

**Áramlási citometriás FRET mérések optimalizálása és alkalmazása a majdnem teljes
ErbB2 molekula modellezésében**

Horváth Gábor

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



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

1. BEVEZETÉS

A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata segítségünkre lehet a sejtek magasabb szerveződési szintű molekuláris komplexeinek, azok struktúra-függő funkciójának, és ezen keresztül 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, ép funkciójú sejteken.

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 szilárdtest lézerek váltak elérhetővé, és nagyszámú új fluoreszkáló festékmolekula került kifejlesztésre. A sok lehetséges kombináció így felveti, hogy milyen festékek is tekinthetők optimálisnak egy adott lézergyjesszettel rendelkező áramlási citométernél. Munkánk során hét fluoreszkáló festéket vizsgáltunk meg három áramlási citométeren és meghatároztuk a FCET mérések jellemzésére alkalmas paramétereket.

Az ErbB2 az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család tagja és a sejtek proliferációjáért és differenciálódásáért felelős. A receptor kóros (túlzott) működése figyelhető meg számos tumoros elváltozásban, mint például emlő-, petefészek- és gyomortumzorokban, ami többnyire a receptor gén amplifikációján és a fehérje megnövekedett sejt felszíni 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. Kísérleteinkben az általunk optimalizált FCET módszerrel kívántuk feltérképezni az extracelluláris doménen lévő antitest kötőhelyeket, és megállapítani az ektodomén sejtmembránhoz való orientációját. Ezután molekula modellezési eljárások segítségével kívántuk megalkotni az ErbB2 molekula teljes szerkezetét.

A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer elmélete és áramlási citometriás megvalósítása

A FRET jelenség egy olyan folyamat, melynek során egy gerjesztett állapotban lévő fluoreszkáló molekula (donor) energiáját, foton megjelenése nélkül, egy nagy hatótávolságú

dipólus-dipólus kölcsönhatás eredményeként egy másik molekulának (akceptor) adja át. Az energiatranszfer hatékonysága a donor és akceptor távolságára rendkívül érzékeny és a távolság hatodik hatványával meredeken csökken 1 – 10 nm távolságon belül, így mintegy „spektroszkópiás vonalzóként” használható és molekuláris asszociációk becsülhetők meg a segítségével.

Az ideális FRET festékpár esetén a donor emissziós spektruma jelentős mértékben átfed az akceptor molekula gerjesztési spektrumával. Az energiatranszfer eredményeként a donor molekula fluoreszcencia intenzitása (és kvantumhatékonysága) akceptor molekula jelenlétében lecsökken (donor kioltás). Fluoreszkáló akceptor esetén ezzel párhuzamos folyamat az akceptor szenzitizált emissziója, amikor a donort gerjesztve megnövekedett fluoreszcencia intenzitást észlelünk az akceptornak megfelelő emissziós hullámhosszakon.

Az áramlási citométerre kifejlesztett fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer módszer (FCET) nagy számú sejten, rövid időn belül nyújt információt a membránfehérjék sejtfelszíni eloszlásáról és a biológiailag aktív molekulák konformációjának változásairól. Ezt a módszert számos biológiai rendszeren sikerrel alkalmazták már: például membránfehérjék asszociációs állapotának nyomon követésére immunkompetens, valamint különféle daganat sejtek esetében.

Az ErbB2 receptor tirozinkináz szerepe tumoros elváltozásokban

A transzmembrán receptor tirozinkinázok I. típusú - epidermális növekedési faktor receptor - családjának négy tagja van: az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR vagy ErbB1), ErbB2 (HER2 vagy Neu), ErbB3 (HER3) és ErbB4 (HER4). Ezek a receptorok fontos szerepet játszanak a sejtek proliferációjának, differenciálódásának, apoptózisának és migrációjának szabályozásában. Aktiválásukban tucatnál is több, növekedési faktor jellegű ligandum vehet részt: EGF, TGF α , Neuregulin, HB-EGF, Epiregulin, Amfiregulin és β -Cellulin, kivéve az ErbB2-nél, melynek ezidáig nem ismert természetes liganduma. A receptorok asszociációit tekintve az EGFR családon belül a helyzet igen bonyolult, mivel nem csak homo-, de heterodimereket is képezhetnek egymással, így az egyes növekedési faktorok transz-aktiválhatják az őket közvetlenül nem kötő receptorokat is. A képződött dimerek (vagy nagyobb oligomerek) összetételét az egyes receptorok relatív expressziós szintje, egymáshoz való affinitásuk, és a jelenlévő ligandumok koncentrációja határozza meg. Az ErbB2 az egyik preferált heteroasszociációs partner, ami leginkább az ErbB2-ErbB3 heterodimer esetében jelentős, ugyanis az ErbB3 nem rendelkezik saját tirozinkináz aktivitással, s így csak heterodimerben képes aktiválódni.

