

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

# **A SEJTMAGRECEPTOROK DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA**

**Brázda Péter**

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2014

# A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata

## A SEJTMAGRECEPTOROK DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA

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

Írta: Brázda Péter, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia  
Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, az MTA rendes tagja

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Mátyus László, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora  
Dr. Várnai Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris  
Biológiai Intézet  
2014. február 13. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora  
Prof. Dr. Roland Brock, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Mátyus László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora  
Prof. Dr. Roland Brock, PhD  
Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora  
Dr. Várnai Péter, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet  
„A” épület tanterme  
2014. február 13. 14 óra

## **BEVEZETÉS, ELMÉLETI HÁTTÉR**

### **A sejtmagreceptorok**

Az eukarióta transzkripciót befolyásoló jelek a szervezet legkülönbözőbb pontjaiból érkehetnek. A hormonok esetében például az endokrin szervből származó jel a keringési rendszer által lényegében a szervezet bármely részére eljuthat. A célszövethez eljutva egyes hormonok, anyagcseretermékek, kismolekulák képesek áthatolni a sejtek plazmamembránján. A sejten belül ezek a molekulák specifikus transzkripciós faktorokhoz, a sejtmagreceptorokhoz (NR) kötődve fejtik ki hatásukat. Ezáltal a sejtmagreceptorok direkt kapcsolatot létesítenek a sejt külső- és belső környezete, illetve a genetikai állomány kifejeződéséért felelős transzkripciós mechanizmusok között.

### **Peroxiszóma Proliferátor Által Aktivált Receptorok (PPAR)**

A szokatlan név a receptorok tudománytörténetéből adódik. Az első izoformát az egyes xenobiotikumok által a májsejtekben okozott peroxiszóma proliferációs folyamatok kapcsán izolálták. Ez a PPAR<sub>α</sub> volt. Gyorsan követte ezt a PPAR<sub>δ</sub> és a PPAR<sub>γ</sub> is. A legtöbb sejttípusban több izoforma is kifejeződik, ami felveti annak kérdését, hogy milyen módon szabályozódnak az egyes típusokhoz tartozó célgének. Ez valószínűleg a válaszadó elemeket övező szekvenciák specificitásán, illetve a szelektív koaktivátor fehérjéken keresztül történik.

A különböző zsírsavak és származékaik viszonylag alacsony affinitással kötődnek a PPAR<sub>γ</sub>-hoz. Számos nagy affinitással rendelkező szintetikus PPAR<sub>γ</sub> ligand létezik. Ezek közé tartoznak a tiazolidindion (TZD) típusú hatóanyagok, amelyek a klinikai gyakorlatban II. típusú cukorbetegségben szenvedő betegeknél inzulin érzékenyítőként alkalmaznak.

Kizárólagos heterodimer partnerükkel, az RXR-rel képesek közvetlen DNS-kötésre a specifikus válaszadó elem felismerése (PPRE) után.

### **Retinsav Receptorok (RAR)**

Az RAR az A-vitamin biológiailag aktív formáját képes felismerni és megkötni. A fehérjecsald más tagjaitól (a szteroid receptoroktól) eltérően, a retinoid

## A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata

receptorok mindig a sejtmagban találhatóak. Ligandjuk hiányában a saját válaszadó elemüket felismerve, represszorként kötődnek a DNS-hez. Nagy affinitást mutatnak az RXR-ek felé, melyek ezeknek a receptoroknak is obligát dimerizációs partnerei. Endogén ligandjuk a csupa-transz retinsav (ATRA), valamint a 9-cisz-retinsav. Érdekes, hogy az utóbbi agonista ligandja az RXR-nek is. Ez a jelenség is a két receptor bensőséges kapcsolatára utal.

### **Retinoid X Receptorok (RXR)**

A csupa-transz retinsav receptorának azonosítása után egy másik receptort is találtak, amely részt vesz a retinoidok jelátviteli útvonalában. Ezzel párhuzamosan, egy új kofaktort is leírtak, ami az RAR válaszadó eleméhez történő kötődéshez szükséges. Ezek a felfedezések ugyanazt a sejtmagreceptort, az RXR-t írták le. A három izoforma ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) nagyfokú homológiája azt jelzi, hogy hasonló célszekvenciákhoz kötődve, hasonló ligandokon keresztül fejtik ki hatásukat. A különbség a szövetspecifikus expressziós mintázatukból adódik. Az RXR $_{\alpha}$  és az RXR $_{\beta}$  a legtöbb szövettípusban megtalálható, viszont az RXR $_{\gamma}$  elsősorban az izomrostok és agy szöveteit felépítő sejtekben fejeződik ki.

