

**ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS FRET MÉRÉSEK OPTIMALIZÁLÁSA ÉS
ALKALMAZÁSA A MAJDNEM TELJES ERBB2 MOLEKULA
MODELLEZÉSÉBEN**

HORVÁTH GÁBOR



**Témavezetők:
Prof. Dr. Szöllősi János
Dr. Vereb György**

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2005**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer elmélete és áramlási citometriás megvalósítása	6
2.2 Az ErbB2 receptor tirozinkináz szerepe tumoros elváltozásokban.....	13
3. CÉLKITŰZÉSEK	19
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
4.1 Sejtek tenyésztése.....	20
4.2 Antitestek	20
4.2.1 A FCET kísérletekben felhasznált antitestek.....	20
4.2.2 Fab fragmentumok preparálása.....	20
4.2.3 Antitestek és Fab fragmentumok konjugálása fluoreszkáló festékekkel.....	21
4.3 Sejtfelszíni jelölések FCET mérésekhez.....	21
4.3.1 Sejtfelszíni antigének jelölése antitestekkel.....	21
4.3.2 A sejtmembrán jelölése fluoreszkáló lipid szondával.....	22
4.4 Áramlási citometriás energiatranszfer mérések	22
4.4.1 Új fluoreszkáló festékek tesztelése.....	22
4.4.2 Az azonos és eltérő ErbB2 epitópok közötti távolságok meghatározása	23
4.4.3 Az ErbB2 epitópok membrántól való távolságának meghatározása.....	24
4.5 Az ErbB2 domének szerkezetének megállapítása.....	26
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	28
5.1 Az energiatranszfer hatékonyságát befolyásoló tényezők FCET mérésekben.....	28
5.2 A FCET mérésekhez optimális fluoreszkáló festékpár kiválasztása.....	32
5.3 Az azonos és eltérő ErbB2 epitópok között mért távolságok.....	42
5.4 Az ErbB2 epitópok membrántól való távolsága	46
5.5 A majdnem teljes hosszúságú ErbB2 dimer modellje.....	48
6. ÖSSZEFOGLALÁS	58
7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG	60
8. IRODALOMJEGYZÉK	61
9. KÖZLEMÉNYEK	69
10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI	70

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

EGF: epidermális növekedési faktor

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

FCET: áramlási citometriás energiatranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer)

FRET: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)

TM: transzmembrán domén

1. BEVEZETÉS

A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatának segítségével közelebb juthatunk a sejtekben meglévő nagyobb strukturális szerveződések funkciójának és a jelátviteli folyamatok szabályozásának megértéséhez. A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) alapú módszerek kiváló lehetőséget nyújtanak biomolekulák konformációjának és asszociációs mintázatának vizsgálatához a sejtek felszínén és a sejteken belül. A FRET segítségével molekuláris távolságokat lehet meghatározni élő, funkcionálisan sértetlen sejteken, ami a korábbi, klasszikus módszerekkel (például elektronmikroszkópiával) nem volt lehetséges. A FRET módszerrel sikerült meghatározni, többek között, az immunválaszban fontos receptorok (Damjanovich és mtsai, 1998; Dornan és mtsai, 2002; Vámosi és mtsai, 2004) és tumor sejteken lévő növekedési faktor receptorok (Brockhoff és mtsai, 2001; Nagy és mtsai, 1999; Nagy és mtsai, 2002) asszociációit, lipid mikrostruktúrák szerkezetét (Szöllősi és mtsai, 2002; Vereb és mtsai, 2003; Vereb és mtsai, 2004) és fehérjék konformációját (Bagossi és mtsai, 2005; Gáspár és mtsai, 2001).

A FRET módszer egyik leghatékonyabb alkalmazása az áramlási citometriás energiatranszfer (FCET) mérés, amely nagy számú élő sejten, megbízható statisztikával teszi lehetővé a molekulák közelségének nyomon követését. Az utóbbi években nagyobb teljesítményű, olcsó dióda és szilárd test lézerek váltak elérhetővé, és nagyszámú új fluoreszkáló festék molekula került kifejlesztésre, amelyek a teljes látható színek tartományt lefedik, mind gerjesztési, mind kibocsátási spektrumukkal. A sok lehetséges kombináció így felveti, hogy milyen festékek is tekinthetők optimálisnak egy adott lézergyjlesztéssel rendelkező áramlási citométernél. Munkánk során hét fluoreszkáló festéket vizsgáltunk meg három áramlási citométeren és meghatároztuk a FCET mérések jellemzésére alkalmas paramétereiket.

Az ErbB2 az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család tagja és a sejtek növekedéséért és differenciálódásáért felelős. A receptor kóros (túlzott) működése figyelhető meg számos tumoros elváltozásban, mint például emlő-, petefészek- és gyomortumorokban, ami többnyire a receptor gén amplifikációján és a fehérje megnövekedett sejtfelszíni kifejeződésén alapul. Eddig két ErbB2 támadáspontú, humanizált antitest alapú immunterápiát is kifejlesztettek már, de ezen antitestek pontos hatásmechanizmusa - mely feltehetően a kötőhely térbeli elhelyezkedésének és molekuláris kölcsönhatásainak függvénye - még nem ismert.

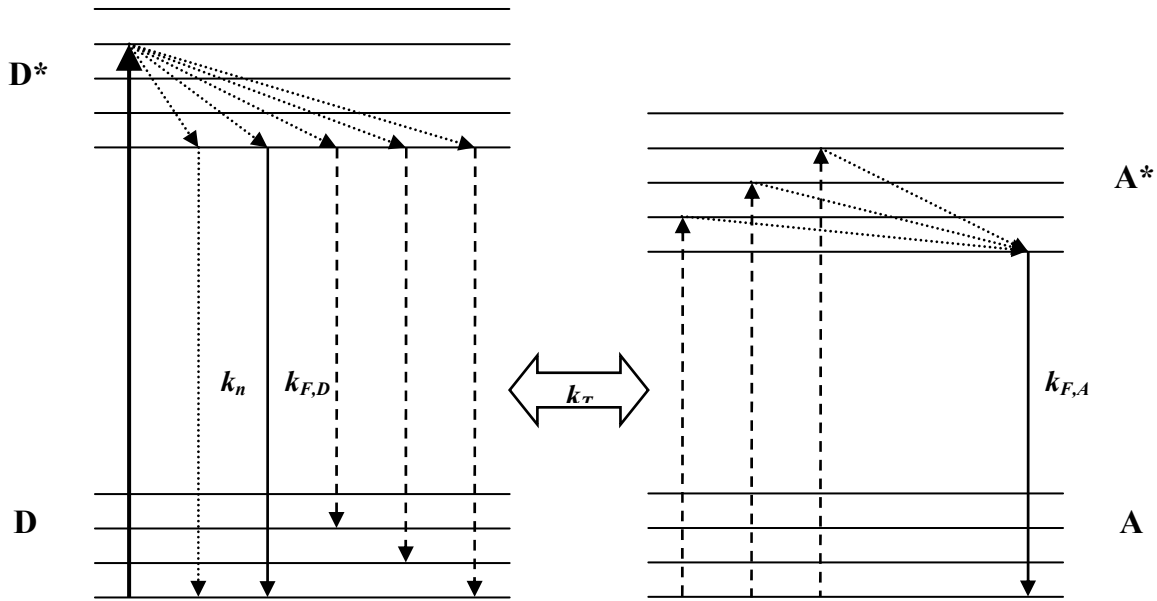
Munkánk során orvosi gyakorlatban használt és jelenleg tesztelés alatt álló immunterápiás ErbB2 ellenes antitestek hatása és az ErbB2 szerkezete közötti kapcsolatot vizsgáltuk. Az EGFR család számos tagjának ismert már az extracelluláris részének a szerkezete, azonban a teljes receptor molekulának ez idáig nem sikerült meghatározni a röntgen kristályszerkezetét. Kísérleteinkben négy antitest fragmentum segítségével, FCET módszerrel kívántuk feltérképezni az extracelluláris doménon lévő kötőhelyeket és megállapítani az ektodomén sejtmembránhoz való orientációját. Ezután molekula modellezési eljárások segítségével kívántuk megalkotni az ErbB2 molekula teljes szerkezetét (beleértve a transzmembrán régiót és az intracelluláris tirozinkináz domént).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer elmélete és áramlási citometriás megvalósítása

A sejtfelszíni fehérjék kölcsönhatásai fontos szerepet töltenek be az extracelluláris jelek sejtmag felé történő közvetítésében. A transzmembrán receptorok kisebb-nagyobb mértékű csoportosulása, illetve konformációjuk változása gyakran elengedhetetlen tényezők a ligandum-receptor kölcsönhatás végkimenetelét illetően. A leginkább elterjedt molekuláris biológiai és immunológiai vizsgáló módszerek („co-capping”, ko-precipitáció, kémiai keresztkötés) értékes információt szolgáltatnak a sejtfelszíni fehérjék elhelyezkedéséről, azonban számos jelentős hátránnyal rendelkeznek. Az ilyen módszerek során alkalmazott kivonási és izolálási eljárások eleve megakadályozzák, hogy a fehérjéket saját környezetükben vizsgáljuk. Emellett ezek a módszerek megbonthatják a fehérjék kölcsönhatásait, másrészt mesterséges aggregátumok kialakulását is okozhatják (Shiroo és mtsai, 1992). Ezzel szemben a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) kiváló megoldást jelent a fenti problémára, mivel élő sejteken alkalmazható anélkül, hogy a sejtek fiziológiás állapotába jelentősen beavatkoznánk.

A FRET jelenségét Theodore Förster írta le az 1940-es évek végén (Förster, 1948). Ez egy olyan folyamat, amely során egy gerjesztett állapotban lévő fluoreszkáló molekula (donor) energiáját, foton megjelenése nélkül, egy nagy hatótávú dipólus-dipólus kölcsönhatás eredményeként egy másik molekulának (akceptor) adja át. A következő ábrán egy Jablonski-diagram szemlélteti a donor és akceptor molekulák energiaszintjeit és a köztük lehetséges átmeneteket.



1. ábra: A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer jelenségét bemutató Jablonski-diagram. A vastag felfele mutató nyíl jelzi a donor gerjesztési átmenetet, a folytonos lefele mutató nyilak a fluoreszcencia átmenetet ($k_{F,D}$ és $k_{F,A}$), a pontozott lefele mutató nyilak az egyéb átmeneteket (k_n), míg a szaggatott nyilak a rezonancia feltételnek megfelelő energiatranszfer átmeneteket (k_T) jelzik.

A transzfer átmenet (k_T) makroszkopikus szinten kompetícióként fogható fel a fluoreszcencia (k_F) és egyéb átmenetek (k_n) mellett, így a transzfer átmenet hatásfoka felírható az átmenetek sebességi állandóinak hányadosaként:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_F + k_n}. \quad (1)$$

Vagyis a transzfer hatékonyság megadja az abszorbeált fotonok azon hányadát, melyek sugárzás nélkül adódtak át az akceptornak. A kölcsönhatás sebességi állandója Förster elmélete alapján a következő egyenlettel írható le:

$$k_T = (k_F + k_n) \left(\frac{R_0}{R} \right)^6. \quad (2)$$

A fenti két egyenlet kombinációjával lehet megadni a FRET hatékonyság távolság függését:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}, \quad (3)$$

ahol az R_0 az úgynevezett kritikus Förster távolság, amelyen a FRET átmenet valószínűsége 50 %. Az R_0 [nm] a következő kifejezéssel adható meg:

$$R_0 = 978 \cdot (Q_D \kappa^2 n^{-4} J_{DA})^{1/6}, \quad (4)$$

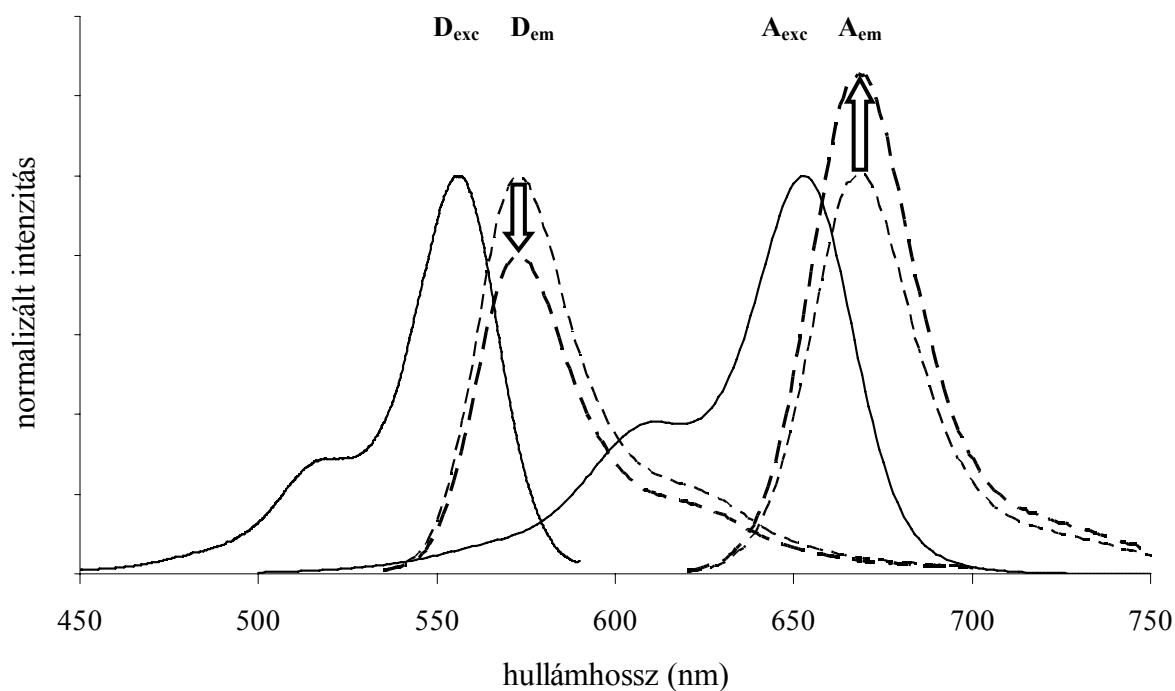
ahol Q_D a donor fluoreszcencia kvantumhatékonysága az akceptor festék távollétében, n a közeg törésmutatója (sejtfelszíni jelölésekben általában 1,4-nek feltételezik), κ^2 az orientációs faktor (értéke 0 és 4 között változhat, és izotróp átmeneti momentumok dinamikus átlagolásánál 2/3-al egyenlő (Dale és mtsai, 1979; van der Meer, 2002)) és J_{DA} az átfedési integrál (van der Meer és mtsai, 1994). The J_{DA} átfedési integrál [$M^{-1}cm^3$] a donor kibocsátási és az akceptor gerjesztési színe alapján határozható meg:

$$J_{DA} = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (5)$$

ahol $f_D(\lambda)$ a donor festék egységre normált fluoreszcencia spektruma:

$$f_D(\lambda) = \frac{F_{D\lambda}(\lambda)}{\int_0^{\infty} F_{D\lambda}(\lambda) d\lambda}. \quad (6)$$

A Förster-típusú rezonancia energiatranszfer módszert csak a 70-es évek közepétől kezdték el használni orvos-biológiai kutatásokban Stryer cikke nyomán, aki egyfajta „spektroszkópai vonalzóként” fogalmazta meg a módszer lényegét (Stryer, 1978). Ezáltal számos alkalmazást fejlesztettek ki spektrofluoriméterre, áramlási citométerre és fluoreszcens mikroszkópra. Az alkalmazások többsége azt a jelenséget használja ki, hogy a donor molekula fluoreszcencia intenzitása (és kvantumhatékonysága) akceptor molekula jelenlétében energiatranszfer hatására lecsökken (donor kioltás). Ugyanígy használható fluoreszkáló akceptor esetén az ezzel párhuzamos folyamat, az akceptor szenzitizált emissziója, amikor a donort gerjesztve megnövekedett fluoreszcencia intenzitást észlelünk az akceptornak megfelelő emissziós hullámhosszakon (lásd 2. ábra).



2. ábra: Az Alexa546 (D) és Alexa647 (A) fluoreszkáló festékek gerjesztési (exc) és kibocsátási (em) színeképei. Az ábrán feltüntettük az átfedési integrált (sátozott terület), a donor kioltást (lefele mutató nyíl) és az általa lecsökkent donor jelet (D_{em} , vastag szaggatott vonal), valamint az ezzel párhuzamos akceptor szenzitizált emissziót (felfele mutató nyíl) és az ezt kísérő megnőtt akceptor jelet (A_{em} , vastag szaggatott vonal).

A két jelenség során az energiáttranszferre jellemző hatékonyság a következő egyenletekkel számítható:

donor kioltás:
$$E = 1 - \frac{I_D^{DA}}{I_D^D} \tag{7}$$

akceptor szenzitizáció:
$$E = \frac{\epsilon_A c_A}{\epsilon_D c_D} \left(\frac{I_A^{DA}}{I_A^A} - 1 \right) \tag{8}$$

(az I intenzitások az átlag háttér intenzitásokkal korrigált értékek; az alsó indexek, D és A, a donornak és akceptornak megfelelő emissziós hullámhosszakon történő detektálást, míg a felső indexek, D, A és DA, a megfelelő fluoreszkáló festékek jelenlétét jelöli).

Ezen kívül léteznek olyan eljárások is, melyek a két folyamatot egyszerre veszik figyelembe, valamint a transzfer partner rezonáló képességét szüntetik meg (donor és akceptor fotoelhalványítás), vagy a transzfer hatására megváltozott fluoreszcencia

élettartamot vagy anizotrópiát vizsgálják. A két folyamat nyomon követése kiválóan oldható meg áramlási citométerrel, amely emellett még lehetővé teszi nagyszámú sejt vizsgálatát, így megbízható statisztikával jellemezhető paraméterek mérését. Azonban nagy hátrányuk, hogy az átlagos fluoreszcencia intenzitásokkal számolnak, így csak két külön mintából számíthatók, a két jel közötti kismértékű eltérés nehezen mutatható ki, valamint alacsony receptor szám esetén a jelek közel vannak a háttér intenzitáshoz, ami az alacsony jel-zaj viszony következtében csökkenti a módszer megbízhatóságát.

