

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Magreceptorok kölcsönhatásainak vizsgálata
kvantitatív fluoreszcencia mikroszkópiás
eszközökkel**

Dr. Rehó Bálint

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023

**MAGRECEPTOROK KÖLCÖNPHATÁSAINAK VIZSGÁLATA KVANTITATÍV
FLUORESZCENCIA MIKROSKÓPIÁS ESZKÖZÖKKEL**

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

Írta: Dr. Rehó Bálint okleveles orvosdoktor
Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Biofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja programja) keretében
Témavezető: Dr. Vámosi György, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Demény Máté Ágoston, PhD

Dr. Pankotai Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja

tagok: Dr. Balkay László, PhD

Dr. Demény Máté Ágoston, PhD

Dr. Hegedűs Tamás, PhD

Dr. Pankotai Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2023. október 19. 13 óra

1. BEVEZETÉS

Magreceptorok szupercsaládja

A magreceptorok szupercsaládjába olyan transzkripciós faktorok tartoznak, melyek ligandfüggő módon képesek befolyásolni célgénjeik átírását. Szerepük van számos folyamatban, ilyen például a sejtek homeosztázisának, osztódásának, anyagcseréjének, illetve halálának szabályozása.

A területen zajló intenzív kutatások eredményeként emberben összesen 48 db magreceptort sikerült azonosítani.

Természetes ligandjaik közé olyan kis méretű, lipidoldékony molekulák tartoznak, melyek képesek szabadon átdiffundálni a sejtmembránon. Ezek a molekulák elsősorban zsírolékony vitaminok, hormonok, szteroidok. Bizonyos magreceptorok endogén ligandjait nem ismerjük, ezeket árva receptoroknak nevezzük.

Magreceptorok doménszerkezete

A magreceptorok móltömege 50-100 kDa közé esik. Legtöbbjük 5 doménre osztható, doménszerkezetük nagyfokú homológiát mutat.

A receptorok N-terminális végén található az A/B domén. Ez a legkevésbé konzervált szekvencia a magreceptorok szerkezetében.

Az A/B domént követi a leginkább konzervált DNS-kötő domén (DNA-binding domain, DBD), mely két darab, egyenként 4-4 konzervált ciszteint tartalmazó cink-ujjal rendelkezik. A két Zn-ujj által létrehozott hélix a DNS nagyárkához képes kapcsolódni, amennyiben specifikus válaszadó elemet ismer fel.

A D-régió flexibilis hidat képez a DBD és a ligand-kötő domén (LBD) között. A ligandkötő domén (LBD) igazi multifunkciós domén. Nemcsak a ligand kötésében, hanem a dimerizációban, a ligandfüggő transzkripciós aktiválásban

(activation function 2, AF2), és a koregulátor kötésben is meghatározó szerepe van.

Az F-domén nagyfokú variabilitást mutat az egyes magreceptorok között, olyannyira, hogy egyes magreceptorok F-doménje hiányzik.

Magreceptorok csoportosítása szerkezetük alapján

Az emberben előforduló 48 féle magreceptort szekvencia homológia alapján 7 nagy csoportba oszthatjuk. Az NR1 csoportba többek között a reténsav receptorok (RAR), a D-vitamin receptor (VDR) tartoznak.

A reténsav természetes ligandjai az A-vitamin aktív metabolitjai, a lipidoldékony csupa-transz-reténsav és a 9-cisz-reténsav. Számos sejtfolyamatban részt vesz, többek között a sejtek növekedésében és differenciálódásában, de immunmodulációs szerepe is van. A retinoid szignalizáció kóros működését számos malignus betegségben, többek között leukémiákban, melanomában, tüdő-, mell-, petefészek-, prosztata-, hasnyálmirigy- és májdaganatban kimutatták, ezáltal az RAR potenciális kemoterápiás célponttá válhat. Az RAR működése során rexinoid receptorral (RXR) dimerizálódik.

A D-vitamin receptor is RXR-rel képez heterodimert, endogén ligandja a D-vitamin aktív metabolitja, a kalcitriol. Az RAR-rel ellentétben a VDR nem csak a sejtmagban, hanem a citoszolban is megtalálható, de egyes kutatócsoportok a sejtmembránban is leírták előfordulását. A VDR részt vesz a szervezet kalciumtranszportjában, de számos tanulmány utal arra, hogy az immunválaszban és a tumorigenezisben is jelentős szerepe van.

Molekuláris kapcsoló modell

A magreceptorok működését tradicionálisan a molekuláris kapcsoló modell írja le. A modell értelmében a receptorok ligand hiányában a kromatinhoz

kötődnek és korepresszor komplexszel asszociálnak, mely hiszton-deacetiláz aktivitása révén gátolja célgénjeik átírását.

Ligand jelenlétében az agonista a ligandkötő zsebbe kötődik, ami konformációváltozást vált ki, mely során a H12 hélix rácsukodik a ligandkötő zsebre. Ez a konformációváltozás csökkenti a magreceptor korepresszorok iránti, de ugyanakkor fokozza a koaktivátorok iránti affinitását, így koregulátorcsere zajlik le.