Számos molekulát írtak már le potenciális RXR ligandként, köztük a 9-cisz retinsav, a dokozaheptaénsav illetve szintetikus szelektív ligandok, mint például az LG268. Mindezek ellenére, az endogén RXR ligandot még nem sikerült azonosítani.

Az emlős két-hibrid rendszerben mutatott aktiválhatóságuk alapján az RXR heterodimerek két csoportra oszthatóak. A nem-permisszív heterodimerek (például az RXR:RAR dimer) nem aktiválhatóak szelektíven az RXR oldaláról. A kétoldali aktiváció szinergista hatást vált ki. Ezzel szemben a permisszív heterodimerek (például az RXR:PPAR dimer) két-funkciós transzkripciós faktorokként viselkednek, melyek a dimer bármely oldaláról, külön-külön is aktiválhatóak.

### **A sejtmagreceptorok működési modellje**

A 'molekuláris kapcsoló modell' alapján ligand távollétében korepresszorok és a represszor komplex további tagjai (köztük HDAC-ok) kapcsolódnak a magreceptorokhoz. Ez a zárt nukleoszómás szerkezet kialakulásának kedvez a kromatinon. Ez a környezet korlátozza a transzkripciós faktorok hozzáférését a genom adott szakaszához, ami gátolt transzkripciós állapotot jelent. Az agonista ligand

megjelenése után, a sejtmagba jutva bekötődik a specifikus receptor ligandkötő zsebébe, annak konformáció-változását idézve elő.

A ligandkötött forma affinitása csökken a korepresszorok felé, ugyanakkor nő a koaktivátorok felé. Ezek után a koaktivátoron keresztül az aktivátor komplex további acetiltranszferáz aktivitással bíró tagjai csatlakoznak. Az így kialakuló acetilált milió az adott genomi régió transzkripció aktiválását segíti elő.

### **A sejtmagreceptorok dinamikus működése**

A kromatin immunprecipitáció (ChIP) módszere a transzkripció faktorok korábban ismeretlen tulajdonságát segítette feltárni. Az első eredmények alapján az ösztrogén receptor (ER) DNS-kötésében rövidebb és hosszabb idejű időszakok ciklikusan váltják egymást. Az ER, az HDAC és a DNS polimeráz ciklikus DNS-kötése, egy magas szinten integrált transzkripció 'racni'-t ír le. Ez rendkívül dinamikus választ tesz lehetővé, amely azonban mobil végrehajtó elemeket (esetünkben transzkripció faktorokat) feltételez.

### **Fluoreszcencia visszatérés kioltás után (FRAP)**

Az itt tárgyalt fluoreszcencia technikák a fluktuáció-disszipáció tételén alapulnak, amely kimondja, hogy akár egy random fluktuáció eredményeként, akár egy külső erő hatására jön létre egy nem egyensúlyi állapot, az egyensúly felé történő fejlődése mindkét esetben azonos. A fluktuáció-disszipáció tétel lehetővé teszi, a külső erőterekre adott válaszon keresztül a rendszer áramlási tulajdonságainak vizsgálatát. Az egyik ilyen, külső hatáson alapuló technika a FRAP, amely alkalmazásával tanulmányozni lehet az oldatban levő fluoreszcens molekulák kötési kinetikáját és diffúzióját.

Egy tipikus FRAP kísérlet során az előre meghatározott modellek alkalmazásával a fluoreszcencia visszatérési arányát, és a fél-visszatérési időt ( $\tau_{1/2}$ ) lehet meghatározni. FRAP az elsők módszerek között volt, amivel másodperces időbeli felbontás alatt tanulmányozták transzkripció dinamikájának. Ezek a kísérletek jelentették az első kihívást a 'statikus' modell számára és segítettek elő a 'hit-and-run' modell megalkotását.