Az ErbB2 molekulát először egy protoonkogén mutánsaként azonosították. 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, és normál felnőtt szövetekben csak ritkán fejeződik ki. Ezzel szemben az emlőtumrok 25 - 30 %-ában kimutatható a fehérje túlzott expressziója, ami agresszív fenotípussal, kemoterápiával szemben mutatott rezisztenciával és rossz prognózissal társítható. Ezek 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. Ilyen lehetséges terápiák: antitest terápia, immuno-liposzómákkal történő specifikus „drug-delivery”, génamplifikáció megszüntetése „antisense” oligonukleotidokkal, specifikus tirozinkináz inhibitorok alkalmazása, valamint hősokkfehérjék specifikus blokkolása félszintetikus drogokkal.

Az ErbB receptorok felépítése hasonló, ennek részleteiről - elsősorban kristályszerkezeti tanulmányok alapján - számos közlemény számolt be, így az EGFR, ErbB2 és ErbB3 extracelluláris doménjének szerkezetéről, valamint az EGFR tirozinkináz doménjéről. A receptorok szerkezete alapvetően a következő részekből áll: négy doménből (L1, CR1, L2 és CR2) felépülő, ligandum kötő extracelluláris rész, egy transzmembrán hélix, egy tirozinkináz domén, és egy tirozin foszforilációs helyeket tartalmazó C-terminális farok rész. 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 jelentős konformációváltozást indukál a receptor extracelluláris doménjében. Az ErbB2 extracelluláris domén szerkezete viszont azt mutatja, hogy ennek ligandkötőhelye csukott állapotban van, és a fenti két domén közvetlenül érintkezik. Az ErbB fehérjék dimerizációjának lehetséges szerkezeti mechanizmusa a ligandum indukálta konformációs változással magyarázható. Ligandum nélkül az EGFR és az ErbB3 úgynevezett „zárt” konformációban van, azaz a cisztein gazdag CR1 domén kölcsönhat a CR2 domén egy részével. A ligandum-kötött, „nyitott” állapotban a CR1 domén kiáll a molekulából, és kristályszerkezete alapján ez felelős az EGFR dimer kialakulásáért, amit eddig csak ligandum-kötött molekulánál tapasztaltak. Ezzel szemben az ErbB2 extracelluláris doménje mindig „nyitott” állapotban található, még monomer formában is, ami megmagyarázhatja, hogy miért ez a molekula a család másik három tagjának a kedvelt dimerizációs partnere.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során új fluoreszcens molekulák és áramlási citométerek alkalmazhatóságát szeretnénk volna 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?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek

Kísérleteinkben az ErbB2 és MHC I molekulákat nagy számban kifejező SK-BR-3 emlő és N87 gyomor karcinóma sejt vonalakat alkalmaztunk.

Antitestek

A fluoreszkáló festékek tesztelésénél W6/32 (az MHC I nehéz lánc ellen) és L368 (a β 2-mikroglobulin ellen) egész monoklonális antitesteket használtuk. Az ErbB2 epitóp térképének elkészítéséhez 4D5 (Trastuzumab, Herceptin™) és 2C4 (Pertuzumab, Omnitarg™) Fab', 7C2 Fab és F5 scFv antitesteket használtuk. 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.

A 7C2 antitest Fab fragmentumait egy már korábban ismertetett módszer szerint állítottuk elő. A teljes antitest papain emésztését követően a reakciót jódcetamiddal állítottuk le, majd Sephadex G-100 oszlopon választottuk el az Fab és Fc fragmentumokat tartalmazó frakciókat. Az Fab fragmentumokat protein A oszlopon szeparáltuk az Fc résztől.

