

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérések optimalizálása

Dr. Fábián Ákos István

Témavezető: Dr. Szöllősi János



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2013

Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérések optimalizálása

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Fábián Ákos István okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálmódszerek programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Dr. Bugyi Beáta, PhD
	Dr. Hevessy Zsuzsanna, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2013. május 6.

Az értekezés bírálói:

Dr. Hild Gábor, PhD
Dr. Jóna István, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Dr. Bugyi Beáta, PhD
	Dr. Hevessy Zsuzsanna, PhD
	Dr. Hild Gábor, PhD
	Dr. Jóna István, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2013. május 6.

I. Bevezetés

A rezonancia energiatranszfer elméletét először 1948-ban ismertette Förster. Ez egy rövid hatósugarú, sugárzásmentes energia átadás egy gerjesztett donor és egy akceptor molekula között. A folyamat során egyidejűleg legerjesztődik a donor és gerjesztődik az akceptor molekula. Amennyiben a donor és az akceptor is fluoreszcens molekula, úgy a folyamatot fluoreszcencia rezonancia energiatranszfernek (FRET) hívják. Az energiatranszfer átmenet valószínűsége fordítottan arányos a donor és akceptor közötti távolság hatodik hatványával, így az energiatranszfer hatékonysága (E) is nagyfokú távolság függést mutat:

$$E = \frac{1}{1 + \frac{r^6}{R_0^6}}$$

ahol r a donor és akceptor közötti távolság és R_0 az úgynevezett Förster távolság, amely jellemző az adott donor-akceptor párra. A Förster távolság felel meg annak a távolságnak, ahol az energiatranszfer hatékonysága 50%.

Ezt a távolság függést használta ki Stryer és Haugland, akik először alkalmazták a FRET-et mint „spektroszkópai vonalzót”. A képalkotó módszerek fejlődésével a FRET később biológiai minták távolság viszonyainak tanulmányozásában is alkalmazást nyert. A FRET kísérletek mára elterjedté váltak, különböző mikroszkópos és áramlási citométeres alkalmazásokkal. Az újabb módszerekkel ki lehet aknázni a fluoreszcens fehérjékben rejlő lehetőségeket és nagy minta kapacitású módszerek is kialakulóban vannak, ezért a FRET módszerek a nanométeres tartomány távolság kérdéseinek megválaszolásának hasznos eszközének tekinthetők.

1. Több, egyidejűleg kölcsönható fluorofór hatása az energiatranszferre

A FRET elmélete egy donor kölcsönhatását írja le egy akceptorral, azonban a legtöbb képalkotó eljárás egyszerre több tíz-száz fluorofór jelét rögzíti. Ráadásul biológiai mintákban az egy donor-egy akceptor kölcsönhatás nem biztosítható. Ennek lehet az az oka, hogy eleve egyenetlenek a fehérje mintázatok, vagy a komplex képződés, fehérje transzlokáció vagy a membránban zajló egyszerű laterális diffúzió következményeként a fehérjék dinamikus újrendeződése jön létre. Ezeken kívül, amennyiben fluoreszcensen jelölt antitesteket használnak, gyakran több fluorofór molekulát kötnek kovalensen egy antitesthez, hogy ezzel jobb jel-zaj arányt érjenek el. Ugyanazzal a donorral egyidejűleg kölcsönható több akceptor növeli az energiatranszfer átmenet valószínűségét. Ez nagyobb transzfer hatékonyságot eredményez anélkül, hogy csökkenne a donor és akceptor közötti távolság. Ezt a hatást figyelembe veszik, amikor kétdimenziós síkban szabadon mozgó fluorofórok vagy egy akceptorokkal telített sík és fölülte elhelyezkedő donor között mérnek energiatranszfert. Ezekben az esetekben speciális modellezési és kalibrációs eljárásokat kell alkalmazni, hogy pontosan lehessen meghatározni a festékek közötti távolságot. Azt is kimutatták, hogy fluoreszcens fehérjékből álló constructokon mérhető transzfer hatékonyság nő, ha növelik az akceptorok számát. Mivel az egy donorral kölcsönható több akceptor hatása a kinetikai állandók szintjén érvényesül, ezért az összes energiatranszfert meghatározó eljárás egy látszólagos, az egy donor-egy akceptor kölcsönhatáshoz képest megnövekedett transzfer hatékonyságot fog mérni. Ezért meg akartuk határozni, hogy több kölcsönható fluorofór hogyan befolyásolja a mért transzfer hatékonyságot. Ehhez egy intramolekuláris modell rendszerben a jelöléshez használt antitestek fluorofór/protein arányát (F/P) változtattuk és megfigyeltük a mért transzfer hatékonyság változását.

2. Transzfer hatékonyság három festékes rendszerekben

Eredetileg a FRET módszerek két festék közötti kölcsönhatás vizsgálatára korlátozódtak. Aztán a 2000-es évek elején felfedezték, hogy egy harmadik festék hozzáadásával bővíthető a hagyományos FRET módszerek hatékonysága. Először is, a harmadik festék „átjátszó toronyként” képes megnövelni a FRET-tel vizsgálható távolság tartományt. Másodszor, a harmadik festék lehetővé tette, hogy egyidejűleg három különböző molekula között lehessen FRET-et és így kölcsönhatást mérni. Ennek nagy jelentősége lehet biológiai kísérletek esetén, ahol magasabb rendű multimerek és többtagú jelátviteli komplexek fontos szerepet játszanak a biológiai funkció vezérlésében. A harmadik festék hozzáadása számos előnnyel jár, ugyanakkor több problémát is magával vonz. Nő a műszerigény, hiszen a választott műszernek képesnek kell lennie három festék gerjesztésére és az egyedi emissziók detektálására. A három festékes FRET rendszerek elméleti hátterét Watrob és mtsai. közzölték 2003-ban. Egy ilyen rendszerben a festékeket növekvő gerjesztési hullámhossz szerint A, B és C festéknek nevezik. A festékek viselkedése a következő: a legrövidebb gerjesztési hullámhosszal rendelkező festék – A festék – a globális donor a B és C festékek számára; a közbülső gerjesztési hullámhosszú festék – B festék – az A festék számára akceptor és a C festék számára donor; a leghosszabb gerjesztési hullámhosszú festék – C festék – a globális akceptor. Az A-ból C-be irányuló teljes energiatranszfer vonatkozásában két fő esetet lehet megkülönböztetni: egy egylépéses, közvetlen energia átadás A és C között (E_{AC}); és egy kétlépéses, közvetett energia átadás, amely során az energia először A-ból B-be (E_{AB}), majd B-ből C-be (E_{BC}) jut. Ezt a második esetet relay-FRET-nek is nevezik. Mivel ebben az esetben az energiatranszfer két egymástól független gerjesztési-legerjesztődési folyamat következménye, ezért a relay-FRET

felírható E_{AB} és E_{BC} szorzataként. Amennyiben az energia átadás közvetlenül történik A-ból B-be és A-ból C-be is, úgy a két akceptor versengésben lesz ugyanazon donorért. Ennek következményeként az eredeti nem-kompetitív energiatranszferek helyett látszólagos, kompetitív FRET-et mérünk. A FRET elmélete egy három festékes rendszerben lényegesen bonyolultabb a két festékes rendszerekénél, ami munkaigényesebb számolást tesz szükségessé. Több módszert is kifejlesztettek a FRET mérésére három festékes rendszerekben. A három festékes rendszer bonyolultsága ugyanakkor számos egyszerűsítést tett szükségessé, akár munkaigényes minta előkészítéssel, korlátozott mintaválasztással vagy bizonyos transzfer folyamatok elhanyagolásával. Ezért fejlesztettünk ki egy új módszert – tripleFRET – amelyet a biológiai minták széles körével lehet alkalmazni és nem igényel különösebb minta előkészítést a minták fluoreszcens jelölését leszámítva.

