

Válasz Prof. Lukács András kérdéseire

Hálásan köszönöm Lukács András professzor úrnak, hogy elvállalta disszertációm bírálatát és a fizikai részletekbe menő elgondolkodtató kérdéseket. Válaszaim a kérdésekre:

1. A módszertani leírás során az 5. egyenletben az α kiszámolásánál szerepel az ECFP és az EYFP kvantumhatásfoka. A kvantumhatásfok számítását saját maguk végezték el – ha igen hogyan – vagy irodalmi adatot használtak.

Ehhez kapcsolódó alkérdésem lenne, hogy milyen alacsony kvantumhatásfok esetében lehet még jó konfokális képeket készíteni? A dolgozatban sok olyan mérés van, ahol az mCherry-t használták, aminek a kvantumhatásfoka meglehetősen alacsony az EGFP-hez képest, tehát a 20 százalék körüli kvantumhatásfok még nem kizáró ok.

Ugyancsak itt tenném fel azt a kérdést, hogy megfelelő minőségű FLIM képekhez mennyi lenne a legalacsonyabb kvantumhatásfok?

Az 5. egyenlet alakja a következő:

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_A}{Q_D \eta_D} \quad (5)$$

Ebben a definícióban valóban szerepel a kvantumhatásfok, azonban annak ismerete nem szükséges az α paraméter kiszámításához. A számláló és a nevező is értelmezhető annak valószínűségként, hogy egy gerjesztett akzeptortól vagy donortól milyen valószínűséggel detektálhatunk egy fotont a 2-es, illetve 1-es csatornában. Hányadosukat fluoreszcencia intenzitások hányadosaként is megkaphatjuk, melyeket

korrigálunk a gerjesztések valószínűségeit jellemző abszorpciós együtthatók $\frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A}$ hányadosával a

gerjesztő lézervonal hullámhosszán. Az akceptor 2-es csatornában direkt gerjesztésből származó intenzitását pedig az akceptor tiszta, donor jelet nem tartalmazó, akceptor gerjesztési és akceptor emissziós hullámhosszaknál mért I_3 intenzitásából kaphatjuk az S_2 átvilágítási paraméterrel való szorzással. Így kapjuk a 6. egyenletet, mely nem tartalmazza explicit módon a kvantumhatásfokokat:

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D} \frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A} \quad (6)$$

A gyakorlatban α értéke egy négyismeretlenes egyenletrendszer megoldásaként adódik, melynek első három egyenlete az ECFP-EYFP fúziós fehérjével mért I_1 - I_3 intenzitásokra vonatkozik (a 3-as számú egyenletrendszer), negyedik egyenlete pedig a fenti, 6-os számú egyenlet.

$$\begin{aligned} I_1(458, 475 - 525) &= I_D(1 - E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2} \\ I_2(458, 530 - 600) &= I_D(1 - E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \quad (3) \\ I_3(514, 530 - 600) &= I_A \end{aligned}$$

Ennek az egyenletrendszernek a megoldása α -ra:

$$\alpha = \frac{S_2 \left(I_1 S_1 - I_2 + \left(1 + \frac{\epsilon_{458}^D}{\epsilon_{458}^A} \right) I_3 (S_2 - S_1 S_4) \right)}{I_1 S_2 - I_2 S_4} \quad (7)$$

Az mCherry alacsony, 20% körüli kvantumhatásfokkal rendelkezik, ami miatt az I_2 intenzitásban jelenlévő szenzitizált emisszió is kisebb. Azonban az egyenletrendszer I_1 -re vonatkozó első egyenlete a donor kioltást tartalmazza, ami nem függ az akceptor fluoreszcenciájától, az akár sötét is lehet. Donor élettartam méréseknél sem szükséges, hogy az akceptor intenzitását mérjük. Így méréseinkben nem jelentett korlátozó tényezőt az mCherry viszonylag alacsony kvantumhatásfoka.