A fluoreszkáló festékek tesztelésére végzett kísérleteinkben a kb. 1 mg/ml koncentrációjú W6/32 antitestet donor festékek (Cy3, Alexa546, Alexa555 és Alexa568), míg az L368 antitestet akceptor festékek (Cy5, Alexa633 és Alexa647) szukcinimid észter származékaival konjugáltuk a termékek leírásának megfelelően. Az antitesthez nem kötődött festéket gélszűrővel távolítottuk el Sephadex G-25 oszlop segítségével. A festék-fehérje jelölési arányt 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 leírásnak megfelelően. Az antitesthez nem kötődött festéket gélszűrővel távolítottuk el Sephadex G-25 oszlop segítségével. A festék-fehérje jelölési arányt spektrofotométerrel határoztuk meg, értéke 1 körül volt.

Sejtfelszíni jelölések FCET mérésekhez

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

A membrántól való távolság FRET alapú 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-foszfátidilkolinnal (BODIPY-PC (581/591)) jelöltük, ami FRET akzeptorként 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 végtérfogatban. 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.

Áramlási citometriás energiatranszfer mérések

Az új fluoreszkáló festékek teszteléséhez a FCET méréseket három kereskedelemben kapható áramlási citométeren végeztük: FACSCalibur, FACSVantage SE DiVa opcióval bővítve és FACSArray. A citométerek beállításai:

		<i>I</i> ₁ donor	<i>I</i> ₂ szenz. akceptor	<i>I</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

Az anti-ErbB2 antitestek egymás, és önmaguk között mért transzfer hatékonyság értékeit FACSCalibur citométeren határoztuk meg, a mérésekhez Cy3- és Cy5-konjugált antitest Fab'-kat használtunk. A donor és akceptor jelölt antitestek átlagos távolságára jellemző energiatranszfer hatékonyságot sejtenként számoltuk ki.

A fehérje membrántól való távolságának FRET módszerrel történő meghatározásánál a fluoreszkáló festékekkel jelzett molekulát nagyszámú akceptor festékekkel jelzett lipid veszi körül, ezért a FRET hatékonyság nemcsak a távolság, de a donor-akceptor arány függvénye is. Ilyen esetekben csak a jelzett epitóp sejtmembrán síkjától való merőleges távolsága számít, ami jól közelíthető Yguerabide elméleti modelljével. A modell szerint „steady state” állapotban a donor intenzitás lineárisan változik az akceptor lipid szonda felületi sűrűségével, és a változás mértéke a membrántól való távolság negyedik hatványának függvénye.

A membrántól való távolság meghatározásához a kísérleteket 488 és 514 nm-es lézergyjtéssel felszerelt FACSSStar^{PLUS} áramlási citométerrel végeztük. A donor intenzitás változását a BODIPY-PC (581/591) akceptor lipid szonda felületi sűrűségének függvényében ábrázoltuk, és a kísérleti adatokra egyenest illesztettünk. A BODIPY-PC felületi sűrűségét a hozzáadott festék és a sejtek koncentrációjából számoltuk, teljes festékfelvételt feltételezve.

Az ErbB2 domének szerkezetének megállapítása

Az ErbB2 és EGFR extracelluláris doménjének kristályszerkezetét a Protein Data Bankból töltöttük le. A nem ismert részeket Modeller és Sybyl szoftverekkel építettük. Az ErbB2 transzmembrán (TM) hélix NMR szerkezetét használtuk fel a TM dimerek szerkesztéséhez, valamint mintaként felhasználtuk a glikoforin A, a fotoszintetikus reakció központ és a bakteriorodopszin TM régióit. A transzmembrán és a tirozinkináz domének között található, belső membránközeli régiónál az alábbi másodlagos szerkezeti predikciós módszereket használtuk: a GOR, Maxfield-Scheraga és Qian-Sejnowski Sybyl-ben implementált eljárásokat, a GOR4, SOPMA Jnet és HNN eljárásokat, melyek elérhetők az ExPASy molekuláris biológiai szerveren (<http://www.expasy.org>). Az ExPASy szervert BLAST szekvencia hasonlósági keresésekhez is használtuk. Az ErbB2 tirozinkináz doménjének homológ modelljét Modeller szoftverrel építettük az ErbB1 tirozinkináz doménjének kristályszerkezetére és ClustalW szoftverrel készült szekvencia illesztés alapján. A modellezés során esetleg keletkezett, kedvezőtlen van der Waals kölcsönhatások kiiktatására rövid minimalizációkat alkalmaztunk a modellezési folyamat több lépésénél.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