A koaktivátorok további fehéjéket kötnek, melyek hiszton-acetiltranszferáz aktivitásuk révén a kromatin szerkezetét lazítják, lehetővé téve a transzkripció gépezet aktiválódását.

Magreceptor-működés dinamikus modelljei

A területen zajló intenzív kutatások eredményeként a fenti molekuláris kapcsoló modellt egyre dinamikusabb kép kezdi felváltani. Kimutatták, hogy a transzkripció faktorok a kromoszómán háromdimenziós letapogatást végeznek, míg el nem érnek egy válaszadó elemet, ahol megfelelő feltételek esetén hosszabb időt tölthetnek, és elősegíthetik a transzkripció beindítását. Az ösztrogén receptor esetében kimutatták, hogy a sejtmagon belül eltérő mobilitású magreceptor komplexek vannak jelen. A leggyorsabbak a nem kromatinhoz kötött magreceptor dimerek, míg a leglassabbak azok, melyek a kromatinhoz tranziensen kötődnek és koregulátor komplexszel asszociálódnak. A magreceptorokkal folytatott FRAP, ChIP és FCS vizsgálatok során új dinamikus modellt alkottak, melyet „hit-and-run” modellnek neveztek el. A modell alapján a receptorok ligand hiányában korepresszorokat kötnek, majd a kromatint szkennelve tranziensen kötődnek specifikus és nem specifikus válaszadó elemekhez. Ligand hatására koregulátorcsere történik, a magreceptorok az AF-2 doménen keresztül nagy tömegű koaktivátor komplexhez kötődnek. Specifikus válaszadó elemhez érve

a magreceptorok a kromatinhoz stabilabban kötődnek és aktiválják a transzkripciós gépezetet.

Konfokális mikroszkópia

Az epifluoreszcens mikroszkópia legnagyobb hátránya, hogy a gerjesztő fényforrás a minta teljes vastagságában gerjeszti a fluorofórokat, ezáltal a fókuszsíkon kívül eső fotonok is detektálásra kerülnek. Amennyiben a minta vastagsága elhanyagolható, ez nem okoz jelentős képminőség romlást, azonban vastagabb minták, például sejtek vizsgálata során, a fókuszsíkon kívülről származó fluoreszcens szignál elkülönítése nehézkes.

Fentiek miatt számos új módszer került kifejlesztésre, mellyel a fókuszsíkon kívül eső fotonok a detektálásból kizárhatóak. Ilyen módszer a konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM), mely során a mintát fókuszált lézerfényvel világítjuk meg, majd ezt követően az emittált fotonok egy szűk résen, pinhole-on haladnak keresztül. A pinhole biztosítja, hogy csak a fókuszsíkból érkező fotonok érkezenek a detektorba. Mivel a gerjesztés egy pontszerű lézernyalábbal történik, a mikroszkópos kép a minta letapogatásával jön létre, mely során a lézerfényt tükrök segítségével a minta pontjaira irányítjuk, majd az egyes pontokon gerjesztett fluoreszcencia intenzitást detektáljuk.

Szelektív sík-megvilágítású mikroszkópia (SPIM)

Az tradicionális konfokális mikroszkópiával szemben sík-megvilágítású mikroszkópia a minta vékony síkját világítja meg. A gerjesztés során hengeres lencsével egy lézerfény-síkot képezünk, mely a detektálás irányára merőleges. A gerjesztés szinte kizárólag a fókuszsíkból történik, ezáltal a háttér gerjesztése minimális. A fenti módszerrel lehetőség nyílik optikai szelektelésre, jelentősen csökkenthető a fotohalványítás, valamint a sejtekre kifejtett fototoxicitás. Mivel a gerjesztés és detektálás egy egész síkban egyszerre történik, a CLSM-hez képest 100-1000x gyorsabb képalkotás érhető el.

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia során konfokális mikroszkóppal mérjük a kicsiny, femtoliteres gerjesztett térfogatba be- és kilépő fluorofórok által okozott fluoreszcencia intenzitás változását.

FCS vizsgálatok során a gerjesztő fotonokat egy fókuszált lézernyaláb biztosítja, melyet egy nagy numerikus apertúrával ($NA > 0,9$) rendelkező objektív vetít a mintára. A mintából kibocsájtott fluoreszcens jel az objektíven keresztül egy dikroikus tükrön és egy emissziós szűrőn halad át, majd egy pinhole-on keresztül jut a detektorba. A mintavételezés hosszabb ideig, szub-mikroszekundumos felbontással történik, ezáltal megkapjuk a minta $F(t)$ időfüggő fluoreszcencia intenzitását, mely adott időben a detektálási térfogatban található fluorofórok számával arányos. A fluktuációk hossza a molekulák sebességétől, tehát diffúziós állandójától függ.

Az autokorrelációs függvény különféle modellfüggvényekkel illeszthető, és az illesztési paraméterekből a diffúziót jellemző fizikai tulajdonságok kinyerhetők. A modellválasztás során a rendszert a lehető legegyszerűbben, de megfelelő pontossággal leíró modellt keressük.

Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS)

Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával vizsgálhatjuk két együtt diffundáló, különböző fluorofórral megjelölt molekula asszociációját. FCCS során a fókuszterefogatot két átfedő lézernyalábbal gerjesztjük, a beérkező fluoreszcencia jeleket pedig két különálló detektorral detektáljuk. Amennyiben a két fluorofórral megjelölt molekula egymással asszociál, a keresztkorrelációs függvény amplitúdója magas lesz, így a függvény amplitúdójából következtethetünk az asszociáció mértékére.

Förster rezonancia energia transzfer (FRET)

A FRET érzékeny módszer két molekula közelségének meghatározására. A FRET a gerjesztett állapotban lévő donor, valamint egy megfelelő spektroszkópiai paraméterekkel rendelkező akceptor között dipól-dipól kölcsönhatás révén sugárzás nélküli energiaátadás formájában jön létre. Az energiaátadás feltétele, hogy a donor-akceptor távolság kb. 1 és 10 nm közé essen, a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma átfedést mutasson, valamint szükséges még hozzá a molekulák megfelelő relatív orientációja.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatomban elsősorban az RAR, VDR és RXR magreceptorok dinamikájának vizsgálatával foglalkozom, élő-sejtes környezetben, fluoreszcenciás vizsgálati módszereket felhasználva.

Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- Mobilitás szempontjából homogén-e a sejtmagban található magreceptor populáció?
- Hogyan változik a magreceptorok mobilitása heterodimerizáló partner, illetve agonista ligand hatására?
- A mobilitásban bekövetkező változás a heterodimerizáció vagy a fokozott DNS kötődés következménye?
- Megjelenik-e az RXR kötődésért folytatott versengés a VDR és RAR között a kromatin-kötődés szintjén?

A fenti kérdések megválaszolásához elsősorban konfokális mikroszkóppal végeztünk fluoreszcencia korrelációs vizsgálatokat, de továbbfejlesztettünk egy olyan szelektív sík-megvilágítású mikroszkópiára (SPIM) épülő módszert is, mellyel egyszerre vizsgálható a molekulák egymással való asszociációja, valamint a kölcsönható részecskék mobilitása (SPIM-ALEX-FRET-FCCS) is. A jelen disszertáció eredményei a későbbiek folyamán segíthetnek a magreceptorok működését befolyásoló terápiás célpontokat találni, valamint felhívja a figyelmet a magreceptorokat célzó terápiák esetében a kompetíció fontosságára. Az általunk továbbfejlesztett mikroszkópos módszer más fehérjék esetében is segíthet a molekuláris kölcsönhatások és mobilitás feltérképezésében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

A mikroszkópos vizsgálatok során humán embrionikus vese karcinóma (HEK293), humán méhnyakrák sejteket (HeLa) és humán kolorektális adenokarcinóma (Caco-2) sejteket használtunk. A sejteket fenolvörös festéket tartalmazó, 10% FBS-el, 50 mg/l gentamycinel és GlutaMax-al kiegészített DMEM-ben növesztettük 37°C-os inkubátorban 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában. A sejteket hétfő-szerda-pénteki napokon passzáltuk.

48 órával a konfokális mikroszkópai méréseket megelőzően a sejteket 8-lyukú ibidi kamrákban szélesztettük. A sejteket ezt követően 300 µl fenolvörös-mentes médiumban növesztettük. 24 órával a mérések előtt a sejtekhez 65 ng magreceptor-plazmidot és 0,3 ng FuGene transzfekciós reagenst, valamint 5 µl szérum-mentes DMEM-et tartalmazó oldatot adtunk a gyártó előírásainak megfelelően.

SPIM-méréseink során a sejteket egyedileg elkészített, előzőleg 0,01%-os poli-L-lizint tartalmazó oldattal kezelt fedőlemezekre szélesztettük. Ehhez 48 órával a mikroszkópos vizsgálatok előtt 3 db, előzetesen poli-lizinezett fedőlemezt tartalmazó, 35 mm-es petri-csészékre 120000 sejtet helyeztünk át. Ezt követően a sejteket 400 ng plazmidot, 3 µl FuGene-t, valamint 50 µl szérum-mentes DMEM-et tartalmazó oldattal transzfektáltuk.

Kompetíciós vizsgálatainkhoz a korábban munkacsoportunk által létrehozott, TagBFP-vel jelölt RXRα-t expresszáló HEK293 sejteket használtunk, melyeket a fentebb ismertetett módon transzfektáltunk további magreceptorokkal. A mikroszkópos mérésekre minden esetben a transzfekciót követően 24 órával került sor.

Konfokális mikroszkópia

Konfokális mikroszkópiai méréseinket Zeiss LSM880 – AiryScan konfokális lézer pásztázó mikroszkópon végeztük, 40-szeres nagyítású, 1,2 numerikus apertúrával rendelkező vízimmerziós objektívvel. A képfelvételek $70,85\ \mu\text{m} \times 70,85\ \mu\text{m}$ látómezőről 512×512 pixel felbontásban 16 bit mélységben készültek. A flurofórral megjelölt magreceptorok relatív expressziós szintjét EGFP-mCherry és TagBFP-EGFP fúziós fehérjék használatával határoztuk meg. HEK293 sejtekben az endogén és transzfektált magreceptorok relatív expressziós szintjének meghatározásához Western-blottal kombinált konfokális mikroszkópiai méréseket végeztünk.