## A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata

### **Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)**

A fluoreszcens fehérjék felfedezése és az egyetlen-molekula érzékenységgű módszerek megjelenése forradalmasította a molekuláris kölcsönhatásokkal kapcsolatos vizsgálatokat. Az érzékenységet a konfokális mikroszkóp teszi lehetővé egy fókuszált lézernyalábbal, femtoliteres méretű érzékelési térfogatot hozva létre. Az FCS hasonlít a FRAP-hoz abban az értelemben, hogy ez is a fluktuáció-disszipáció tétel elvén működik. Azonban az FCS esetében nincs külső hatás ami eltérést okozna az egyensúlyi állapotban. Ez a módszer az egyensúlyi állapottól való természetes módon történő eltéréseket, ingadozásokat használja ki. A fluoreszcensen jelölt molekulák a konfokális térfogaton át történő diffúziója a detektált jel intenzitásának ingadozását eredményezi. A elsődleges adat egy FCS mérés során az fluoreszcencia intenzitása az idő függvényében, amely arányos a megfigyelt részecskék számával. Ebből a jelsorozatból, autokorrelációs függvény képezhető, a jelsorozat időben változó ön-hasonlóságát vizsgálva a molekulák fotofizikai és diffúziós tulajdonságait írja le.

### **Vizsgálatok a teljes genom szintjén: kromatin immunprecipitációval kombinált szekvenálás (ChIP-Seq)**

Sok információnak van arról, hogy egy-egy transzkripciós faktor milyen módon kötődik egy-egy genomi régióhoz, azonban az újabb szekvenálási technológiák és ezzel párhuzamosan az egyre több teljesen megszekvenált genom a transzkripciós gépezet új arcát mutatja be. A kromatin immunprecipitáció (ChIP) során egy DNS-kötő faktorra specifikus antitest alkalmazásával elválsztható és feldúsítható a mintából a faktor által kötött genomi régió. A feldúsított DNS darabok szekvenálásuk és azonosításuk után visszailleszthetőek bioinformatikai módszerekkel egy referencia genomra. Ha egy adott szakaszhoz a minta több sejtjében kötődött az adott faktor, akkor a szakasz több alkalommal lesz reprezentálva az illesztés során. Így egy, a teljes genomot lefedő eloszlást kapunk, adott helyeken csúcsokat kialakító feldúsulásokkal. Ezen csúcsok eloszlása a faktor szekvencia preferenciáját és annak kötési valószínűségét mutatja. Esetünkben jó lehetőséget jelent ez a módszer arra, hogy a nagy időbeli felbontással rendelkező módszerek mellett globálisan is vizsgáljuk az RXR dinamikáját.

## CÉLKITŰZÉS

Vizsgálataink a transzkripciós szabályozás dinamikus természetére irányultak. A fókuszban az RXR állt, mint a magreceptorok általi szabályozás központi molekulája. Olyan módszereket alkalmaztunk, melyek kombinációja az eddig példátlan időbeli és térbeli felbontás révén, ezen mechanizmusok új jellegzetességeit, összefüggéseit tárhatja fel. A korábbi vizsgálattal szemben, ezen méréseket élő sejtekben végeztük el.

Munkánkat a klasszikus promoter-analízis eszköztárának használatával kezdtük, majd elő-sejtes konfokális mikroszkópiára tértünk át. Utóbbiak között a FRAP és FCS módszerekre. A receptorok működését különböző ligandok és mutációk alkalmazásán át tanulmányoztuk. Ezen vizsgálatokat SPIM-FCS és ChIP-Seq mérésekkel egészítettük ki, így megnövelve egyrészt a térbeli felbontást, másrészt kísérletek léptékét is, mivel a korábbi kezeléseket ezáltal a teljes genom vonatkozásában vizsgálhattuk.

A főbb kérdések, amikre választ kerestünk:

- Melyek az RXR és az RAR általános mobilitási paramétereit?
- Milyen hatással van az RXR és az RAR aktiválása a sejttagon belüli dinamikájukra?
- Milyen események befolyásolják a receptorok mobilitását?
- Hogyan tükröződik az RXR és az RAR közötti funkcionális különbség a dinamikájukon?

Ezen kérdések megválaszolásával a magreceptorok dinamikus működését leíró modelleket kívántuk kiegészíteni.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Sejttenyésztés és transzfekeció

A HeLa-sejteket fenol-vörös mentes RPMI tápoldatban tenyésztettük, 10 % borjúsérummal (FBS), 2 mM glutaminnal, penicillinnel és sztreptomocinnel kiegészítve. A sejteket 48 órával a mérés előtt 8-lyukú Nunc kamrákba helyeztük. 24 órával később, transzfekeciót végeztünk lyukanként 40 ng DNS, 0,16  $\mu$ l FuGene (Roche) használatával.