Az energiatranszfer hatékonyságát befolyásoló tényezők FCET mérésekben

A FRET mérésekben használható festékpárok alkalmazhatóságának meghatározására négy paramétert találtunk relevánsnak, ezek a normalizált fluoreszcencia intenzitás, spektrális átfedési integrál, normalizált energiatranszfer hatékonyság 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, hogy a donor jel legalább kétszerese legyen a háttér intenzitásnak. Hogy megkapjuk az azonos számú festékre vonatkozó fluoreszcencia intenzitást, az átlag fluoreszcens jelekből először levontuk az átlag háttér intenzitás értékeit, majd elosztottuk a festék-fehérje jelölési aránnyal. Az így normalizált fluoreszcencia intenzitás értékek 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, 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 a sejtfelszínen (vagy a sejtben) jellemző Q_D érték nem határozható meg pontosan a konjugátatlan festék paramétereiből. Jelen tanulmányban a kritikus Förster távolság helyett a spektrális átfedési integrált használtuk. A J_{DA} átfedési integrált a festékek gyártói által ismertett színeképek alapján számoltuk. 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 szintén meg kell vizsgálni, hogy megállapíthassuk az E értékek megfelelő 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 terheltek a számolási módszer miatt. Ahhoz, hogy az egyes festékpárookra kapott hatékonyság értékeket összehasonlíthassuk, normalizálni kell az értékeket a gerjesztési színeképekre, a kvantumhatékonyságra, és a jelölési donor-akceptor arányra. Utóbbihoz 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 kell

számolni, mivel az antitestek számának aránya közelítőleg egy. Ugyanakkor, mivel a FRET hatékonyság nem lineárisan aránylik a jelölési arányokhoz, ezért az $A = E/(1 - E)$ értékeket kell használni a normalizáláshoz. A normalizált FRET hatékonyság értékek az Alexa568 donort tartalmazó pár esetében voltak a legnagyobbak, például az Alexa568 és Alexa633 párra 0,80 volt a normalizált transzfer hatékonyság FACSDiVa citométeren, míg a legalacsonyabbak értéket (kb. 0,22) az Alexa546 donort tartalmazó párokra kaptuk FACSCalibur-on.

Egy másik fontos paraméter az *efr* együttható. Az *efr* együttható a festékek donor gerjesztési hullámhosszon vett moláris abszorpciós együtthatóinak arányaként számolható, és minél nagyobb az értéke, annál pontosabb a FRET hatékonyság meghatározása. Ezt a fizikai paramétert nem lehet megbízhatóan meghatározni a festékek elnyelési színe alapján, viszont arra lehetőség van, hogy a FRET hatékonyságot meghatározzuk, majd az *efr* együtthatót 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 megegyezzen a csak donor jelzett minta fluoreszcencia intenzitásával. Az ily módon meghatározott *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.

A közölt J_{DA} és *efr* együttható értékek más kísérletekben is felhasználhatók. Mivel az átfedési integrálokat a festékek ismert gerjesztési és kibocsátási színe alapján számoltuk, ezek az értékek felhasználhatók a kritikus Förster távolság kiszámítására a donor kvantumhatékonyságának ismeretében. Az *efr* együttható legfontosabb tulajdonsága, hogy az egyes festékpárookra kapott értékek azonos optikai rendszerrel ellátott citométerek között átvihetők, és felhasználhatók FCET mérések értékeléséhez. Az itt meghatározott *efr* együtthatók eltérnek a színek alapján számítottaktól, de a közölt értékek pontosabbak biológiai rendszereken végzett mérésekben, mivel élő sejtek felszínéhez kötődő fluoreszkáló antitestekre vonatkoznak.