Pont FCS mérések

FCS mérések során a vizsgálni kívánt sejtről először konfokális képet vettünk fel a korábban ismertetett módon, majd a sejtmagban 2 szabadon választott pontban az EGFP-vel jelölt magreceptorokkal FCS méréseket végeztünk. Az EGFP gerjesztése 488 nm-es Ar-ion lézerrel történt. Az objektívnél észlelhető lézerintenzitást minden mérési nap elején $1.7\ \mu\text{W}$ -ra állítottuk be. Ezt követően a kiválasztott pontokban 10×8 másodpercen keresztül mértük a fluoreszcencia intenzitást, amiből a mikroszkóp Zen szoftvere kiszámította az autokorrelációs függvényeket. A mérések minden esetben szobahőmérsékleten történtek (22.5°C).

Az autokorrelációs függvények kiértékeléséhez a QuickFit3 szoftvert használtuk.

SPIM mikroszkópia

SPIM mikroszkópiai méréseinkhez egy egyedileg összeállított mikroszkópot használtunk. Speciális kialakítású mintatartóban a már korábban ismertetett tárgylemezekre kirakott sejteket az objektív síkjához képest kb. 45° fokkal elfordítottuk. A mintatartót DMEM médiummal töltöttük meg. A mintákat 488

nm-es és 561 nm-es szilárdtest lézerrel gerjesztettük, a fókuszterefogatban sikkal közelíthető gerjesztési nyalábot cilinderes lencsékkel és egy objektívvel hoztuk létre. Az optikai szeletek 1,28 μm és 1,35 μm vastagságúak voltak 488 nm-es és 561 nm-es megvilágítás esetében. Az objektívnél mért lézerintenzitások 910 és 4750 μW -nak adódtak.

A fluorofórok által kibocsájtott fluoreszcens fotonokat a gerjesztésre merőlegesen, 60x-os nagyítású vízimmerziós objektívvel gyűjtöttük össze. A fluoreszcens fotonokat spektrálisan kettéosztottuk (500-550 nm, >593 nm) egy DualView nyalábosztóval, majd a zöld és vörös fotonokból alkotott képeket egyazon EMCCD kamerával rögzítettük egymás mellett a fényérzékeny chip két térfelén 530 μs -os mintavételezéssel, 51 $\mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ (128 $\times$ 20 pixel) méretben.

A FRET és FCCS mérések ugyanabban a síkban történtek, a kiértékelés mindig pixelenként történt. FRET mérésekhez olyan előnézeti képeket használtunk, melyeket az FCCS mérés előtt közvetlenül vettünk fel, és a beállításokat a FRET méréshez optimalizáltuk. Ezt követően két lézerrel történő folyamatos gerjesztés mellett FCCS képeket vettünk fel, mely során minden egyes pixelre zöld- és piros autokorrelációs és keresztkorrelációs görbe került kiszámításra.

Alternáló gerjesztés (ALEX)

A fentebb ismertetett módszer hátránya, hogy az előnézeti képekből számított FRET hatásfokot, valamint az FCCS amplitúdót különböző időpontban, különböző képekből számítjuk ki. A sejtek mozgásából, vagy a fotelhalványodásból származó intenzitás különbségek miatt a két mérés közvetlenül nem összehasonlítható. Ráadásul az FCCS mérésekor alkalmazott kétlézeres folyamatos gerjesztés során számolnunk kell a csatornák közötti átvilágítással és a fokozott fotoelhalványítással is.

Hogy ezeket a műtermékeket elkerüljük, SPIM mikroszkópiai méréseink során alternáló gerjesztést (ALEX) vezettünk be. ALEX során időben különválasztjuk a két lézerrel történő gerjesztést, 488 nm-es gerjesztés során donor és transzfer képet (500-550 nm, illetve >593 nm detektálás), 561 nm-es gerjesztés során akceptor képet (>593 nm detektálás) kapunk, melyet FRET vizsgálatainkhoz használtunk. Az egymást követően felvett donor- és az akceptor képek korreláltatásával FCCS vizsgálatokra nyílt lehetőségünk. A fenti módszerrel a FRET és FCCS vizsgálataink egy időben, ugyanazon fluoreszcens fotonok felhasználásával történnek, így közvetlenül összehasonlíthatóak.

Ligandkezelés

Ligandkezeléshez a magreceptorok szintetikus ligandjait használtuk, AM580-at az RAR, LG268-at az RXR és kalcitriolt a VDR aktiválásához.

A ligandkezelés során a ligandokat 100 nM koncentrációban adtuk a sejtekhez, a méréseket 20 perc inkubációt követően végeztük. A sejteket a ligandkezelést követően maximum 1 órán keresztül vizsgáltuk, ezt követően új mintán újabb ligandkezelést végeztünk.