Az áramlási citométernek azonban meg van az az előnye, hogy egyes fluoreszcencia intenzitások sejtenként lemérhetők, és ez által a transzfer hatékonyság is sejtenként számolhatóvá válik. A sejtenkénti kiértékelésnél a transzfer hatékonyság mellett ismerni kell a donor és akceptor molekulák sejtenkénti koncentrációját is, amihez egyszerre kell detektálni a donor, a szenzitizált akceptor és a közvetlen akceptor jelet. Sajnálatos módon a transzfer átmenethez szükséges spektrális átfedés miatt az egyes fluoreszcens jelek nem tisztán tartalmazzák ezeket a paramétereket, így azokat egyszerűen jelölt mintákból, külön-külön kell meghatározni. A donor és akceptor festékpárral egyszerre jelzett sejtek esetén a detektált három fluoreszcencia intenzitás az alábbi összefüggésekkel oldható fel:

$$I_1(\lambda_{excD}, \lambda_{emD}) = I_D(1-E) + I_A S_4 + \frac{S_4}{S_2} \cdot I_D E \alpha \quad (9)$$

$$I_2(\lambda_{excD}, \lambda_{emA}) = I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \quad (10)$$

$$I_3(\lambda_{excA}, \lambda_{emA}) = I_D(1-E)S_3 + I_A + \frac{S_3}{S_1} \cdot I_D E \alpha \quad (11)$$

A fenti egyenletekben az I_1 - I_3 paraméterek a megfelelő hullámhosszokon gerjesztett (λ_{excD} és λ_{excA}), illetve detektált (λ_{emD} és λ_{emA}) fluoreszcencia intenzitások, az I_D a tiszta donor, míg I_A a tiszta akceptor jel, E a transzfer hatékonyság. Az S_1 - S_4 spektrális átvilágítási paraméterek a következőképpen számolhatók:

csak donor jelölt minta:
$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D}, \quad S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D}, \quad (12)$$

csak akceptor jelölt minta:
$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A}, \quad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A}. \quad (13)$$

A 9-11. egyenletrendszer megoldása a következő:

$$A = \frac{E}{1-E} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{S_1 S_2 [I_2 (1 - S_3 S_4) - I_1 (S_1 - S_2 S_3) - I_3 (S_2 - S_1 S_4)]}{(S_1 - S_2 S_3)(I_1 S_2 - I_2 S_4)}, \quad (14)$$

amiből a transzfer hatékonyság:

$$E = \frac{A}{1+A}. \quad (15)$$

Az egyenletekben szereplő α faktor egy gerjesztett akceptor molekulától származó fluoreszcens jel detektálási érzékenységét adja meg egy gerjesztett donor molekula detektálhatóságához viszonyítva, és a következő formulával empirikusan számolható:

$$\alpha = \frac{I_2^A}{I_1^D} \cdot \frac{L_D B_D \varepsilon_D}{L_A B_A \varepsilon_A}, \quad (16)$$

ahol B az antitestek által elfoglalt kötőhelyek számát, L az antitestekként felkötődő festék molekulák számát, valamint ε a donor gerjesztési hullámhosszon (λ_{excD}) mért moláris abszorpciós koefficiens (későbbiekben az $\varepsilon_D/\varepsilon_A$ arányra *efr* együtthatóként fogunk hivatkozni).

A FCET módszert egy klasszikus citométerre fejlesztették ki, ami 488 és 514 nm lézergyjlesztéssel rendelkezett, és az előszeretettel használt fluoreszcein és rodamin festékpár detektálására volt alkalmas (Szöllősi és mtsai, 1984; Trón és mtsai, 1984). A FRET mérésekben azonban ezek a lézer hullámhosszak nem optimálisak ezen két festékre, mivel jelentős a festékek spektrális átfedése az egyes detektálási csatornáknakban. Az újabb citométer rendszerekben, melyek általában 488 és 635 nm lézergyjlesztést használnak, a fluoreszcein és rodamin pár már nem alkalmazható, mivel a 635 nm-es gerjesztés a rodamin

színképtartományán kívül van és a 635 nm-en gerjeszthető festékeknek a fluoreszcenciával képzett spektrális átfedése olyan kicsi, hogy a transzfer átmenet gyakorlatilag nem történik meg. Ugyanakkor egy nemrég kifejlesztett festékpárt (Cy3 és Cy5) sikerrel tudunk alkalmazni újabb típusú, asztali citométerre (FACSCalibur), és a kiértékelési módszert is sikerült továbbfejlesztenünk oly módon, hogy egy eddig nem használt detektálási csatorna segítségével, amelyben számottevően a sejtek autofluoreszcenciája jelenik meg, az autofluoreszcencia korrekciót sejtenként tudtuk figyelembe venni (Sebestyén és mtsai, 2002).

A leírt áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer módszereket az elmúlt években sikerrel alkalmazták immunológiában és tumoros elváltozásokban jelentős receptorok asszociációjának vizsgálatában. Például a CD45 izoformák T sejt antigén receptor jelátvitelében betöltött szerepénél sikerült megfigyelni az egyes izoformák eltérő viselkedését. A csak az egyes izoformákat kifejező T sejteken kimutatták, hogy csak a CD45R0 izoforma képez homodimereket és ez a CD4 és CD8 preferált asszociációs partnere. Emellett a CD45R0 izoforma magasabb alap foszforilációs aktivitást indukált a CD4-társított *lck* tirozinkinázon, és számos más T sejt receptor jelátvitelében aktív enzimnek is magasabb volt az aktivitása (Dornan és mtsai, 2002). Azt is kimutatták, hogy számos receptor, így az MHC I és II, az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1), tetraspanin molekulák (CD81, CD82, CD53), valamint az IL-2 receptor alegységei nem véletlenszerűen helyezkednek el a sejtmembránban, és ez a struktúrák már ligandummal történő indukálás előtt is kimutathatók. A FCET mérésekben meghatározott transzfer hatékonyság értékek alapján sikerült felállítani ezen receptor csoportok kétdimenziós térképét is (Damjanovich és mtsai, 1998). Ezeket a kísérleteket egészíti az a munka, amelyben kimutatták, hogy az IL-2 és IL-15 receptorok a közös α -alegységüket egymásnak átadhatják megfelelő citokinek hatására, ily módon szabályozva, hogy az IL-2 vagy IL-15 szerinti jelátviteli útvonalak aktiválódnak (Vámosi és mtsai, 2004). Egyes tumoros elváltozásokban fontos szerepe van az epidermális növekedési

faktor receptor (EGFR) családnak, amely tagjairól már korán sikerült kimutatni egymás közötti asszociációikat; valamint kiderült, hogy a jelentős jelátviteli aktivitással rendelkező gócpontok nagyszámú (akár több 100) receptor asszociációjával társíthatók (Nagy és mtsai, 1999). Emellett sikerült kimutatni, hogy még azonos EGFR és ErbB2 kifejeződési szinttel rendelkező tumor sejtek esetén is eltérő lehet a növekedési faktorok által indukált receptor asszociációk mértéke, amely a jelátviteli útvonalak eltérő aktivitásában is megmutatkozott (Brockhoff és mtsai, 2001). A fenti vizsgálatokat összegezve egy modell adható meg a Singer-Nicholson-féle „szabad fehérje és lipid mozgás” paradigma kiegészítéseként, amely a receptorok mozgékonyasága mellett nagyobb hangsúlyt fektet a membrán mozaikszerű mikrodoménekbe való szerveződésére, és tekintettel van ezen nagyobb szerveződési struktúrák együttes mozgására, a bennük található fehérjék nem véletlenszerű eloszlására, valamint ezek domének közötti dinamikus kicserélődésére (Vereb és mtsai, 2003).

2.2 Az ErbB2 receptor tirozinkináz szerepe tumoros elváltozásokban

A transzmembrán receptor tirozinkináz I. típusú, epidermális növekedési faktor receptorcsaládnak négy tagja van: az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR vagy ErbB1), ErbB2 (HER2 vagy Neu), ErbB3 (HER3) és ErbB4 (HER4) (Alroy és Yarden, 1997; Yarden és Sliwkowski, 2001). Ezek a receptorok fontos szerepet játszanak a sejtek proliferációjának, differenciálódásának, apoptózisának és migrációjának szabályozásában.

Aktiválásukban tucatszámú is több, növekedési faktor jellegű ligandum vehet részt: EGF és TGF α az ErbB1, NRG1 (Neuregulin-1) az ErbB3, NRG1-4 az ErbB4, de HB-EGF, Epiregulin, Amfiregulin és β -Cellulin mindháromnak ligandumai, míg az ErbB2-nek ezidáig nem ismert természetes liganduma (Holbro és mtsai, 2003). Egy növekedési faktor fehérje receptorhoz való kötődését általában a receptor dimerizációja (vagy magasabb rendű komplex képződése) követi. Ennek alapesete az EGF és EGFR kölcsönhatása: az EGF 1:1 arányban

kötődik az epidermális növekedési faktor receptorhoz, de egy EGF fehérje két receptorral van kölcsönhatásban, vagyis egy teljesen aktív receptor dimer két EGF receptort és két EGF molekulát tartalmaz (Lemmon és mtsai, 1997). Az EGFR családon belül a helyzet sokkal bonyolultabb, mivel nem csak homo-, de heterodimereket is képezhetnek egymással, így az egyes növekedési faktorok keresztbe aktiválhatják a receptorokat. A képződött dimerek (vagy nagyobb oligomerek) összetételét az egyes receptorok relatív expressziós szintje, egymáshoz való affinitásuk, és a jelenlévő ligandumok koncentrációja határozza meg (Tzahar és mtsai, 1996).

A ligandum aktivált receptor dimerizációt az ily módon közel került tirozinkináz domének által történő *transz*-foszforiláció követi a C-terminális farok részen. A foszforilált receptorokhoz adaptor fehérjék és citoplazmatikus tirozinkinázok kapcsolódhatnak, melyek több jelátviteli útvonalat is aktiválhatnak (Jorissen és mtsai, 2003). Az EGFR esetén az elsődleges adaptor fehérje a Grb2/Sos komplex, amely a proto-onkogén Ras és azon keresztül a Raf-1 fehérjéket aktiválja. A Raf-1 sorozatos kináz aktiválás révén (a MAP kináz útvonal) az Erk transzkripciós faktorok nukleáris transzlokációját okozza, ami génátíráshoz vezethet. Emellett a Grb2 a citoskeleton átrendeződéssel is társítható. Az EGFR aktivációt követheti a c-Src tirozinkinázzal történő kölcsönös foszforiláció, ami proliferációs és transzformációs jelátviteli útvonalakat aktiválhat. Egy másik fontos útvonal a foszfolipid metabolizmusban szerepet játszó enzimek közvetlen asszociációt követő aktiválása: a foszfolipáz C- γ (PLC- γ) és a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3-K). Az aktivált PLC- γ felelős az 1,2-diacil-glicerol (DAG) és az inozitol-1,3,5-triszfoszfát (IP₃) másodlagos hírvivő molekulák képződéséért: az IP₃ az intracelluláris raktárakból szabadítja fel a Ca²⁺-ot, így befolyásolva számos Ca²⁺-dependens enzim működését, míg a DAG a PKC szerin/reonin kináz kofaktora. A PI3-kináz szintén másodlagos hírvivőn keresztül az Akt kináz útvonal, vagyis túlélési és proliferációs útvonalak aktiválásáért felelős, így feltehetőleg az EGFR antiapoptotikus

hatásának fő mediátora. A HerceptinTM-rezisztencia kialakulásának hátterében feltehetőleg éppen a PI3-K természetes inhibitorának, a PTEN-nek a csökkent aktivitása állhat (Pandolfi, 2004). Ezek a jelátviteli útvonalak eltérő erősséggel az EGFR család többi tagjára is jellemzők, valamint a heterodimerek révén több, párhuzamos útvonal is aktiválódhat, melyek szintén hathatnak egymásra, így az egyes receptorok külön-külön vett közvetlen hatásai nehezen fejthetők meg.

Az ErbB2 molekulát először egy protoonkogén mutánsaként azonosították független neuroglioblasztómákban, melyek karcinogén-kezelt patkányokban fejlődtek ki (Schechter és mtsai, 1984). Bár hasonló ErbB2 mutációk az emberi daganatokban nagyon ritkák, a vad-típusú ErbB2 igen gyakran amplifikált genomi szinten és ebből fakadóan, de akár amplifikáció nélkül is, túlzott kifejeződése figyelhető meg fehérje szinten. Eredeti funkcióját az embriogenezisben fejt ki (a differenciálódás szabályozásában), és normál felnőtt szövetekben csak ritkán fejeződik ki (szívizom). Ezzel szemben emlőtumorok 25 – 30 %-ában kimutatható a fehérje túlzott expressziója, ami agresszív fenotípussal (fokozott tumor proliferáció és magasabb metasztatikus potenciál), kemorezisztenciával és rossz prognózissal társítható (Menard és mtsai, 2001; Slamon és mtsai, 1987). Bár az ErbB2 nem rendelkezik ligandummal, mégis az egyik preferált heterodimerizációs partner. Ez leginkább ErbB2-ErbB3 heterodimer esetében jelentős, ugyanis az ErbB3 nem rendelkezik saját tirozinkináz aktivitással, s így csak heterodimerben képes aktiválódni, valamint ez a dimer szolgáltatja a legpotensebb jelet a sejtek növekedésére (Siegel és mtsai, 1999).

A fentiek alapján az ErbB2 kiváló immunterápiás célpontnak ígérkezett, amire többféle stratégiát dolgoztak ki az elmúlt években, és ezek közül egy már a klinikai gyakorlatban is elterjedt. A lehetséges terápiák: antitest terápia (a Trastuzumab az internalizált ErbB2 újbóli sejtfelszínre való kikerülését (Sliwkowski és mtsai, 1999), míg a Pertuzumab az ErbB2 homo- és heterodimerizációját gátolja (Agus és mtsai, 2000)), immuno-liposzómákkal

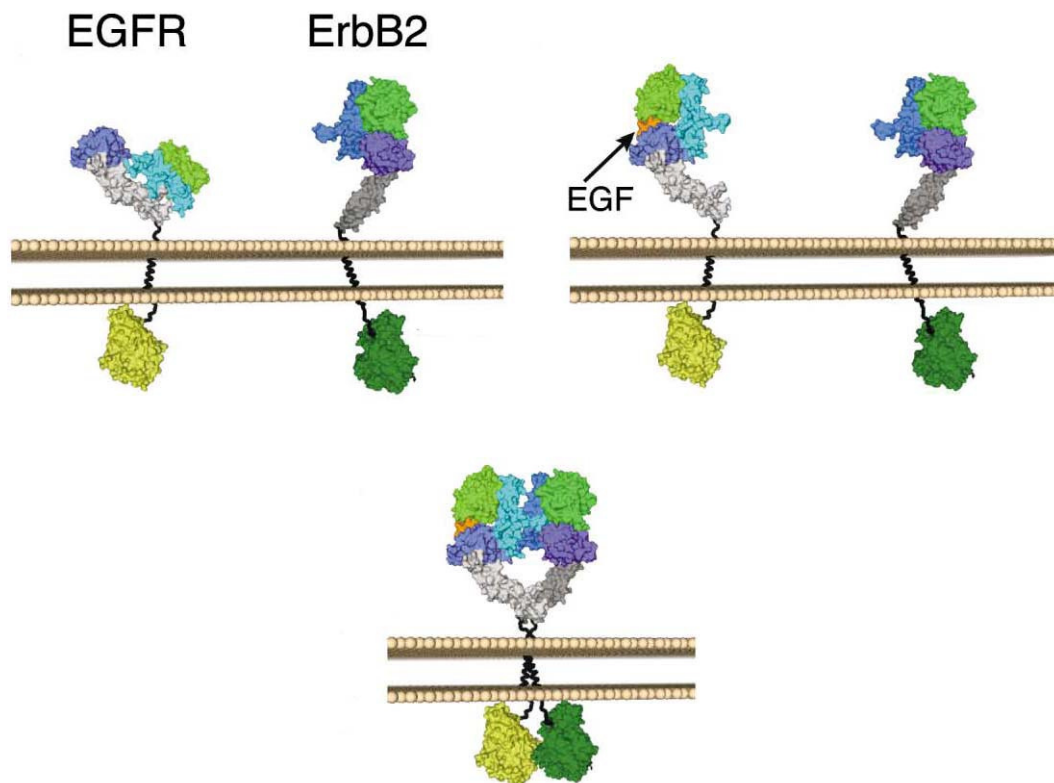
történő specifikus „drug-delivery” (F5) (Park és mtsai, 2004), génamplifikáció megszüntetése „antisense” oligonukleotidokkal (Vaughn és mtsai, 1995), specifikus tirozinkináz inhibitorok alkalmazása (például az EGFR ellen klinikumban is használt Gelitimid és Erlotimid (Esteva, 2004)), valamint hősokkfehérjék specifikus blokkolása félszintetikus drogokkal (17-AAG) (Munster és mtsai, 2001).

Az emlősökben található négy ErbB molekula 40 – 45 %-ban azonos, ami a gerincesek evolúciójának korai szakaszán bekövetkezett sorozatos génkettőzéseknek köszönhető (Stein és Staros, 2000). Az ErbB receptoroknak azonos a felépítésük, melyek részleteiről számos közlemény számolt be, így az EGFR (Garrett és mtsai, 2002; Ogiso és mtsai, 2002), ErbB2 (Cho és mtsai, 2003; Garrett és mtsai, 2003) és ErbB3 (Cho és Leahy, 2002) extracelluláris domén szerkezetéről, valamint az EGFR tirozinkináz doménjéről (Stamos és mtsai, 2002). Szerkezetük alapvetően a következő részekből állnak: négy doménből (L1, CR1, L2 és CR2) felépülő, ligandum kötő extracelluláris szakasz, egy szimpla transzmembrán hélix, a Janus kinázokhoz nagyban hasonló tirozinkináz domén, és egy tirozin foszforilációs helyeket tartalmazó C-terminális farok rész, amely a jelátviteli folyamatokat indító adaptor fehérjék és enzimek csatlakozási helye.

Az ErbB3 és EGFR monomerek szerkezetét a ligandummal kötött EGFR dimer szerkezetével összehasonlítva megállapították, hogy a ligandum az L1 és L2 domének közé köt be és drámai konformációs változást indukál a receptor extracelluláris doménjében (Ferguson és mtsai, 2003). Az ErbB2 extracelluláris domén szerkezete viszont azt mutatja, hogy a ligandum kötőhely csukott állapotban van és a fenti két domén közvetlenül érintkezik.

Az ErbB fehérjék dimerizációjának lehetséges szerkezeti mechanizmusa a ligandum indukált konformációs változással magyarázható (3. ábra) (Burgess és mtsai, 2003). Ligandum nélkül az EGFR és ErbB3 úgynevezett „zárt” konformációban van, azaz a cisztein gazdag CR1 domén kölcsön hat a CR2 domén egy részével. A ligandum kapcsolt, „nyitott”

állapotban a CR1 domén kiáll a molekulából, és kristályszerkezet alapján ez felelős az EGFR dimer kialakulásáért, amit eddig csak ligandummal kötött molekulánál tapasztaltak. Ezzel szemben az ErbB2 extracelluláris doménje a feltételezések szerint mindig „nyitott” állapotban található, még monomer formában is, ami megmagyarázhatja, hogy miért ez a molekula a család másik három tagjának a kedvelt dimerizációs partnere.