II. Célkitűzések

Annak érdekében, hogy meghatározzuk több fluorofór együttes kölcsönhatásának FRET-re kifejtett hatását egy intramolekuláris FRET rendszert használtunk, amelyben változtattuk az antitestek fluorofór/protein (F/P) arányát. Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- Milyen a különböző F/P arányú antitest variánsok viselkedése, különös tekintettel az intenzitásukra és sejtfelszíni affinitásukra?
- Hogyan befolyásolja a kölcsönható akceptorok száma a transzfer hatékonyságát?
- Hogyan befolyásolja a kölcsönható donorok száma a transzfer hatékonyságát?

A korábbi három festékes FRET módszerek fél-quantitatív hatékonyság meghatározásra korlátozódtak vagy egyes transzfer folyamatok elhanyagolására szorultak, hogy lehetővé váljon a FRET jelek értelmezése. Legtöbbször a donor quenching valamelyik változatát használták, ami egy külső referencia mintát tesz szükségessé, amiből a nem-quenchelt donor intenzitást határozzák meg. Ezen hiányosságok orvoslására az alábbi célkitűzéseink voltak:

- Lefektessük egy olyan három festékes intenzitás alapú FRET módszer matematikai hátterét, amely lehetővé teszi az A, B és C festékek között létrejövő összes közvetlen energiatranszfer valamint a relay- és teljes-FRET kiszámolását referencia minta nélkül is.
- Hitelesítsük a módszert egy sejtfelszíni fehérjék három festékes jelölésével létrehozott rendszeren és összehasonlítsuk a hagyományos, két festékes rendszerekre kifejlesztett intenzitás alapú eljárással.
- Teszteljük a módszert eltérő kölcsönhatási sémákat követő molekuláris rendszereken.

III. Anyagok és Módszerek

1. *Sejt kultúrák*

Az NCI-N87 emberi gyomor tumor sejtvonalat, amely magas szintű ErbB2 (az epidermális növekedési faktor receptor család tagja) és fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) expresszióval rendelkezik, az American Type Culture Collection-ből (ATCC, Rockville, MD, USA) vettük és a sejteket az ATCC előírásának megfelelően (10% főtális borjú szérumot, 2 mM L-glutamint és 0,25% gentamicint tartalmazó RPMI-ben 5%-os CO₂ légkörben) növesztettük amíg azok el nem érték a konfluenciát. Az áramlási citométeres kísérletekhez a konfluensen kitapadt sejtekből 0,05% tripszint és 0,02% etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA-t) tartalmazó oldat segítségével készítettünk egyedi sejteket tartalmazó sejtuszuspenziót az antitesttel történő jelölések számára.

2. *Antitestek konjugálása fluoreszcens festékkel*

Kísérleteinkhez az alábbi ErbB2-höz kötődő monoklonális antitesteket használtuk: pertuzumab (ajándék a Hoffman-La Roche-tól, Grenzach-Wyhlen, Németország); trastuzumab (Hoffman-La Roche-tól, Grenzach-Wyhlen, Németország vásároltuk); és a H76.5 antitest (a Yosef Yardentől ajándékba kapott azonos nevű hibridóma sejtvonalból preparáltuk). Az amino-reaktív festékek (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555 és Alexa Fluor 647; Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, OR) monofunkcionális szukcimilészter származékainak kovalens kötése az antitestek lizil- ϵ amino csoportjához 8,3 pH-ra beállított 0,1 M-os nátrium-bikarbonát pufferben történt. A nátrium-bikarbonát pufferben oldott festékeket hozzáadtuk az antitest oldatokhoz, majd a keveréket inkubáltuk. A reakcióba nem lépett festékeket egy Sephadex G-50 oszlopon történő gél filtrációval távolítottuk el.

A különböző F/P arányokat az antitest koncentráció, a pH és/vagy a jelölési idő változtatásával érték el.

Az F/P jelölési arányt a 280 nm-en és az alkalmazott festék maximális elnyelési hullámhosszán mért abszorpcióból határoztuk meg egy spektrofotométer (Nanodrop, Wilmington, DE) segítségével és az 1–10 tartományba esett. Az artefaktumok képződésének megelőzésére sejtek jelölése előtt eltávolítottuk az aggregátumokat a festékkel konjugált antitestek oldatából, úgy hogy az oldatot Airfuge ultracentrifugával (Beckman Coulter, Fullerton, CA) centrifugáltuk $110000 \times g$ -vel 20 percig 4°C-on.

3. Sejtek jelölése fluoreszcens antitestekkel

A frissen szuszpendált sejteket kétszer mostuk 4°C-os, foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS; pH 7,4). Centrifugálás után, a sejt pelletet PBS-ben szuszpendáltuk és a sejtkoncentrációt 2×10^7 sejt/ml koncentrációra állítottuk be. Ezután a konjugált antitest oldatból 25 μ l-t adtunk a sejt szuszpenzió 25 μ l-éhez és az elegyet 30 percig inkubáltuk 4°C-on. Az inkubáció során az antitest koncentráció legalább ötszöröse volt a telítési koncentrációnak (100 μ g/mL végső jelölési koncentráció). Az inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel majd fixálásukra 500 μ L 1% formaldehid-PBS-t használtunk. Külön figyelmet fordítottunk arra, hogy a sejtfelszíni molekulák aggregációját elkerüljük, így a sejteket a jelölés során végig 4°C-on tartottuk.

4. Műszerek és minták mérése

Az egyidejűleg több kölcsönható FRET partner hatásának vizsgálatára FACSArray bioanalizátort (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) használtunk. Az áramlási citométer egy 532 nm-es szilárdtest és egy 635 nm-es dióda lézerrel van felszerelve. FRET mérésekhez az 585/42 band pass

(donor csatorna; I_1), 685 long pass (energia transzfer csatorna; I_2), és 661/16 band pass (akceptor csatorna; I_3) szűrőkkel felszerelt detektorokat használtuk. Mindegyik mintából 20000 eseményt rögzítettünk.

A tripleFRET mérésekhez egy DiVa opcióval felszerelt FACSVantage SE áramlási citométert (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) használtunk, amely egy vízűtéses 488 nm-es argon-ion, egy 532 nm-es szilárdtest és egy 633 nm-es léghűtéses HeNe lézerrel van felszerelve. Az alkalmazott fluoreszcencia detektálási csatornák jellemzői: 488 nm-es gerjesztés 530/30 band pass szűrővel (I_1), 488 nm-es gerjesztés 585/42 band pass szűrővel (I_2), 488 nm-es gerjesztés 675/20 band pass szűrővel (I_3), 532 nm-es gerjesztés 585/42 band pass szűrővel (I_4), 532 nm-es gerjesztés 650 long pass szűrővel (I_5), 633 nm-es gerjesztés 650 long pass szűrővel (I_6).