### Plazmidok

A hRXR $\alpha$ , hRAR $\alpha$ , hRXR $\alpha$ -LBD, hRAR $\alpha$ -LBD, hRAR $\alpha$ -dH12, a kofaktor interakciós domént és maglokalizációs szignált (NLS-SMRT-ID és NLS-ACTR-ID) kódoló cDNS-eket PCR-t követően pEGFP-C3 (Clontech) és pmCherry-C3 vektorokba klónoztuk BglII/HindIII (RXR), XhoI/HindIII (SMRT) és NheI/SacI (ACTR) endonukleázzal történő emésztés után. A GFP-RAR mutánsokat a Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) felhasználásával hoztuk létre a gyártó utasításai szerint. A plazmidok DNS-szekvenálással ellenőriztük.

A tranziens transzfekeciós vizsgálatokban használt expressziós vektorok, (Gal-SMRT ID1-2, VP-hRXR $\alpha$ -LBD, VP-hRAR $\alpha$ -LBD, CMX-hRAR $\alpha$ , pMH100-TK-luc, bRARE-luc, PCMX- $\beta$ -galaktozidáz, Gal-ACTR-ID1+2, Gal-DRIP-ID1+2) Dr. R. Evans és Dr. Sz. Benkő ajándékozta laborunknak.

### Tranziens transzfekeciós vizsgálatok

Fehérjék funkcionális vizsgálata során 500 ng cDNS-t és 120 ng válaszadó elemmel fúzionált riporter plazmidot (RARE) és 90 ng a  $\beta$ -galaktozidáz plazmidot kotranszfekektáltunk AD293T sejtekbe 48-lyukú kamrákban. A lizátumban a luciferáz aktivitást Luciferase Assay Kit (Promega) használatával, Wallac Victor2 multilabel fluoriméterrel határoztuk meg.

### Pulzáló ligandkezelés

A transzfekektált sejteket 100 nM AM580, vagy LG268 ligandot tartalmazó sérummentes tápoldatban tartottuk 10 percen át az FCS-mérések előtt. A méréseket 40 percen át végeztünk. A ligandot tartalmazó tápoldat kimosása után előmelegített (37°C) HBSS-pufferben tartottuk sejteket sérummentes közegben egy CO<sub>2</sub>-



inkubátorban 37°C-on 20 percig. A méréseket 40 percen át végeztünk ligand távollétében.

### **ChIP (kromatin immunprecipitáció)**

A keresztkötés diszukcinimidil glutarát (30 perc), és a formaldehid (Sigma) (10 perc) jelenlétében történt, amit az RXR immunprecipitációja követett. A kromatint ultrahanggal (Diagenode Bioruptor) szonikáltuk 200-1000 bp darabokat generálva. A kromatint IgG-t (12-370, Millipore) és RXR (sc-774, Santa-Cruz Biotechnologies, Inc.) elleni antitestekkel immunprecipitáltuk. A kromatin-antitest komplexeket anti-IgG mágneses gyöngyökkel precipitáltuk (Life Technologies). 6 mosási lépés után a komplexek eluáltak és keresztkötést oldottuk. A DNS-fragmentumokat oszlopon tisztítottuk (Qiagen, MinElute).

### **Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia ( FCS ) mérések**

A 2-csatornás FCS-bővítmény (a prototípust Dr. Jörg Langowski , DKFZ, Heidelberg, Németország tervezete) konfokális pásztázó egység negyedik detektálási csatornájához van csatlakoztatva. Az FCS-méréseket az élő HeLa sejteken végeztünk. Az EGFP gerjesztése 488 nm-en Ar-ion lézerrel történt. Az emissziót egy 500-550 nm-es sáváteresztő szűrőn keresztül, fotodiódával detektáltuk (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). A fluoreszcencia autokorreláció görbéket ALV-5000E korrelátor kártyával határoztuk meg (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mb.H., Langen , Németország).

### **FRAP mérések**

A FRAP méréseket egy fordított a IX-81 állványra épített egy 60×UPlanAPO NA1,2 víz immerziós objektívvel felszerelt Olympus FluoView1000 konfokális mikroszkóppal végeztük. Az EGFP gerjesztése 488 nm-en Ar-ion lézerrel történt. Az emissziót egy 500-550 nm-es sáváteresztő szűrőn keresztül detektáltuk. A kvantitatív elemzés 256×256 pixel méretű területen történt, és a nyitott pinhole és 10×zoom mellett. Minden mérés előtt 10 égetés előtti képeket vettünk 1%-os lézerintenzitással, majd 1500 ms-on át égettük ki a területet 100%-os lézerintenzitással egy 256×10 pixeles területen. A kiértékelés során az átlagos pixel-intenzitásokat NIH ImageJ (ver. 1.45s) segítségével határoztuk meg. A visszatérési görbéket az IGOR szoftverbe illesztett FrapCalc-EMBL modullal illesztettük az előre elkészített modellekhez.