3. ábra: Az EGFR család dimerizációs mechanizmusa szerkezeti modellekkel bemutatva. A bal felső ábrán a „zárt” konformációjú EGFR és a „nyitott” konformációjú ErbB2 látható (a világoszöld és lila részek a ligandum kötő régiók, L1 és L2, a világos- és sötétkék részek a dimerizációs hurok, CR1, és a szürke rész a CR2 domén), valamint tirozinkináz doménjük (sárga és sötétzöld részek) szerkezete. A jobb felső ábrán az EGF ligandum bekötődése után bekövetkező konformációs változás (zárt → nyitott) látható az EGFR molekulán. Az alsó ábrarész pedig az EGFR-ErbB2 heterodimer kialakulását mutatja; a lehetséges dimerizációs felszínek jól láthatók. Az ábra Franklin és mtsai, *Cancer Cell*, 2004 cikke alapján készült.

A fenti leírásokból látszik, hogy mára már viszonylag sok kristályszerkezeti adat áll rendelkezésre az EGFR család tagjairól, bár ezek csak az extracelluláris domén egy részére és az intracelluláris kináz doménre vonatkoznak. Ezekből jól lehet következtetni a receptorok

működésére, de pontosabb megértésükhöz a receptorok teljes szerkezetének megléte elengedhetetlen. Emellett ismertek még az ErbB2 receptor immunterápiában használt antitestekkel képzett komplexeinek kristályszerkezeti adatai is (Herceptin™: (Cho és mtsai, 2003), Omnitarg™: (Franklin és mtsai, 2004)), így ezen két antitestnek pontosan tudjuk a kötődési helyét is. Az egyetlen problémát már csak az jelenti, hogy a transzmembrán régió (és a kettős lipid réteg) hiányában nem lehet megmondani az ErbB2 molekula ektodoménjének orientációját, így csak feltételezésekkel élhetünk a receptor dimerek kialakulását illetően.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során új fluoreszcens molekulák és áramlási citométerek alkalmazhatóságát szeretnénk vizsgálni, valamint az ErbB2 receptor modelljét felépíteni. Ehhez az alábbi kérdéseket kívántuk megválaszolni:

- Új fluoreszcenciás festékek és áramlási citométerek hogyan befolyásolják az áramlási citometriás energiatranszfer (FCET) méréseket és a kapott transzfer hatékonyságot?
- Milyen objektív fizikai paraméterek alapján lehet egy adott optikával rendelkező citométerhez a legmegfelelőbb FRET festékpárt kiválasztani?
- Milyen messze helyezkednek el az egyes ErbB2 epitópok egymástól és a sejtmembrántól különböző epitópokhoz kötődő antitest fragmentumokkal végzett FRET mérések alapján?
- Lehetséges-e az ErbB2 molekula teljes szerkezeti modelljének predikciója a jelenlegi irodalmi adatok és az általunk végzett FRET mérések alapján?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Sejtek tenyésztése

Az SK-BR-3 emlő- és N87 gyomortumor sejtvonalak az American Type Culture Collection (Rockville, MD) gyűjteményéből származnak, és a specifikációjuk szerint (10 % FCS-t, 2mM L-glutamint és 0,25 % gentamicint tartalmazó RPMI médiumban 5 %-os CO₂ atmoszférában) nőttek korai konfluens állapotig. Áramlási citometriás mérésekhez a sejteket 0,05 % tripszin - 0,02 % EDTA kezeléssel vettük fel.

4.2 Antitestek

4.2.1 A FCET kísérletekben felhasznált antitestek

A fluoreszkáló festékek tesztelésénél használt antitesteket, W6/32-t (az MHC I nehéz lánc ellen) és L368-t (a β 2-mikroglobulin ellen) Francis Brodskytól kaptuk.

Az ErbB2 epitóp térképének elkészítéséhez használt antitesteket, 4D5 (Trastuzumab, Herceptin™) és 2C4 (Pertuzumab, Omnitarg™) Fab'-kat, 7C2 Fab-t és F5 scFv-t, a Genentech, Inc.-től kaptuk. Ezek a genetikailag módosított antitest fragmentumok az epitóp felismerő hellyel átellenes végen egy szabad SH-oldalláncú ciszteint tartalmaztak (kivéve a 7C2), így maleimid-reaktív festékek segítségével biztosítani tudtuk az 1:1 festék-antitest jelölési arányt, megkönnyítve a pontos FRET távolságok számolását.

4.2.2 Fab fragmentumok preparálása

A 7C2 antitest Fab fragmentumait egy már korábban ismertett módszer szerint állítottuk elő (Szöllösi és *mtsai*, 1996). A teljes antitestet pH = 8,0 foszfát pufferelt sóoldatba (PBS: 100 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0) dializáltuk, majd L-cisztein jelenlétében (11 percig 37 °C-on) papainnal emésztettük. Az emésztést jód-acetammal

állítottuk le, az Fab és Fc fragmentumokat tartalmazó frakciókat Sephadex G-100 oszlopon választottuk el. Végül az Fab fragmentumokat protein A oszlop alkalmazásával szeparáltuk el az Fc résztől.

4.2.3 Antitestek és Fab fragmentumok konjugálása fluoreszkáló festékekkel

A fluoreszkáló festékek tesztelésére végzett kísérleteinkben a W6/32 antitestet donor festékekkel jelöltük (Cy3, Alexa546, Alexa555 és Alexa568), míg a L368 antitestet akceptor festékekkel (Cy5, Alexa633 és Alexa647). Az antitestek kb. 1 mg/ml koncentrációjú oldatait fluoreszcein (Alexa546, Alexa555, Alexa568, Alexa633 és Alexa647; Molecular Probes, Eugene, OR) és indokarbocianin jellegű (Cy3 és Cy5; Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) festékek szukcinimid észterével konjugáltuk a termékek leírásának megfelelően. Az antitesthez nem kötődött festéket gél-szűrővel távolítottuk el Sephadex G-25 oszlop segítségével. A festék-fehérje jelölési arányt (L) spektrofotométerrel határoztuk meg, értéke 1 és 5 között volt, amely tartományban a koncentrációs fluoreszcencia kioltásnak még nincs számottevő hatása a donor és akceptor festékek fluoreszcencia kvantumhatásfokára.

Az ErbB2 ellenes antitestek (4D5, 2C4 és F5) kb. 1 mg/ml koncentrációjú oldatait Alexa488, illetve Cy3 és Cy5 fluoreszkáló festékek maleimid-származékaival, a 7C2-t a festékek szukcinimid észterével jelöltük a használati utasításnak megfelelően. Az antitesthez nem kötődött festéket gél-szűrővel távolítottuk el Sephadex G-25 oszloppal. A festék-fehérje jelölési arányt (L) spektrofotométerrel határoztuk meg, értéke 1 körül volt.

4.3 Sejtfelszíni jelölések FCET mérésekhez

4.3.1 Sejtfelszíni antigének jelölése antitestekkel

A sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben (pH = 7,4), majd kb. 1 millió sejtet szuszpendáltunk fel 50 μ l PBS-ben. A sejteket ezután 30 percig, jégen, sötétben jelöltük a

megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestek vagy azok Fab fragmentumainak telítő koncentrációjával. A FRET mérésekben használt kettős jelölés esetén a fluoreszcensen jelölt antitest fragmentumokat egyszerre adtuk a sejtekhez. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk kétszer és 1 %-os hideg formaldehid-PBS-ben fixáltuk. Az élő illetve a formaldehiddel fixált sejteken kapott eredmények között a mérési hibán belül nem volt eltérés.

4.3.2 A sejtmembrán jelölése fluoreszkáló lipid szondával

A FRET alapú membrántól való távolság meghatározásához a sejtek felszínét 2-(4,4-difluoro-5-(4-fenyl-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén-3-pentanoil)-1-hexadekanoil-sn-glicero-3-foszfatidilkolinnal (BODIPY-PC (581/591); Molecular Probes, Eugene, OR) jelöltük, ami FRET akceptorként szolgált az ErbB2 receptorokat jelölő, Alexa488 konjugált Fab' fragmentumoknak. A BODIPY-PC (581/591)-el való jelöléshez a lipid szondát maximum 5 µg/ml végső koncentrációban adtuk 10⁶ sejtet tartalmazó üvegcsőbe (50 µl végtérfogat). A jelölést 30 percig jégen végeztük, majd a sejteket kétszer jéghideg PBS-el mostuk, és az Fab'-val jégen történő, 30 perces jelölés után a sejteket azonnal áramlási citométerrel analizáltuk. A jelölt sejteket jéghideg, formaldehid mentes PBS-ben tartottuk.

4.4 Áramlási citometriás energiatranszfer mérések

4.4.1 Új fluoreszkáló festékek tesztelése

A FCET méréseket három kereskedelmi áramlási citométeren végeztük: FACSCalibur, FACSVantage SE DiVa opcióval bővítve és FACSArray (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). A három citométeren mért fluoreszcenciás jelek detektálásánál használt lézer hullámhosszakot, detektorokat és detektálási színekészűrőket az I. táblázatban tüntettük fel.

		I_1 donor	I_2 szenz. akceptor	I_3 akceptor
FACSCalibur	lézer	488	488	635
	detektor	FL2	FL3	FL4
	szűrő	585/42	670LP	661/16
FACSDiVa	lézer	532	532	633
	detektor	FL4	FL5	FL6
	szűrő	585/42	650LP	650LP
FACSArray	lézer	532	532	635
	detektor	Yellow	Far Red	Red
	szűrő	585/42	685LP	661/16

I. táblázat: A vizsgálatainkban használt három áramlási citométer optikai adatai. A lézereknél a gerjesztési hullámhosszat, a detektoroknál a detektor gyári elnevezését, valamint a szűrőknél az optikai szűrők átérésztési hullámhossz-tartományát (pl.: 585/42: 563 – 607 nm, 670LP: 670 nm felett) tüntettük fel.

A vizsgálatokban Cy3, Alexa546, Alexa555 és Alexa568 (donor) fluoreszkáló festékekkel konjugált W6/32 és Cy5, Alexa633 és Alexa647 (akceptor) fluoreszkáló festékekkel konjugált L368 antitestekkel jelöltünk meg N87 gyomortumor sejteket MHC I molekulákra. A transzfer hatékonyságot, az antitestek közötti kompetíciót figyelembe véve, mind donor kioltásos (7. egyenlet), mind sejtenkénti (14. egyenlet) eljárásban kiértékeltek AFlex szoftverrel (Szentesi és mtsai, 2004).

4.4.2 Az azonos és eltérő ErbB2 epitópok közötti távolságok meghatározása

Az ErbB2 ellenes antitestek egymás és önmaguk között mért transzfer hatékonyság értékeit FACSCalibur citométeren határoztuk meg, az I. táblázatnak megfelelő beállításokkal. A mérésekhez Cy3- és Cy5-konjugált antitesteket használtunk. A transzfer hatékonyság értékeket a 14. egyenlet segítségével sejtenként határoztuk AFlex szoftverrel, majd 20000 sejt transzfer hatékonyság eloszlási görbéinek átlagát használtuk fel távolság értékek kiszámítására a 3. egyenletnek megfelelően. A VI. táblázatban feltüntetett átlag transzfer hatékonyság és távolság értékeket három független kísérletből számoltuk.

4.4.3 Az ErbB2 epitópok membrántól való távolságának meghatározása

A fehérje membrántól való távolságának FRET módszerrel történő meghatározásánál a fluoreszkáló festékkel jelzett molekulát nagyszámú akceptor festékkel jelzett lipid veszi körül, ezért a FRET hatékonyság nemcsak a távolság, de a donor-akceptor arány függvénye is. Számos analitikus (Dewey és Hammes, 1980; Wolber és Hudson, 1979; Zimet és mtsai, 1995) és numerikus modellt (Snyder és Freire, 1982) dolgoztak ki véletlenszerűen és szigetekben elhelyezkedő, egy síkban elterülő akceptorral való energiatranszfer kiszámítására. Ilyen esetekben csak a jelzett epitóp sejtmembrán síkjától való merőleges távolsága számít, ami jól közelíthető Yguerabide elméleti modelljével (Yguerabide, 1994). A modell szerint „steady state” állapotban, a donor intenzitás lineárisan változik az akceptor lipid szonda felületi sűrűségével, azaz:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_q \sigma, \quad (17)$$

ahol

$$K_q = \frac{\pi R_0^2}{2} \left(\frac{R_0}{R} \right)^4 \quad (18)$$

a „steady state” kioltási állandó, σ az akceptor felületi sűrűsége, I_0 az akceptor nélküli fluoreszcencia intenzitás ($\sigma = 0$), R_0 a kritikus Förster távolság, R pedig a donor festék merőleges távolsága az akceptorok síkjától.

A membrántól való távolság meghatározásához a kísérleteket 488 és 514 nm lézergyjlesztéssel felszerelt FACSSStar^{PLUS} (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) áramlási citométerrel végeztük. A mintákról három fluoreszcens paramétert detektáltunk: (i) specifikus donor fluoreszcencia intenzitás (Alexa488) az FL1 (540/40 BP) csatornában 488 nm gerjesztésnél, (ii) 488 nm-en gerjesztett és FL2 (590 LP) csatornában detektált fluoreszcencia intenzitás, és (iii) 514 nm-en gerjesztett és FL4 (590 LP) csatornában detektált fluoreszcencia

intenzitás. Az E transzfer hatékonyság értékeket sejtenként számoltuk ki AFlex szoftver segítségével. Ezután a donor intenzitás frakcionális változását, $E/(1-E) = (I_0/I) - 1$, ábrázoltuk a BODIPY-PC (581/591) akceptor lipid szonda felületi sűrűségének függvényében, és a kísérleti adatokra egyenest illesztettünk (6. ábra). Három független kísérlet illesztett egyenesének átlagából határoztuk meg a K_q kioltási állandót, amiből a membrán síkjától való merőleges távolságot a következő egyenlettel számoltuk:

$$R = R_0^{3/2} \left(\frac{\pi}{2K_q} \right)^{1/4}. \quad (19)$$

Az R_0 kritikus Förster távolság értéke 5,6-nak adódott az Alexa488 festék kibocsátási és a BODIPY-PC (581/591) gerjesztési szinképe alapján. A BODIPY-PC felületi sűrűségét a hozzáadott festék és a sejtek koncentrációjából számoltuk, teljes festékfelvételt feltételezve, amit vizuálisan mikroszkóppal, valamint a sejt szuszpenzió felülúszójának spektrofluorimetriás elemzésével igazoltunk.

Az energiatranszfer kiszámolására használt módszerünkben egy speciális paramétert kell meghatározni, az α faktort (lásd 14. és 16. egyenlet), amit két, külön donor és akceptor jelzett, azonos számú festéket tartalmazó mintából lehet empirikusan kiszámolni, és ezen paraméter segítségével lehet az E transzfer hatékonyság értéket abszolút módon meghatározni. A mi esetünkben sajnos az egy-egy donor-akceptor arányt nem tudtuk elérni, mivel egy fehérjéről és egy lipid szondáról volt szó, és nem találtunk a lipid szonda spektrális tulajdonságaihoz hasonló egyszerű akceptor festéket. Ezért egy olyan standardot használtunk (az MHC I molekula nehéz láncához kötődő W6/32 Fab antitestet) a rendszer kalibrálására, amelynek már ismert volt a membrántól való vertikális távolsága (6,2 nm, (Gáspár és mtsai, 2001)). A W6/32 Fab antitesttel kapott E transzfer hatékonyság értéket hasonló módon meghatároztuk, majd az illesztett egyenes meredekségéből és az ismert vertikális távolságból

meghatároztuk az α faktort, amit azután ugyanabban a kísérletben felhasználtunk a többi antitest transzfer hatékonyságának sejtenkénti kiértékelésénél.

Ezt a megközelítést később egy érzékenyebb citométeren (FACSDiVa) végzett független kísérletben igazoltuk, amiben az α faktort közvetlenül határoztuk meg és azt használtuk a transzfer hatékonyság kiszámítására. A sejtfelszíni antigének (ErbB2 receptor) számát 8 fluoreszcens csúcsot adó, több színben gerjeszthető gyönggyel határoztuk meg (P-RPC8-3.0, G.Kisker GbR, Steinfurt, Germany). A lipid festék számát a felületi sűrűség kiszámításánál használt módszer alapján becsültük. Ezzel az új, független kalibrációs eljárással ugyanakkora membrántól való távolságot kaptunk a 4D5 Fab' esetén, mint a W6/32 antitestet referenciaként használó eljárásban.

4.5 Az ErbB2 domének szerkezetének megállapítása

Az ErbB2 és EGFR extracelluláris doménjének kristályszerkezetét (PDB hozzáférési kódok: 1N8Z (Cho és mtsai, 2003) és 1IVO (Ogiso és mtsai, 2002)) a Protein Data Bank-ból töltöttük le (Berman és mtsai, 2000). A nem látható részeket Modeller (Sali és Blundell, 1993) és Sybyl (Tripos, Inc., St. Louis, MO) szoftverekkel építettük.

Az ErbB2 transzmembrán (TM) hélix NMR szerkezetét (PDB hozzáférési kód: 1IIJ (Goetz és mtsai, 2001)) használtuk fel a TM hélix dimerek szerkesztéséhez, valamint mintaként felhasználtuk a dlikoforin A (PDB hozzáférési kód: 1AFO (MacKenzie és mtsai, 1997)), a fotoszintetikus reakció központ (PDB hozzáférési kód: 1PRC (Deisenhofer és mtsai, 1995)) és a bakteriorodopszin (PDB hozzáférési kód: 1AP9 (Pebay-Peyroula és mtsai, 1997)) TM régióit.

A transzmembrán és a tirozinkináz domének között található, belső membránközeli régiónál az alábbi másodlagos szerkezeti predikciós módszereket használtuk: a GOR (Garnier és mtsai, 1978), a Maxfield-Scheraga (Maxfield és Scheraga, 1976) és a Qian-Sejnowski

(Qian és Sejnowski, 1988) módszerek Sybyl-ben alkalmazott változatait, valamint a GOR4 (Garnier és mtsai, 1996), a SOPMA (Geourjon és Deleage, 1995), a Jnet (Cuff és Barton, 1999) és a HNN (Guermeur és mtsai, 1999) eljárásokat, melyek elérhetők az ExPASy molekuláris biológiai szerveren (<http://www.expasy.org>). Az ExPASy szerveret BLAST szekvencia hasonlósági keresésekhez is használtuk.

Az ErbB2 tirozinkináz doménjének homológ modelljét a Modeller programmal építettük fel az ErbB1 tirozinkináz doménjének kristályszerkezete (Stamos és mtsai, 2002) és ClustalW-el készült szekvencia illesztés (Thompson és mtsai, 1994) alapján.

A modellezés során esetleg keletkezett, kedvezőtlen van der Waals kölcsönhatások kiiktatására rövid minimalizációkat alkalmaztunk a modellezési folyamat több lépésénél a következő paraméterekkel: Tripos töltés nélküli erőtér, 5 angströmös vágási határ a nem kötött atomok közötti kölcsönhatásokra, 100 Simplex és 100 Powell iteráció. A szerkezeti számításokat és megjelenítéseket Silicon Graphics O2 és Fuel grafikus munkaállomásokon végeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

5.1 Az energiatranszfer hatékonyságát befolyásoló tényezők FCET

mérésekben

A FRET mérésekben használható festékpárok használhatóságának meghatározására négy paramétert találtunk relevánsnak, ezek a normalizált fluoreszcencia intenzitás (I_{norm}), spektrális átfedési integrál (J_{DA}), normalizált energiatranszfer hatékonyság (E_{norm}) és az efr együttható.