Konfokális képek felvételekor az mCherry 0,22-es kvantumhatásfoka alacsonyabb jel/zaj viszonyt eredményezett az EGFP-hez képest, mégis előrelépést jelentett a korábban használt mFRP1-hez képest, melynél másfélszer nagyobb abszorpciós együtthatóval rendelkezik (50000 illetve 75000 M⁻¹cm⁻¹), így fényessége is nagyobb. Tapasztalataink szerint néhány tízezer fehérje/sejt expressziós szint esetén jó konfokális képek készíthetők. Újabban az mScarlet3 festéket használjuk, melynek kvantumhatásfoka 0,75, abszorpciós együtthatója 104000 M⁻¹cm⁻¹, ami sokkal jobb jel/zaj viszonyt eredményez. Ennek hátránya viszont, hogy néhány százaléknyi (<5%) zöld komponenst is tartalmaz egy alternatív érési útvonal következtében.

A FLIM mérésekben általában EGFP, Alexa 488 vagy Alexa 546 festékek élettartamát határoztuk meg, melyek magas kvantumhatásfokkal rendelkeztek (0,6; 0,92; 0,79)). Általános szabályként egy ROI-ból kb. százezer foton begyűjtése esetén kaptunk biexponenciális függvényvel kis szórással illeszthető lecsengési görbéket. Monoexponenciális illesztés esetén már 500 foton elegendő az élettartam 0,4% hibával történő illesztéséhez Barber és mtsai szerint (Global and pixel kinetic data analysis for FRET detection by multi-photon time-domain FLIM, SPIE Proceedings Volume 5700, <https://doi.org/10.1117/12.590510>).

Alacsony kvantumhatásfok esetén a fluoreszcencia élettartamok is általában rövidek. Ez akkor problematikus, ha a festék élettartama túl közel esik a sejtes autofluoreszcencia élettartamához, ami 1 ns körüli átlagértékkel rendelkezik, ilyenkor a festék élettartama nem különíthető el megbízható módon az autofluoreszcenciáétól.

In vitro, oldatban 10⁻⁵ kvantumhatásfokú molekulák fluoreszcencia élettartamát is meghatározták (Morshedi és mtsai, References for Small Fluorescence Quantum Yields, J Fluoresc, 2024, 35:3253–3266).

2. Szintén általános kérdésem lenne, hogy mennyire lehet építeni 1-2 százalékos FRET hatásfok változásra?

A 60. oldalon például 1.5±3%-ról, 5.3±2.4%-ra változik a FRET hatásfok, a 94. oldalon 1.6- ról 4.9-re növekszik. (Egy olyan esetben, ahol mondjuk az R0 ~ 50 Å egy két százalékos FRET hatásfok 100 Å körüli donor-akceptor távolságot jelent, ami már elég nagy távolság, és a Förster által felvázolt határon mozog).

A FRET méréseket két csoportra érdemes osztani. Az intenzitás alapú (ld. 3-as egyenletrendszer) mérésekben több segédparamétert kell meghatározni (S_1 , S_2 , α faktorok, átlagos autofluoreszcencia intenzitások), melyek mindegyikének hibája terheli az E meghatározásának pontosságát. Ezért fontos, hogy a méréseket egy adott napon minden összehasonlítható mintára azonos beállítások mellett elvégezzük, és a különböző napokon mért E értékek minták közötti különbségeinek tendenciáit összevessük. Egy FRET hatásfok különbséget két kezelés között akkor fogadunk el valósnak, ha – a statisztikai szignifikancia mellett – legalább a tendenciák megegyeznek különböző mérési napokon.