4. EREDMÉNYEK

Fluoreszcensen jelölt magreceptorok eloszlásának és diffúziós paramétereinek meghatározása HEK293 sejtekben

Mikroszkópos vizsgálataink kimutatták, hogy az RAR ligand hiányában főként a sejtmagban helyezkedik el.

A sejtmagban elhelyezkedő magreceptorok szabadon diffundálhatnak, tranzienzen vagy stabilan kötődhetnek a kromatinhoz. Ezeknek a mozgásoknak a dinamikáját a fluoreszcencia idő szerinti autokorrelációs függvénye fejezi ki. Az autokorrelációs függvényt a Módszerek fejezetben bemutatott egy- vagy kétkomponensű, normál- és anomális diffúziós modellekkel illesztettük. EGFP-RAR esetében az egykomponensű modellfüggvény nem illeszkedett megfelelően a mért ACF-re. Kétkomponensű modellekkel a függvény jól illeszthető volt, a 2-komponensű anomális diffúziós modell a 2-komponensű normál diffúziós modellhez képest viszont szignifikánsan nem adott jobb illesztést.

Eredményeink alapján teljes hosszúságú magreceptorok esetében a továbbiakban a 2-komponensű normál diffúziós modellt alkalmaztuk.

Agonista kezelés, vagy ko-expresszált heterodimerizáló partner fokozza az RAR kromatin kötését

Az RAR diffúziós paramétereinek vizsgálatához HEK293 sejtekbe EGFP-vel megjelölt RAR és mCherry-vel jelölt RXR magreceptorokat transzfektáltunk, majd a sejteket az RAR szintetikus ligandjával, AM580-al kezeltük. Agonista ligand és heterodimerizáló partner hiányában az EGFP-RAR lassú populációjának (ρ_2) aránya, kb. 22%-nak adódott, ez az arány munkacsoportunk korábbi méréseivel megegyezik. Amennyiben a sejteket AM580 liganddal kezeltük, a lassú populáció aránya növekedett, míg a lassú populáció diffúziós állandója (D_2) csökkent, mely a kromatinhoz történő

erősebb kötődés, a kromatinhoz kötött állapot meghosszabbodásának következménye lehet.

Amennyiben az EGFP-RAR mellé mCherry-RXR-t transzfektáltunk, az RAR lassú komponensének aránya még nagyobb mértékben emelkedett, míg a lassú populáció diffúziós állandója jelentősen csökkent, ez a fokozott heterodimerizációra, valamint fokozott kromatinkötésre utal. AM580 ligandkezelés additív módon növelte a lassú populáció arányát.

Az RXR által indukált fokozott kromatin kötődés mechanizmusának megértéséhez az EGFP-RAR mellé mCherry-vel jelölt RXR ligandkötő doméneket (RXR-LBD) transzfektáltunk. Az RXR-LBD képes RAR-rel heterodimerizálódni, DNS-kötő domén híján viszont önmagában nem képes kromatinhoz kötődni. A teljes hosszúságú RXR-rel ellentétben az RXR-LBD kotranszfekciója nem növelte a lassú populáció arányát; AM580 hozzáadása is csak minimális változást idézett el. Ebből következik, hogy az RAR RXR-rel történő dimerizációja csak akkor fokozza a komplex kromatinkötését, ha az RXR is rendelkezik DNS-kötő képességgel.

A VDR mobilitása csak heterodimerizáló partner és agonista ligand együttes jelenléte esetén csökken

Agonista ligand hiányában - az EGFP-RAR-rel ellentétben - az EGFP-VDR a sejten belül homogén eloszlást mutat. mCherry-RXR ko-transzfeckiót követően, illetve kalcitriol kezelés hatására az EGFP-VDR a sejtmagba vándorol, ahogy ezt korábban munkacsoportunk, illetve egyéb kutatócsoportok is kimutatták.

Az EGFP-RAR-rel ellentétben az EGFP-VDR lassú populációjának aránya igen alacsony volt, tehát a VDR affinitása a kromatinhoz jóval kisebb, mint az RAR esetében. Ligandkezelés és mCherry-RXR kotranszfekció hatására a lassú

populáció aránya csak kismértékben nőtt, a lassú populáció diffúziós állandója nem változott.

Agonista ligand és mCherry-RXR ko-transzfekció együttes hatására a lassú populáció aránya csaknem kétszeresére nőtt, míg a diffúziós állandó csökkent, ami a kromatinkötés megnövekedett időtartamára utal.

Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója

Munkacsoportunkban korábban magi transzlokációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy különböző magreceptorok versengenek az RXR kötődéséért. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a fent leírt kompetíció megjelenik-e a DNS-kötés szintjén is RAR és VDR között.

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom magreceptor jelenléte esetén az RAR lassú populációjának aránya kissé alacsonyabb volt ($p_2 \sim 0,32$), mint csak RAR és RXR jelenlétében ($p_2 \sim 0,38$). Ez arra utal, hogy az RXR készlet egy része VDR-hez kötődik, ezáltal csökkentve az RAR/RXR heterodimerek arányát.