Az áramlási citometriás FRET mérések egyik legfontosabb paramétere a fluoreszcencia intenzitás, mivel a transzfer hatékonyság egyik mértéke a donor fluoreszcens jelének csökkenése rezonáló akceptor jelenlétében. A donor kioltás észlelése végett ajánlatos, ha a donor jel legalább kétszerese legyen a háttér intenzitásnak. Méréseinkben a fluoreszcencia intenzitások legalább háromszor, de akár övenszer is nagyobbak voltak, mint a háttér intenzitás. Az azonos számú festékre vonatkozó fluoreszcencia intenzitást úgy kaptuk meg, hogy az átlag fluoreszcens jelekből először levontuk az átlag háttér intenzitás értékeit, majd elosztottuk a festék-fehérje jelölési aránnyal (L). Az így normalizált fluoreszcencia intenzitás értékeit (I_{norm}) a II. táblázatban tüntettük fel, és 5 – 200, illetve 60 – 1100 között változtak FACSCalibur, illetve FACSDiVa citométereken mérve.

Az energiatranszfer sebességi állandója függ az adott festékpár Förster távolságától, ami a festékekre jellemző fizikai állandókat tartalmaz (lásd 4. egyenlet), ezért ezzel a paraméterrel kiválóan lehetne jellemezni a FRET festékpárokat. Sajnálatos módon a kritikus távolság kiszámításánál használt donor kvantumhatékonyság nagyban függ a környezeti hatásoktól, ezért egy adott donorra jellemző Q_D érték nem igazán határozható meg mérési körülmények között. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy R_0 leginkább a 0,0 – 0,3 tartományban érzékeny a Q_D -re (van der Meer és mtsai, 1994), ami főként a cianin (Cy3 és

Cy5) festékekre jellemző, míg az Alexa festékek kvantumhatékonysága tapasztalataink szerint legalább 0,3 (további információért lásd (Shapiro, 2003), 336-338. oldal). A jelen tanulmányban az aktuális távolságok nem voltak fontosak, ezért a kritikus Förster távolság helyett a spektrális átfedési integrált használtuk. A J_{DA} átfedési integrált az 5. és 6. egyenlet alapján számoltuk a festékek gyártói által ismertett színek alapján és a III. táblázatban tüntettük fel. A J_{DA} értékek $5 - 15 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ között változtak, és a legnagyobbak az Alexa568 donort, míg a legkisebbek a Cy3 donort tartalmazó párok esetén voltak.

A mért FRET hatékonyságot (E) szintén meg kell vizsgálni, hogy megállapíthassuk az E értékek dinamikus tartományát. Az alacsony E tartományok rontják a mérések statisztikai megbízhatóságát, és nem teszik lehetővé, hogy az asszociációs mintázatokban bekövetkezett változásokat nyomon kövessük. A magas E tartományok (főleg 85 % felett) szintén hibával terhelték, mivel azt a kísérletesen meghatározott A paraméterből számoljuk ($E = A/[1 + A]$). Az E értékeket, a 9-11. egyenletekben található három intenzitás érték detektálása után, a 14. és 15. egyenletek alapján számítottuk sejtenként, majd az egy módusú FRET hatékonyság eloszlási hisztogramok átlagát vettük. Ahhoz, hogy az egyes festékpárokra kapott hatékonyság értékeket összehasonlíthassuk, normalizálni kell az értékeket a gerjesztési színekre, a kvantumhatékonyságra és a jelölési donor-akceptor arányra. A gerjesztési színeket már az α számításában vettük figyelembe, míg a kvantumhatékonyságokat nem ismerjük, de a donor-akceptor arányokra való korrekciót könnyű megvalósítani. A kísérleteinkben egy olyan biológiai rendszert használtunk, amelyekben az MHC I molekulák nehéz és könnyű lánc egyszerre fejeződnek ki a sejt felszínén, és a nehéz láncoknak csak csekély része (kevesebb, mint 10 %-a) áll önmagában. Ezért azt feltételeztük, hogy az összes donor jelzett antitest egy, és csakis egy akceptor jelzett antitesttel van kölcsönhatásban. Ebben az esetben csak a festék-fehérje jelölési arányok arányaival ($L_D/L_A = L_R$) kell számolni, mivel az antitestek számának aránya közelítőleg egy. Ugyanakkor mivel a FRET hatékonyság nem

lineárisan aránylik a jelölési arányokhoz (vagy az α faktorhoz), ezért az $A = E/(1 - E)$ értékeket kell használni az $L_D:L_A = 1:1$ értékre való normalizáláshoz. A normalizált FRET hatékonyság értékeket (E_{norm}) a 14-16. egyenletek alapján a következőképpen számolhatjuk:

$$A_{norm} = \frac{L_R}{L_{Rnorm}} \cdot \frac{E}{1 - E}, \quad (20)$$

ahol $L_{Rnorm} = 1$; majd a kapott A_{norm} értékeket normalizált transzfer hatékonyság értékekre konvertáljuk:

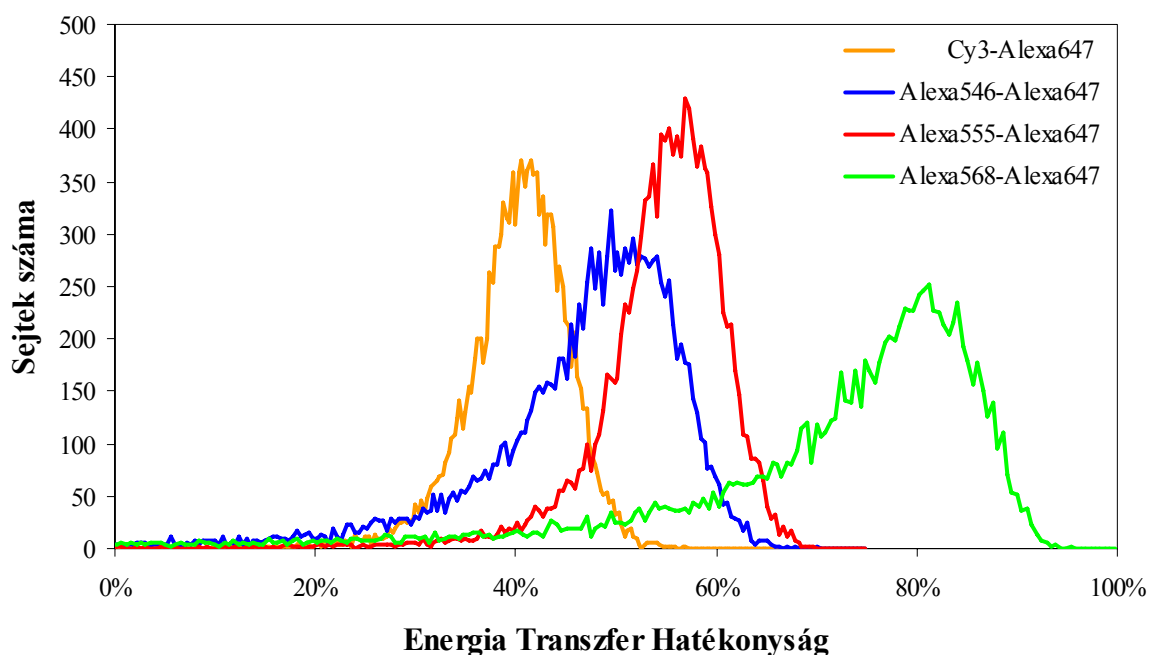
$$E_{norm} = \frac{A_{norm}}{1 + A_{norm}}. \quad (21)$$

Az így kapott értékeket, valamint összehasonlítás végett az eredeti számolt transzfer hatékonyságokat, a IV. táblázatban tüntettük fel.

A FRET hatékonyság értékek a Alexa568 donort tartalmazó párok esetében voltak a legnagyobbak, például az Alexa568 és Alexa633 párra 0,80 volt a normalizált transzfer hatékonyság FACSDiVa citométeren, míg a legalacsonyabb értéket (kb. 0,22) az Alexa546 donort tartalmazó párokra kaptuk FACSCaliburon. Néhány, Alexa647 akzeptort tartalmazó festékpárra feltüntettük a FRET hatékonyság eloszlási hisztogramokat a 4. ábrán. A legmagasabb átlag hatékonyság értéket az Alexa568-Alexa647 párra kaptuk, de szintén ennek a párnak az eloszlásgörbéje volt a legszélesebb.

Egy másik fontos paraméter az α faktor vagy az *efr* együttható, amivel a FRET hatékonyság skála abszolút helyzetét állítjuk be. Mivel az α faktor olyan paramétereket tartalmaz, amelyek kísérletenként változhatnak, ezért úgy gondoltuk, hogy az *efr* együtthatóval megbízhatóbban lehet leírni a FRET festékpárokat. Az *efr* együttható a festékek donor gerjesztési hullámhosszon vett moláris abszorpciós együtthatóinak arányként számolható (ϵ_D/ϵ_A). Ezt a fizikai paramétert nem lehet megbízhatóan meghatározni a festékek elnyelési színe alapján, viszont arra lehetőség van, hogy a FRET hatékonyságot meghatározzuk a 14. egyenlet alapján, majd az *efr* (vagy α) faktort úgy változtassuk, hogy a

hatékonyság érték megegyezzen a donor kioltással számolt (antitest kompetícióra korrigált) értékkel és/vagy a transzfer hatékonyságból visszaszámolt, „kioltás nélküli” donor fluoreszcencia intenzitás (I_D) megegyezzen a csak donor jelzett minta fluoreszcencia intenzitásával. Az ily módon meghatározott efr együtthatókat az V. táblázatban tüntettük fel. Az efr együtthatók 0,2 és 17,0 közötti értékeket vettek fel, és a Cy3 donort tartalmazó festékpárok esetén volt a legnagyobb, míg az Alexa568 donort tartalmazókra a legkisebb.



4. ábra: Az Alexa647 festék transzfer hatékonyság eloszlási hisztogramjai az összes donor festékekkel FACSDiVa áramlási citométeren. A hatékonyság értékeket sejtenként határoztuk meg a 14. és 15. egyenlet alapján.

Az itt közölt J_{DA} és efr együttható értékek más kísérletekben is felhasználhatók. Mivel az átfedési integrálokat a festékek ismert gerjesztési és kibocsátási színeképei alapján számoltuk, ezek az értékek felhasználhatók a kritikus Förster távolság kiszámítására a donor kvantumhatékonyságának ismeretében. Egyedüli problémát a κ^2 megadása jelenthet, amely azonban speciális esetekben megbecsülhető, ha elegendő bizonyíték áll rendelkezésre. Az efr együttható legfontosabb tulajdonsága, hogy az egyes festékpárookra kapott értékek azonos típusú citométerek között átvihetők, és azonos optikai rendszerrel ellátott citométereken

felhasználható FCET mérésekhez (ez főleg a gyári konfigurációval rendelkező citométerekre igaz, mint a FACSCalibur és a FACSArray). Ezek az együtthatók elméletileg kiszámíthatók a festékek gerjesztési színekéből, de az így kapott értékek nem megbízhatók, mert egyrészt a gyártók által megadott spektrumok szabad, vagy egy fehérjéhez konjugált festékre vonatkoznak és nem az általunk használt festék-fehérje konjugátumra, másrészt még ha a használt konjugátumra is határozzuk meg a moláris abszorpciós együtthatókat, akkor is az akceptor festékek gerjeszthetősége nagyon alacsony az általában használt donorgerjesztési hullámhosszakon. Így az itt meghatározott *efr* együtthatók eltérnek a színek alapján számítottaktól, és a közölt értékek pontosabbak biológiai rendszereken végzett mérésekben, mivel élő sejtek felszínéhez kötődő fluoreszkáló antitestekre vonatkoznak.

5.2 A FCET mérésekhez optimális fluoreszkáló festékpár kiválasztása

A négy donor és három akceptor festék nagyszámú kombinációban képezhetnek párt, ezért le kívántuk szűkíteni a tartományt, amelyben a legoptimálisabb festékpárt kerestük. A kevésbé kedvező festékek kiszűrésére az átfedési integrál és a FRET hatékonyság tűnt a megfelelő támpontnak.

Ahogy az a III. és IV. táblázatban látható, a Cy3 festéknek a legkisebb az átfedési integrálja és a FRET hatékonyság értékei, valamint ennek a legkisebb a fluoreszcencia kvantumhatásfoka, bár az E_{norm} és *efr* értékek elég magasak és az intenzitások is átlagosak. Egy másik kiugró adat az Alexa568 festék igen magas J_{DA} és E_{norm} értékei, amik azonban ellentétben állnak a rendkívül alacsony intenzitás és *efr* értékekkel, ami kevésbé megbízható FRET hatékonyság hisztogramokhoz vezet (lásd 4. ábra) és gyakorlatilag célszerűtlenné teszi ezen festék FCET mérésekben való használatát a vizsgált citométereken. Így ezt a két donor festéket (Cy3 és Alexa568) nem vettük figyelembe a további vizsgálatokban, ugyanakkor használhatóságukat meg kell vizsgálni más citométereken és alkalmazásokban. Bár a Cy3

festék nagy népszerűségnek örvend genomikai kutatásokban, fehérje vizsgálatokra nem igazán előnyös FRET donorként, csak ha a vizsgált fehérje expressziója kellően magas. Ugyanakkor a Cy3-Cy5 festékpár ideális mikroszkópos, akceptor fotoelhalványításos FRET kísérletekhez (Bastiaens és Jovin, 1996; Vereb és mtsai, 1996), mivel a Cy5 eléggé fotolabilis, valamint a hozzáférhető detektálási szűrőkkel és higanygőzlámpákkal vagy 543 nm-es lézergeszttel a Cy3 megfelelően mérhető. Az Alexa568 festéket a 488 és 532 nm lézervonalakon való rossz gerjeszthetősége miatt zártuk ki, ugyanakkor ha a citométer olyan gerjesztő forrással van ellátva, amely közelebb esik a festék gerjesztési színképének maximumához (azaz például egy He-Ne lézer 543 nm vagy egy Ar/Kr lézer 568 nm lézervonala), akkor valószínűleg az Alexa568 lenne a legjobb FRET donor az itt vizsgált festékek közül. Hasonló lézereket már alkalmaznak konfokális lézer mikroszkópokban, így az Alexa568-Alexa647 festékpár (lásd J_{DA} értékek a III. táblázatban) tűnik a legideálisabbnak az intenzitás alapú FRET mikroszkópiában (Nagy és mtsai, 1998).

Az akceptor festékekre jellemző paramétereknél nem találtunk hasonló kiugró értékeket. Bár az Alexa647 kicsit alacsonyabb E_{norm} értékeket mutat, ennek a legnagyobb az intenzitása, míg az Alexa633 alacsony J_{DA} és efr értékekkel rendelkezik, de az E_{norm} értékei kimagaslók. Így egyik akceptor festéket sem hagytuk el.

Ezért a további vizsgálatokban az Alexa546 és Alexa555 donor, illetve a Cy5, Alexa633 és Alexa647 akceptor festékeket (hat festékpárt) használtuk.

Először az intenzitásokat elemeztük (II. táblázat) és azt találtuk, hogy az Alexa546 körülbelül kétszer akkora fluoreszcencia intenzitást mutat, mint az Alexa555. Az akceptor festékeknél nem találtunk ilyen nagy különbségeket, bár az intenzitás arányok eltértek a két citométeren, feltehetőleg a detektorszűrőknek köszönhetően. A két citométeren mért fluoreszcencia intenzitások között látható nagy különbségek az eltérő digitalizálási tartományok miatt vannak: a FACSCalibur 10-bites, a FACSDiVa jel alatti területre 18-bites

A/D konverziót használ. Mindenesetre az Alexa647-nek volt a legmagasabb, míg az Alexa633-nak a legalacsonyabb intenzitása. Így a fluoreszcencia intenzitások alapján az Alexa546-Alexa647 pár tűnik a legjobb választásnak.

FACSCalibur						
	festék	$I_{mért}$	L	I_{norm}	ϵ_{max} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ_{exc} (M ⁻¹ cm ⁻¹)
donor (488 nm)	–	8				
	Cy3	124	3,56	33	150000	28000
	Alexa546	100	1,85	50	112000	8000
	Alexa555	147	3,46	40	158000	23000
	Alexa568	29	4,19	5	88000	5000
akceptor (635 nm)	–	1				
	Cy5	411	2,91	158	250000	187000
	Alexa633	80	1,06	75	159000	154000
	Alexa647	1054	5,2	202	250000	141000
FACSDiVa						
	festék	$I_{mért}$	L	I_{norm}	ϵ_{max} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ_{exc} (M ⁻¹ cm ⁻¹)
donor (532 nm)	–	27				
	Cy3	1737	3,56	481	150000	86000
	Alexa546	2094	1,85	1118	112000	37000
	Alexa555	2215	3,46	632	158000	78000
	Alexa568	280	4,19	61	88000	30000
akceptor (633 nm)	–	8				
	Cy5	1130	2,91	386	250000	174000
	Alexa633	392	1,06	362	159000	159000
	Alexa647	2954	5,2	567	250000	129000

II. táblázat: Normalizált fluoreszcencia intenzitások és a donor és akceptor festékek moláris abszorpciós együtthatói. Az $I_{mért}$ az adott citométeren mért fluoreszcencia intenzitás (tetszőleges egységben), L a festék-fehérje jelölési arány (W6/32 antitest a donorok és L368 antitest az akceptorok esetén), I_{norm} a normalizált fluoreszcencia intenzitás, ϵ_{max} a intenzitás maximumnál mért moláris abszorpciós együttható, ϵ_{exc} a gerjesztési hullámhosszon mért moláris abszorpciós együttható.

Ezután a spektrális átfedési integrálokat (J_{DA}) vizsgáltuk meg (III. táblázat), mivel a kritikus Förster távolságon keresztül ezek határozzák meg az energiatranszfer érzékenységi tartományát. Az összes esetben az Alexa633 akceptor adta a legkisebb és Alexa555 donor a legnagyobb átfedési integrálokat. A másik két akceptorral, Cy5 és Alexa647, hasonló értékek adódtak, bár a Cy5 festéké egy kicsit magasabb volt. Így az átfedési integrál alapján az Alexa555-Cy5 pár tűnik a legjobb festékpárnak, bár a többi festéket sem lehet figyelmen kívül hagyni, mivel az egyes festékpárok közötti különbségek kicsik voltak (a J_{DA} értékek a $7,2 - 8,7 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ tartományba estek).