## EREDMÉNYEK, DISZKUSSZIÓ

### **A PPAR<sub>γ</sub> kötődése az ABCG2 promoterén (egy 'klasszikus' promoter-analízis)**

A korábban leírt és publikált PPAR<sub>γ</sub>-kötő promoter egy 1647 bp méretű szakaszból áll (-1285 / 362). Ebben a szekvencia-elemzés nem tárt fel ismert PPAR<sub>γ</sub> válaszadó elemet. Ezután egy nagyobb régiót (5000 bp) vizsgáltunk. Egy 150 bp-nyi, konzervált régiót (-3946 / -3796) sikerült így azonosítani bioinformatikai eszközökkel. Ez a szekvencia három, potenciális PPAR<sub>γ</sub> válaszadó elemet tartazott, melyek mindegyikében megtaláltuk az ismétlődő AGGTCA motívumot (DR1). Az újonnan azonosított ABCG2-erősítő elemet egy minimális TK-luciferáz promoter elé klónoztuk (enhancer TK-luciferáz). Ezt a konstrukciót COS1 és 293T-sejtekbe kotranszfektáluk a PPAR<sub>γ</sub> konstitutívan aktív formájával együtt (VP-PPAR<sub>γ</sub>), RXR nélkül, illetve jelenlétében. A fokozott luciferáz aktivitás a magreceptorok az erősítő elemhez történő kapcsolódását jelezte. A PPAR:RXR heterodimer komplex nagyobb aktivitást mutatott, mint a PPAR monomer formában. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a PPAR<sub>γ</sub> direkt módon, heterodimerként képes felismerni és kötődni az újonnan azonosított, humán ABCG2 génhez tartozó erősítő szekvenciához.

### **Az RXR dinamikája élő sejtekben (FRAP)**

A FRAP mérések lehetővé tették, hogy másodperces időfelbontás mellett tanulmányozzuk az RXR dinamikáját. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy megjelenik-e egy immobil (tartósan helyezkötött) hányad az aktiváció során és hogy milyen hatással van az agonista ligand megjelenése a receptor magon belüli diffúziójára. Az égetési terület geometriájának és az ehhez tartozó diffúziós modell megtalálása után lehetővé vált az immobil hányad és a fél-visszatérési idő meghatározása.

A ligand távollétében, a fluoreszcens jel gyors visszaépülést mutatott ( $t_{1/2} = 2,5 \pm 0,4$  s, immobil hányad  $3 \pm 3\%$ ). Tíz perces LG268 (RXR agonista) kezelés után a fél-visszatérési idő emelkedett ( $t_{1/2} = 7,3 \pm 0,7$  s), de immobil frakciót továbbra sem detektáltunk ( $7 \pm 3\%$ ). Az agonista kezelés a közvetlen DNS-kötésre képtelen GFP-RXR-LBD konstrukt fél-visszatérési idejét is emelte, bár kisebb mértékben. Ezekben a kísérletekben az aktiválás során az RXR lelassulása volt kimutatható, de ellentétben

számos más magreceptorral, az RXR nem képzett olyan immobil frakciót, amely a hosszabb tartózkodási időre utalna a kromatinhoz kötve.

### **Az RXR és az RAR dinamikája miliszekundumos felbontás mellett, élő sejtekben (FCS)**

FCS segítségével méréseinket a miliszekundumos tartományba helyezhettük át. A két-komponensű normál diffúziós modell bizonyult legjobban használhatónak rendszerünkben. A tézis ezen szakaszában az RAR és az RXR diffúziós paraméterei kerülnek összevetésre. A receptorokra jellemző diffúziós idők a  $\tau_1 = 1,5-10$  ms (gyors komponens) és  $\tau_2 = 60-240$  ms (második, lassabb komponens) tartományba estek.

### **Az RAR és az RXR jelentős hányada viszonylag szabadon diffundál a magban**

A receptorok diffúziós idő eloszlás-hisztogramja hasonló mintázatot mutat. Azonban két lényeges különbség jelenik meg: az RXR rövidebb az átlagos diffúziós ideje és a lassú hányad RAR-hez képest kisebb mérete.