A FCET mérésekhez optimális fluoreszkáló festékpár kiválasztása

A négy donor és három akceptor festék nagyszámú kombinációban képezhet párt, ezért le kívántuk szűkíteni a tartományt, amelyben az optimális festékpárt kerestük. A Cy3 festéknek a legkisebb az átfedési integrálja és a FRET hatékonyság értékei, valamint ennek a legkisebb a fluoreszcencia kvantumhatásfoka. Egy másik kiugró adat az Alexa568 festék igen magas J_{DA} és E_{norm} értékei, amelyek azonban ellentétben állnak a rendkívül alacsony intenzitás

és *efr* értékekkel, ami kevésbé megbízható FRET hatékonyság hisztogramokhoz vezet, és gyakorlatilag célszerűtlenné teszi a festék FCET mérésekben való használatát a vizsgált citométereken. Így ezt a két donor festéket (Cy3 és Alexa568) nem vettük figyelembe a további vizsgálatokban. Az akceptor festékekre jellemző paramétereknél nem találtunk hasonló kiugró értékeket. Ezért a további vizsgálatokban az Alexa546 és Alexa555 donor, illetve a Cy5, Alexa633 és Alexa647 akceptor festékeket (hat festékpárt) használtuk.

Először az intenzitásokat elemeztük és azt találtuk, hogy az Alexa546 körülbelül kétszer akkora fluoreszcencia intenzitást mutat, mint az Alexa555. Az akceptor festékeknél nem találtunk ilyen nagy különbségeket. 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.

Ezután a spektrális átfedési integrálokat (J_{DA}) vizsgáltuk meg, mivel a kritikus Förster távolságon keresztül ezek határozzák meg az energiatranszfer érzékenységi tartományát. Az összes esetben az Alexa633 akceptor adta a legkisebb és az 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).

Ezek után a normalizált FRET hatékonyság értékeket vizsgáltuk meg. A két donorral közel hasonló értékeket kaptunk, 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.

Utolsónak az *efr* együtthatót vizsgáltuk, és itt találtuk a legnagyobb eltéréseket. Az Alexa555 festékpárokra magasabb *efr* együttható adódott, mint az Alexa546-ot tartalmazó párokra. Ugyanakkor az Alexa633-al kapott értékek nagyjából ugyanakkorák voltak, 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. Tehát az *efr* értékek alapján az Alexa555-Cy5 pár látszik a legjobb választásnak FCET mérésekhez.

Három műszer-függő paramétert az Alexa546-Alexa647 párra FACSArray áramlási citométeren is meghatároztunk. A normalizált fluoreszcencia intenzitások a FACSDiVán kapott értékeknél is magasabbak voltak, feltehetőleg a küvettás megvilágítási rendszernek

köszönhetően. A normalizált FRET hatékonyság érték magasabb volt, mint amit a FACSCaliburon és FACSDiVán kaptunk. Az *efr* együtthatót a fentiekhez hasonló módon határoztuk meg, és értéke ugyanannyi volt, mint a FACSDiVán a hasonló lézergyjlesztésnek és detektálási rendszernek köszönhetően.

A festékek tulajdonságait összegezve elmondhatjuk, hogy két donor festék, az Alexa546 és az Alexa555 minden szempontból igen hasonlóak voltak, de a legtöbb esetben az Alexa555 bizonyult kiválóbbnak. Ugyanakkor egy donor festék esetén a legfontosabb paraméter a mért fluoreszcencia intenzitás és a donor csatornában detektálható jel/zaj viszony, ami alapján az Alexa546 a jobb FRET donor partner. Akceptor festék esetén a donor fluoreszcencia csatornába való átvilágítás hiánya 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.

A négy releváns paraméter (normalizált fluoreszcencia intenzitás, átfedési integrál, normalizált energiatranszfer hatékonyság és *efr* együttható) vizsgálata alapján azt találtuk, hogy az Alexa555-Cy5 és az Alexa546-Alexa647 festékpárok rendelkeznek a legjobb jellemzőkkel. Az első pár rendelkezik a legmagasabb 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 fotokémiai labilitása is fontos, így mikroszkópos akceptor fotoelhalványításos FRET méréseknél az Alexa555-Cy5 a legjobb választás.

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 szinképek ismeretében. Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a FCET mérések érzékenységének növelése érdekében nem elegendő, hogy, mint az korábban leírtuk, olyan fluoreszkáló festékeket alkalmazzunk, 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 értékeket 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 hasonlónak kell lenni, és az esetleges eltérések a minták biológiai változékonyságának tudhatók be. Ugyanakkor a donor gerjesztésére használt lézer hullámhossz megváltoztatása nagyban befolyásolhatja a festék kvantumhatékonyságát, ami a Förster távolságon keresztül hatással van a FRET hatékonyság értékére is. Egy megfelelőbb 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.

Az ErbB2 epitópok egymástól mért molekuláris távolságai

Az ErbB2 receptor extracelluláris doménjének és azok dimerjének modelljét négy antitest segítségével kívántuk megszerkeszteni: a 4D5, 2C4, 7C2 és F5 antitestekkel. A 4D5 monoklonális antitest humanizált változatát (Trastuzumab) Herceptin™ kereskedelmi néven már a klinikai gyakorlatban is használják magas ErbB2 expressziójú emlőtumorok esetében, míg a 2C4 humanizált változata (Pertizumab) Omnitarg™ néven 2. fázisú klinikai kipróbálás alatt áll, és a remények szerint olyan tüdő- és prosztatatumor fenotípusoknál is alkalmazható, melyekben az ErbB receptorok expressziós szintje alacsonyabb. Az F5 scFv antitestet liposzómához kapcsoltn kívánják használni célzott gyógyszeres terápiában.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a négy jelölt antitest egymástól való molekuláris távolságait, valamint egy-egy ErbB2 molekulához azonos epitópon kapcsolódó, donor és akceptor jelölésű antitest segítségével az ErbB2 intermolekuláris (homodimerizációs) távolságait is. A FRET hatékonyság értékek minden esetben a megbízhatósági határ (5 %) körül vagy felett voltak, és számottevően eltértek a csak donorról jelzett mintára (negatív kontroll) kapott értéktől. Hasonló adatokat kaptunk az SK-BR-3 és N87 sejtvonalakon (a továbbiakban csak az N87 sejtvonalról nyert adatokat ismertetjük).

Az intra- és intermolekuláris jelölésnek megfelelő FRET hatékonyság eloszlási hisztogramok alapján a 4D5 és 2C4 között mértük a legmagasabb transzfer hatékonyságot, 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.

Az egymástól való molekuláris távolság adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a 4D5 és 2C4 antitestek végpontjai találhatóak legközelebb egymáshoz (6,2 nm), míg a többi a kimutathatósági határ közelében, igen messze helyezkedik el egymástól. Az intermolekuláris transzfer hatékonyság (7 – 14 %) és távolság (6,8 – 7,7 nm) értékek igen hasonlóak voltak egymáshoz. Elméleti megfontolások alapján ez kétféleképpen magyarázható: egyrészt elképzelhető, hogy az antitestek végén elhelyezkedő festékmolekulák 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 az egyszerű képet árnyalja a festékmolekulák membrántól való távolsága, amiből meghatározható az antitestek kötőhelyüknél mérhető, membránhoz viszonyított dőlésszöge.

Az ErbB2 epitópok membrántól való távolsága

Az antitestek sejtmembrántól való távolságának meghatározásához Yguerabide módszerét alkalmaztuk. 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 transzfer hatékonyság változását.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a négy jelölt antitest membrán síkjától vett vertikális távolságait. 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. A membránra merőleges molekuláris távolságokat három független kísérletben meghatározott, illesztett egyenesek meredekségének átlagaiból számoltuk.

Az 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 (rendre 4,7, 6,1 és 7,4 nm). Ennek ellentmondani látszott, hogy a 4D5 kötőhelye, „phage display” kísérletek alapján, a membránhoz közel található, ami viszont feloldható, ha azt feltételezzük, hogy a 4D5 Fab’ a membrántól elfele áll. Ezeket a távolság adatokat alátámasztotta az ErbB2 ektodomén 4D5 és 2C4 Fab-kkal képzett komplexeinek a méréseket követően publikált röntgen kristályszerkezete, és a további számításoknál ezeket a koordinátákat használtuk fel.

A majdnem teljes hosszúságú ErbB2 dimer modellje

Noha kísérleteinkben mind a négy Fab antitest egymástól és a membrántól való távolságait meghatároztuk, az itt közölt molekulamodellizációs számításoknál csak a 4D5 Fab antitest távolság adatait használtuk fel. Ennek oka, hogy a 2C4, szerkezeti adatok alapján, gátolja a homo- és heterodimerek képződését, az F5 scFv antitestnek kicsi az affinitása és erősen kompetál a többi antitesttel, míg a 7C2 kötőhelyét pedig – mivel nem állt rendelkezésre SH-reaktív festékkel 1:1 arányban jelölhető Fab, még nem sikerült teljes bizonyossággal meghatároznunk.

Az ErbB2 dimer modelljének felépítését az ErbB2 extracelluláris doménjével kezdtük. Feltételeztük, hogy az ErbB2 dimer felvehet az EGFR kristályszerkezeti dimerhez hasonló konformációt. Az ErbB2 Herceptin Fab-val képzett komplex modelljének két másolatát az EGFR dimer kristályszerkezetének A és B láncával hoztuk fedésbe, és a dimerizációs hurkok konformációját az EGFR dimerhez hasonlóra változtattuk Modeller szoftverrel. A fedésbe hozott régiók csak a CR1 domének elemeit tartalmazták (a CR2 dimerizációs hurkot nem), mivel az EGFR és ErbB2 L és CR doménjeinek eltérő relatív pozíciója a két monomer rossz átfedését eredményezheti. 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.

Bár 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 lehet a több lehetséges közül. A FRET módszerrel mért 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 ErbB2 ektodomének lehetséges dimerizációja mellett a transzmembrán domén (TM) is dimerizálódhat. Az ErbB2 TM domén dimer megszerkesztéséhez ismert szerkezetű membrán fehérje, a fotoszintetikus reakció központ molekula transzmembrán alfa-hélix párjait használtuk kiindulási alapul. Két ErbB2 TM hélix NMR-el meghatározott szerkezetét a mintaként szolgáló alfa-hélix pár elemeivel fedésbe hoztuk, majd rövid minimalizálást alkalmaztunk. A hélix dimert az ektodomén dimer alá helyeztük az ektodoménnel azonos 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 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. A két domén közötti rést 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.

Az CR2 domén C-terminális része nem rendezett, vagy nincs jelen az ErbB molekulák kristályszerkezeteiben, és flexibilis kart alkothat a külső membránközeli régióval, ahogy azt az ErbB1 membránközeli régiójára megmutatták. 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 és mutációs vizsgálatok sugallnak.

A transzmembrán és a protein kináz közötti membránközeli régió másodlagos szerkezetét a Sybyl szoftver, valamint az ExPASy molekuláris biológia szerver (<http://www.expasy.org>) különböző módszereivel becsültük. Mindegyik becslési módszer alfa-hélix szerkezetet valószínűsített a szekvencia N-terminális felére. Az alfa-helikális transzmembrán szegmens közelsége, valamint a másodlagos szerkezet becslések egybehangzó eredménye és a 3HLA fragmentum háromdimenziós szerkezete alapján a 3HLA fragmentum mintaként szolgálhat az ErbB2 belső membránközeli régiójának homológ modellezésénél.

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 négy közös, C-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. 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.

Az extracelluláris és az intracelluláris dimer modelljeit a közös transzmembrán régióon 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. Az így összeálló ErbB2 homodimer szerkezete három potenciális kölcsönhatási felszínnel rendelkezett. 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. 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.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk két fő célja az volt, hogy fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) alapú epitóp térképezési és molekuláris modellezési eljárásokkal az ErbB2 receptor és dimerjének molekuláris modelljét megszerkesszük, valamint, hogy megállapítsuk újonnan kifejlesztett fluoreszkáló festékek és áramlási citométerek használhatóságát áramlási citometriás FRET (FCET) mérésekben. 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.
- 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 távolságait.
- A fenti távolság és irodalmi kristályszerkezeti adatok alapján, molekulamodellezési eljárások segítségével megszerkesztettük a majdnem teljes ErbB2 transzmembrán receptor molekuláris 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, valamint a tirozinkináz régióknál.

6. 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.

7. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. Bagossi P., **Horváth G.**, Vereb G., Szöllősi J., Tőzsér J.: Molecular modeling of nearly full length ErbB2 receptor. *Biophysical Journal* (2005) 88:1354-1362.
IF: 4,463 (JCR 2003)
2. **Horváth G.**, Petrás M., Szentesi G., Fábíán 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, Epub ahead of print*)
IF: 2,095 (JCR 2003)

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 (JCR 2003)
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 Science* (2002) 115(Pt 22):4251-4262.
IF: 7,250 (JCR 2003)
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 (JCR 2003)
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. *Experimental Cell Research* (2005) 304(2):604-619.
IF: 3,949 (JCR 2003)