Donor	Akceptor		
	Cy5	Alexa633	Alexa647
Cy3	5,5	5,5	5,2
Alexa546	8,1	7,2	7,8
Alexa555	8,7	7,4	8,6
Alexa568	14,6	10,5	14,9

III. táblázat: A donor és akceptor festékpárok J_{DA} átfedési integráljai. Az átfedési integrálokat (J_{DA} : $10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$) a festékek gerjesztési és kibocsátási színeképeiből az 5. és 6. egyenlet alapján számoltuk.

Ezek után a normalizált FRET hatékonyság értékeket vizsgáltuk meg (IV. táblázat). A két donorral közel hasonló értékeket kaptunk mindkét citométeren, ezért úgy véljük, hogy esetükben nem a FRET hatékonyság érték a meghatározó. Ugyanakkor nagy különbségek láthatók az akceptoroknál: az Alexa633 a legnagyobb, míg az Alexa647 a legkisebb normalizált FRET hatékonyság értékekkel rendelkeznek. Ezek alapján az Alexa555-Alexa633 pár a leghatékonyabb FRET pár. A táblázatban látható, hogy a FACSDiVán (532 és 633 nm lézergyjlesztés) mért E_{norm} értékek minden esetben magasabbak voltak, mint a FACSCaliburon (488 és 635 nm lézergyjlesztés) mért értékek, noha elméletileg a transzfer hatékonyság független a műszertől. Az eltérés azzal magyarázható, hogy a donor csatornában

jobb a jel/zaj viszony, mivel az 532 nm-es gerjesztés optimálisabb erre a festékekre, mint a 488 nm-es.

a)

Donor	Akceptor					
	FACSCalibur			FACSDiVa		
	Cy5	Alexa633	Alexa647	Cy5	Alexa633	Alexa647
Cy3	0,273	0,126	0,382	0,277	0,126	0,320
Alexa546	0,302	0,135	0,415	0,387	0,286	0,495
Alexa555	0,301	0,159	0,494	0,321	0,262	0,553
Alexa568	0,455	0,311	0,637	0,539	0,497	0,704

b)

Donor	Akceptor					
	FACSCalibur			FACSDiVa		
	Cy5	Alexa633	Alexa647	Cy5	Alexa633	Alexa647
Cy3	0,341	0,327	0,298	0,345	0,326	0,244
Alexa546	0,236	0,213	0,202	0,311	0,412	0,258
Alexa555	0,366	0,382	0,393	0,388	0,537	0,451
Alexa568	0,574	0,641	0,585	0,655	0,796	0,657

IV. táblázat: Transzfer hatékonyság értékek két áramlási citométeren. Az a) részben a közvetlen mért, míg a b) részben a festék-fehérje jelölési arányokra normalizált transzfer hatékonyság értékeket tüntettük fel W6/32 (donor) és L368 (akceptor) antitestek között FACSCalibur és FACSDiVa áramlási citométereken.

Utolsónak az *efr* együtthatót vizsgáltuk (V. táblázat), és itt találtuk a legnagyobb eltéréseket. Az Alexa555 festékpárokra magasabb *efr* együttható adódott, mint az Alexa546-ot tartalmazó párokra, ami csak a gerjesztési spektrumok alapján épp az ellenkező lett volna (ÁBRA ?!). Ugyanakkor az Alexa633-al kapott értékek nagyjából ugyanakkorák voltak mindkét citométeren, és a FACSDiVán az Alexa546-Alexa647 párra magasabb *efr* értéket kaptunk, mint az Alexa555-Alexa647 párra. Az akceptorokkal kapott *efr* együttható értékek a donoroktól függetlenül az Alexa633, Alexa647 és Cy5 sorrendben növekedtek mindkét citométeren. Tehát az *efr* értékek alapján az Alexa555-Cy5 pár látszik a legjobb választásnak FCET mérésekhez.

Donor	Akceptor					
	FACSCalibur			FACSDiVa		
	Cy5	Alexa633	Alexa647	Cy5	Alexa633	Alexa647
Cy3	17,0	10,4	14,8	8,5	3,7	7,1
Alexa546	9,0	7,1	8,1	4,2	1,3	3,3
Alexa555	12,7	6,8	9,2	6,0	1,3	3,1
Alexa568	1,1	0,7	0,9	0,7	0,2	0,4

V. táblázat: Az *efr* együttható két áramlási citométeren. Az *efr* együttható a fluoreszkáló festékpárok donor gerjesztési hullámhosszon (488 nm a FACSCaliburon és 532 nm a FACSDiVán) mért moláris abszorpciós együtthatóinak aránya. Az együtthatókat a sejtenkénti és a donor kioltásos módszerrel kapott transzfer hatékonyságok összevetésével határoztuk meg.

Három műszer-függő paramétert az Alexa546-Alexa647 párra FACSArray áramlási citométeren is meghatároztunk. A normalizált fluoreszcencia intenzitások (I_{norm}) külön-külön 5356 és 20852 értékeknek (83 és 11 háttér értékek mellett) adódtak az Alexa546 ($L_D = 4,05$) és Alexa647 ($L_A = 4,54$) festékekre. Ezek az értékek a FACSDiVán kapott értékeknél is magasabbak, feltehetőleg a küvettás megvilágítási rendszernek köszönhetően. A normalizált FRET hatékonyság értékre (E_{norm}) 0,352-t kaptunk, ami magasabb, mint amit a FACSCaliburon és FACSDiVán kaptunk. Az *efr* együtthatót a fentiekhez hasonló módon határoztuk meg, és értéke (3,3) ugyanannyi volt, mint a FACSDiVán a hasonló lézergörjesztés és detektálási rendszer miatt.

Az összes adatot összevetve a legkiemelkedőbb tulajdonság a donor festékek megnövekedett fluoreszcencia intenzitása (és jel/zaj viszonya) 532 nm hullámhosszú gerjesztésnél, ami nem meglepő a gerjesztési színeképek fényében. Másrészt a különböző áramlási citométereken kapott normalizált fluoreszcencia intenzitásokat igazából nem lehet összevetni egymással, még a lézerteljesítmény és detektálási profilok ismeretében sem, mert a gerjesztési és fénygyűjtési körülmények nagyban eltérhetnek egymástól. Így azt a

következtetést vonhatjuk le, hogy a FCET mérések érzékenységének növelése érdekében nem elegendő, hogy, mint az korábban leírtuk (Sebestyén és mtsai, 2002), olyan fluoreszkáló festékeket alkalmazunk, melyek a látható spektrum vörös tartományában emittálnak, hanem az is szükséges, hogy az áramlási citométerek ezen festékek gerjesztéséhez optimális lézervonalakkal legyenek felszerelve.

A jel/zaj viszonyok nagyban befolyásolták a FRET hatékonyság értékeit is. Mind a jel/zaj viszony, mind a FRET hatékonyság nagyobb volt az összes vizsgált festékpárra nézve a FACSDiVán, mint a FACSCaliburon mérve, noha a FRET hatékonyság elméletileg műszertől független. Ez az ellentmondás szükségessé teszi a különböző kutatóközpontokban eltérő műszerekkel kapott FRET eredmények összehasonlíthatóságának vizsgálatát. Általában elmondható, hogy az azonos, vagy azonos típusú műszeren mért FRET hatékonyságoknak (és még azok eloszlási hisztogramjának is) igen hasonlónak kell lenniük, és az esetleges eltérések a minták biológiai változékonyságának tudhatók be. Ez feltehetőleg igaz azokra a műszerekre is, melyek hasonló lézervonalakkal, optikai szűrőkkel és detektorokkal vannak felszerelve. Ugyanakkor a donor gerjesztésére használt lézer hullámhossz megváltoztatása nagyban befolyásolhatja a festék kvantumhatékonyságát (ez a fizikai paraméter nem független a hullámhossztól, csak különleges esetekben), ami a Förster távolságon keresztül hatással van a FRET hatékonyság értékére is. Egy ideálisabb gerjesztési hullámhossz a donor jelet is megnöveli, valamint lecsökkenti a FRET hatékonyság eloszlási hisztogramok műszerfüggő varianciáját, ami megváltoztathatja az átlagos FRET hatékonyságot. Vagyis különböző laboratóriumokból származó FRET adatok összehasonlításánál legalább a fluoreszcencia intenzitásokat és normalizált FRET hatékonyságokat figyelembe kell venni, és ha lehetséges, akkor a használt festékek kvantumhatékonyságát is.

A festékek tulajdonságait összegezve elmondhatjuk, hogy a két donor festék, Alexa546 és Alexa555 minden szempontból igen hasonlóak voltak, de a legtöbb esetben az

Alexa555 bizonyult jobbnak. A nagyszámú antigént expresszáló modell rendszerünkben nem volt jelentős a két festék közötti donor fluoreszcencia jel/zaj viszony különbsége, ugyanakkor egy alacsony antigén-szám mellett kapott alacsony donor fluoreszcencia kedvezőtlenül befolyásolhatja a FRET eloszlások szórását, és jelentősen behatárolhatja a FRET mérések érzékenységét. Ezért egy donor festék esetén a legfontosabb paraméter a mért fluoreszcencia intenzitás és a donor csatornában detektálható jel/zaj viszony, ami alapján viszont az Alexa546 a jobb FRET donor partner (a magasabb normalizált fluoreszcencia intenzitás egyedül az Alexa546 jobb kvantumhatékonyságának tulajdonítható). Egy akceptor festék esetén a donor fluoreszcencia csatornába való átvilágítás és az átfedési integrál a fontosabb. Ez alapján a Cy5 a legjobb, míg az Alexa633 a legrosszabb FRET akceptor, és az Alexa647 igen hasonló a Cy5-höz. Az egyedüli oka, hogy a Cy5-öt kevésbé jó festéknek tartjuk az az alacsony kvantumhatékonyságával és a gyenge fotostabilitásával van összefüggésben, amit figyelembe kell venni, ha ezeket az eredményeket mikroszkópos és fluoriméteres vizsgálatokban is fel szeretnénk használni.

A négy releváns paraméter (normalizált fluoreszcencia intenzitás (I_{norm}), átfedési integrál (J_{DA}), normalizált energiatranszfer hatékonyság (E_{norm}) és efr együttható) vizsgálata alapján azt találtuk, hogy az Alexa555-Cy5 és az Alexa546-Alexa647 festékpárok rendelkeznek a legkedvezőbb jellemzőkkel. Az első pár rendelkezik a legnagyobb átfedési integrállal, és ezzel kaptuk a legnagyobb FRET hatékonyság értéket, míg az utóbbi festékpárral mértük a legmagasabb fluoreszcenciás jeleket. Mivel a fluoreszcenciás mérésekben a fluoreszkáló festék gerjeszthetősége és detektálhatósága a legfontosabb, ezért áramlási citometriás energiatranszfer kísérletekhez az Alexa546-Alexa647 festékpár a legmegfelelőbb. Ugyanakkor egyes mikroszkópos technikákban a fluoreszkáló festékek fotódestrukciója is fontos, így akceptor fotóelhalványításos FRET méréseknél az Alexa555-Cy5 a legjobb választás (Vereb és mtsai, 2004).

Sajnos kísérleteinkben nem volt alkalmunk és lehetőségünk az összes áramlási citométeren kipróbálni a festékpárokat csak néhány Becton-Dickonson által gyártott műszeren, de leírások alapján megvizsgáltunk más gyártóktól származó és beszerezhető citométereket is (ezekről bővebben: (Shapiro, 2003), 8. fejezet). Úgy találtuk, hogy az FC500 (Beckman Coulter, Inc.) és a CyAn (Dako Cytomation) citométerek a FACSCaliburhoz hasonló fényforrásokat, detektálási szűrőket és küvetta rendszert tartalmaznak, ezért az itt közölt eredmények feltehetőleg ezekre a rendszerekre is érvényesek, valamint az igen hasonló két Becton-Dickinson műszerre is: az LSR II-re és a FACS Aria-ra. Ezeken kívül még a CyFlow (Partec GmbH.) citométert találtuk, amelyet kívánság szerint többféle dióda lézerrel lehet felszerelni, így elméletileg lehetséges egy olyan rendszert építeni, amelyik optikai tulajdonságaiban az általunk vizsgált kereskedelmi rendszereknél optimálisabban használható FCET kísérletekben. A FACSArray egy viszonylag olcsó és rendkívül gyors műszer, ezért kiválóan alkalmas nagymennyiségű ép sejten molekuláris asszociációk vizsgálatára áramlási citométeres fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer kísérletekben.

A gyakran használt fluoreszkáló festékek számos típusát nem vizsgáltuk kísérleteinkben, így a fikobilin fehérjéket, a zöld fluoreszkáló fehérje variánsait és a kvantum gyöngyöket, melyeknek azonban érdemes tanulmányozni a FCET mérésekben való használhatóságukat.

A fikobilin fehérjék, R-fikoeritrin (R-PE) és allofikocianin (APC), valamint tandem konjugált származékaik igen népszerűek immun-fluoreszcens kísérletekben, mivel kiváló gerjeszthetőségük révén (az R-PE moláris abszorpciós együtthatója: $\epsilon \sim 2$ millió $M^{-1}cm^{-1}$) akár néhány száz antigén detektálására is alkalmasak (Maecker és mtsai, 2004). Azonban ezen fehérjék mérete összevethető az antitestek méretével, így kis molekuláris távolságok

meghatározására nem igazán alkalmasak. A méretükből következően ezek meglehetősen lassú mozgásokat végeznek, és nem foroghatnak olyan szabadon, mint a kisebb fluoreszkáló molekulák, ami olyannyira behatárolja orientációs szabadsági fokukat (κ^2), hogy az így előállt FRET hatékonyság tartomány gyakorlatilag használhatatlan (Batard és mtsai, 2002).

Amikor élő sejteken végzett FRET tanulmányokban antitestekhez konjugált fluoreszkáló festékeket alkalmazunk donor-akceptor párként, akkor ezekkel gyakran csak a molekulák extracelluláris részét tudjuk vizsgálni, és a vizsgálatok kivitelezhetősége nagyban függ attól, hogy van-e megfelelő antitest. A fluoreszcencia rezonanciára alkalmas zöld fluoreszkáló fehérje (GFP) változatok kifejlesztése révén a módszer alkalmazhatóságát sikerült kiterjeszteni az intracelluláris folyamatok tanulmányozására is (Chan és mtsai, 2001; Dumas és mtsai, 2004; Hawley és mtsai, 2004). Azonban az ismert előnyeik és fontosságuk mellett számos hátránnyal rendelkeznek, melyek megnehezítik FRET kísérletekben való használatukat. Egy jó FRET párt alkotó GFP változatok kiválasztása megfelelő körültekintést igényel, mivel a gerjesztési és detektálási tartományok általában igen közel vannak egymáshoz, és a spektrális átvilágítások nagyban leronthatják a FRET hatékonyság meghatározásának pontosságát. Ezen a problémán segíthet a teljes színek egyszerű detektálása, majd annak komponensekre bontása matematikai algoritmusokkal (Gadella és mtsai, 1997; Vermeer és mtsai, 2004). Egy másik akadályozó tényező, hogy a legtöbb hozzáférhető lézervonal nem optimális a fehérjék gerjesztésére, és a GFP változatok főleg a látható színek alacsony hullámhosszú tartományát fedik le, ahol az autofluoreszcencia nagyban csökkentheti az érzékenységet. Mindenesetre néhány újonnan kifejlesztett vörös emittáló fluoreszkáló fehérje változat (DsRed, RFP) sikerrel alkalmazható lehet FRET kísérletekben is (Erickson és mtsai, 2003). A legnagyobb hátrány, hogy egyszerre két fehérjével kell transzfektálni a sejteket, hogy FRET festékpárt kapjunk. Ez a nehézség áthidalható, ha a GFP változatok kölcsönhatásait homotranszferrel vizsgáljuk, amely jelenség

két azonos típusú fluoreszkáló molekula között játszódhat le és a fluoreszcencia anizotrópia csökkenésében jelentkezik. Ezt a módszert nemrég sikerrel alkalmazták mikroszkópon (Lidke és mtsai, 2003), amit kis befektetéssel és egyszerű változtatásokkal áramlási citométerre is át lehet ültetni.

A kvantum gyöngyöket egyre gyakrabban használják orvosbiológiai tanulmányokban, ezért meg kell vizsgálnunk ezek használhatóságát a FRET mérésekkel kapcsolatban is. A kvantum gyöngyök fő előnye, hogy széles gerjesztési és keskeny és szimmetrikus kibocsátási spektrummal, jó kvantumhatékonysággal és fotostabilitással rendelkeznek (Bruchez és mtsai, 1998; Jovin, 2003). Ugyanakkor ezek a tulajdonságok FRET tanulmányokban hátrányosak is lehetnek. Így a nagyon széles gerjesztési spektrum miatt a kvantum gyöngyöket nem lehet FRET akzeptorként használni, mivel az akceptor szenzitizáció túl alacsony lenne, ami rontaná a FRET mérés pontosságát. Donorként alkalmazva viszont a keskeny kibocsátási spektrum miatt az átfedési integrál lenne túl alacsony, így az adott donor-akceptor pár R_0 kritikus Förster távolsága is. Valamint itt is jelentős hátrányt jelenthet a méret: bár a belső mag igen kicsi (2-5 nm), a biológiai védelem és antitest kötés miatt alkalmazott köpeny annyira megnöveli a kvantum gyöngy méretét (15-20 nm), hogy az már FRET mérésekre alkalmatlanná válik.