A VDR esetében RXR hozzáadásakor nem tapasztaltunk fokozott kromatinkötést, és ugyanezt az eredményt kaptuk mindhárom magreceptor együttes jelenléte esetén is.

AM580 ligand hozzáadására nem tapasztaltunk szignifikáns változást az RAR lassú populációjának arányában, míg kalcitriol hatására a lassú populáció aránya kissé csökkent. AM580 és kalcitriol együttes alkalmazása esetén nem tapasztaltunk érdemi változást a liganddal nem kezelt mintához képest.

A VDR lassú populációja kalcitriol hatására jelentősen emelkedett, míg AM580 hatására mérsékelten csökkent. AM580 és kalcitriol együttes alkalmazásakor a lassú populáció aránya a két külön-külön végzett kezelés értéke közé esett.

Fentiek alapján elmondható, hogy amennyiben az RAR és VDR egyszerre vannak jelen, az RXR inkább az RAR-t részesíti előnyben a VDR-rel szemben, és ez a kromatinkötésben is megjelenik.

Mindhárom magreceptor jelenlétében az LG268 az RAR esetében minden kombinációban emelte, míg VDR esetében minden kombinációban csökkentette a lassú populáció arányát.

RAR esetében a kromatinkötött lassú populáció aránya LG268 hatására emelkedett, ellentétben a VDR-rel, melynél csökkenést tapasztaltunk; ez az RXR RAR-hez történő fokozott affinitását jelzi. AM580 és LG268 együttes alkalmazása tovább növelte az RAR lassú komponensének arányát az AM580 kezeléshez képest, míg VDR esetében kalcitriol és LG268 dupla kezelés hatására csökkenést tapasztaltunk a kalcitriol kezeléshez képest.

Az RXR RAR-hez történő fokozott affinitása abban az esetben is kimutatható volt, ha az RXR ligandját a kompetáló partner ligandjával együtt alkalmaztuk: az RAR lassú komponensének aránya LG268 és kalcitriol együttes alkalmazásakor magasabb volt, mint csak kalcitriol kezelés esetén; ezzel szemben a VDR lassú komponensének aránya LG268 és AM580 kezelés mellett érdemben nem változott a csak AM580 kezeléshez képest.

Összességében mérési adataink arra utalnak, hogy a ligand-vezérelt kompetíció az RAR és VDR között nemcsak fehérje-fehérje kölcsönhatások, hanem a kromatin kötődés szintjén is megjelenik. Az RAR ligand hiányában, illetve VDR és RAR ligand együttes jelenlétében is nagyobb affinitással kötődött az RXR-hez, mint a VDR, az RAR-RXR komplex pedig erősebben kötődik a kromatinhoz, mint a VDR-RXR komplex.

Alternáló gerjesztés bevezetése SPIM méréseink során (SPIM-ALEX-FRET-FCCS)

Korábbi FCCS mérések során a két lézerrel történő együttes és folyamatos gerjesztés további korrekciókat igényelt: többek között a donor vörös csatornába történő átvilágítását, a FRET-et és a vörös festék 488 nm-es lézerrel történő gerjesztését is figyelembe kellett vennünk.

Ezen problémák kiküszöbölésére a SPIM mikroszkópot alkalmassá tettük alternáló gerjesztés (ALEX) használatára. Ezzel a módszerrel a 488 nm-en történő gerjesztés során donor és transzfer jeleket kapunk, míg az 561 nm-es lézerrel történő gerjesztés átvilágítástól mentes akceptor képet hoz létre. A donor és akceptor képek 0,53 ms-os különbséggel keletkeznek, ezek további FCCS analízisre is használhatóak.

A módszer hitelesítésére folyamatos és alternáló gerjesztéssel végeztünk méréseket különböző kontroll mintákon.

Az ALEX alkalmazásával számított E értékek szórása magasabb, mint az előnézeti képekből számolt E értékeké. Ez a kisebb jel/zaj aránya következménye, azonban javítható több ALEX mérés során keletkezett kép szummázásával.

Folyamatos gerjesztéssel még a negatív kontroll esetében is viszonylag magas relatív keresztkorrelációs amplitúdó ($rCCF$) értéket kapunk, a csatornák közötti átvilágításból adódóan. Amennyiben az átvilágítást szoftveresen korigáljuk, az $rCCF$ értéke alacsonyabb lesz.

ALEX alkalmazásával a pozitív kontrollok esetén a korigált $rCCF$ értékhez képest magasabb, míg a negatív kontroll esetében alacsonyabb értékeket kaptunk, ezáltal a mérés dinamikus tartománya kb. 45%-kal emelkedett, így dimerizáció mértéke jobban kvantifikálható, valamint a módszer szenzitivitása is fokozódik.

Mivel a gerjesztés időtartama rövidebb, ALEX alkalmazásával a kiegészítés mértéke is csökkenthető.

Alternáló gerjesztés során a FRET és FCCS mérések egyidejűleg történnek, így lehetőségünk van az E és $rCCF$ paramétert közös koordináta rendszerben ábrázolni, ezáltal egyszerre kvantifikálható a molekuláris távolság és a ko-diffúzió mértéke.