A FRET hatásfok értékek átszámítása távolságra csak korlátozottan lehetséges. A számított FRET hatásfok értékek egy adott pixelen belüli (áramlási citometriás mérésnél egy adott sejten belüli) átlagok, melyek az akceptor párral nem rendelkező donorok és akceptor párral (akár több akceptorral is) rendelkező donorok egyedi FRET hatásfok értékeinek súlyozott átlagai. Egy 5%-os mért FRET hatásfok lehet pl. 50-50 %-nyi magányos donor ($E=0$) és akceptorral rendelkező donor (a példában $E=10\%$) keverékének is az eredménye. A FRET hatásfok különbségek értelmezésekor mind az asszociált hányad, mind a donor-akceptor páron belüli tényleges FRET hatásfok megváltozásának lehetőségét figyelembe kell venni, és ugyancsak fontos, hogy azonos relatív akceptor/donor expressziós aránnyal rendelkező mintákat hasonlítsunk össze, illetve az akceptor/donor arányt figyelembe vegyük.

A FLIM-FRET méréseknél, mint pl. a 60. oldalon bemutatott, IL-15 receptor alegységei között mért FRET hatásfok, nagyon egyszerűen számítható a FRET hatásfok az $E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$ egyenlettel. Nem kell segédparamétereket meghatározni, csak két fluoreszcencia élettartamot. Tapasztalataink szerint a hiba jóval kisebb, mint az intenzitásalapú méréseknél, a kapott élettartamok és a belőlük kapott FRET hatásfokok nagyon jól, 1%-on belül reprodukálhatóak. Így, ha alacsony FRET hatásfokokat kell megmérni, a FLIM-FRET méréseket preferáljuk az intenzitás alapú mérésekkel szemben.

3. FLIM mérések esetében mekkora fluoreszcencia élettartam változás tekinthető már elfogadottnak, amiből érdemes FRET hatásfokot számolni?

A 69. oldalon szereplő 32. ábrán bemutatott donor élettartamok nagyon közel vannak egymáshoz. Nincsen táblázat mellékelve, de ránézésre a többi élettartam is nagyon közel esik az eredeti donor élettartamhoz. Egy szub-nanoszekundumos csökkenésből lehet már megbízható módon FRET hatásfokot számolni?

Az általunk használt EGFP sejtekben két élettartam komponenssel rendelkezik, amplitúdókkal súlyozott átlagos élettartama 2,2-2,3 ns élő sejtekben. Ez az érték kismértékben függ a hozzá kapcsolt fehérje típusától. Emellett pH-függést is mutathat különböző sejtorganellumokban. Ennek megfelelően a csak donoros kontroll mintának mind a hozzá kapcsolódó fúziós fehérje, mind a sejtorganellumban való elhelyezkedés tekintetében meg kell egyeznie a FRET-es mintával. Ha ez teljesül, akkor – megfelelő sejtszám és statisztika esetén – tapasztalataink szerint már 0,1 ns-os élettartam különbség megbízhatóan kimutatható két minta között, ami 4% FRET hatásfoknak felel meg.

4. A 75-76. oldalon bemutatott mérések esetében nem képzelhető el a GFP dimerizációja? Az ugyanis befolyásolná a kapott eredményeket.

Az YFP disszociációs állandója Daniel A. Zacharias és munkatársainak cikke (*Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells*. Science 2002, 296(5569):913–916) cikke szerint 0,11 mM, melyet szedimentációval határoztak meg. Az Aqueora victoria-ból származó GFP összes színvariánsa (CFP, YFP) és az EGFP (a GFP F64L, S65T mutánsa) tartalmazza az Ala²⁰⁶, Leu²²¹ és Phe²²³ által alkotott hidrofób foltot, mely a béta-hordók dimerizációjáért felelős. Ezért ezt az értéket tekintik a vad típusú FP-k disszociációs állandójának. A Bíráló által említett, EGFP-RAR-rel végzett FCS mérésekben a molekulák koncentrációja legtöbb esetben a szubmikromólos tartományban volt, tehát az eredményeket nem befolyásolhatta számottevő mértékben az EGFP dimerizációja. Az FP-k egyébként sem magas ön-affinitását több nagyságrenddel csökkentették a fenti közleményben leírt A206K mutációval 74 mM értékre (ezek az ún. monomer FP-k, pl. az mGFP).

