhoz, a disszociációs állandó (K_d) értéke 10^5 , és a fotoelhalványítási korrekciós faktor értéke (BCF) 0,6.

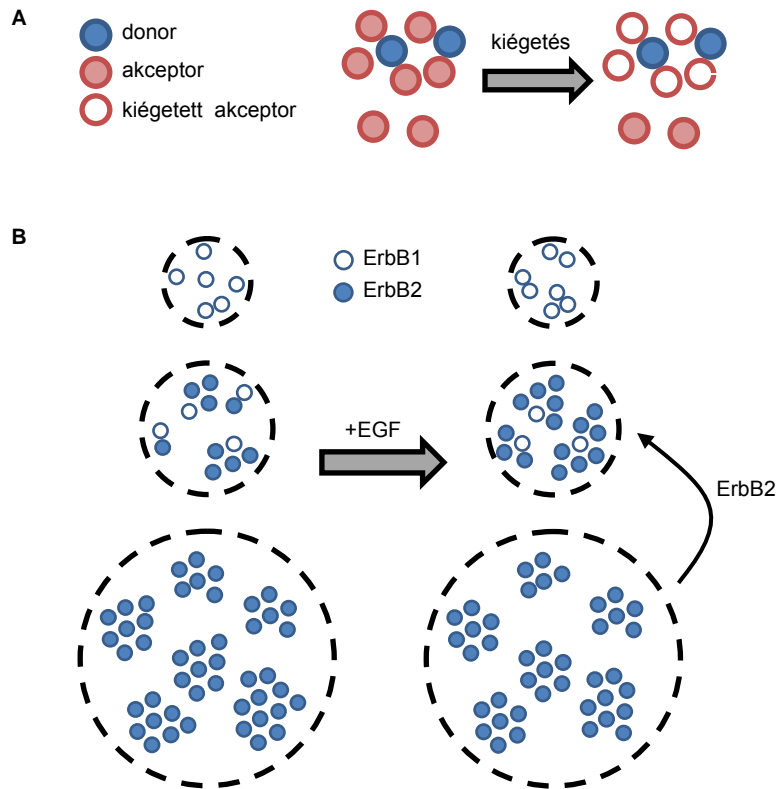
4.2.6. Az FSAB módszerrel meghatározott ErbB1 és ErbB2 receptorokból felépülő homo- és heteroklaszterek kvantitatív jellemzése – Összegzés

Az FSAB technikával detektált ErbB1 és ErbB2 fehérjékből felépülő homoklaszterek mérete hasonlóan változott nyugalomban lévő és EGF által stimulált A431 és SKBR-3 sejteken, mint a korábbi, fluoreszcencia anizotrópia mérésén alapuló kísérleteink során. Az ErbB2 receptorok legnagyobb része homoklaszter formában van jelen nyugalomban lévő SKBR-3 sejteken, de EGF stimulálás hatására ezek a nagyméretű homoklaszterek részben felbomlanak. A homoasszociátumokban inaktív ErbB2 fehérjék találhatóak, melyek képesek heteroklaszterizálódni más, ligand által aktivált ErbB receptorokkal, ezáltal csökkentve a homoklaszterek méretét. Ezzel szemben az ErbB1 molekuláknak csak kis hányada fordul elő homoasszociátumokban nyugalomban lévő A431 sejteken, de EGF stimulálás megtriplázta a homoklaszterizálódott ErbB1 fehérjék arányát, hiszen az EGF nemcsak az ErbB1-ErbB2 heterodimerizációt, hanem az ErbB1-ErbB1 homodimerizációt is fokozza.

		nyugalomban lévő ($\times 10^3$)	EGF stimulált ($\times 10^3$)
ErbB1	szabad vagy homoklaszterizálódott	120 ± 8 ($60 \pm 4\%$)	134 ± 10 ($67 \pm 5\%$)
	heteroklaszterben az ErbB2-vel	80 ± 8 ($40 \pm 4\%$)	66 ± 10 ($33 \pm 5\%$)
ErbB2	szabad vagy homoklaszterizálódott	1080 ± 24 ($90 \pm 2\%$)	948 ± 36 ($79 \pm 3\%$)
	heteroklaszterben az ErbB1-gyel	120 ± 24 ($10 \pm 2\%$)	252 ± 36 ($21 \pm 3\%$)