Magreceptorok dimerizációjának és kromatin kötésének egyidejű vizsgálata SPIM-ALEX-FRET-FCCS alkalmazásával

Az új módszer használhatóságát először EGFP-vel és mCherry-vel megjelölt magreceptorokon teszteltük HeLa sejtekben.

A magreceptorok közötti FRET hatások megállapításához az FCCS mérést megelőzően készített előnézeti képeket használtuk a magreceptorok közötti alacsony E érték miatt. Teljes hosszúságú magreceptorok esetében ligand hiányában a FRET hatások 1,6%-nak adódtak, ami AM580 kezelés hatására szignifikánsan növekedett. LG268 és dupla ligandkezelés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést.

Az E értékével ellentétben a magreceptorok közötti komobilitás ($rCCF$) már ligand hiányában is magas volt. AM580 hozzáadásakor az $rCCF$ értékében markáns, míg LG268 esetében kisebb növekedést tapasztaltunk. Dupla ligandkezelés hatására szignifikáns változást nem sikerült kimutatnunk. LG268 hatására az RXR endogén receptorokkal is dimerizálódhat, mely az AM580-nál gyengébb hatást magyarázhatja.

A diffúziós paraméterek pixelenkénti meghatározásához az autokorrelációs függvényeket két-komponensű normál diffúziós modellel illesztettük. A gyors populáció diffúziós állandója (D_1) $4-9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -nak, míg a lassú populációé (D_2) $0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -nak adódott. Ezek az eredmények korábbi konfokális FCS vizsgálatainkkal megegyeznek. A keresztkorrelációs függvényeket

egykomponensű normál diffúziós modellel illesztettük, a sejtek diffúziós állandója $0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ körül alakult, mely a dimer kromatinkötésére utal.

A lassú komponens arányának (ρ_2) meghatározásából kitűnik, hogy az RAR kromatinkötése kevésbé függ a ligand hozzáadásától, a ρ_2 már ligand hiányában is igen magas, mint ahogy ezt korábbi konfokális FCS vizsgálataink is kimutatták. RXR esetében azonban a lassú komponens aránya 23%-ról AM580 hozzáadásakor 29%-ra, míg LG268 hozzáadására 35%-ra növekedett. A fenti diffúziós paramétereket és ezek változását is figyelembe véve elmondható, hogy AM580 és LG268 hatására fokozódik az RAR-RXR dimerizáció, de LG268 esetében kisebb mértékben, mely nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy az RXR nemcsak az EGFP-vel jelölt RAR-rel, hanem más jelöletlen, endogén magreceptorokkal is dimerizálódik és így kötődik a kromatinhoz.

Ezek az eredmények bizonyítják a SPIM-FRET-FCCS módszer előnyeit: csak FRET alkalmazásával a dimerizáció mértékét alulbecsülnénk, valamint az RAR és RXR kromatinkötődésének különbségeit sem tudnánk kimutatni.

Magreceptorok ligandkötő doménjeinek vizsgálata SPIM-FRET-FCCS módszerrel

Hogy a dimerizációt a kromatinkötés “zavaró” hatása nélkül tisztán vizsgálhassuk, a magreceptorok ligandkötő doménjeivel is elvégeztük kísérleteinket. Ehhez EGFP-vel jelölt RAR-LBD-t és mCherry-vel megjelölt RXR-LBD-t kotranszfektáltunk.

Ligand hiányában a két magreceptor LBD között mért FRET hatásfok magasabbnak adódott, mint a teljes hosszúságú magreceptorok esetében. Ez egyrészt utalhat a magasabb dimerizációra, de okozhatja a két fluorofór előnyösebb relatív orientációja, vagy a két fluorofór közötti kisebb távolság is. A két magreceptor LBD közötti keresztkorrelációs amplitúdó a teljes

hosszúságú magreceptoroknál mért értékhez képest alacsonyabb volt, ami arra utal, hogy a kromatinkötődés vagy a DNS-kötő domének kölcsönhatása is hozzájárul a dimerizációhoz.

AM580 kezelés hatására a FRET hatások közel kétszeresére nőtt, azonban az *rCCF* nem növekedett szignifikáns mértékben, ami arra utal, hogy a FRET hatások növekedését részben a két fluoroför távolságának csökkenése vagy kedvezőbb orientációja, mintsem a fokozott dimerizáció okozta. LG268 hatására az *E* kismértékben növekedett, míg az *rCCF* értéke nem változott. Dupla ligandkezelés hatására a FRET hatások majdnem kétszeresére nőtt, míg az *rCCF* nem változott.