### **Az aktiválás a receptorokat egy lassabb állapot felé tolja el**

A magreceptorok működését leíró molekuláris kapcsoló modell alapján a ligandfüggő koregulátorcsere az egyik legfontosabb, az aktiválást lehetővé tevő lépés. A kérdésünk az volt, hogy a ligandfüggő aktiváció és koregulátorcsere hogyan tükröződik a receptorok mobilitásán. A telítési koncentrációban adagolt szelektív agonista (100 nM AM580 vagy LG268) csak kis változást okozott a diffúziós időkben. Azonban már öt perccel a ligand hozzáadása után átrendeződött a gyors/lassú receptorok aránya. Az aktivált RXR esetében a lassabb molekulák aránya 16%-ról 43%-ra változott. Az RAR esetében eleve nagyobb volt ez a frakció az aktiválását megelőzően is (29 %). Az AM580-kezelés az RXR-hez hasonlóan gyors változást eredményezett ennél a receptornál is.

### **A ligandfüggő mobilitásbeli változások az RXR esetében tranziensek, ellentétben a RAR-ral**

A véráramban található metabolitok, kismolekulák és egyéb potenciális magreceptor ligandok mennyisége időben nem állandó. Látva a válasz azonnali jellegét, kíváncsiak voltunk a változás tartósságára. "Kimosást" végeztünk. Ugyanazon kamrában mértünk keydetben agonista nélkül, majd agonista jelenlétében.

## A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata

Ezután a ligandot tartalmazó tápoldatot üresre cseréltük, és ebben inkubáltuk 20 percig a sejteket, majd ismét FCS-mérést végeztünk ugyanabban a kamrában. Meglepő különbségeket tapasztaltunk. Az RXR esetében a ligand eltávolítása után a mobilitási viszonyok visszarendeződtek. Ezzel ellentétben, az RAR esetében a ligand eltávolítása után is megmaradt az aktivált állapotra jellemző gyors/lassú hányad.

### **A koaktivátorkötés feltétele a ligandfüggő mobilitásbeli változásoknak**

A magreceptorok aktivációjának kulcs mozzanata a ligandkötést követően a korepresszor komplex leválása és a koaktivátor komplex bekötődése a receptor felszínén. Az RAR ezen felületét módosítottuk pont-mutációval, majd tanulmányoztuk a változások hatását a fent leírt ligandfüggő lassulásra.

A kezeletlen "aktivátorkötő" mutáns (amely nagyobb affinitással köti a koaktivátort) diffúziós paraméterei a kezeletlen receptor hasonlóak voltak a vad típusú receptoréhoz. Ezzel szemben, a megnövekedett korepresszorkötő affinitással rendelkező mutáns esetében a ligand hatása elmaradt a vad-típusnál tapasztalttól. A lassú hányad ligandfüggő növekedése tehát a koregulátorkötéshez kapcsolt.

Mivel az RXR esetében nem ismertek jól leírt koregulátorkötő mutánsok, egy másik stratégiát alkalmaztunk. Az LG1208 egy szintetikus (RXRa-specifikus) antagonist. A kettős LG1208 + LG268 kezelés mérsékelte az agonista LG268 hatását. Az antagonist önmagában nem okozott változást, de kombinálva az agonista liganddal megakadályozta a gyors/lassú komponensek átrendeződését. jraelosztása . Ez azt sugallja, hogy csakúgy, mint az RAR esetében, koaktivátorkötés előfeltétele az RXR mobilitásbeli változásának.

### **A DNS-kötés az aktiváció előtti dinamikai viszonyokat befolyásolja, az aktivációfüggő átrendeződésre csak limitált hatással bír**

Transzkripciós faktorokként a sejtmagreceptorok egyik legfontosabb képessége a DNS-kötés. Ezalapján arra számítottunk, hogy a DNS-kötő képesség redukálása vagy megszüntetése jelentős hatással van a receptorok diffúziójára. Olyan, csonkolt receptorokat hoztunk létre melyek csak egy ligandkötő doménből (és egy maglokalizációs szignálból állnak), tehát hiányzik a DNS-kötő doménjük. (GFP-RXR-LBD, GFP-RAR-LBD). A FRAP mérések alapján az RXR-LBD diffúziója gyorsabb volt, mint a teljes hosszúságú receptoré, azonban aktiválás hatására