5. Transzfer hatékonyság meghatározása

A FRET kísérleteknél az FSC - SSC kétdimenziós pont hisztogrammon kézi kapuzást alkalmaztunk a törmelékek és sejt aggregátumok kizárására. Egyszeresen jelölt mintákat használtunk a nem-specifikus háttérrel korrigált intenzitások meghatározására az egyes festék csatornák esetén. Két festékes rendszerekben a dupla pozitív populációt kapuztuk ki és használtuk a FRET számolásokhoz. TripleFRET mérésekhez a dupla pozitív, A és B festékre valamint A és C festékre pozitív populációkat kapuztuk ki a három festékkel jelölt mintákon. A két populáció metszeteként képzett populáció A, B és C festékre is pozitív volt, ezt használtuk a tripleFRET kiértékeléshez. Mindegyik energiáttranszfer folyamathoz transzfer hatékonyság hisztogramokat generáltunk, majd kézi kapuzást követően meghatároztuk a transzfer hatékonyság medián értékét.

Az áramlási citométerrel mért FRET adatok kiértékelésére a ReFlex programot használtuk. (A program ingyen elérhető a <http://www.freewebs.com/cytoflex> címen.) Az egyenleteket a program egyenlet szerkesztőjébe adtuk be. Két festékes rendszerek intenzitás alapú transzfer hatékonyságát a következő egyenlet alapján számoltuk:

$$A = \frac{E}{1-E} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2}{I_1}$$

TripleFRET mérésekhez az Eredmények fejezetben ismertetett egyenleteket használtuk. A transzfer hatékonyságként a transzfer hatékonyság eloszlások medián értéke van megadva. Az áramlási citométeres hisztogramokat ReFlex-szel, a háromdimenziós szóródási plottokat Wolfram Mathematica 7 (Wolfram Research, Champaign, IL) programmal generáltuk.

6. Alfa és korrekciós faktorok meghatározása

Az alfa faktorok skálázási tényezők, amelyek figyelembe veszik a donor és akceptor között fennálló fluoreszcencia kvantum hatékonyság és a műszer detektálási hatékonyságában fennálló különbségeket. Ezért azonos számú gerjesztett donor és akceptor fluorofór molekula intenzitását kell összehasonlítani adott hullámhosszon. Kísérleteinkhez több ezer, kizárólag Alexa Fluor 488-cal, -546-tal, -555-tel vagy -647-tel jelölt sejt intenzitását átlagoltuk és használtuk fel az alfa faktorok meghatározására. A korrekciós faktorokat egyszeresen jelölt mintákon határoztuk meg.

7. Anizotrópia mérések

A fluoreszcencia anizotrópia méréseket egy Fluorolog-3 spektrofluoriméterrel (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, Franciaország) végeztük. A gerjesztési fényforrásként egy 450-W Xe-ív lámpa szolgált. Az Alexa Fluor 546-tal, -555-tel és -647-tel konjugált trastuzumab, szabad festék oldatok és PBS oldat

anizotrópiáját L-formátumú konfigurációban lévő FL-1044 polarizátorokkal mértük. A fluoreszcens festékekkel konjugált antitestek és a szabad festékek koncentrációja a 10^{-7} – 10^{-6} M tartományban volt, ahol a minta abszorbanciája 0,05 alatt volt és így a belső szűrő hatások elhanyagolhatóak voltak. Egy cm optikai úthosszal rendelkező kvarc küvettát (Hellma, Müllheim, Németország) használtunk. A gerjesztési és emissziós monochromátor hullámhosszokat az alkalmazott festékek gerjesztési és kibocsátási maximumai szerint állítottuk. A rés szélességet és a gyűjtési időt úgy állítottuk, hogy az összes polarizátor üzemmódú intenzitás (I_{VV} , I_{VH} , I_{HH} and I_{HV}) mindegyik koncentráció esetén 1000000 esemény/másodperc alatt maradjon. Az adatokat a DataMax for Windows v2.1 programmal értékeltük.

IV. Eredmények

1. Több, egyidejűleg kölcsönható FRET partner hatásának meghatározása

a) Különböző F/P arányú antitest változatok összehasonlítása

Kísérleteinkhez az NCI-N87 sejtek felszínén található ErbB2 fehérjét jelöltük Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 vagy Alexa Fluor 647-tel konjugált trastuzumab és pertuzumab monoklonális antitestekkel. Az alkalmazott antitestek F/P arányát spektrofluorimetriával határoztuk meg. A jelölési arányok hitelesítése érdekében sejteket festettünk meg különböző F/P arányú antitestekkel és megmértük a sejtek átlagos intenzitását. Az átlagos sejt intenzitás növekedett a jelölési arány növelésével, de a növekedés nem volt egyenes arányban, különösen az alkalmazott F/P tartomány felső határán észleltünk intenzitás kiesést. Az Alexa Fluor 546 mutatta a legnagyobb F/P aránytól függő telítődést, míg Alexa Fluor 555 esetén volt legkevésbé kifejezett ez a hatás. Az azonos festékkel konjugált trastuzumab és pertuzumab esetén az antitest F/P arány függvényében ábrázolt intenzitás görbék hasonlóak voltak, amíg a különböző festékkel konjugált azonos típusú antitest esetén a görbék jelentősen eltértek. Az oldatban lévő szabad antitestek esetén spektrofluoriméterrel is kimutattuk az antitest F/P arány függvényében jelentkező intenzitástelítődést, az így kapott görbék nagyon hasonlóak voltak az azonos antitest sejtfelszíni kötődése esetén kapottakkal.

A festékkel konjugált antitesteket tovább jellemeztük az oldatban lévő szabad antitestek anizotrópia méréseivel. Az anizotrópiát számos koncentrációnál megmértük és a koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az egyedi mérési pontokat egy egyenessel illesztettük és az y-tengely metszeteket, melyet intrinzik anizotrópiának nevezünk (mely megfelel egy végtelenül híg oldat anizotrópiájának és így egyenlő egy egyedülálló antitest anizotrópiájával) használtuk az antitestek összehasonlítására. Azt tapasztaltuk, hogy az F/P

arány növekedésével az intrinzik anizotrópia csökkent. Ez az F/P arány függő anizotrópia csökkenés mindegyik alkalmazott antitestre igaz volt, de a görbe jellegzetes volt a vizsgált festékre. Az antitesttel konjugált festék anizotrópiája jelentősen nagyobb volt a szabad festék anizotrópiájánál.

b) Energiatranszfer mérések különböző F/P arányú antitestekkel

Amennyiben nő az egy donorral kölcsönható akceptorok száma, az növeli annak esélyét, hogy a gerjesztett donor kölcsönhatásba lépjen egy akceptor partnerrel. Ez a transzfer átmenet valószínűségét és következményesen a transzfer hatékonyságot emeli. Ha a donorral kölcsönható összes n akceptor egyenlő a FRET kölcsönhatás szempontjából, akkor a rendszer transzfer átmenetének valószínűsége n -szerese lesz az egy akceptor esetén tapasztalhatónál. Ebben az esetben a viszony E_0 (az eredeti transfer hatékonyság egy akceptorral) és E_n (a transzfer hatékonyság n -szeresre növelt transzfer átmeneti valószínűséggel) között:

$$E_n = \frac{n \cdot k_{\text{transzfer}}}{n \cdot k_{\text{transzfer}} + k_{\text{egyéb}}} = \frac{n \cdot k_{\text{transzfer}}}{k_{\text{transzfer}} + k_{\text{egyéb}}} \cdot \frac{k_{\text{transzfer}} + k_{\text{egyéb}} + (n-1) \cdot k_{\text{transzfer}}}{k_{\text{transzfer}} + k_{\text{egyéb}}} = \frac{nE_0}{1 + (n-1)E_0}$$

Ez a viszonylag bonyolult képlet linearizálható, ha E helyett az $A = E/(1 - E)$ kifejezést használjuk:

$$A_0 = \frac{E_0}{1 - E_0}$$

$$A_n = \frac{E_n}{1 - E_n} = n \cdot \frac{E_0}{1 - E_0} = n \cdot A_0$$

Tehát A -t n függvényében ábrázolva egy egyenest kapunk, amelynek y -tengelymetszete A_0 . Következésképpen E_0 értéke kiszámolható A_0 -ból. Mivel E_0 az egy donor – egy akceptor kölcsönhatásra jellemző transzfer hatékonyság, ezért felhasználható az eredeti Förster egyenletek szerinti távolság számításokra.

A sejtfelszíni FRET mérések donorral (Alexa Fluor 546 vagy Alexa Fluor 555) konjugált trastuzumabbal és akceptorral (Alexa Fluor 647) konjugált pertuzumabbal történtek. Az egy adott donorral mért transzfer hatékonyság nem lineárisan növekedett az akceptor F/P arány növelésével és a görbék követték az elméleti számításaink által jósoltakat. Az összes donorral hasonló telítési görbéket kaptunk, azonban a görbék a donor F/P arány növelésével eltolódtak a nagyobb transzfer hatékonyság irányába, különösen az Alexa Fluor 546 esetében. A transzfer hatékonyság és a donor jelölési arány közötti korreláció gyenge volt, Alexa Fluor 546 esetén 0,14 és Alexa Fluor 555 esetén 0,038 Pearson-féle korrelációs együtthatót számoltunk. A mért transzfer hatékonyság csak enyhe emelkedést mutatott a donor F/P arány növelésével. Ezzel szemben a transzfer hatékonyság és az akceptor jelölési aránya között nagy korrelációt találtunk, az összes akceptor-donor párra 0,95 Pearson-féle korrelációs együtthatót számoltunk. Az akceptor F/P arány növelésével bármelyik donor esetén jelentősen nőtt a transzfer hatékonyság. A transzfer hatékonyság az akceptor/donor (A/D) aránnyal is korrelációt mutatott. Ez azonban annak következménye, hogy az A/D arányt az akceptor F/P arány és a donor F/P arány hányadosaként számoljuk. Az ok-okozati viszony hiányát jól szemlélteti, hogy hasonló A/D aránnyal nagyon különböző transzfer hatékonyságot lehetett mérni az akceptor F/P aránytól függően és különböző A/D aránnyal hasonló transzfer hatékonyságot azonos akceptor F/P arány esetén. Az A kifejezést az akceptor jelölési arány függvényében ábrázolva az elméleti modellünk által jósolt lineáris összefüggést kaptuk. Az illesztett egyenesek meredekségéből meghatároztuk A_0 -t és belőle az egyes festékek jellegzetes transzfer hatékonyságát. A jellegzetes FRET hatékonyságot a donor F/P arány függvényében ábrázoltuk és egy festékre jellemző lineáris összefüggést tapasztaltunk.

2. TripleFRET: transzfer hatékonyság meghatározása három festékes rendszerekben

a) TripleFRET számítások

A továbbiakban az A festékből C-be történő közvetlen és relay-transzfer kiszámítását mutatjuk be. A számításokhoz hat független emissziós intenzitás, I_1 - I_6 mérése szükséges. A hat intenzitást a következők szerint értelmezhetjük: I_1 – az A donor csökkentett emissziója (B és C akceptorok által), az A festék natív intenzitás csatornája; I_2 – B akceptor szenzitizált (az A donor felől) és csökkentett (C akceptor által) emissziója, I_3 – C akceptor szenzitizált emissziója (az A donor és az A donor által gerjesztett B akceptor felől), I_4 – B donor csökkentett emissziója (C akceptor által), a B festék natív intenzitás csatornája; I_5 – C festék szenzitizált emissziója (B donor felől) és I_6 – a C festék natív intenzitás csatornája. Az egyenletrendszer az A-ból B-be és A-ból C-be irányuló E'_{AB} és E'_{AC} kompetitív FRET folyamatokat feltételezi. Összesen hét ismeretlen van: az egyedi I_A , I_B és I_C festék intenzitások és a négy transzfer hatékonyság, E'_{AB} , E'_{AC} , E_{BC} és E_{relay} .

$$I_1(488nm \rightarrow 530 / 30BP) = I_A(1 - E'_{AB} - E'_{AC})$$

$$I_2(488nm \rightarrow 585 / 42BP) = S_1 I_A(1 - E'_{AB} - E'_{AC}) + \alpha_{AB} I_A E'_{AB}(1 - E_{BC}) + S_4 I_B(1 - E_{BC})$$

$$I_3(488nm \rightarrow 675 / 20BP) = \alpha_{AC} I_A(E_{relay} + E'_{AC}) + S_{12} \alpha_{AB} I_A E'_{AB}(1 - E_{BC}) + S_9 I_A(1 - E'_{AB} - E'_{AC}) + S_{10} I_B(1 - E_{BC}) + S_7 I_C$$

$$I_4(532nm \rightarrow 585 / 42BP) = I_B(1 - E_{BC})$$

$$I_5(532nm \rightarrow 650LP) = S_2 I_B(1 - E_{BC}) + \alpha_{BC} I_B E_{BC} + S_3 I_C$$

$$I_6(633nm \rightarrow 650LP) = I_C$$

Mivel az egyenletrendszer alulhatározott (hat független egyenlet hét változóval), egy további egyenletre van szükség:

$$E_{relay} = E'_{AB} \cdot E_{BC}$$

Az egyenletrendszer jelenlegi formájában megoldható, azonban a legtöbb változó esetén bonyolult megoldásokat eredményez. Ezeket azonban helyettesítési kifejezésekkel tovább lehet egyszerűsíteni:

$$I_{X1} = I_1$$

$$I_{X2} = I_2 - S_1 I_1 - S_4 I_4$$

$$I_{X3} = I_3 - S_{12} I_2 - (S_9 - S_1 S_{12}) I_1 - S_7 I_6 - S_4 I_{X5}$$

$$I_{X4} = I_4$$

$$I_{X5} = I_5 - S_2 I_4 - S_3 I_6$$

A kifejezések megfelelnek korrigált szenzitizált emisszió (I_{X2} , I_{X3} és I_{X5}) és quenched donor (I_{X1} és I_{X4}) intenzitásoknak. Az egyes változók megoldásai a következők:

$$I_A = I_{X1} + \frac{I_{X2}}{\alpha_{AB}} + \frac{I_{X3}}{\alpha_{AC}}$$

$$I_B = \frac{I_{X5} + \alpha_{BC} I_{X4}}{\alpha_{BC}}$$

$$I_C = I_6$$

$$E'_{AB} = \frac{\alpha_{AC} I_{X2} (I_{X5} + \alpha_{BC} I_{X4})}{\alpha_{BC} I_{X4} [\alpha_{AC} I_{X2} + \alpha_{AB} (I_{X3} + \alpha_{AC} I_{X1})]}$$

$$E'_{AC} = \frac{\alpha_{AB} \alpha_{BC} I_{X3} I_{X4} - \alpha_{AC} I_{X2} I_{X5}}{\alpha_{BC} I_{X4} [\alpha_{AC} I_{X2} + \alpha_{AB} (I_{X3} + \alpha_{AC} I_{X1})]}$$

$$E_{BC} = \frac{I_{X5}}{I_{X5} + \alpha_{BC} I_{X4}}$$

A nem-kompetitív FRET hatékonyságok is kiszámolhatóak:

$$E_{AB} = \frac{I_{X2}(I_{X5} + \alpha_{BC} I_{X4})}{I_{X2}(I_{X5} + \alpha_{BC} I_{X4}) + \alpha_{AB} \alpha_{BC} I_{X1} I_{X4}}$$

$$E_{AC} = \frac{\alpha_{AB} \alpha_{BC} I_{X3} I_{X4} - \alpha_{AC} I_{X2} I_{X5}}{\alpha_{AB} \alpha_{BC} I_{X4}(I_{X3} + \alpha_{AC} I_{X1}) - \alpha_{AC} I_{X2} I_{X5}}$$

Relay-transzfer és teljes transzfer a következő képlettel adhatók meg:

$$E_{relay} = \frac{\alpha_{AC} I_{X2} I_{X5}}{\alpha_{BC} I_{X4} [\alpha_{AC} I_{X2} + \alpha_{AB}(I_{X3} + \alpha_{AC} I_{X1})]}$$

$$E_{teljes} = \frac{\alpha_{AB} I_{X3}}{\alpha_{AC} I_{X2} + \alpha_{AB}(I_{X3} + \alpha_{AC} I_{X1})} = \frac{I_{X3}}{\alpha_{AC} I_A}$$

Hasonló egyenletrendszereket dolgoztunk ki az A és C festék közötti csak relay-transzfer közvetlen FRET nélkül, csak közvetlen FRET relay-transzfer nélkül és a közvetlen és relay-FRET mentes esetekre is.

b) Két és három festékes rendszerek transzfer hatékonyságai

Kísérleteinkhez az Alexa Fluor 488 (A festék), Alexa Fluor 546 (B festék) és Alexa Fluor 647 (C festék) festékeket használtuk. NCI-N87 sejteken ErbB2 fehérjét jelöltünk trastuzumab, pertuzumab és H76.5 antitestekkel. A mintákat három festékes illetve megfelelő két festékes rendszerekként készítettük el. Hitelesítés és a módszerünk három festékes rendszerben való alkalmazhatóságának igazolása céljából az összes mintát a saját módszerünk mellett a két festékes rendszerek intenzitás alapú módszerével is kiértékeljük. A három festék összes két festékes permutációja mérhető transzfer hatékonyságot eredményezett ($E_{AB} = 13,5\%$, $E_{AC} = 4,9\%$, $E_{BC} = 45,1\%$). A két festékes rendszerek tripleFRET módszerrel való elemzése a hagyományos

két festékes rendszerre kifejlesztett intenzitás alapú módszerrel azonos eredményeket hozott. A három festékes rendszer tripleFRET módszerrel történő értékelése a két festékes rendszerhez hasonló eredményeket produkált ($E_{AB} = 12,9\%$, $E_{AC} = 4,0\%$, $E_{BC} = 44,4\%$). A kompetícióra való korrekció tovább növelte az egyezést a két festékes rendszerek eredményeivel ($E_{AB} = 13,4\%$, $E_{AC} = 4,6\%$). Ugyanakkor a hagyományos intenzitás alapú FRET nem tudta reprodukálni a két festékes rendszer FRET értékeit. Konkrétan, E_{AB} -t alulbecsülte (13,5% helyett 7,9%) és E_{AC} -t felülbecsülte (4,9% helyett 11,4%). A B festék hozzáadása a csak A és C festékből álló rendszerhez jelentősen megnövelte az A-ból C-be átadott teljes energiát ($E_{teljes} = 4,9\% \rightarrow 10,4\%$), ami bizonyítéka a relay-transzfer folyamatnak az intramolekuláris rendszerükben. A tripleFRET számítások érzékenységének és a különböző fehérje asszociációval rendelkező populációk diszkriminációjának bemutatására hét különböző jelöléssel rendelkező mintát kevertünk össze egy mintavételi csőbe. Ezt követően áramlási citométerben mértük meg a kevert minta energiatranszfer értékeit. Három FRET hatékonyság együttes meghatározásával képesek voltunk a hét eltérő jelölésű sejtpopulációt azonosítani a kevert mintában. Az ilyen módon mért transzfer hatékonyságok jó egyezést mutattak az egyes populációk külön-külön mért értékeivel.

c) TripleFRET különböző térbeli mintázatú három festékes rendszerekben

Végezetül úgy módosítottuk a jelölési protokollt, hogy az antitestek közötti kompetíció miatt a három festék nem kötődhetett ugyanazon fehérjéhez. Így olyan festék konfigurációt értünk el ahol az energia átadás A-ból B-be intermolekulárisra vált vagy az A által gerjesztett B festék távol került a C festéktől, így minimálisra csökkentettük a relay-FRET-et. Az energiatranszfer kiszámításához négy esetet vettünk alapul: párhuzamos direkt és relay-transzfer A és C festék között; csak relay-transzfer direkt transzfer nélkül;

csak direkt transzfer relay-transzfer nélkül; sem relay, sem direkt transzfer. A három festék intramolekuláris elhelyezkedése esetén az A és C festék között direkt és relay-transzfert feltételező modell közelítette legjobban a két festékes rendszerben mért eredményeket. Ugyanez volt igaz arra az esetre, amikor az A és B festék közötti energia átadás intermolekuláris volt. Ebben az esetben csak relay-FRET-et feltételezve az A és C festék közötti jelentős közvetlen FRET-et hanyagoltuk el. Amennyiben csak közvetlen energiatranszfert feltételeztünk alábecsültük az A és B festék közötti transzfert. Azonban amikor az A festék által gerjesztett B távol került a C festéktől, párhuzamos közvetlen és relay-FRET-et feltételezve fizikailag értelmezhetetlen eredményeket kaptunk, az A-ból C-be átadott energia hányad negatívvá vált. Csak relay-FRET-et feltételezve a teljes FRET-nél magasabb relay-FRET-et számoltunk. Kizárólag direkt transzfert feltételezve kaptuk a legjobb eredményeket, fizikailag értelmezhető értékekkel mindegyik számolt FRET folyamathoz. Egyúttal azonban egy kicsi, de releváns relay-FRET-et elhanyagoltunk, hiszen a teljes transzfer magasabb volt a három festékes rendszerben, mint a csak A és C festékből állóban.

V. Megbeszélés

1. Több, egyidejűleg kölcsönható FRET partner hatása

a) Antitestek intenzitás telítődése és anizotrópiája

Először összehasonlítottuk a különböző F/P arányú antitest változatokat. Növekvő F/P aránnyal a fluoreszcens jel nem lineáris növekedését tapasztaltuk, ami a jel kioltás vagy más hatás miatti veszteségét sejteti. A jelölési koncentrációtól függő intenzitás telítődés közel azonos volt (a maximum intenzitásra való normalizálást követően) az alacsony és magas F/P arányú antitestek esetén, tehát az F/P arány nem befolyásolta az antitestek kötődését. Az oldatban lévő szabad antitestek a sejtes kísérletekben tapasztalt F/P arány függő intenzitás telítődést mutatták, ami ugyancsak kizárta az antigén-antitest kölcsönhatás szerepét. Azt is megvizsgáltuk, hogy a különböző F/P arányú antitest változatok különböznek-e elnyelési, gerjesztési vagy kibocsátási spektrumukban. Az adataink nem mutattak különbséget az egyes F/P arányú antitest változatok spektrumaiban, így ezt is kizártuk az intenzitás telítődés okaként. Az F/P arány függő telítődési görbék eltérőek voltak az azonos antitesthez kötött különböző festékek esetén, míg a különböző antitestekhez kötött azonos festékek esetén egyeztek a görbék. Megállapítható, hogy az intenzitás telítődési hatás az alkalmazott festékre volt jellemző.

Az antitest változatokat anizotrópia mérésekkel tovább jellemeztük. Az anizotrópia megmutatja a polarizált fénnel való gerjesztés és a fluoreszcens kibocsátás közötti depolarizáció mértékét. Az egyes antitest változatok anizotrópiájának összehasonlítására az Eredmények részben bevezetett intrinzik anizotrópiát használtuk. A várakozásoknak megfelelően a szabad festéknek jelentősen alacsonyabb volt az anizotrópiája az antitesttel konjugált változatoknál, ami a kötött antitest méretéből adódó lassabb mozgás következménye. Érdekes módon az intrinzik anizotrópia az F/P arány

növekedésével csökkent. Ez nem magyarázható a magasabb F/P arányú változatok megnövekedett méretével (a megnövekedett antitest-festék konjugátum méretből adódó további mozgáskorlátozódás inkább növelné az anizotrópiát). Számos folyamat játszódhat le az egy antitesthez kötött festékek között, amely befolyásolja az anizotrópiát. A homo-FRET egy olyan FRET folyamat, ahol a donor és az akceptor ugyanazon festéktípushoz tartozik és bármely festék kibocsátási és gerjesztési spektruma között fennálló átfedés miatt lehetséges. A homo-FRET lehetővé teszi, hogy a festékek között átadódjon az energia fluoreszcencia nélkül. Bár az egy adott festék molekula által gerjesztetett állapotban töltött idő ugyanúgy lerövidül, mint hetero-FRET esetén, a tényleges fluoreszcens emisszió később következik be, mint homo-FRET nélkül. Ráadásul, mivel a FRET-hez nem szükséges a gerjesztési és kibocsátási dipólok tökéletes együttállása, ezért az emissziós polarizáció ugrásszerűen is változhat. Ezen hatások együtteseként a homo-FRET szétteríti a kisugárzott fény irányát és így csökkenti az anizotrópiát. Ugyanakkor például az ütközési kioltás csökkenti a fluoreszcencia élettartamot és növeli a mért anizotrópiát. A méréseink azt mutatják, hogy az F/P arány növekedésével csökken az anizotrópia, ami alapján a homo-FRET lehet a domináns alapfolyamat. Az intrinzik anizotrópia minimális értéke korrelált az antitest által mutatott F/P aránytól függő intenzitás telítődéssel, azaz minél nagyobb fokú volt az intenzitás telítődés, annál magasabb volt az intrinzik anizotrópia plató értéke. Ez egybevág azzal a feltételezéssel, hogy az intenzitás telítődés az ütközési kioltás következménye, így a nagyobb telítődés több kioltást jelent ami ellene hathat a homo-FRET hatásainak.

b) Az akceptor jelölési arány hatásai

A kísérleteink azt igazolták, hogy az akceptor jelölési aránya erősen korrelál a mért transzfer hatékonysággal. Az egy adott donorral és különböző F/P arányú

akceptorral mért transzfer hatékonyság nem lineárisan változott a jelölési aránnyal. A mérési pontok szorosan illeszkedtek az elméleti számításaink által jósolt görbékre. Az $A = E/(1-E)$ ábrák úgyszintén az elméletünk által jósolt lineáris viszonyt mutatták. Az a tény, hogy $E/(1-E)$ -t az akceptor jelölési arány függvényében ábrázolva egyenest kaptunk azt mutatja, hogy rendszerünkben az egyes akceptorok hasonlóan viselkednek és a FRET kölcsönhatás valószínűségét azonos mértékben növelik. Egyúttal az akceptor F/P arány függvényében ábrázolt transzfer hatékonyság görbék jelentősen hasonlítanak a különböző koncentrációjú, oldatban véletlenszerűen megoszló festékek esetére közölt görbékkel, ami megint alátámasztja, hogy az egy antitesthez kötött akceptorok egyenlő, nem kitüntetett valószínűséggel lépnek kölcsönhatásba ugyanazon donorral. A méréseink az akceptor hozzáférhetőséget igazolják a mért transzfer hatékonyság korlátozó tényezőjeként. Az akceptor F/P arány növelésével a mért transzfer hatékonyságot majdnem kétszeresére tudtuk növelni.

c) A donor jelölési arány hatásai

Elméletileg a donorok számának növelése nem növeli annak valószínűségét, hogy egy adott donor kölcsönhatásba lépjen bármely akceptorral. Ezért a donorok azon hányada, amely FRET-tel adja le az elnyelt energiát nem változik és azért a transzfer hatékonyság is változatlan. Egyúttal az akceptorral kölcsönható több donor nem hat ki negatívan az energia transzferre, mivel a donor legerjesztődés annyira gyors folyamat, hogy minimális annak a valószínűsége, hogy két egyidejűleg gerjesztett donor versengjen az akceptorért. Ezért a több, ugyanazon akceptorral kölcsönhatásra alkalmas távolságban levő donorból álló rendszereket (mint a több festékkel jelölt antitestek) hagyományosan egydonoros rendszerként kezelik a transzfer valószínűség vonatkozásában.

Kísérleteink során enyhe energiatranszfer növekedést láttunk a donor F/P arány növekedésének függvényében, amely hatás kifejezettebb volt, amikor az Alexa Fluor 546-ot használtuk donorként. Ugyanez igaz volt a jellegzetes transzfer hatékonyság esetén is, amely lineárisan nőtt a donor jelölési arány növelésével. Ezt a hatást nagy valószínűséggel az egy antitesthez kötött festékek között fellépő homo-FRET okozza, amely nő a festékszám emelésével. A homo-FRET hatását a következő módon lehet értelmezni. Ahogy a donor és akceptor a lehetséges térbeli helyzeteik között vándorolnak a donor emissziós és az akceptor gerjesztési dipóljainak relatív helyzete is folyamatosan változik. Közben ciklusosan a FRET-nek kedvező, illetve azt gyakorlatilag megakadályozó relatív orientációk alakulnak ki. A donor szemszögéből ez azt jelenti, hogy bizonyos helyzetekben nagy a FRET valószínűsége és így uralja az egyéb legerjesztődési folyamatokat, mint például a fluoreszcenciát. Más pozíciókban viszont csekély a FRET átmenetek esélye, így egyéb legerjesztődési folyamatok határozzák meg a gerjesztett állapot sorsát. Az általunk javasolt elmélet szerint a homo-FRET mentőövként viselkedik a gerjesztett állapot számára azon pozíciókban, ahol a hetero-FRET nem járul hozzá a legerjesztődéshez. A FRET-mentes legerjesztődés helyett a gerjesztett állapot megőrzésre kerül és homo-FRET-tel a FRET-nek kedvező pozícióba helyeződhet át. Mivel a homo-FRET az energiát az elhanyagolható FRET valószínűséggel rendelkező helyzetekből áthelyezi, nagyobb FRET hatékonyságot észlelünk az akceptor-donor távolság csökkenése nélkül.

d) Jelentőség a FRET mérések számára

Eredményeink azt mutatják, hogy az antitestek jelölési arányának manipulálása egy egyszerű eszköz a mérések érzékenységének növelésére, amely túlmutat a mért intenzitások jel-zaj arányának javításán. Az akceptor-donor festék rendszer R_0 távolsága módosítható a jelölési arányok

változtatásán keresztül. Ha az n akceptorral rendelkező FRET rendszer Förster távolságát R_n -nel jelöljük, akkor R_n és R_0 között az összefüggés:

$$E_n = \frac{n \cdot R_0^6}{n \cdot R_0^6 + R_n^6} = \frac{R_n^6}{R_n^6 + R_0^6}$$

$$R_n = n^{\frac{1}{6}} \cdot R_0$$

A rendszer R_0 távolságának változtatásával eltolható az intermolekuláris távolság-FRET hatékonyság görbe. Tehát az akceptor jelölési arányának növelésével növelhető a transzfer hatékonyság is. Ez hasznos lehet alacsony FRET-tel jellemezhető rendszerekben, ahol a FRET szinteket a háttér felett észlelhető mértékűre növelhetjük. Továbbá, a görbét úgy is el lehet tolni, hogy egy adott rendszerben minden lehetséges távolság változást szignifikáns FRET hatékonyság változás kövessen. Egy telítésben lévő rendszer esetén például hasznos lehet az akceptor F/P arányának csökkentése, mivel így csökken a rendszer R_0 távolsága és ez növeli a FRET változást abban az adott távolság tartományban.

Ezt az elvet nem rég hasznosították fehérje rendszerek Förster távolságának növelésére és így már 15 nm-es intermolekuláris távolságban is mérhető volt a transzfer hatékonyság. A cél fehérjét számos, a fehérje felszínén random módon elhelyezkedő akceptorral jelölték, ezáltal a transzfer hatékonyságot az egy akceptorral mérhető szint fölé emelték. Bár ezzel a megközelítéssel az akceptor távolsága a donortól többé nem tekinthető egy jól meghatározott, fix értéknek, azonban lehetővé teszi a FRET kísérletek hagyományos tartományán kívül eső molekuláris kölcsönhatások vizsgálatát. Ezzel lehetővé válik a molekuláris hálózatok szélesebb körű feltérképezése, hiszen az energiatranszfer kísérletek távolság korlátai miatt eddig nem észlelt interakciós partnerek is azonosíthatóvá válnak.

2. TripleFRET mérések

a) TripleFRET: egy új módszer energiatranszfer mérésére három festékes rendszerekben

Azonosítottunk és számszerűsíthető elemekre bontottunk összesen hat különböző emissziós intenzitást, amelyek egy egyenletrendszerben lehetővé teszik a rendszer minden egyes eleme között létrejövő FRET megállapítását. Ezáltal információt nyerünk a vizsgált molekulák és építópok relatív térbeli elrendeződéséről. Korrigált és korrigálatlan transzfer hatékonyságokat is meghatároztunk, így a festérendszer látszólagos FRET értékei mellett a két festékes rendszerek kompetíció mentes értékeit is megkaptuk.

Kísérleteinkhez az Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647 fluorofórokat használtuk A, B és C festékként. A fluorofórok kibocsátási és gerjesztési spektrumai között kellően nagy az átfedés, hogy az elméletileg lehetséges összes transzfer folyamat megvalósuljon. Két festékes rendszerben a klasszikus két festékes intenzitás alapú FRET-tel és tripleFRET-tel hasonló eredményeket kaptunk. Három festékes rendszerben tripleFRET-tel bármely festékpárra a két festékes rendszerben mért FRET hatékonysággal jól egyező értékeket számoltunk. Azonban amikor a két festékes intenzitás alapú módszert használtuk három festékes rendszerben, a két festékes rendszerhez viszonyítva jelentősen alacsonyabb E_{AB} és jelentősen magasabb E_{AC} értékeket kaptunk. Ez a harmadik festék által okozott fluorofór intenzitás kioltásnak és megnövelt szenzitizált emisszióknak tulajdonítható, ami torzítja az energiatranszfer számolás során használt donor és akceptor fluorofór intenzitásokat.

b) Transzfer hatékonyság különböző térbeli mintázatú három festékes rendszerekben

Eredményeink azt mutatják, hogy bár a módszerünk megbízható, nem tudja megkülönböztetni a közel azonos transzfer hatékonyságot produkáló eltérő térbeli elrendeződéseket. Ezekben az esetekben csak akkor lehet pontos modellt felállítani, ha ismerjük az antitestek kötődési sztöchiometriáját (például csak egy felismert epitóp fehérjénként). Elvileg a járulékos transzfer útvonalakból adódó enyhe transzfer hatékonyság növekedés megkülönbözteti az egyes eseteket, de ezeknek az útvonalaknak a hozzájárulása általában csekély és a mérési hibából és biológiai változatosságból adódó bizonytalanság el is fedheti a különbségeket.

A legtöbb esetben több különböző molekuláris kölcsönhatási séma is lehetővé teszi, hogy fizikailag értelmezhető E_{AB} , E_{AC} és E_{BC} értékeket számoljunk ugyanazon kioltott donor és szenzitizált akceptor emissziós intenzitásokból. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy egy adott transzfer hatékonyság kiszámíthatósága nem biztosítja, hogy a FRET folyamat tényleg a feltételezett molekuláris távolságon játszódik le. Például a C festék szenzitizált emisszióját egyaránt tulajdoníthatjuk az A-ból C-be irányuló közvetlen FRET-nek, a B-n keresztüli relay gerjesztésnek vagy mindkettőnek. Kizárólag az intenzitás adatok alapján nem lehet különbséget tenni ezen esetek között vagy eldönteni, hogy egy adott helyzetben melyik érvényes. Még ha többféle orientációt is veszünk figyelembe a FRET számításoknál, akkor sem lehet pontosan kiszámítani a transzfer hatékonyságot, ha az egyes folyamatok hozzájárulása az összesített FRET jelhez nem ismert. Ugyanez a helyzet áll elő, ha nem mindegyik fluorofór vesz részt a transzfer folyamatban, például ha három különböző fehérjét jelölünk. A transzfer partner nélküli, egyedülálló festék populáció a hagyományos összegzett jelen alapuló méréseknél is problémát

jelent. Elméletileg ki lehet fejleszteni egy egyenletrendszert, mely több párhuzamos sémát is figyelembe vesz, de a változók száma miatt ez nem megoldható a hat mért intenzitással. Ezért a pontos intenzitás alapú mérésekhez előzetes ismerettel kell rendelkezni a lehetséges transzfer útvonalakról, akár két festékes rendszerekben végzett mérésekből vagy a festékek ismert és/vagy korlátozott térbeli helyzeteiből.

Ezt a korlátozást a korábbi közlemények nem említették, mert a módszerek bemutatására használt modell rendszerek biztosították mindhárom festék kölcsönhatását és kizárták a kölcsönhatási séma változását. Ez az egy-molekulás képalkotó eljárások esetén azért biztosított, mert egyszerre csak egy fluorofór hármas és így egy séma kerül észlelésre. Továbbá, az összes DNS szál, rögzített távolságú három festékes szerkezet és multimer, ahol a FRET csak bizonyos konformációkban lehetséges, biztosítja, hogy az energia transzfer folyamat egyedi A, B és C festékből álló trimerekre korlátozódjon. Ennek a sémának a főbb jellemzői: FRET csak a festék-trimeren belül jön létre; egy közös B festék vesz részt E_{AB} és E_{BC} transzferekben, így ha E_{AB} és E_{BC} detektálható, akkor a relay-FRET is létrejön és E_{AB} -t kioltja E_{BC} ; csak a domináns E_{AB} és E_{BC} járulnak hozzá a relay-FRET-hez; ha E_{AC} mérhető az az A, B és C festékeket egy képzeletbeli háromszög sarkaiba helyezi. Ezekben a korlátozott rendszerekben a tripleFRET azonos hatékonyságú a korábban közölt módszerekkel, viszont nem igényel külső referencia mintát. Azt nem lehet megítélni, hogy más módszerek jobban működnek-e több interakciós séma esetén, mivel a kipróbálásukra használt modell rendszerekben nem lehetségesek ilyen változatos kölcsönhatási sémák. Ilyen módon akár terv szerint vagy véletlenül nem lepleződtek le a három festékes mérések korlátai. Ugyanakkor ezek a megfontolások csak akkor életbe vágoók, ha pontos abszolút transzfer hatékonyság értékekre van szükség és részben

elhanyagolhatóak, ha a FRET-et csak szemi-quantitatív indikátorként használjuk vagy ki lehet zárni a kölcsönhatási séma változását a kísérlet során.

VI. Összefoglalás

Célul tűztük ki, hogy jellemezzük a fluorofórral konjugált antitestek különböző változatait és utána segítségükkel megállapítsuk a festék kínálat hatását a transzfer hatékonyságra. A fő eredményeink:

- A festékekkel konjugált antitestek fluoreszcens intenzitása nem lineárisan nő az F/P aránnyal és festékre jellemző intenzitás telítődés figyelhető meg.
- Az akceptor és donor F/P arány közvetlen hatással van a mért transzfer hatékonyságra.
- Az akceptor kínálatnak van a legnagyobb hatása a FRET hatékonyságra, a transzfer hatékonyság nem lineárisan nő a kölcsönható akceptorok számával.
- Elméleti modellünkkel meg tudtuk jósolni a festékek hatását, ami elősegíti a FRET rendszer tudatos manipulálását a jobb eredmények érdekében.

Két kulcskérdésben, amely a két festékes FRET népszerűségéért is felelős, akartunk hozzájárulni a három festékes FRET mérések növekvő területéhez: könnyű metodika és sejtes rendszerekben való alkalmazhatóság. Az új három festékes módszerünk, a tripleFRET a következő tulajdonságokkal bír:

- Hétköznapi áramlási citométereken kivitelezhető.
- Külső referencia minta nélkül lehetővé teszi az egyedi transzfer hatékonyságok kiszámítását három festékes rendszerekben.
- Érzékenysége azonos a korábban közölt három festékes módszerekével.
- Hagyományos két festékes FRET-tel összehasonlítva két festékes rendszerben azonos eredményt nyújt, míg három festékes rendszerben megbízhatóbb.

- Lehetővé teszi a kettő és három festékes rendszerben mért transzfer hatékonyságok összevetését, ha előzőleg adatokkal rendelkezünk a térbeli pozíciókról.

Összegezve, a munkánk új adatokkal szolgál a három festékes és több fluorofóros rendszerekben lezajló FRET folyamatokról. Ez lehetővé teszi még több információ gyűjtését a vizsgált rendszerekről és a FRET mérések optimalizálását.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. Projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



VII. Közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/125/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fábián Ákos

Neptun kód: V2H8VR

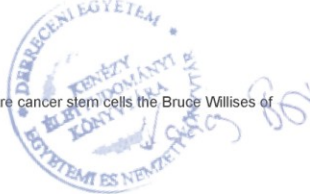
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

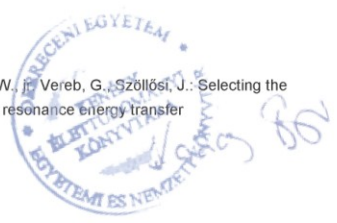
1. **Fábián, Á.**, Horváth, G., Vámosi, G., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: TripleFRET measurements in flow cytometry.
Cytom. Part A. 83 (4), 375-385, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22267>
IF:3.729 (2011)
2. **Fábián, Á.I.**, Rente, T., Szöllősi, J., Mátyus, L., Jenei, A.: Strength in numbers: Effects of Acceptor Abundance on FRET Efficiency.
Chemphyschem. 11 (17), 3713-3721, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201000568>
IF:3.339

További Közlemények

3. **Fábián, Á.**, jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: Markers, pathways and therapy.
Cytom. Part A. 83A (1), 62-71, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22206>
IF:3.729 (2011)
4. **Fábián, Á.**, Barok, M., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: Die Hard: Are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology?
Cytometry A. 75A (1), 67-74, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20690>
IF:3.032



5. Varga, Z., Csépany, T., Papp, F., **Fábián, Á.**, Gogolák, P., Tóth, Á., Panyi, G.: Potassium channel expression in human CD4(+) regulatory and naive T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients.
Immunol. Lett. 124 (2), 95-101, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.04.008>
IF:2.906
6. Fazekas, Z., Petrás, M., **Fábián, Á.**, Pályi-Krek, Z., Nagy, P., Damjanovich, S., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: Two-sided fluorescence resonance energy transfer for assessing molecular interactions of up to three distinct species in confocal microscopy.
Cytom. Part A. 73 (3), 209-219, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20489>
IF:3.259
7. Kovács, T., Békési, G., **Fábián, Á.**, Rákossy, Z., Horváth, G., Mátyus, L., Balázs, M., Jenei, A.: DNA flow cytometry of human spermatozoa: Consistent stoichiometric staining of sperm DNA using a novel decondensation protocol.
Cytometry A. 73 (10), 965-970, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20618>
IF:3.259
8. jr. Sipka, S., Bráth, E., Tóth F., F., Aleksza, M., Kulcsár, A., **Fábián, Á.**, Baráth, S., Balogh, P., Sipka, S., Furka, I., Mikó, I.: Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice.
Transpl. Immunol. 16 (2), 99-104, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2006.03.013>
IF:2.297
9. jr. Sipka, S., Bráth, E., Tóth F., F., **Fábián, Á.**, Sipka, S., Németh, N., Bálint, A., Furka, I., Mikó, I.: Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation.
Microsurgery. 26 (1), 43-49, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20209>
IF:0.882
10. Horváth, G., Petrás, M., Szentesi, G., **Fábián, Á.**, Park, J.W., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements.
Cytometry A. 65A (2), 148-157, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20142>
IF:2.115



11. ifj Sipka S., Bráth E., Tóth F. F., **Fábián Á.**, Furka I., Mikó I.: Lép autotransplantatio és lépettávolítás haematologiai és immunologiai hatásainak összehasonlító vizsgálata egerekben.
Magyar Seb. 58, 84-88, 2005.
12. Szentesi, G., jr. Vereb, G., Horváth, G., Bodnár, A., **Fábián, Á.**, Matkó, J., Gáspár, R., Damjanovich, S., Mátyus, L., Jenei, A.: Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series.
Cytometry A. 67 (2), 119-128, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20175>
IF:2.115

Összesített impakt faktor: 30.662

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.068

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

Debrecen, 2013.03.29