A lassú populáció aránya az LBD-k esetében minden esetben alacsonyabb volt, mint a teljes hosszúságú magreceptorok esetében. Mivel az LBD-k nem képesek a kromatinhoz kötődni, a lassú populáció kizárólag olyan LBD dimereket tartalmazhat, melyek nagy móltömegű koaktivátor komplexet kötnek, vagy indirekten, nem jelölt endogén partnereken keresztül kötődnek a kromatinhoz.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A magreceptorok működését leíró viszonylag statikus molekuláris kapcsoló modellt a területen zajló intenzív kutatások eredményeképpen egyre dinamikusabb kép kezd felváltani. FCS vizsgálataink arra utalnak, hogy a magreceptoroknak két eltérő mobilitású populációja van jelen a sejtmagban: a gyors populáció rövid ideig kötődik a kromatinhoz, ez felelhet meg a kromatint pásztázó egydimenziós mozgásnak. Ezzel szemben a lassú populációba tartozó magreceptorok hosszabb ideig kötődnek a kromatinhoz, feltehetően specifikus módon a válaszadó elemekhez.

Agonista ligandkezelés vagy RXR kotranszfekció hatására RAR esetében a lassú populáció aránya jelentősen növekedett, mely a kromatinhoz történő erősebb kötődés, a kromatinhoz kötött állapot meghosszabbodásának következménye lehet. Ezzel szemben VDR esetében a lassú populáció aránya csak ligand és RXR együttes hozzáadása mellett növekedett, vagyis a VDR kromatinkötése csak ligandkötött állapotban, RXR-rel heterodimert képezve stabil.

Három magreceptort (RAR, VDR, RXR) egy sejtben vizsgálva kimutattuk, hogy az RAR és a VDR versengése az RXR kötődéséért a kromatinkötés szintjén is megjelenik, ami felelőssé tehető a magreceptorokon ható humán terápiák mellékhatásaiért. Ligand hiányában az RXR az RAR-t preferálja a VDR-rel szemben, ligand jelenlétében pedig mindig a ligandkötött receptor képezett heterodimert az RXR-rel.

Munkám második fázisában továbbfejlesztettünk egy mikroszkópos módszert, mely lehetővé tette, hogy a sejt egy adott síkjában egyidőben vizsgáljuk a molekulák diffúziós tulajdonságait, valamint a közöttük lévő kölcsönhatásokat. A SPIM-FRET-FCCS módszert használva lehetővé vált a magreceptorok dimerizációjának és komobilitásának egyidőben történő

mérése, valamint a magreceptor populációk diffúziós paramétereinek meghatározása a sejt egy adott síkjában. A két módszer kombinálásával lehetőség nyílt olyan interakciók megfigyelésére, melyek vizsgálata FRET vagy FCCS külön-külön történő alkalmazásával félrevezető eredményt adott volna. Alternáló gerjesztés (ALEX) bevezetésével tovább finomítottuk módszerünket, ezáltal csökkent a fluoreszcens fehérjék kiegészése és jelentősen javult az FCCS dinamikus tartománya és érzékenysége is.

A jelen disszertáció eredményei a későbbiek folyamán segíthetnek a magreceptorok működését befolyásoló terápiás célpontokat találni, valamint felhívják a figyelmet a magreceptorokat célzó terápiák esetében a kompetíció fontosságára. Az általunk kifejlesztett új mikroszkópos módszer más fehérjék esetében is segíthet a molekuláris kölcsönhatások és mobilitás feltérképezésében.

6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/120/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Rehó Bálint

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Rehó, B.**, Fadel, L., Brázda, P., Benziane, A., Hegedűs, É., Sen, P., Gadella, T. W., Tóth, K., Nagy, L., Vámosi, G.: Agonist-controlled competition of RAR and VDR nuclear receptors for heterodimerization with RXR is manifested in their DNA-binding.
J. Biol. Chem. 299 (2), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102896>
IF: 5.486 (2021)
2. **Rehó, B.**, Lau, L., Mocsár, G., Müller, G., Fadel, L., Brázda, P., Nagy, L., Tóth, K., Vámosi, G.: Simultaneous Mapping of Molecular Proximity and Comobility Reveals Agonist-Enhanced Dimerization and DNA Binding of Nuclear Receptors.
Anal. Chem. 92 (2), 2207-2215, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04902>
IF: 6.986

További közlemények

3. Fadel, L., **Rehó, B.**, Volkó, J., Bojcsuk, D., Kolostyák, Z., Nagy, G., Müller, G., Simándi, Z., Hegedűs, É., Szabó, G., Tóth, K., Nagy, L., Vámosi, G.: Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor.
J. Biol. Chem. 295 (29), 10045-10061, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA119.011614>
IF: 5.157





4. Simándi, Z., Pájer, K., Károlyi, K., Sieler, T., Jiang, L. L., Kolostyák, Z., Sári, Z., Fekecs, Z., Pap, A., Patsalos, A., Contreras, G. A., **Rehó, B.**, Papp, Z., Guo, X., Horváth, A., Kiss, G., Keresztessy, Z., Vámosi, G., Hickman, J., Xu, H., Dormann, D., Hortobágyi, T., Antal, M., Nógrádi, A., Nagy, L.: Arginine Methyltransferase PRMT8 Provides Cellular Stress Tolerance in Aging Motoneurons.
J. Neurosci. 38 (35), 7683-7700, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-17.2018>
IF: 6.074

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,703

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
12,472**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.04.21.