megnövekedett fél-visszatérési ideje, azaz lelassult. Ez a mutáns továbbra is képes a ligand és a koregulátor megkötésére és a dimerképzésre, viszont nem képes direkt módon kötődni a DNS-hez. Fontos megjegyezni, hogy a dimerizációs partneren keresztül történő DNS-kötést nem lehet kizárni az LBD esetében. Az FCS mérések a teljes hosszúságú (FL) formáknál mértéknél rövidebb diffúziós időket mutattak. A lassú komponens látszólagos diffúziós ideje nem különbözött szignifikánsan az FL-nél mértéktől, de a frakció mérete kisebb volt. Ez az eredmény arra utal, hogy a ligand távollétében is van bizonyos mértékű DNS-, illetve kromatinkötés a teljes hosszúságú RAR és RXR esetében.

### **Az RXR mobilitás-térképe**

A különböző mobilitással bíró molekula-populációk sejten belüli megjelenítése új utakat nyithat a magreceptorok vizsgálatában. A SPIM-FCS esetében a fluoreszcens molekulák gerjesztése nem a sejt egy adott pontjában történik, hanem egy teljes sejtszeletben. Így nem egy, hanem esetünkben (a detektortól függően) 40x20 FCS mérés történhet egyszerre a sejtmag egy szeletében. Ezen mérések kiértékelése után megkaphatjuk a vizsgált fehérje mobilitás-térképét. A SPIM-FCS-sel meghatározott diffúziós paraméterek megegyeztek az FCS-sel mértékekkel. A különböző mobilitással bíró populációk azonban egyenletes eloszlást mutattak a magon belül, nem láttuk tehát nyomát helyi feldúsulásoknak.

### **Az RXR DNS-kötése a teljes genom szintjén**

Amint a korábbi mérések során láthattuk, megfelelő stimulus hatására jelentősen megváltozik a magreceptorok dinamikája egyrészt a koregulátorkötés, másrészt a DNS-kötés következtében. Mi történik a transzkripciós faktor és a kromatin között? Több potenciális kötőhely válik vajon elérhetővé az aktiváció során?

Ezekre a kérdéseket csak akkor lehet válaszolni, ha a magreceptorok kromatinkötését a teljes genom szintjén vizsgáljuk. ChIP-Seq kísérleteket végeztünk HeLa sejtekben, hogy összevessük az aktiválás előtti és az aktiválás utáni RXR kötőhelyeket. Az immunoprecipitáció, a szekvenálás és a megszekvenált DNS szakaszok referencia-genomra történő illesztése után meghatároztuk az RXR által elfoglalt kötőhelyek számát. 6636 RXR-kötő szakaszt azonosítottunk a kontrol (kezeletlen) mintában. Ez a szám 8302-re nőtt az LG268 aktivált mintában. 5138

## A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata

(több, mint 50 %) azon helyeknek a száma amelyek azonosak a két mintában. 1498 kötőhely tűnt el, és 3164 új hely jelent meg a ligandkezelés után.

Az aktiválás hatására az RXR nem kötődik lényegesen több kötőhelyre. Azonban a kromatin 'foglaltsága' változik. Agonista hatására ugyanis nőtt annak a valószínűsége, hogy az RXR-t kötőhelyhez kapcsoltn találjuk.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az RXR és az RAR sejtmagon belüli mobilitását vizsgáltuk aktiválás során élő-sejtes konfokális mikroszkópiás módszerekkel. A FRAP és az FCS technikák kombinált alkalmazásával széles időskálán tudtuk tanulmányozni a magreceptorok rendkívül dinamikus viselkedését. A rendszert legjobban a két-komponensű szabad diffúziós modell írja le. Ligand távollétében a legtöbb receptor a gyorsabb populációhoz tartozik. Agonista kezelést követően, a populációk eloszlása gyorsan megváltozik; megnő a lassú receptorok aránya. A koaktivátorkötés nélkülözhetetlen ehhez a változáshoz.

Az RXR és az RAR receptorok FCS-mérése jelentős dinamikai különbségekre mutatott rá: RXR dinamikusabb molekulaként viselkedett. Az aktiválás során szélesebb spektrumon változott a mobilitása. SPIM-FCS méréseink alapján ezek a dinamikai változások a teljes sejtmagban azonos mértékben végbemennek.

A teljes genomra vonatkozó eredményeink alapján az aktiváció során nem nő meg jelentősen az RXR-kötött helyek száma. A ChIP-Seq mérések arra utalnak tehát, hogy a receptorok nem foglaltak el több kötőhelyet, azonban a kötések valószínűsége nőtt.