2. TÁBLÁZAT: A szabad és heteroklaszterizálódott ErbB1 és ErbB2 receptorok számának és arányának a meghatározása nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejtek felszínén FSAB módszerrel a 36. ábránál leírt módon. A heteroklaszterizálódott molekulák százalékainak a hibáit közelítőleg 100 sejtől számítottuk ki három független kísérlet során. Ezek a hibák azonosak a szabad formában lévő fehérjék arányainak a hibáival, ugyanis ezeket az értékeket úgy számoltuk ki, hogy 100%-ból kivontuk a heteroklaszterizálódott receptorok arányát.

A 2. táblázatban és a 38. ábrán foglaltam össze az FSAB módszerrel meghatározott ErbB1 és ErbB2 fehérjékből felépülő heteroklaszterek összetételét nyugalomban lévő és EGF stimulált SKBR-3 sejtek felszínén. Az ErbB1 receptoroknak majdnem a fele heteroklasztert alkot az ErbB2 fehérjékkel nyugalomban lévő sejteken, és ez az arány nem változik szignifikánsan EGF stimulálás hatására, hiszen az EGF elősegíti az ErbB1 homodimerizációja mellett az ErbB1-ErbB2 heterodimerizációt is. Ezzel szemben az ErbB2-nek mindössze 10%-a alkot heteroasszociátumot az ErbB1 molekulával, mely megduplázódik EGF stimulálás hatására. Ez teljesen összhangban van azzal a fluoreszcencia anizotrópia mérésén alapuló eredményünkkel, hogy EGF hatására csökken a homoklaszterek mérete, hiszen ebben az esetben az EGF által aktivált ErbB1 receptor ErbB2 fehérjéket szakít ki a homoasszociátumokból, és ezért nő a heteroklaszterek mérete.



38. ÁBRA: Az FSAB módszer által feltárt ErbB1 és ErbB2 membrán proteinek klaszterizációja. **A.** A heteroklaszterekben az ErbB1 és az ErbB2 receptorokat megjelöltük donort és akceptort tartalmazó antitestek keverékével. Azok az akceptor molekulák, amelyek FRET távolságon belül vannak a donortól, az FSAB következtében fotoelhalványodnak. **B.** Nyugalomban lévő SKBR-3 sejteken homo- és heteroklaszterek, valamint nem klaszterizálódott (szabad) receptorok keveréke található. A legtöbb ErbB1 fehérje nem alkot heteroklasztert az ErbB2-vel, és a fluoreszcencia anizotrópia mérésekből tudjuk, hogy ezek a molekulák monomer formában vannak jelen. Az ErbB2 receptorok túlnyomó többsége nagyméretű homoklasztert alkot, melyből EGF stimulálás hatására ErbB2 fehérjék szakadnak ki, és heteroklaszterizálódnak az ErbB1-gyel, ezáltal csökkentve az ErbB2 homoklaszterek méretét, és növelve az ErbB2 heteroklaszterizálódott arányát. Ugyanakkor az ErbB1 homoklaszterek mérete nő, mert az EGF elősegíti az ErbB1 homoasszociációját is az ErbB1-ErbB2 heterodimerizáció mellett. A homo- és a heterodimerizáció ellentétes irányú hatásai miatt az ErbB1 heteroklaszterizálódott aránya nem változik szignifikánsan EGF stimulálás hatására. A homo- és heteroklaszterizálódott ErbB fehérjék arányai várhatóan függenek a sejt típusától, és az általános tendencia, amely látható az ábrán, valószínűsíthetően érvényes azokra a sejtekre, melyeken az ErbB2 receptor túlzott sejtfelszíni kifejeződése figyelhető meg, miközben az ErbB1 fehérjék közepes expressziós szintet mutatnak.

5. Összefoglalás

Az ErbB1 és az ErbB2 homoasszociátumok kvantitatív jellemzéséhez kidolgoztunk egy áramlási citométeren alkalmazható módszert, mely homo-FRET mérésén alapszik. Az ErbB1 és az ErbB2 receptorokat megjelölve különböző arányban összekevert fluoreszcensen jelölt és jelöletlen antitesttel mértük a spektroszkópiailag azonos molekulák között kialakult homo-FRET kölcsönhatást. Ha sok fluorofór van egymáshoz közel (10 nm-en belül), akkor az energia szétoszlik az adott klaszterben. A homo-FRET egyetlen manifesztációja a fluoreszcencia anizotrópia csökkenése, aminek mértéke függ a fluorofórok koncentrációjától. A koncentrációtól függő anizotrópia csökkenés megmutatja, hogy a vizsgált molekula monomert, dimert, trimert vagy magasabb rendű oligomert alkot.