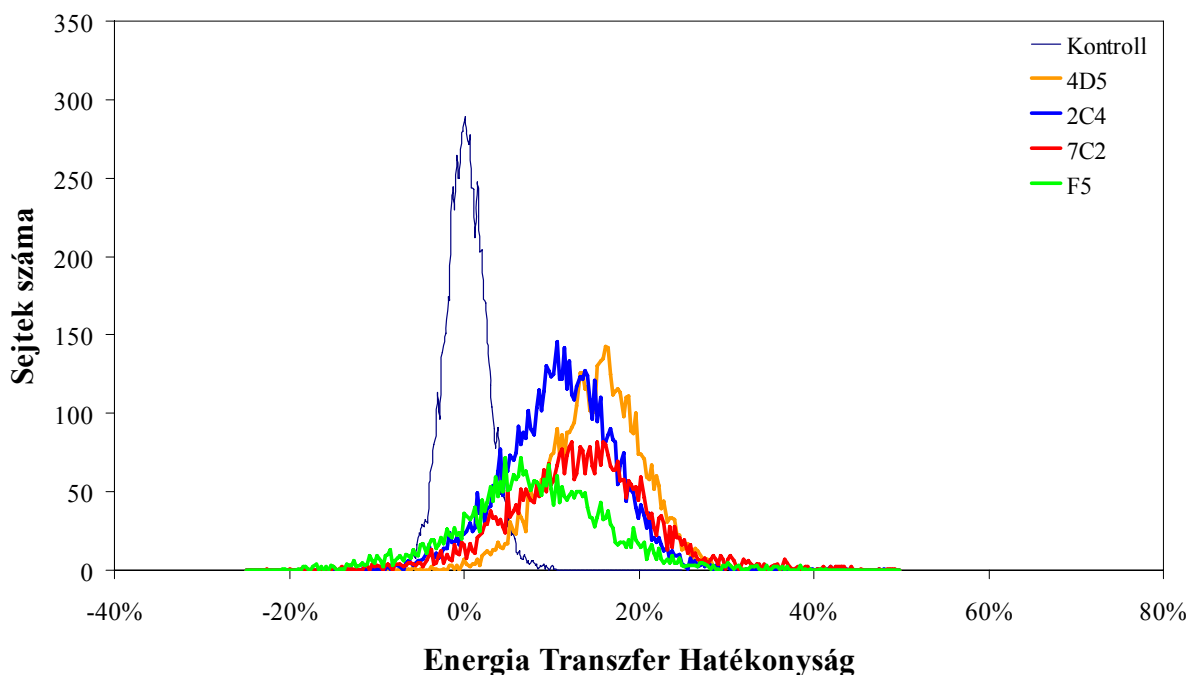
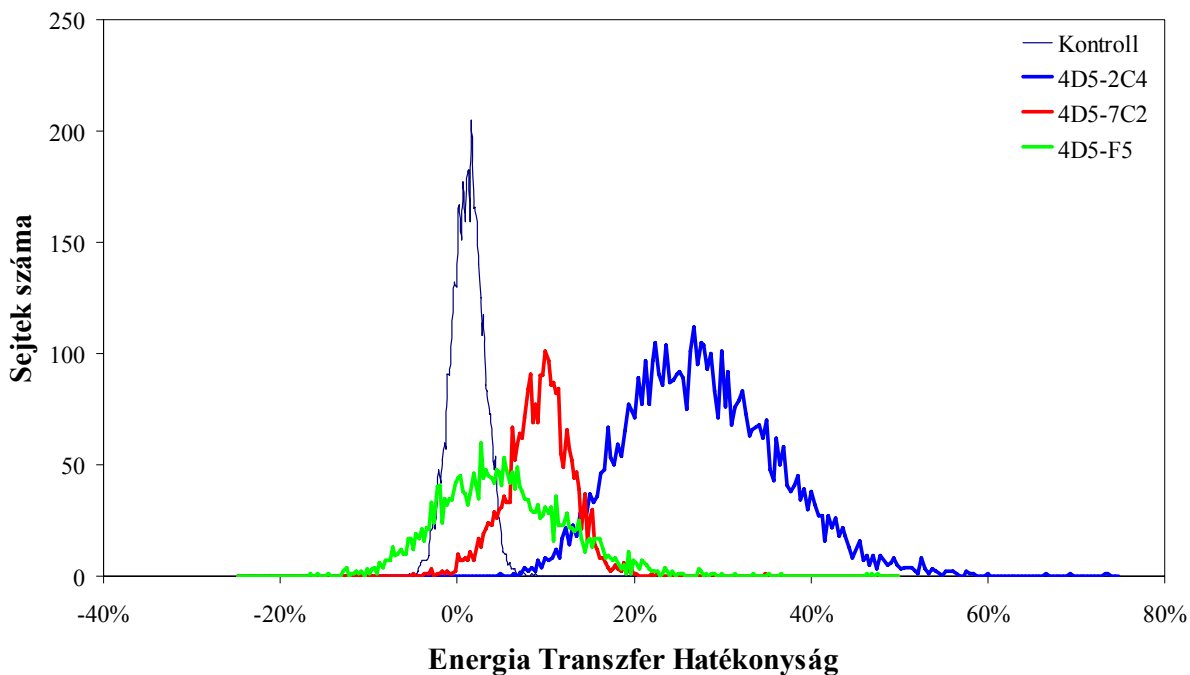
5.3 Az azonos és eltérő ErbB2 epitópok között mért távolságok

Az ErbB2 receptor molekuláris asszociátumait négy antitest segítségével kívántuk feltérképezni: a 4D5, 2C4, 7C2 és F5 antitestekkel. A 4D5 monoklonális antitest humanizált változatát (Trastuzumab; kereskedelmi nevén Herceptin™) már klinikai gyakorlatban is használják magas ErbB2 expressziójú emlőtumrok esetében, míg a 2C4 humanizált változata (Pertuzumab; Omnitarg™) 2. fázisú klinikai kipróbálás alatt áll, és a remények szerint olyan tüdő- és prosztata tumor fenotípusoknál is alkalmazható, melyekben az ErbB receptorok

expressziós szintje alacsonyabb (Esteva, 2004). Az F5 scFv antitestet liposzómához kapcsoltn kívánják használni célzott gyógyszeres terápiában (Park és mtsai, 2004).

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a négy jelölt antitest egymástól való (intramolekuláris) távolságait, valamint két ErbB2 molekulához kapcsolt ugyanazon antitest intermolekuláris (homodimerizációs) távolságait is. A FRET mérésekhez Cy3- és Cy5-jelzett antitestekkel jelöltünk magas ErbB2 expressziós szintű emlő- (SK-BR-3) és gyomortumor (N87) sejteket. A FRET hatékonyság hisztogramokat sejtenként határoztuk meg FACSCalibur áramlási citométerrel, mintánként 20000 sejtről gyűjtve adatot. A FRET hatékonyság értékek minden esetben a megbízhatósági határ (5 %) körül vagy felett voltak, és számottevően eltértek a csak donorral jelzett mintára (negatív kontroll) kapott értéktől. Hasonló adatokat kaptunk mindkét sejtvonalon, de mivel az ErbB2 expressziós szintje kb. 30 %-kal magasabbnak mutatkozott az N87 sejteken, továbbiakban csak az N87 sejtvonalról nyert adatokat ismertetjük.

Az intra- és intermolekuláris jelölésnek megfelelő FRET hatékonyság eloszlási hisztogramokat az 5. ábrán tüntettük fel. Jól látható a 4D5 és 2C4 között mért magasabb transzfer hatékonyság, bár az eloszlási hisztogram elég széles, ami pusztán biológiai változékonysággal nem magyarázható, főleg ha összevetjük a kicsit alacsonyabb átlag transzfer hatékonyságú 4D5-7C2 eloszlási hisztogrammal. A legvalószínűbb magyarázat, hogy nem csak intra-, de intermolekuláris kölcsönhatások is megjelennek, amik áramlási citométeres módszerekkel nem oldhatók fel. Ugyanez mondható el a 4D5-F5 párra is, bár ott a transzfer hatékonyság már a kimutathatósági határ közelében található.



5. ábra: *Eltérő és azonos ErbB2 ellenes antitestek között mért energiatranszfer hatékonyság eloszlás hisztogramok.* A hatékonyság értékeket sejtenként határoztuk meg a 14. és 15. egyenletek alapján FACSCalibur áramlási citométeren.

A három független mérés átlagából számolt (3. egyenlet) molekuláris távolságok (és azok hibája) a VI. táblázatban láthatók. A Cy3-Cy5 párra jellemző kritikus Förster távolság $R_0 = 5,0$ volt a számításainkban (Bastiaens és Jovin, 1996).

<i>Eltérő epitópok közötti távolságok</i>			
Donor	Akceptor	korrigált átlag $E \pm$ SEM (%)	átlag $R \pm$ SEM (nm)
4D5	2C4	21,1 \pm 2,3	6,2 \pm 0,2
4D5	F5	5,0 \pm 0,8	8,2 \pm 0,2
2C4	7C2	6,2 \pm 0,8	7,9 \pm 0,2
2C4	F5	3,9 \pm 0,9	8,5 \pm 0,4
7C2	4D5	5,3 \pm 0,3	8,1 \pm 0,1
7C2	F5	3,4 \pm 0,5	8,7 \pm 0,2

<i>Azonos epitópok közötti távolságok</i>			
Donor	Akceptor	korrigált átlag $E \pm$ SEM (%)	átlag $R \pm$ SEM (nm)
4D5	4D5	11,2 \pm 0,9	7,1 \pm 0,2
2C4	2C4	9,9 \pm 0,7	7,2 \pm 0,2
7C2	7C2	13,4 \pm 0,1	6,8 \pm 0,2
F5	F5	6,8 \pm 0,6	7,7 \pm 0,2

VI. táblázat: *Az ErbB2 ellenes antitestek között mért FRET hatékonyságok (E) és az ezekből számolt molekuláris távolságok (R).* A hatékonyság értékek három független mérés átlagai, a SEM pedig a minta középértékének közepes hibája.

A fenti vizsgálatokat már egyszer elvégezték (Nagy és mtsai, 1998) három emlőtumor sejtvonalon (SK-BR-3, BT474 és BT474-M), de kísérleteikben teljes, monoklonális antitesteket használtak és nem ismerték a fluoreszkáló festékek kötőhelyét. Az intramolekuláris transzfer hatékonyság értékek valamelyest nagyobbak adódtak ezekben a kísérletekben, ami a teljes antitestek nagyobb méretéből adódó flexibilitással magyarázható, viszont az intermolekuláris transzfer hatékonyságok jó egyezést mutattak az általunk kapott eredményekkel.

Az eltérő epitópok közötti molekuláris távolság adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a 4D5 és 2C4 antitestek végpontjai találhatóak legközelebb egymáshoz, míg a többi a kimutathatósági határ közelében, igen messze helyezkedik el egymástól. A később meghatározott ErbB2-2C4 kristályszerkezet lehetőséget adott arra is, hogy a két Fab

molekulát egy ErbB2 molekulához dokkoljuk. Az így meghatározott 4D5-2C4 távolság 9,57 nm volt, jóval nagyobb, mint a mérési eredményekből számolt 6,2 nm. Ebből arra következtethetünk, hogy a 4D5 és 2C4 közötti transzfer főleg intermolekuláris lehet, összhangban a FRET eloszlás vizsgálatokon levont következtetésünkkel.

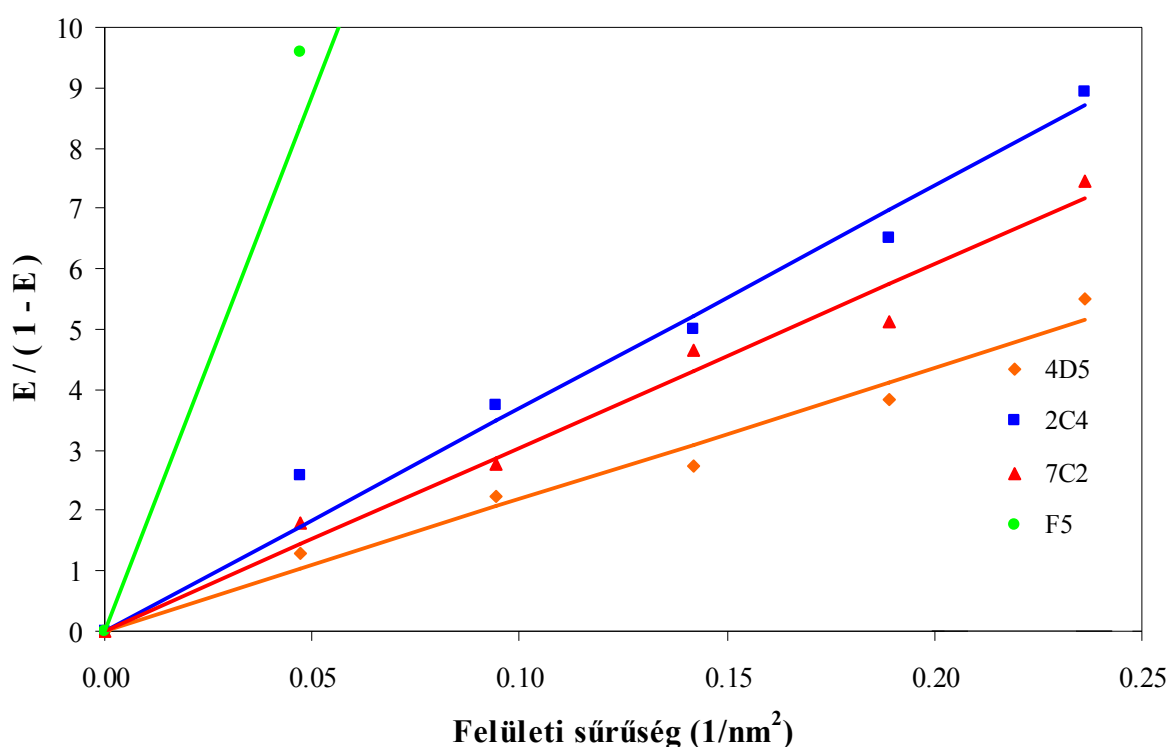
Az azonos epitópok közötti transzfer hatékonyság (7 – 14 %) és távolság (6,8 – 7,7 nm) értékek igen hasonlóak voltak. Elméleti megfontolások alapján ez kétféleképpen magyarázható: egyrészt elképzelhető, hogy az antitestek végén elhelyezkedő festék molekulák a receptor egyik „oldalára” esnek, így a receptor felszínét követik egy bizonyos távolságra, másrészt az is lehetséges, hogy az antitestek a receptor több oldaláról állnak ki, s így bár antitestenként kettő, de valójában három vagy több receptor közötti kölcsönhatásokat reprezentálnak. Ezt a képet tovább árnyalja a festék molekulák membrántól való távolsága, amiből meghatározható az antitestek kötőhelyüknél mérhető, membránra merőleges dőlésszöge.

5.4 Az ErbB2 epitópok membrántól való távolsága

Az antitestek sejtmembrántól való távolságának meghatározásához Yguerabide módszerét (Yguerabide, 1994) alkalmaztuk, amellyel korábban már sikerült feltérképezni az MHC I molekula szerkezetét (Gáspár és mtsai, 2001). A módszer lényege, hogy egy pontszerű fluorofór síkban elhelyezkedő, fluoreszcencia rezonanciára képes másik fluorofórtól való vertikális távolsága meghatározható, ha a síkban lévő festék felületi sűrűségének függvényében vizsgáljuk a fluoreszcencia intenzitás arány, azaz a transzfer hatékonyság változását.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a négy jelölt antitest membrán síkjától vett vertikális távolságait. A FRET mérésekhez BODIPY-PC (581/591) lipid festékkel jelöltük a sejtmembránt, majd Alexa488-jelzett antitestekkel jelöltük az ErbB2 receptort magas ErbB2

expressziós szintű gyomortumor (N87) sejteken. A FRET hatékonyság hisztogramokat sejtenként határoztuk meg FACSSStar^{PLUS} áramlási citométerrel, mintánként 10000 sejtről gyűjtve adatot. Az egyes antitestekkel kapott transzfer hatékonyság értékeket, pontosabban az $E/(1 - E)$ értékeket ábrázoltuk a lipid festék felületi sűrűségének függvényében, majd a kapott pontokra egyenest illesztettünk, ami a 6. ábrán látható. A jobb ábrázolás miatt az F5 antitestre csak az első pontot és az illesztett egyenes elejét tüntettük fel, de ez a pontsorozat is hasonló illeszkedést mutatott.



6. ábra: Az *ErbB2* ellenes antitestek membrántól való távolságának meghatározására használt Stern-Volmer ábra. A transzfer hatékonyság értékeket sejtenként határoztuk meg a 14. egyenlet alapján FACSSStar^{PLUS} áramlási citométeren, a felületi sűrűséget pedig a sejt méretéből és a hozzáadott lipid festék mennyiségéből becsültük.

Három független kísérletben a fenti ábrán láthatóhoz hasonló illesztett egyenesek meredekségének átlagait (K_q), valamint az azokból a 19. egyenlettel számított távolság (R) értékeket (és azok hibáját) a VII. táblázat tartalmazza. A BODIPY-PC (581/591)-Alexa488

párra jellemző kritikus Förster távolságot a festékek szinképe alapján számoltuk ki, és az $R_0 = 5,6$ -nak adódott.

Antitest	átlag K_q	átlag $R \pm \text{SEM}$ (nm)
4D5	2,96	$7,4 \pm 0,4$
2C4	5,00	$6,0 \pm 0,1$
7C2	4,12	$6,2 \pm 0,2$
F5	24,00	$4,7 \pm 0,2$

VII. táblázat: Az *ErbB2* ellenes antitestekkel kapott „kioltási állandók” (K_q) és az abból számolt membrántól való távolságok (R). A kioltási állandók három független mérés átlagai, a SEM pedig a minta középértékének közepes hibája.

A fenti adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az F5 scFv található legközelebb a membránhoz, míg a 2C4 és 7C2 közepesen, a 4D5 pedig meglehetősen messze helyezkedik le a membrántól. Ennek ellentmondani látszott, hogy a 4D5 kötőhelye, „phage display” kísérletek alapján (Genentech, Inc. személyes kommunikáció), a membránhoz közel található, ami viszont feloldható, ha azt feltételezzük, hogy a 4D5 Fab’ a membrántól elfele áll. Ezeket a távolság adatokat később részben alátámasztották az ErbB2 ektodomén 4D5 és 2C4 Fab-kkal képzett komplexeinek röntgen kristályszerkezete, és a további számításoknál ezeket a koordinátákat használtuk fel.

5.5 A majdnem teljes hosszúságú ErbB2 dimer modellje

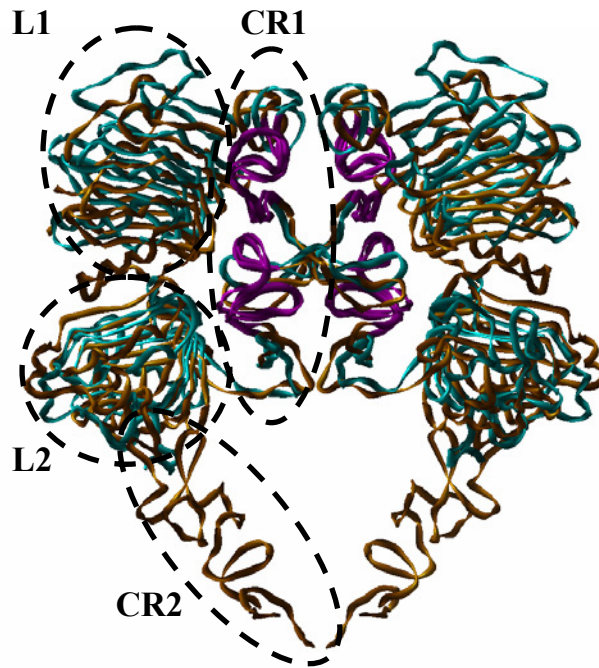
Noha kísérleteinkben mind a négy antitest egymástól és a membrántól való távolságait meghatároztuk, az itt közölt molekulamodellzési számításoknál csak a 4D5 Fab’ antitest távolság adatait használtuk fel. Ennek oka, hogy a 2C4, szerkezeti adatok alapján (Burgess és mtsai, 2003), gátolja a homo- és heterodimerek képződését, az F5 scFv antitestnek kicsi az affinitása és erősen kompetál a többi antitesttel, míg a 7C2 kötőhelyét még nem sikerült teljes bizonyossággal meghatároznunk.