Az RXR és más magreceptorok kapcsolata számos érdekes kérdést tartogat még. Arra, hogy hogyan befolyásolják és szabályozzák az elérhető kötőhelyek, ligandok és dimerizációs partnerek a különböző RXR-heterodimerek létrejöttét, valószínűleg hamarosan választ kaphatunk. Egy másik érdekes terület a kromatin, a transzkripciós faktorok és a transzkripciósan aktív régiók viszonya. Ezekhez kapcsolódó kérdésekre adhat választ számos, nemrégiben elérhetővé vált módszer. A SPIM-FCCS (SPIM fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia) alkalmazásával például megrajzolható a sejtmagon belüli fehérje-fehérje kölcsönhatások térképe. A GROseq (Global Run-On szekvenálás) módszerével globális, teljes-genom szinten lehet meghatározni az aktív RNS-szintézis helyeit. Azokban az esetekben amikor mechanizmusok leírása és feltárása a cél, célravezető a különböző elveken alapuló és eltérő érzékenységgű módszerek kombinációját alkalmazni.

# A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/8/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

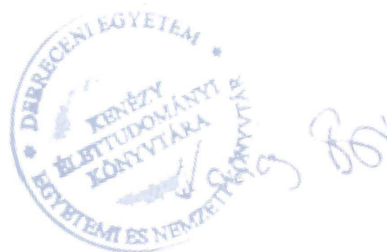
Jelölt: Brázda Péter

Neptun kód: N4J0F0

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Brázda, P.**, Krieger, J., Dániel, B., Jonas, D., Szekeres, T., Langowski, J., Tóth, K., Nagy, L., Vámosi, G.: Ligand binding shifts highly mobile RXR to chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner as revealed by single cell imaging.  
*Mol. Cell. Biol.* "accepted by publisher", 2014.  
IF:5.372 (2012)
2. **Brázda, P.**, Szekeres, T., Bravics, B., Tóth, K., Vámosi, G., Nagy, L.: Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility.  
*J. Cell Sci.* 124 (21), 3631-3642, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.086082>  
IF:6.111
3. Szatmári, I., Vámosi, G., **Brázda, P.**, Bálint, B.L., Benkő, S., Széles, L., Jeney, V., Özvegy-Laczka, C., Szántó, A., Barta, E., Balla, J., Sarkadi, B., Nagy, L.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells.  
*J. Biol. Chem.* 281 (33), 23812-23823, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604890200>  
IF:5.808







## További Közlemények

4. Tóth, K., Sarang, Z., Scholtz, B., **Brázda, P.**, Ghyselincx, N., Chambon, P., Fésüs, L., Szondy, Z.:  
Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T cells by facilitating glucocorticoid  
receptor-mediated transcription.  
*Cell Death Differ.* 18 (5), 783-792, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.136>  
IF: 8.849
5. Vámosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C., Szalóki, N., Mocsár, G., Müller, G., **Brázda, P.**,  
Waldeck, W., Damjanovich, S., Langowski, J., Tóth, K.: Conformation of the c-Fos/c-Jun  
complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study.  
*Biophys. J.* 94 (7), 2859-2868, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120766>  
IF: 4.683

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30.823

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló  
közleményekre): 17.291

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, 2014.01.14



## A sejtmagreceptorok dinamikájának vizsgálata

### AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

**P., Brazda, K., Toth, L. Nagy, Gy., Vamosi** (2011) “Dissecting the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor (RAR) mobility by live cell FCS” (presentation)

– 8<sup>th</sup> European Biophysics Congress (EBSA), Budapest

**P., Brazda, B., Reho, J., Krieger, K., Toth, Gy., Vamosi** (2013) “Activation enhances DNA-binding of RXR but not the number of binding sites, as shown by FCS and CHIP-Seq” (poster)

– 9<sup>th</sup> European Biophysics Congress (EBSA), Lisbon

Gy., Vamosi, **P., Brazda, B., Reho, J., Krieger, K., Toth** (2013) “Liganded RXR displays highly dynamic behavior governed by coactivator binding as revealed by single cell imaging” (presentation)

– 23<sup>rd</sup> Wilhelm Bernhard Workshop, Debrecen

### TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

**Brazda P, et al.** (2007) A transzkripció szabályozás dinamikus arca.  
*Biokémia* 4(31):74-81.