Nyugalomban lévő A431 sejteken az ErbB1 receptorok legnagyobb része monomer formában van jelen, és EGF vagy szérum stimulálás hatására nő az ErbB1 homoklaszterek mérete, hiszen az EGF az ErbB1 ligandja lévén fokozza homoasszociációját. Ezzel szemben stimulálatlan SKBR-3 sejtek felszínén az ErbB2 fehérjék legnagyobb része inaktivált állapotban van jelen nagyméretű homoasszociátumokban, melynek mérete lecsökken EGF, heregulin vagy szérum stimulálás hatására, hiszen a ligandok által aktivált ErbB1 és ErbB3 receptorok ErbB2 molekulákat szakítanak ki a homoklaszterekből azért, hogy az ErbB2-vel heterodimerizálódjanak.

A heteroasszociátumok kvantitatív jellemzéséhez a méréseket konfokális mikroszkópon végeztük az általunk kidolgozott FSAB technikát felhasználva. Ez azon alapul, hogy egy fotostabil donor molekulát gerjesztve csak azok a fotolabilis akceptor molekulák égnek ki, melyek elég közel vannak a donorhoz, hogy közöttük hetero-FRET jöhessen létre. Így meghatározható az akceptor molekulák azon aránya, melyek a donorral egy klaszterben vannak. A kísérletek során az Alexa546 festéket használtuk fotostabil donorként, míg a Cy5 fluorofór volt a fotolabilis akceptor.

Nem stimulált SKBR-3 sejtek felszínén az ErbB1 receptorok közel fele heteroklasztert alkot az ErbB2 fehérjével, és ez az arány nem változik szignifikánsan EGF stimulálás hatására, hiszen az EGF elősegíti az ErbB1 homodimerizációját mellett az ErbB1-ErbB2 heterodimerizációt is. Ezzel szemben az ErbB2-nek mindössze 10%-a van heteroasszociátumban az ErbB1 molekulával nyugalomban lévő SKBR-3 sejteken, mely megduplázódik EGF stimulálás hatására. Az ErbB2 stimulálatlan sejtek felszínén nagyméretű homoasszociátumokat alkot, amiből EGF hatására az ErbB1 ErbB2 molekulákat szakít ki.

Az általunk leírt nagyméretű klaszterek az ErbB fehérjék által mediált szignáltranszdukció helyszínei, melyekben ligandkötés hatására átrendeződések mennek végbe. A stimulálatlan sejteken jelenlévő nagyméretű ErbB2 asszociátumok biztosítják a ligandkötés hatására létrejövő aktív ErbB1 és ErbB3 molekulák számára a heterodimerizációhoz az ErbB2 proteineket könnyen elérhető módon. A növekedési faktorok által aktivált jelátvitel számára kedvező, hogy a nagyméretű klaszterekben a receptorok magas lokális koncentrációban vannak jelen. A klaszterek ilyen módon a fiziológiás és kóros jelátvitel helyszínei, melyek pontosabb megismerése közelebb vihet bennünket a daganatos sejtburjánzást kiváltó jelátviteli útvonalak gátlásához.

6. Summary

We presented a statistically reliable, flow cytometric homo-fluorescence resonance energy transfer (homo-FRET) method for quantitative characterization of the homoassociation of ErbB1 and ErbB2. ErbB1 and ErbB2 receptors were labeled by a mixture of unlabeled and fluorescent antibodies and homo-FRET was measured between two spectroscopically identical fluorophores. The excitation energy is distributed in the ensemble of molecules by homo-FRET. The only manifestation of homo-FRET is decreased fluorescence anisotropy which depends on the concentration of fluorophores. The decrease in the concentration dependent anisotropy shows whether the molecule is monomeric, dimeric, trimeric or forms higher order oligomers.

In quiescent A431 cells most ErbB1 receptors are monomeric and stimulation with EGF or serum leads to an increase in the cluster size of ErbB1 due to ligand-induced homodimerization of ErbB1. On the contrary, most of the ErbB2 proteins are inactivated and present in large homoclusters in unstimulated SKBR-3 cells whose size decreases upon EGF, heregulin or serum stimulation. We attribute this phenomenon to the recruitment of ErbB2 to heterodimers with ligand-activated ErbB1 and ErbB3 resulting in the removal of ErbB2 from homoclusters.

We developed the FRET-sensitized acceptor bleaching (FSAB) technique to quantitate the ratio of ErbB1 and ErbB2 in their heteroclusters by confocal microscopy. Briefly, a photostable donor excites a photolabile acceptor by FRET, and the acceptors within FRET distance to the donor will get photobleached and the fraction of acceptor molecules in the vicinity of donors can be determined. Alexa546 and Cy5 fluorophores were used as a photostable donor and a photolabile acceptor, respectively.

In unstimulated SKBR-3 cells almost half of ErbB1 receptors form heteroclusters with ErbB2 and after EGF treatment, the fraction of heteroclustered ErbB1 did not change significantly, because EGF induces the formation of both ErbB1 homodimers and ErbB1-ErbB2 heterodimers. On the contrary, only 10% of ErbB2 is in heteroclusters with ErbB1 in quiescent SKBR-3 cells and this fraction doubles upon EGF stimulation, because ligand-activated ErbB1 recruits ErbB2 proteins from the large ErbB2 homoclusters.

The large-scale clusters described by us are the place of signal transduction mediated by ErbB receptors where rearrangements take place upon ligand binding. The large ErbB2 homoassociations present in quiescent cells ensure that ErbB2 proteins are easily accessible

for ligand-activated ErbB1 and ErbB3 to form heteroclusters. The receptors in large clusters are present in high local concentration which is favorable for signal transduction activated by growth factors. In this way the clusters are the places of physiological and pathological signal transductions. A better understanding of these clusters may shed light on the mechanisms of malignant cell proliferation and its inhibition.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Jones, F. E., and D. F. Stern. 1999. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* 18:3481-3490.
2. Cohen, S. 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562.
3. Holbro, T., G. Civenni, and N. E. Hynes. 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284:99-110.
4. de Larco, J. E., and G. J. Todaro. 1978. Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 94:335-342.
5. Ushiro, H., and S. Cohen. 1980. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255:8363-8365.
6. Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M. D. Waterfield. 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307:521-527.
7. Schechter, A. L., D. F. Stern, L. Vaidyanathan, S. J. Decker, J. A. Drebin, M. I. Greene, and R. A. Weinberg. 1984. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312:513-516.
8. Guy, P. M., J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione, and K. L. Carraway, 3rd. 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8132-8136.
9. Garrett, T. P., N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, M. Kofler, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess, and C. W. Ward. 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11:495-505.
10. Harris, R. C., E. Chung, and R. J. Coffey. 2003. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284:2-13.
11. Wilson, K. J., J. L. Gilmore, J. Foley, M. A. Lemmon, and D. J. Riese, 2nd. 2009. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* 122:1-8.
12. Ogiso, H., R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J. H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*

- 110:775-787.
13. Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, R. W. Akita, W. J. Henzel, J. Lee, J. W. Park, D. Yansura, N. Abadi, H. Raab, G. D. Lewis, and et al. 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256:1205-1210.
 14. Meyer, D., and C. Birchmeier. 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390.
 15. Jones, J. T., R. W. Akita, and M. X. Sliwkowski. 1999. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447:227-231.
 16. Graus-Porta, D., R. R. Beerli, J. M. Daly, and N. E. Hynes. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655.
 17. Olayioye, M. A., D. Graus-Porta, R. R. Beerli, J. Rohrer, B. Gay, and N. E. Hynes. 1998. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18:5042-5051.
 18. Yarden, Y., and M. X. Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137.
 19. Yarden, Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S3-8.
 20. Clayton, A. H., M. L. Tavarnesi, and T. G. Johns. 2007. Unligated epidermal growth factor receptor forms higher order oligomers within microclusters on A431 cells that are sensitive to tyrosine kinase inhibitor binding. *Biochemistry* 46:4589-4597.
 21. Clayton, A. H., F. Walker, S. G. Orchard, C. Henderson, D. Fuchs, J. Rothacker, E. C. Nice, and A. W. Burgess. 2005. Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280:30392-30399.
 22. Keating, E., A. Nohe, and N. O. Petersen. 2008. Studies of distribution, location and dynamic properties of EGFR on the cell surface measured by image correlation spectroscopy. *Eur Biophys J* 37:469-481.
 23. Webb, S. E., S. K. Roberts, S. R. Needham, C. J. Tynan, D. J. Rolfe, M. D. Winn, D. T. Clarke, R. Barraclough, and M. L. Martin-Fernandez. 2008. Single-molecule imaging and fluorescence lifetime imaging microscopy show different structures for high- and low-affinity epidermal growth factor receptors in A431 cells. *Biophys J* 94:803-819.
 24. Yang, S., M. A. Raymond-Stintz, W. Ying, J. Zhang, D. S. Lidke, S. L. Steinberg, L. Williams, J. M. Oliver, and B. S. Wilson. 2007. Mapping ErbB receptors on breast cancer cell membranes during signal transduction. *J Cell Sci* 120:2763-2773.
 25. Nagy, P., A. Jenei, A. K. Kirsch, J. Szollosi, S. Damjanovich, and T. M. Jovin. 1999. Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J Cell Sci* 112 (Pt 11):1733-1741.

26. Cho, H. S., and D. J. Leahy. 2002. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297:1330-1333.
27. Lemmon, M. A. 2009. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* 315:638-648.
28. Ferguson, K. M. 2004. Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *Biochem Soc Trans* 32:742-745.
29. Penuel, E., R. W. Akita, and M. X. Sliwkowski. 2002. Identification of a region within the ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association. *J Biol Chem* 277:28468-28473.
30. Tzahar, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin, and Y. Yarden. 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16:5276-5287.
31. Holbro, T., R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C. F. Barbas, 3rd, and N. E. Hynes. 2003. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8933-8938.
32. Karunakaran, D., E. Tzahar, N. Liu, D. Wen, and Y. Yarden. 1995. Neu differentiation factor inhibits EGF binding. A model for trans-regulation within the ErbB family of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 270:9982-9990.
33. Sepp-Lorenzino, L., I. Eberhard, Z. Ma, C. Cho, H. Serve, F. Liu, N. Rosen, and R. Lupu. 1996. Signal transduction pathways induced by heregulin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncogene* 12:1679-1687.
34. Karunakaran, D., E. Tzahar, R. R. Beerli, X. Chen, D. Graus-Porta, B. J. Ratzkin, R. Seger, N. E. Hynes, and Y. Yarden. 1996. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 15:254-264.
35. Lenferink, A. E., R. Pinkas-Kramarski, M. L. van de Poll, M. J. van Vugt, L. N. Klapper, E. Tzahar, H. Waterman, M. Sela, E. J. van Zoelen, and Y. Yarden. 1998. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17:3385-3397.
36. Chazin, V. R., M. Kaleko, A. D. Miller, and D. J. Slamon. 1992. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7:1859-1866.
37. Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, and W. L. McGuire. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.
38. Carter, P., L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver, and H. M. Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.

39. Fendly, B. M., M. Winget, R. M. Hudziak, M. T. Lipari, M. A. Napier, and A. Ullrich. 1990. Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res* 50:1550-1558.
40. Baselga, J. 2001. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur J Cancer* 37 Suppl 1:18-24.
41. Lin, A., and H. S. Rugo. 2007. The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Curr Treat Options Oncol* 8:47-60.
42. Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792.
43. Nagy, P., A. Jenei, S. Damjanovich, T. M. Jovin, and J. Szolosi. 1999. Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 5:255-271.
44. Sliwkowski, M. X., J. A. Lofgren, G. D. Lewis, T. E. Hotaling, B. M. Fendly, and J. A. Fox. 1999. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26:60-70.
45. Nagata, Y., K. H. Lan, X. Zhou, M. Tan, F. J. Esteva, A. A. Sahin, K. S. Klos, P. Li, B. P. Monia, N. T. Nguyen, G. N. Hortobagyi, M. C. Hung, and D. Yu. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6:117-127.
46. Lane, H. A., A. B. Motoyama, I. Beuvink, and N. E. Hynes. 2001. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S21-22.
47. Molina, M. A., J. Codony-Servat, J. Albanell, F. Rojo, J. Arribas, and J. Baselga. 2001. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61:4744-4749.
48. Cho, H. S., K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney, Jr., and D. J. Leahy. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421:756-760.
49. Izumi, Y., L. Xu, E. di Tomaso, D. Fukumura, and R. K. Jain. 2002. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416:279-280.
50. Barok, M., J. Isola, Z. Palyi-Krekk, P. Nagy, I. Juhasz, G. Vereb, P. Kauraniemi, A. Kapanen, M. Tanner, and J. Szollosi. 2007. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 6:2065-2072.
51. Cooley, S., L. J. Burns, T. Repka, and J. S. Miller. 1999. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of

- antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 27:1533-1541.
52. Clynes, R. A., T. L. Towers, L. G. Presta, and J. V. Ravetch. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.
53. Agus, D. B., R. W. Akita, W. D. Fox, G. D. Lewis, B. Higgins, P. I. Pisacane, J. A. Lofgren, C. Tindell, D. P. Evans, K. Maiese, H. I. Scher, and M. X. Sliwkowski. 2002. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2:127-137.
54. Franklin, M. C., K. D. Carey, F. F. Vajdos, D. J. Leahy, A. M. de Vos, and M. X. Sliwkowski. 2004. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5:317-328.
55. Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 2:55-75.
56. Dale, R. E., J. Eisinger, and W. E. Blumberg. 1979. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* 26:161-193.
57. van der Meer, B. W. 2002. Kappa-squared: from nuisance to new sense. *J Biotechnol* 82:181-196.
58. Van der Meer, B. W., G. Coker, and S.-Y. Chen. 1994. Resonance energy transfer: theory and data. VCH Publishers, Inc. 5-33.
59. Stryer, L. 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 47:819-846.
60. Anikovskiy, M., L. Dale, S. Ferguson, and N. Petersen. 2008. Resonance energy transfer in cells: a new look at fixation effect and receptor aggregation on cell membrane. *Biophys J* 95:1349-1359.
61. Rao, M., and S. Mayor. 2005. Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts. *Biochim Biophys Acta* 1746:221-233.
62. Sharma, P., R. Varma, R. C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, and S. Mayor. 2004. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116:577-589.
63. Perrin, F. 1926. Polarization of the fluorescent light. The average lifetime of molecular excited states. *J Physiol* 7:390-401.
64. Runnels, L. W., and S. F. Scarlata. 1995. Theory and application of fluorescence homotransfer to melittin oligomerization. *Biophys J* 69:1569-1583.
65. Lidke, D. S., P. Nagy, B. G. Barisas, R. Heintzmann, J. N. Post, K. A. Lidke, A. H. Clayton, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. 2003. Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET). *Biochem Soc Trans* 31:1020-1027.

66. Varma, R., and S. Mayor. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394:798-801.
67. Yeow, E. K., and A. H. Clayton. 2007. Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET spectroscopy and microscopy: theory and application. *Biophys J* 92:3098-3104.
68. Mekler, V. M. 1994. A photochemical technique to enhance sensitivity of detection of fluorescence resonance energy transfer. *Photochemistry and Photobiology* 59:615-620.
69. Mekler, V. M., A. Z. Averbakh, A. B. Sudarikov, and O. V. Kharitonova. 1997. Fluorescence energy transfer-sensitized photobleaching of a fluorescent label as a tool to study donor-acceptor distance distributions and dynamics in protein assemblies: studies of a complex of biotinylated IgM with streptavidin and aggregates of concanavalin A. *J Photochem Photobiol B* 40:278-287.
70. Brock, R., I. H. Hamelers, and T. M. Jovin. 1999. Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry* 35:353-362.
71. Lidke, D. S., P. Nagy, R. Heintzmann, D. J. Arndt-Jovin, J. N. Post, H. E. Grecco, E. A. Jares-Erijman, and T. M. Jovin. 2004. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol* 22:198-203.
72. Nagy, P., G. Vereb, S. Damjanovich, L. Matyus, and J. Szollosi. 2006. Measuring FRET in flow cytometry and microscopy. *Curr Protoc Cytom Chapter 12:Unit12* 18.
73. Bene, L., J. Szollosi, G. Szentesi, L. Damjanovich, R. Gaspar, Jr., T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2005. Detection of receptor trimers on the cell surface by flow cytometric fluorescence energy homotransfer measurements. *Biochim Biophys Acta* 1744:176-198.
74. Lakowicz, J. R. 1983. Fluorescence polarization. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York. 111-153.
75. Bene, L., M. J. Fulwyler, and S. Damjanovich. 2000. Detection of receptor clustering by flow cytometric fluorescence anisotropy measurements. *Cytometry* 40:292-306.
76. Harikumar, K. G., and L. J. Miller. 2005. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the antagonist- and partial agonist-occupied states of the cholecystokinin receptor. *J Biol Chem* 280:18631-18635.
77. Horvath, G., M. Petras, G. Szentesi, A. Fabian, J. W. Park, G. Vereb, and J. Szollosi. 2005. Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements. *Cytometry A* 65:148-157.
78. Nagy, P., L. Bene, M. Balazs, W. C. Hyun, S. J. Lockett, N. Y. Chiang, F. Waldman, B. G. Feuerstein, S. Damjanovich, and J. Szollosi. 1998. EGF-induced redistribution of erbB2 on breast tumor cells: flow and image cytometric energy transfer measurements. *Cytometry* 32:120-131.

79. Landgraf, R., and D. Eisenberg. 2000. Heregulin reverses the oligomerization of HER3. *Biochemistry* 39:8503-8511.
80. Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, M. H. Kraus, O. Segatto, C. R. King, and S. A. Aaronson. 1987. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237:178-182.
81. Worthylake, R., L. K. Opresko, and H. S. Wiley. 1999. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 274:8865-8874.
82. Gadella, T. W., Jr., and T. M. Jovin. 1995. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol* 129:1543-1558.
83. Citri, A., K. B. Skaria, and Y. Yarden. 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284:54-65.
84. Jares-Erijman, E. A., and T. M. Jovin. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21:1387-1395.
85. Nagy, P., and J. Szollosi. 2009. Proximity or no proximity: that is the question - but the answer is more complex. *Cytometry A* 75:813-815.
86. Spriet, C., D. Trinel, F. Riquet, B. Vandebunder, Y. Usson, and L. Heliot. 2008. Enhanced FRET contrast in lifetime imaging. *Cytometry A* 73:745-753.
87. Gould, T. J., Bewersdorf, J., Hess, S. T. 2008. A quantitative comparison of the photophysical properties of selected quantum dots and organic fluorophores. *Z. Phys. Chem.* 222:833-849.
88. Eggeling, C., J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, and C. A. Seidel. 2006. Analysis of photobleaching in single-molecule multicolor excitation and Förster resonance energy transfer measurements. *J Phys Chem A* 110:2979-2995.
89. Füreder-Kitzmüller, E., Hesse, J., Ebner, A., Gruber, H. J., Schütz, G. J. 2005. Non-exponential bleaching of single bioconjugated Cy5 molecules. *Chem. Phys. Lett.* 404:13-18.
90. Gruber, H. J., C. D. Hahn, G. Kada, C. K. Riener, G. S. Harms, W. Ahrer, T. G. Dax, and H. G. Knaus. 2000. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconj Chem* 11:696-704.
91. Heilemann, M., E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, and P. Tinnefeld. 2005. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J Am Chem Soc* 127:3801-3806.
92. Vogelsang, J., R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, and P. Tinnefeld. 2008. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:5465-5469.

93. Frick, M., K. Schmidt, and B. J. Nichols. 2007. Modulation of lateral diffusion in the plasma membrane by protein density. *Curr Biol* 17:462-467.
94. Wey, C. L., R. A. Cone, and M. A. Edidin. 1981. Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor cells measured by fluorescence photobleaching and recovery. *Biophys J* 33:225-232.

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. **Szabó Á.**, Horváth G., Szöllősi J., Nagy P.: Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. *Biophysical Journal* (2008) 95:2086-2096
IF: 4.683
2. **Szabó Á.**, Szöllősi J., Nagy P.: Coclustering of ErbB1 and ErbB2 revealed by FRET-sensitized acceptor bleaching. *Biophysical Journal* (2010) 99:105-114
IF: 4.39 (2009)

Összesített impakt faktor: 9.073

7.3. Poszterek

1. **Ágnes Szabó**, Gábor Horváth, János Szöllősi, Péter Nagy: Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. Regional Biophysics Conference (RBC), Balatonfüred, Hungary, 2007. (első helyezett poszter)
2. **Ágnes Szabó**, Gábor Horváth, János Szöllősi, Péter Nagy: Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. XXIV Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (ISAC), Budapest, Hungary, 2008.

3. **Ágnes Szabó**, János Szöllősi, Péter Nagy: FRET-sensitized acceptor bleaching reveals the large-scale co-clustering of ErbB1 and ErbB2. European Biophysics Congress (EBSA), Genoa, Italy, 2009.
4. **Ágnes Szabó**, János Szöllősi, Péter Nagy: FRET-sensitized acceptor bleaching reveals the large-scale co-clustering of ErbB1 and ErbB2. Methods and Applications of Fluorescence (MAF-11), Budapest, Hungary, 2009.
5. **Ágnes Szabó**, János Szöllősi, Péter Nagy: FRET-sensitized acceptor bleaching reveals the large-scale co-clustering of ErbB1 and ErbB2. XXV Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (ISAC), Seattle, USA, 2010. („Outstanding poster award” díjat nyert)
6. **Ágnes Szabó**, János Szöllősi, Péter Nagy: FRET-sensitized acceptor bleaching reveals the large-scale co-clustering of ErbB1 and ErbB2. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2010.

Kulcsszavak

ErbB fehérjék, fehérje klaszter, homo-FRET, anizotrópia, áramlási citometria, FRET szenzitizált akceptor fotoelhalványítás (FSAB), konfokális mikroszkópia

Keywords

ErbB proteins, protein clustering, homo-FRET, anisotropy, flow cytometry, FRET-sensitized acceptor bleaching, confocal microscopy

8. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy 2006 februárjában lehetőséget kaptam tudásom gyarapításához és doktori értekezésem elkészítéséhez a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben belül az általa vezetett Sejtanalitika munkacsoportban. A személyében egy kedves, segítőkész és rendkívül nagy tudású embert ismerhettem meg.

Továbbá szeretném megköszönni témavezetőim Prof. Dr. Szöllősi János és Dr. Nagy Péter témavezetését, hasznos tanácsaikat, mellyel hozzájárultak az elméleti és a gyakorlati ismereteim bővítéséhez.

Köszönöm Horváth Gábor, Pályi-Krekk Zsuzsanna, Barok Márk és Fábíán Ákos munkám során nyújtott segítségét.

A nélkülözhetetlen technikai segítséget köszönöm Pálné Terdik Tünde, Vágóné Toldi Hajnalka és Farkasné Sánta Gyöngyi asszisztensnőknek.

Szeretném megköszönni legkedvesebb barátnőmnek és munkatársamnak, Váradi Tímeának a bátorítását, a pozitív életszemléletét, melyből én is erőt merítettem a nehezebb napokon.

Ezenkívül köszönöm a 2.045. számú PhD-szoba jelenlegi munkatársainak a családi légkört, amellyel hozzájárultak munkám hatékonyságához.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak a szeretetet és támogatást, külön köszönöm férjemnek szakmai segítsége mellett mérhetetlen türelmét és édesanyámnak a bátorító szavakat. Dolgozatomat szeretném édesapám emlékének ajánlani, aki sajnos nem érthette meg ezt a napot, de soha ki nem merülő támogatása nagyon sokat jelentett nekem.

9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatai

Iktatószám: DEENKÉTK /15/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Dr. Nagyné Szabó Ágnes Tímea

Neptun kód: F6SAVJ

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, Á.**, Szöllősi, J., Nagy, P.: Coclustering of ErbB1 and ErbB2 Revealed by FRET-Sensitized Acceptor Bleaching.
Biophys. J. 99 (1), 105-114, 2010.
IF:4.39 (2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.061>
2. **Szabó, Á.**, Horváth, G., Szöllősi, J., Nagy, P.: Quantitative Characterization of the Large-Scale Association of ErbB1 and ErbB2 by Flow Cytometric Homo-FRET Measurements?
Biophys. J. 95 (4), 2086-2096, 2008.
IF:4.683
DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.133371>

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.01.21.