Az ErbB2 ektodomén dimer modelljének szerkesztése

Az ErbB2 dimer modellépítési eljárást az ErbB2 extracelluláris doménjével kezdtük. Feltételeztük, hogy az ErbB2 dimer felvehet az EGFR kristályszerkezeti dimerhez hasonló konformációt (Ogiso és mtsai, 2002). A feltételezésünket arra alapoztuk, hogy az EGFR család tagjai között az összes lehetséges homo- és heterodimerizációt leírták (Yarden, 2001) és az ErbB1-4 molekulák dimerizációs karjának aminosavsorrendje és szerkezete nagymértékben hasonló. Ugyanakkor az ErbB2 ektodomén kristályszerkezetében nem találtak ilyen dimert (Cho és mtsai, 2003; Garrett és mtsai, 2003), ami arra utal, hogy ez a kölcsönhatás meglehetősen gyenge lehet (Burgess és mtsai, 2003). Garrett és társai azt feltételezték, hogy az ErbB2 ektodomén nem képes az EGFR-hez hasonlóan önmagában dimert képezni, viszont több, párhuzamos kölcsönhatás már hozzájárulhat a receptorok asszociációjához élő sejtek felszínén. Ezzel szemben N87 sejteken végzett áramlási citometriás energiatranszfer kísérletek az ErbB2-ErbB2 ektodomén bizonyos mértékű homoasszociációjára utalnak: reprodukálható FRET hatékonyság értékeket mértünk két különbözően jelölt Herceptin Fab' között, melyek két ErbB2 ektodomén S2 régiójának azonos epitópjához kapcsolódhatnak.

Négy darab nem-látható hurok található a Herceptin Fab' és ErbB2 ektodomén komplex kristályszerkezetében (Cho és mtsai, 2003). Ezek közül kettőt (Ala302-Thr306 és Asp360-Ser365) az EGFR ektodomén (Ogiso és mtsai, 2002) homológ régiói alapján modelleztünk. A másik kettőt (Leu101-Ser111 and Ser580-Ile591) a Sybyl szoftver „Protein Loop Search” algoritmusával építettük ki. Ezen ErbB2 Herceptin Fab'-al képzett komplex modelljének két másolatát az EGFR dimer kristályszerkezetének A és B láncával hoztuk fedésbe, és a dimerizációs hurkok (Cys246-Arg266) konformációját az EGFR dimerhez hasonlóra változtattuk Modeller szoftverrel (Sali és Blundell, 1993). A fedésbe hozott régiók

csak a CR1 domének elemeit tartalmazták (a dimerizációs hurkot nem), mivel az EGFR és ErbB2 L és CR doménjeinek eltérő relatív pozíciója a két monomer rossz átfedését eredményezheti (7. ábra). Ezután a dimert a koordináta rendszer középpontjába állítottuk úgy, hogy a dimer C_2 szimmetria tengelye a Z-tengellyel, míg az XY sík a sejtmembrán külső síkjával essen egybe.



7. ábra: Az egymásra helyezett EGFR (zöldeskék szalag) és ErbB2 (barna szalag) ektodomének szalagmodellje. Az egymásra helyezésnél használt α -szénatomokat lila szalaggal jelöltük mindkét szerkezeten. A domén neveket (L1, CR1, L2 és CR2) és körülbelüli helyzetüket (szaggatott vonal) csak az egyik monomerre tüntettük fel.

Noha ez a dimer konfiguráció az EGFR dimerrel való analógia alapján megfelelőnek tűnik, nem elégíti ki a kísérletesen meghatározott, Herceptin Fab'-k közötti 7,1 nm-es intermolekuláris távolságot. Ezért fel kell tételeznünk más ErbB2 homodimer konfigurációkat is, és a fenti modell csak egy a több lehetséges közül. Ez a 7,1 nm-es távolság a modell alapján várható és más, feltehetően kisebb távolságú dimer, vagy magasabb rendű oligomerek súlyozott átlagának tekinthető. Vagyis úgy gondoljuk, hogy az EGFR-hez hasonló dimer konfiguráció csak egy alcsoportja a lehetséges konfigurációknak és/vagy más dimer

szerkezetek egymásba alakulásából adódó dinamikus átlag szerkezet. Az ErbB molekulák aminosav sorrendbeli és szerkezeti eltérései miatt keletkező eltérő szintű stabilizációs hatások meghatározhatják az egyazon időben fellelhető dimer konfigurációkat.

Az ErbB2 transzmembrán hélix dimer modelljének szerkesztése

Az ErbB2 ektodomének lehetséges dimerizációja mellett a transzmembrán domén (TM) is dimerizálódhat, ahogy arra kísérletes adatok utalnak (Mendrola és mtsai, 2002; Sharpe és mtsai, 2002). Az ErbB2 TM domén dimer megszerkesztéséhez ismert szerkezetű membrán fehérjék transzmembrán alfa-hélix párjait használtuk kiindulási alapul. Két ErbB2 TM hélix NMR-el meghatározott szerkezetét (Goetz és mtsai, 2001) a mintaként szolgáló alfa-hélix pár elemeivel fedésbe hoztuk, majd rövid minimalizálást alkalmaztunk. A korábban leírt modelleknek (Fleishman és mtsai, 2002; Gerber és mtsai, 2004; Kim és mtsai, 2003; Mendrola és mtsai, 2002; Moriki és mtsai, 2001) leginkább a fotoszintetikus reakció központ molekula alapján épített modell felelt meg, így ezt használtuk a továbbiakban.

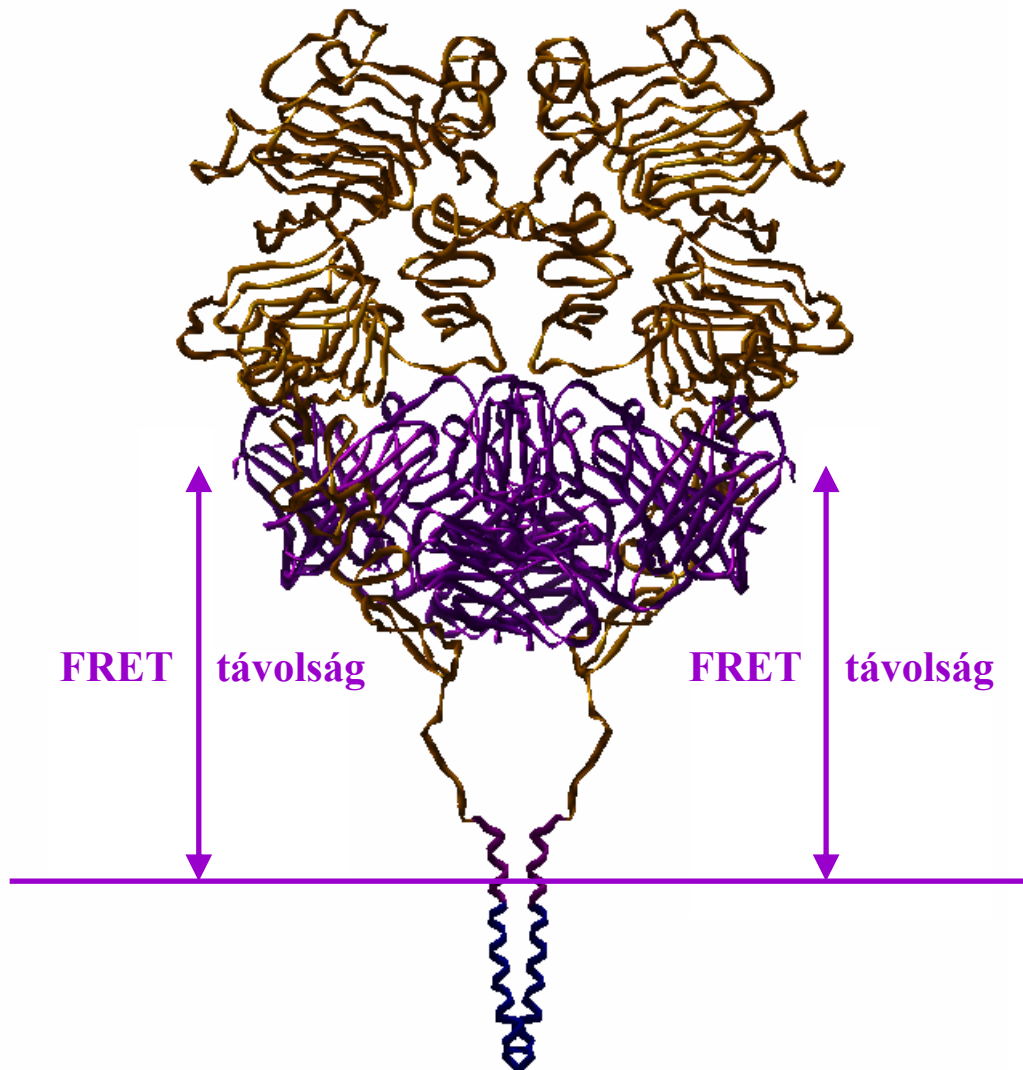
A hélix dimert az ektodomén dimer alá helyeztük egyazon forgástengelyre, így bármelyik dimerizációs felszín erősítheti a másik régió hatását. Az erősen kötött ErbB2 dimerek vagy heterodimerek kialakulását nagyban elősegítheti több, szinergikusan ható dimerizációs felszín.

Az ErbB2 extracelluláris dimer modelljének szerkesztése

Az ektodomén membrántól való távolságát FRET mérések alapján állítottuk be: az ektodomén dimer Herceptin Fab'-val képzett komplexét a Z-tengely mentén addig mozgattuk, míg a Herceptin Fab' szabad végének a sejtmembrántól (XY síktól) mért vertikális távolsága megegyezett a FRET mérésekben kapott kísérletes értékkel. A transzmembrán hélixet a Z-tengely mentén addig mozgattuk lefele, míg az N-terminális hidrofób szegmens elérte az

XY síkot. Az ektodomén C-terminális és a transzmembrán domén N-terminális vége közötti részt a Sybyl szoftver „Protein Loop Search” algoritmusával modelleztük. A szimmetria feltételek kielégítése végett egy, teljes extracelluláris és transzmembrán domént tartalmazó monomert megkettőztünk, majd a másik monomerhez illesztettük, amit a transzformáció után töröltünk (8. ábra). Egy rövid minimalizációt itt is végeztünk a korábbiaknak megfelelően.

Az CR2 domén C-terminális része nem rendezett, vagy nincs jelen az ErbB molekulák kristályszerkezeteiben (Cho és Leahy, 2002; Cho és mtsai, 2003; Ferguson és mtsai, 2003; Garrett és mtsai, 2003; Garrett és mtsai, 2002; Ogiso és mtsai, 2002), és flexibilis kart alkothat a külső membránközeli régióval, ahogy azt az ErbB1 membránközeli régiójára megmutatták (Moriki és mtsai, 2001). A régió flexibilitása nélkülözhetetlen lehet az első monomer (ErbB2) egy változó második monomerhez (ErbB1-4) való megfelelő pozicionálásához. Az általunk készített flexibilis modell nem zárja ki az ErbB molekulák homo- és heterodimerjeinek CR2 doménjei közötti kölcsönhatás lehetőségét sem, amit immunoprecipitációs (Kumagai és mtsai, 2003) és mutációs vizsgálatok (Siegel és Muller, 1996) sugallnak, és ez a lehetőség fennállhat az extracelluláris és a transzmembrán szakaszokat összekötő régióra is.



8. ábra: Az ErbB2 dimer extracelluláris (barna szalag) és transzmembrán doménjeinek (kék szalag), valamint a Herceptin Fab' (lila szalag) szalagmodellje. A nyilak a Herceptin Fab' végétől a membrán külső felszínéig mért FRET távolságot jelzik.

Az ErbB2 intracelluláris dimer modelljének szerkesztése

A transzmembrán és a protein kináz közötti membránközeli régió másodlagos szerkezetét a Sybyl szoftver vagy az ExPASy molekuláris biológia szerver (<http://www.expasy.org>) különböző módszereivel becsültük. Mindegyik becslési módszer alfa-hélix szerkezetet valószínűsített a szekvencia N-terminális felére (9. ábra).

	<i>TM</i>		<i>juxtamembrane</i>		<i>kinase</i>
ErbB2 (648-691)	VFGILIKRRQ		QKIRKYTMRLLQ		ETELVEPLTPSGAMPNQAQMR
GOR	ABBAAAAAAAA	---	B-BBBBBAAAAAAAAABA	-----	AAAAB
Maxfield_Scheraga	-----		AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	----	-----
Qian_Sejnowski	---		BBAAAA-AAAAAAAAAAAA	-----	-----
GOR4	---		BBB-AAAAAAAAAAAAAAAA	-----	BBB-
Jnet	-----		AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	-----	-----
SOPMA	BBBBBBA	---	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	-----	AAAA
HNN	--		BBBAAAAAAAAAAAAAAAA	-----	-----
X-ray	AAAAAAAAA		-----		BBBBBBBBB

9. ábra: Az *ErbB2* belső membránközeli régió másodlagos szerkezetének becslése. Csak az α -hélix (A) és a β -lemez (B) állapotokat tüntettük fel.

Az ExPASy szerver BLAST programjával aminosavsorrend hasonlósági keresést végeztünk a Protein Data Bank-ban. A két leginkább hasonló szekvenciát az 1ETE és a 3HLA kódú fehérjék adták. Mindkettő könyökszerű szerkezetet mutatott alfa-helikális régióval az egyik oldalon, míg nyújtott béta-redő konformációt a másik oldalon. Azonban míg az 1ETE fragmentum alfa-helikális régiója a C-terminális részen volt, addig a 3HLA fragmentumnak az N-terminális végén volt az alfa-helikális régió. Az alfa-helikális transzmembrán szegmens közelsége, valamint a másodlagos szerkezet becslések egybehangzó eredménye és 3HLA fragmentum háromdimenziós szerkezete alapján a 3HLA fragmentum mintaként szolgálhat az ErbB2 belső membránközeli régiójának homológ modellezésénél. A homológ modellt (10. ábra) Modeller szoftverrel készítettük. A belső membránközeli régió merevebbnek tűnt, mint a külső membránközeli régió, ami a transzmembrán domén molekuláris mozgásainak a kináz domén felé továbbításában jelenthet segítséget. A transzmembrán és a kináz domén rotációs kapcsolatát az EGFR (Moriki és mtsai, 2001) és ErbB2 (Bell és mtsai, 2000) esetén kísérletileg is igazolták.

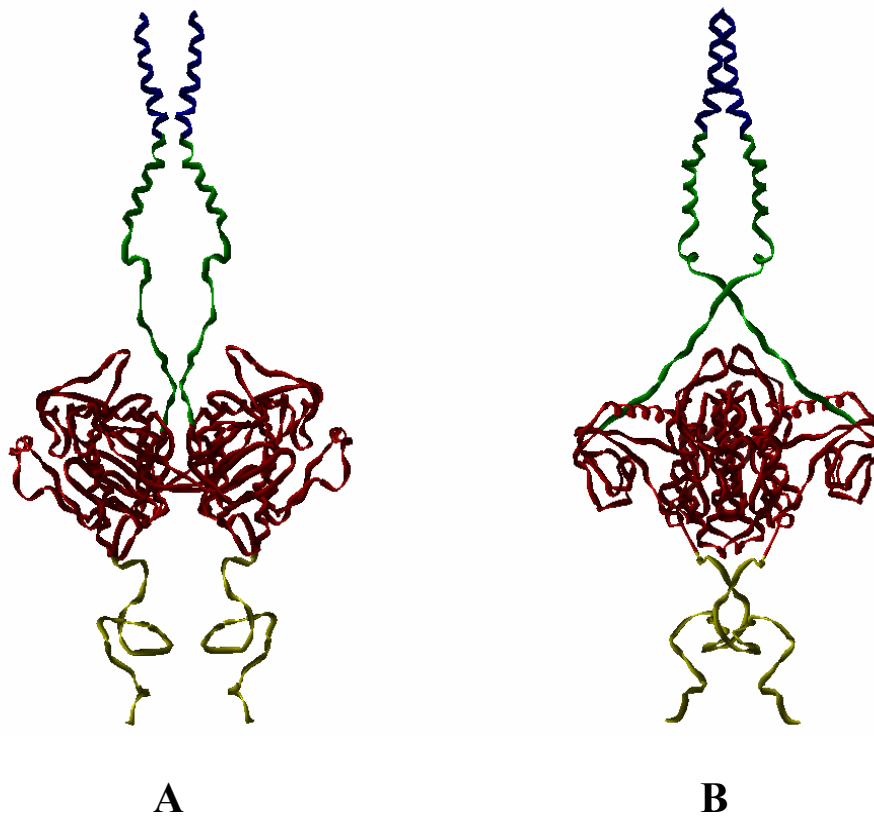


10. ábra: *Az ErbB2 belső membránközeli régió homológ modellje.*

A membránközeli szakasz két példányát fedésbe hoztuk a modellezett transzmembrán hélix dimerrel négy olyan aminosav segítségével, melyek mindkét modellben szerepeltek. A modell építési eljárásban ezután a protein kináz domén két példányát hoztuk fedésbe a közös négy terminális aminosav segítségével. Érdekes módon az így előállt modellben a két kináz domén szabályos és szimmetrikus, egymásnak háttal álló dimert alkotott mindenféle kedvezőtlen kölcsönhatás nélkül (11. ábra). Az extracelluláris dimerhez hasonlóan itt is alkalmaztunk egy rövid minimalizálási eljárást a teljes intracelluláris dimerre.

Modellünkben a kináz domén elhelyezkedését egyedül a transzmembrán domén dimer pozíciója és a belső membránközeli régió modelljének alakja alapján kaptuk meg. Ezen modell szerint a kináz domének kölcsönhatásban lehetnek egymással és egy harmadik dimerizációs felszínként is szolgálhatnak. A kináz domének kölcsönhatását kísérleti adatok is alátámasztják (Penuel és mtsai, 2002).

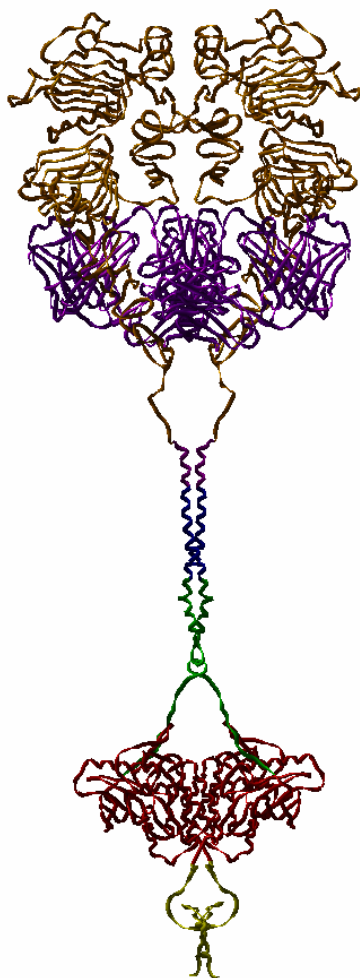
A Protein Data Bank-ot átnézve nem találtunk olyan fehérje kináz dimert, amelyben a két monomer a modellünkhöz hasonló helyzetben lettek volna. Átvizsgáltuk a többi négy transzmembrán hélix dimert is, melyeket korábban elhanyagoltuk. Ha a transzmembrán régiót és a kináz domént az általunk használt könyökszerű szerkezettel kapcsoltuk egymáshoz, akkor a kináz domének vagy túl közel, vagy túl távol voltak, és nem lehetett közöttük kölcsönhatás a dimer konfigurációban.