5. A 79. oldalon beszámolt arról, hogy az első cink-ujj mind a négy ciszteinjének kicserélése alaninra a receptor aktiváló képességének drámai csökkenéséhez vezetett. Ennek mi lehet az oka, mi ebben az esetben a hipotézis?

A cinkujj kialakulását a ciszteinek koordinálják. A mutáció a DNS-kötő egyik cinkujj-motívum létrejöttét akadályozza meg, így annak DNS-kötő és ezáltal aktivációs képessége csökken. A 79. oldalon említett kísérlet egy galaktozidáz riporter mérési eljárás eredményére utal, mely az RAR-nek a beta-galaktozidáz génje előtt elhelyezett retinsav válaszadó elemhez (RARE) való kötődését, és ennek eredményeként a beta-galaktozidáz termelődését méri kolorimetrikus eljárással. Ennek eredménye a Brázda és mtsai, Journal of Cell Science 2011, 124:3631–3642 közlemény Fig. S5 kiegészítő ábráján látható (az értekezés 284. oldalán).

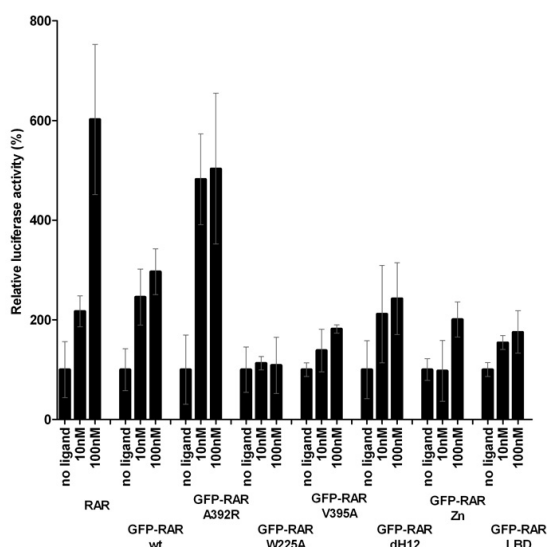


Fig. S5. Transcriptional activities of GFP-tagged wild type and mutated forms of RAR compared with untagged RAR in transient transfection assays. Assays were carried out as described in the Materials and Methods with the indicated plasmid constructs before and after the addition of (10±nM and 100±nM) RAR-agonist ligand (AM 580). Measured activities of receptors were normalized to the untreated sample (Data are mean ± s.d.).

6. A 93. oldalon bemutatott mérések esetében nem zavarja meg a méréseket a GFP dimerizációja?

Amint azt fentebb írtam, az EGFP dimerizáció becsült K_d értéke 0,11 mM. A SPIM-FRET-FCCS kísérleteinkben használt magreceptor koncentrációk a szubmikromólos tartományba estek.

7. A 81. oldalon bemutatta, hogy a GFP dimerként, trimerként és tetramerként is jelen lehet a mérések során. Kérdésem, hogy mennyire jellemző ezek együttes előfordulása? Általában mennyi a dimer/trimer/tetramer populáció a mérések során, illetve hogyan lehet akadályozni a GFP oligomerizációját.

A 81. oldalon bemutatott 1×EGFP monomerek, 2×EGFP dimerek, 3×EGFP trimerek és 4×EGFP tetramerek olyan fúziós fehérjék, melyekben a monomereket rövid peptid linker köti össze kovalensen. Az EGFP alacsony önaffinitása miatt magreceptorokkal végzett kísérleteinkben nem figyeltünk meg homodimerizációt a festékmolekulák között. Erre legnagyobb esély a c-Fos homodimerizáció mérése során lett volna, ahol a c-Fos homodimer 6,7 μM -os affinitása miatt az FCS mérések során 30 μM koncentrációig titráltuk a fehérjét, azonban a negatív kontrollokként használt EGFP és a dimerizációs doménnel nem rendelkező Fos^{ΔA}-EGFP még ebben a tartományban sem mutat, vagy alig mutat molekuláris fényesség növekedést, ami a festékek dimerizációjára utalna. Amennyiben még ennél is magasabb koncentrációtartományban mérnénk, mindenképpen indokolt lenne a monomer FP-k, pl. mGFP használata.

8. Ehhez kapcsolódó kérdés, hogy miért nem használtak inkább mCherry-t, ahol a GFP dimer/trimer/tetramer képződés zavarta volna a méréseket.

Mint fentebb leírtam, az EGFP nem dimerizálódik az általunk használt koncentrációtartományban. Az FCS mérésekben fontos a festék fotostabilitása és fényessége, mivel egy pontban gerjesztünk több másodpercen keresztül. Az mCherry és az mRFP1 jóval kisebb fotostabilitással rendelkezik, mint az EGFP, emellett kvantumhatásfoka is alacsonyabb, így nagyobb gerjesztő intenzitást igényel azonos emisszió eléréséhez, tehát sokkal gyorsabban kifakul. Ezért az FCS méréseknél az EGFP-t részesítettük előnyben, és mCherry-t csak FCCS mérésekhez használtunk, amikor az elkerülhetetlen volt.

9. Kicsit az előző kérdésekhez kapcsolódik a következő is: milyen tömeg-különbség kell a megbízható FCS mérésekhez? Ha GFP-vel jelölünk akkor mekkora az a legkisebb tömegű komplex, amit magabiztosan meg tudunk különböztetni a GFP-től.

Egy gömb alakú molekula diffúziós állandója fordítottan arányos annak sugarával, ennek megfelelően a térfogat vagy a tömeg köbgyökével, a diffúziós idő pedig egyenesen arányos mindezekkel. Egyenmű

molekulákkal, oldatban végzett méréseknél a 33%-os tömegkülönbség, ami 1,1-szeres faktort, 10%-nyi különbséget jelentett a diffúziós idők között, bőven elegendő volt a kovalensen összekapcsolt EGFP trimerek és tetramerek megkülönböztetésére (Vámosi et al, Sci Rep, 2016; 6:33022).

A sejtbeli mikrokörnyezet inhomogén, a lokális mikroviszkozitás változhat, a molekulák különböző tranziens kölcsönhatásokban vehetnek részt, a „molecular crowding” gátolt diffúziót okozhat és a sejtenkénti variabilitás is jelentős. További bizonytalanságot okozó tényező, hogy a molekulásokaságot jól reprezentáló korrelációs görbéhez a szakirodalom szerint kb. 1000 db fluktuáció megmérése szükséges, ami a fotoelhalványítás miatt sejtekben általában nem elérhető. Rövid, néhány másodperces méréseket végzünk (pl. 5x8 s), ami alatt pl. a 100 ms-os fluktuációk száma nem éri el az 1000-et. Ezért általános szabályt nem tudok mondani arra vonatkozóan, hogy milyen különbség az, amit sejtes rendszerben ki lehet mutatni. Nicolas Dross és mtsai (Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. PLoS One. 2009; 4:e5041) képesek voltak EGFP trimerek és tetramerek diffúziós állandóinak különbözőségét kimutatni élő sejtekben. Saját méréseinkben 20%-os diffúziós állandóbeli különbségek reprodukálhatóan kimutathatók voltak (ld. pl. az IL-15R α diffúziós állandójának változását Nagy Éva et al, Biophysical Journal, 2018, 114:2473–2482), de ennek természetesen feltétele, hogy megfelelő számú mérést végezzünk, hogy a különbség statisztikailag szignifikáns legyen.

Egy felbontóképességre vonatkozó klasszikus referencia (Meseth et al, Resolution of Fluorescence Correlation Measurements, Biophysical Journal, 1999, 76:1619 –1631) azt vizsgálta, hogy egy oldatban **együttesen előforduló** molekulák megkülönböztethetőségének mi a feltétele. 15 kHz fluoreszcencia intenzitás mellett optimális esetben, 1:1 molekula-arány és megegyező molekuláris fényességek esetén 4-szeres tömegkülönbséget (1,6-szoros diffúziós idő különbség) adtak meg kritériumként. Ha valamelyik molekula kisebb mennyiségben van jelen, ennél jóval nagyobb diffúziós időbeli különbség szükséges ahhoz, hogy igazolódjon, nem lehet egyetlen diffúziós komponenssel jól megilleszteni az autokorrelációs görbét.

10. Mely esetekben érdemes a FRAP-ot és mely esetekben érdemes az FCS technikát választani?

Az FCS a lokális, diffrakció limitált térfogatban végbemenő diffúziót méri 200-300 nm-es távolságtartományban. A strip FRAP ezzel szemben hosszabb távú, a kifakított folt méretétől függően néhány mikrométeres tartományban tud diffúziós folyamatokat vizsgálni. Az FCS előnye, hogy egy jól beállított FCS-ben a detektálás hatékonysága a konfokális térfogatban ismert (3 D Gauss vagy Gauss-Lorentz eloszlást követ), így pontos modellek írják le az autokorrelációs függvény alakját, és a térfogatelem kalibrálása után abszolút diffúziós állandó értékeket lehet meghatározni. Információt lehet nyerni a diffúzió mechanizmusáról is, pl. a molekuláris „crowding” vagy tranziens kötődés esetén jellemző gátolt diffúziós mechanizmusról vagy éppen az irányított mozgásról az ún. „anomália paraméter” illesztésével. További előny a molekuláris fényesség meghatározása, ami a mobilitástól függetlenül ad információt az asszociációs/aggregációs állapotról. Mindemellett tapasztalataink szerint a különböző minták közötti különbségeknek legalábbis a tendenciái nagyon jól reprodukálhatóak, még ha az egyes napokon kapott diffúziós állandó értékek különböznek is egymástól sejtes mintákban. Az FCS hátránya, hogy az immobilis molekulákat nem tudja kimutatni, mivel fluktuációk elemzésén alapul. Többfókuszú FCS, vagy kamera használata esetén (pl. SPIM-FCS) lehetőség van a két pont közötti (a képsíkban

különböző pixelek közötti) keresztkorrelációs függvények meghatározására is, ami a diffúzió távolság- és irányfüggésének vizsgálatára is alkalmat ad.

A strip FRAP általam ismert előnye az immobilis hányad kimutathatósága, illetve az elhalványított folt méretének változtatásával a különböző távolságokon végbemenő diffúziós folyamatok elemezhetősége. Emellett mindössze egy konfokális mikroszkópra van szükség a kivitelezéséhez. Hátránya, hogy az általánosan alkalmazott, általában mono- vagy biexponenciális modellfüggvények csak empirikusak, hiába írják le jól a visszatérési görbéket, elméleti megalapozottságuk hiányzik. Ennek egyik oka a sejt geometriájának változékonysága, ami egy általános modell kidolgozását megakadályozza. A FRAP így kevésbé kvantitatív módszer, inkább minták közti összehasonlításokra ad lehetőséget, bár megfelelő sztenderdek alkalmazásával diffúziós állandó becslésekre is alkalmas.

A fentieket összegezve a két módszer kiegészíti egymást. Ha abszolút diffúziós állandókat, oligomerizációs állapotot, diffúziós mechanizmust szeretnénk meghatározni, akkor az FCS, ha immobilis hányadot, akkor pedig a FRAP módszer előnyösebb.

Végezetül még egyszer köszönöm Lukács professzor úr gondolatindító kérdéseit.

Debrecen, 2026. 05. 19.



Dr. Vámosi György