11. ábra: *A feltételezett ErbB2 dimer transzmembrán és intracelluláris domének szalagmodellje.* Szemből nézeti (A) és oldalnézeti (B) kép. Az egyes részeket a következő színekkel jelöltük: transzmembrán hélix (kék), belső membránközeli szakasz (zöld), tirozinkináz domén (piros) és C-terminális szakasz (sárga).

Az ErbB2 dimer majdnem teljes hosszúságú modelljének szerkesztése

Az extracelluláris és az intracelluláris dimer modelljeit a közös transzmembrán régió keresztül hoztuk egymással fedésbe. Ez a majdnem teljes hosszúságú ErbB2 dimer tartalmazta a teljes ektodomént, a külső membránközeli régiót, a transzmembrán domént, a belső membránközeli régiót, a protein kináz domént és a szabályozó szerepet betöltő C-terminális farok egy részét (12. ábra).



12. ábra: *Az ErbB2 homodimer Herceptin Fab'-val képzett komplexének majdnem teljes hosszúságú modellje.* Az egyes szakaszok színezése megegyezik a 8. és 11. ábrán láthatókkal.

Felépítettük az ErbB2 homodimer szerkezetét, amely három potenciális kölcsönhatási felszínnel rendelkezik. Ez az ErbB2 homodimer, a többi ErbB molekula ligandummal kapcsolt formájának szerkezetét is figyelembe véve, kiindulási modellként szolgálhat az ErbB2 molekula ErbB család többi tagjával alkotott heterodimerjeinek megszerkesztéséhez. Meg kell jegyeznünk, hogy az ErbB receptorokon keresztül való jelátvitelhez elképzelhető, hogy a receptorok magasabb szintű asszociációja szükséges. Az egymásnak háttal álló kináz dimer elrendezés felelős lehet a citoplazmatikus szabályozó farokrész *transz*-foszforilációjáért, de a kináz domén foszforilációjáért már nem, amihez másik kináz molekulák szükségeltetnek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk egyik célja az volt, hogy megállapítsuk újonnan kifejlesztett fluoreszkáló festék és áramlási citométerek használhatóságát áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FCET) mérésekben. Ezen kívül az ErbB2 receptor és dimerjének modelljét kívántuk megszerkeszteni epitóp térképezési és molekuláris modellezési eljárásokkal, melyekhez FCET mérésekben megállapított molekuláris távolságokat használtunk fel. Vizsgálataink eredményei a következők:

- Az általunk vizsgált hét fluoreszkáló festék segítségével megállapítottuk a sejtek felszínén lévő membránfehérjék asszociációjának áramlási citometriás tanulmányozásához nélkülözhetetlen paramétereket, melyek a normalizált fluoreszcencia intenzitás, a transzfer átmenet nagyságára jellemző átfedési integrál (vagy kritikus Förster távolság), a normalizált FRET hatékonyság, valamint a festékek gerjeszthetőségét figyelembe vevő *efr* együttható. A leírt kiértékelési eljárás könnyen alkalmazható bármely jövőben kifejlesztett fluoreszkáló festékre és áramlási citométerre.
- Az általunk vizsgált három áramlási citométeren azt találtuk, hogy a FCET mérésekhez az Alexa546-Alexa647 és az Alexa555-Cy5 donor-akceptor festékpár optimális.
- FCET mérésekben meghatároztuk az ErbB2 receptor különböző epitópjaihoz kötődő, fluoreszkáló festékekkel jelzett antitestek egymástól és a sejtmembrántól való távolságaikat.
- A fenti távolság és irodalmi kristályszerkezeti adatok alapján, molekulamodellezési eljárások segítségével megszerkesztettük az ErbB2 transzmembrán receptor majdnem teljes modelljét, amely tartalmazta az extracelluláris domént, a transzmembrán régiót

és a tirozinkináz domént, valamint az ezeket összekötő szakaszokat. Az antitesttel jelölt ErbB2 molekulák között mért FRET hatékonyság értékek alapján felállítottunk egy lehetséges modellt az ErbB2 receptor dimerre, amely az EGFR dimerhez hasonló módon kapcsolódott össze, valamint rámutattunk több lehetséges dimerizációs felszínre a külső membránközeli összekötő szakasznál, a transzmembrán és a fehérje kináz régióknál.

7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Az új fluoreszkáló festékek és áramlási citométerek összehasonlításával kidolgoztunk egy olyan eljárást, amellyel megállapítottuk ezek FRET mérésekben való használhatóságát, és amely bármely jövőben kifejlesztett festék és citométer esetén is alkalmazható. A tesztelt új áramlási citométerek között olyan is van, amely lehetővé teszi nagyszámú minta akár automatikus mérését és kiértékelését is.

Eredményeink hozzájárulnak az epidermális növekedési faktor receptorcsalád tumoros elváltozásokban betöltött szerepének és hatásmechanizmusának megértéséhez, mivel rávilágítanak a receptorok közötti kölcsönhatások sokszínűségére. A receptorcsaládon belül az általunk megállapított modell az első, amely magába foglalja az ErbB2 receptor majdnem teljes primer szekvenciáját.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lofgren JA, Higgins B, Maiese K, Scher HI and Sliwkowski MX. A potential role for activated HER-2 in prostate cancer. *Semin Oncol* (2000) **27**:76-83; discussion 92-100.

Alroy I and Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* (1997) **410**:83-86.

Bagossi P, Horváth G, Vereb G, Szöllösi J and Tózsér J. Molecular modeling of nearly full length ErbB2 receptor. *Biophys J* (2005) **88**:1354-1362.

Bastiaens PI and Jovin TM. Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**:8407-8412.

Batard P, Szöllösi J, Luescher I, Cerottini JC, MacDonald R and Romero P. Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: advantages and limitations. *Cytometry* (2002) **48**:97-105.

Bell CA, Tynan JA, Hart KC, Meyer AN, Robertson SC and Donoghue DJ. Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* (2000) **11**:3589-3599.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN and Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* (2000) **28**:235-242.

Brockhoff G, Heiss P, Schlegel J, Hofstaedter F and Knuechel R. Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells. *Cytometry* (2001) **44**:338-348.

Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S and Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* (1998) **281**:2013-2016.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW and Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* (2003) **12**:541-552.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW and Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* (2003) **12**:541-552.

- Chan FK, Siegel RM, Zacharias D, Swofford R, Holmes KL, Tsien RY and Lenardo MJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein. *Cytometry* (2001) **44**:361-368.
- Cho HS and Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* (2002) **297**:1330-1333.
- Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr. and Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* (2003) **421**:756-760.
- Cuff JA and Barton GJ. Evaluation and improvement of multiple sequence methods for protein secondary structure prediction. *Proteins* (1999) **34**:508-519.
- Dale RE, Eisinger J and Blumberg WE. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* (1979) **26**:161-193.
- Damjanovich S, Matkó J, Mátyus L, Szabó G, Jr., Szöllősi J, Pieri JC, Farkas T and Gáspár R, Jr. Supramolecular receptor structures in the plasma membrane of lymphocytes revealed by flow cytometric energy transfer, scanning force- and transmission electron-microscopic analyses. *Cytometry* (1998) **33**:225-233.
- Deisenhofer J, Epp O, Sinning I and Michel H. Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* (1995) **246**:429-457.
- Dewey TG and Hammes GG. Calculation on fluorescence resonance energy transfer on surfaces. *Biophys J* (1980) **32**:1023-1035.
- Dornan S, Sebestyén Z, Gamble J, Nagy P, Bodnár A, Alldridge L, Doe S, Holmes N, Goff LK, Beverley P, et al. Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J Biol Chem* (2002) **277**:1912-1918.
- Dumas D, Gaborit N, Grossin L, Riquelme B, Gigant-Huselstein C, De Isla N, Gillet P, Netter P and Stoltz JF. Spectral and lifetime fluorescence imaging microscopies: New modalities of multiphoton microscopy applied to tissue or cell engineering. *Biorheology* (2004) **41**:459-467.
- Erickson MG, Moon DL and Yue DT. DsRed as a potential FRET partner with CFP and GFP. *Biophys J* (2003) **85**:599-611.
- Esteva FJ. Monoclonal antibodies, small molecules, and vaccines in the treatment of breast cancer. *Oncologist* (2004) **9 Suppl 3**:4-9.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ and Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* (2003) **11**:507-517.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ and Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* (2003) **11**:507-517.

Fleishman SJ, Schlessinger J and Ben-Tal N. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**:15937-15940.

Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* (1948) **2**:55-75.

Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM and Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* (2004) **5**:317-328.

Gadella TW, Jr., Vereb G, Jr., Hadri AE, Rohrig H, Schmidt J, John M, Schell J and Bisseling T. Microspectroscopic imaging of nodulation factor-binding sites on living *Vicia sativa* roots using a novel bioactive fluorescent nodulation factor. *Biophysical Journal* (1997) **72**:1986-1996.

Garnier J, Osguthorpe DJ and Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* (1978) **120**:97-120.

Garnier J, Gibrat JF and Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* (1996) **266**:540-553.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* (2003) **11**:495-505.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* (2002) **110**:763-773.

Gáspár R, Jr., Bagossi P, Bene L, Matkó J, Szöllösi J, Tózsér J, Fésüs L, Waldmann TA and Damjanovich S. Clustering of class I HLA oligomers with CD8 and TCR: three-dimensional models based on fluorescence resonance energy transfer and crystallographic data. *J Immunol* (2001) **166**:5078-5086.

Geourjon C and Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* (1995) **11**:681-684.

Gerber D, Sal-Man N and Shai Y. Two motifs within a transmembrane domain - one for homodimerization and the other for heterodimerization. *J Biol Chem* (2004).

Goetz M, Carlotti C, Bontems F and Dufourc EJ. Evidence for an alpha-helix --> pi-bulge helicity modulation for the neu/erbB-2 membrane-spanning segment. A ¹H NMR and circular dichroism study. *Biochemistry* (2001) **40**:6534-6540.

Guermeur Y, Geourjon C, Gallinari P and Deleage G. Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics* (1999) **15**:413-421.

Hawley TS, Herbert DJ, Eaker SS and Hawley RG. Multiparameter flow cytometry of fluorescent protein reporters. *Methods Mol Biol* (2004) **263**:219-238.

Holbro T, Civenni G and Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* (2003) **284**:99-110.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW and Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* (2003) **284**:31-53.

Jovin TM. Quantum dots finally come of age. *Nat Biotechnol* (2003) **21**:32-33.

Kim S, Chamberlain AK and Bowie JU. A simple method for modeling transmembrane helix oligomers. *J Mol Biol* (2003) **329**:831-840.

Kumagai T, Katsumata M, Hasegawa A, Furuuchi K, Funakoshi T, Kawase I and Greene MI. Role of extracellular subdomains of p185c-neu and the epidermal growth factor receptor in ligand-independent association and transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:9220-9225.

Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM and Schlessinger J. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *Embo J* (1997) **16**:281-294.

Lidke DS, Nagy P, Barisas BG, Heintzmann R, Post JN, Lidke KA, Clayton AH, Arndt-Jovin DJ and Jovin TM. Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET). *Biochem Soc Trans* (2003) **31**:1020-1027.

MacKenzie KR, Prestegard JH and Engelman DM. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* (1997) **276**:131-133.

Maecker HT, Frey T, Nomura LE and Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry* (2004) **62A**:169-173.

Maxfield FR and Scheraga HA. Status of empirical methods for the prediction of protein backbone topography. *Biochemistry* (1976) **15**:5138-5153.

- Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R and Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* (2001) **61 Suppl 2**:67-72.
- Mendrola JM, Berger MB, King MC and Lemmon MA. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* (2002) **277**:4704-4712.
- Moriki T, Maruyama H and Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* (2001) **311**:1011-1026.
- Munster PN, Srethapakdi M, Moasser MM and Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function by ansamycins causes the morphological and functional differentiation of breast cancer cells. *Cancer Res* (2001) **61**:2945-2952.
- Nagy P, Vámosi G, Bodnár A, Lockett SJ and Szöllösi J. Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy. *Eur Biophys J* (1998) **27**:377-389.
- Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, Jovin TM and Szöllösi J. Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res* (1999) **5**:255-271.
- Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, Park JW, Jovin TM and Szöllösi J. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci* (2002) **115**:4251-4262.
- Nagy P, Bene L, Balázs M, Hyun WC, Lockett SJ, Chiang NY, Waldman F, Feuerstein BG, Damjanovich S and Szöllösi J. EGF-induced redistribution of erbB2 on breast tumor cells: flow and image cytometric energy transfer measurements. *Cytometry* (1998) **32**:120-131.
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* (2002) **110**:775-787.
- Pandolfi PP. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med* (2004) **351**:2337-2338.
- Park JW, Benz CC and Martin FJ. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Semin Oncol* (2004) **31**:196-205.
- Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP and Landau EM. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* (1997) **277**:1676-1681.
- Penuel E, Akita RW and Sliwkowski MX. Identification of a region within the ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association. *J Biol Chem* (2002) **277**:28468-28473.

Qian N and Sejnowski TJ. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *J Mol Biol* (1988) **202**:865-884.

Sali A and Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* (1993) **234**:779-815.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI and Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* (1984) **312**:513-516.

Sebestyén Z, Nagy P, Horváth G, Vámosi G, Debets R, Gratama JW, Alexander DR and Szöllösi J. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* (2002) **48**:124-135.

Shapiro HM. Practical flow cytometry. John Wiley & Sons, Inc.; 2003. p.

Sharpe S, Barber KR and Grant CW. Evidence of a tendency to self-association of the transmembrane domain of ErbB-2 in fluid phospholipid bilayers. *Biochemistry* (2002) **41**:2341-2352.

Shiroo M, Goff L, Biffen M, Shivnan E and Alexander D. CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx. *Embo J* (1992) **11**:4887-4897.

Siegel PM and Muller WJ. Mutations affecting conserved cysteine residues within the extracellular domain of Neu promote receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) **93**:8878-8883.

Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD and Muller WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *Embo J* (1999) **18**:2149-2164.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1987) **235**:177-182.

Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM and Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* (1999) **26**:60-70.

Snyder B and Freire E. Fluorescence energy transfer in two dimensions. A numeric solution for random and nonrandom distributions. *Biophys J* (1982) **40**:137-148.

Stamos J, Sliwkowski MX and Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* (2002) **277**:46265-46272.

Stein RA and Staros JV. Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *J Mol Evol* (2000) **50**:397-412.

Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* (1978) **47**:819-846.

Szentesi G, Horváth G, Bori I, Vámosi G, Szöllősi J, Gáspár R, Damjanovich S, Jenei A and Mátyus L. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* (2004) **75**:201-211.

Szöllősi J, Trón L, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin D and Jovin TM. Fluorescence energy transfer measurements on cell surfaces: a critical comparison of steady-state fluorimetric and flow cytometric methods. *Cytometry* (1984) **5**:210-216.

Szöllősi J, Nagy P, Sebestyén Z, Damjanovich S, Park JW and Mátyus L. Applications of fluorescence resonance energy transfer for mapping biological membranes. *J Biotechnol* (2002) **82**:251-266.

Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* (1994) **22**:4673-4680.

Trón L, Szöllősi J, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin DJ and Jovin TM. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys J* (1984) **45**:939-946.

Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ and Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* (1996) **16**:5276-5287.

Vámosi G, Bodnár A, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllősi J, Waldmann TA, et al. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**:11082-11087.

van der Meer BW. Kappa-squared: from nuisance to new sense. *J Biotechnol* (2002) **82**:181-196.

van der Meer BW, Coker G and Chen S-YS. Resonance energy transfer: theory and data. VCH Publishers, Inc.; 1994. 5-33 p.

Vaughn JP, Iglehart JD, Demirdji S, Davis P, Babiss LE, Caruthers MH and Marks JR. Antisense DNA downregulation of the ERBB2 oncogene measured by a flow cytometric assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**:8338-8342.

Vereb G, Szöllősi J, Matkó J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Mátyus L, Waldmann TA and Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:8053-8058.

Vereb G, Jr., Meyer CK and Jovin TM. Novel microscope-based approaches for the investigation of protein-protein interactions in signal transduction. In: Heilmeyer L. M. G., editor^editors.; 1996 sept 10-19; Acquafredda di Maratea, Italy. Springer Verlag. p.

Vereb G, Jr., Szöllősi J, Damjanovich S and Matkó J. Exploring membrane microdomains and functional protein clustering in live cells with flow and image cytometric methods. *Annual Reviews in Fluorescence* (2004) **in press**.

Vermeer JE, Van Munster EB, Vischer NO and Gadella TW, Jr. Probing plasma membrane microdomains in cowpea protoplasts using lipidated GFP-fusion proteins and multimode FRET microscopy. *J Microsc* (2004) **214**:190-200.

Wolber PK and Hudson BS. An analytic solution to the Forster energy transfer problem in two dimensions. *Biophys J* (1979) **28**:197-210.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* (2001) **37 Suppl 4**:S3-8.

Yarden Y and Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) **2**:127-137.

Yguerabide J. Theory for establishing proximity relations in biological membranes by excitation energy transfer measurements. *Biophys J* (1994) **66**:683-693.

Zimet DB, Thevenin BJ, Verkman AS, Shohet SB and Abney JR. Calculation of resonance energy transfer in crowded biological membranes. *Biophys J* (1995) **68**:1592-1603.

9. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. Bagossi P., **Horváth G.**, Vereb G., Szöllősi J., Tózsér J.: Molecular modeling of nearly full length ErbB2 receptor. *Biophys J* (2005) 88:1354-1362. **IF: 4,463**
2. **Horváth G.**, Petrás M., Szentesi G., Fábrián Á., Park J.W., Vereb G., Szöllősi J.: Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements. *Cytometry* (2005) (*közlésre elfogadva*) **IF: 2,095**

Egyéb közlemények:

1. Sebestyén Z., Nagy P., **Horváth G.**, Vámosi G., Debets R., Gratama J.W., Alexander D.R., Szöllősi J.: Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* (2002) 48:124-135. **IF: 2,095**
2. Nagy P., Vereb G., Sebestyén Z., **Horváth G.**, Lockett S.J., Damjanovich S., Park J.W., Jovin T.M., Szöllősi J.: Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J. Cell Scien.* (2002) 115(Pt 22):4251-4262. **IF: 7,250**
3. Szentesi G., **Horváth G.**, Bori I., Vámosi G., Szöllősi J., Gáspár R., Damjanovich S., Jenei A., Mátyus L.: Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* (2004) 75:201-211. **IF: 0,724**
4. Diermeier S., **Horváth G.**, Knuechel-Clarke R., Hofstaedter F., Szöllősi J., Brockhoff G.: Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res.* (2005) 304(2):604-619. **IF: 3,949**

10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI