

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

A reténsav receptor és retinoid X receptor heterodimerek koregulátor kötésének és transzkripciós aktivitásának molekuláris meghatározói

Benkő Szilvia

Témavezető:
Dr. Nagy László

Debreceni Egyetem
Orvosi-és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Debrecen, 2004

1. BEVEZETÉS

1.1. A magreceptorok, mint transzkripció faktorok

A többsejtű élőlényekben a különböző sejtípusok formában és funkcióban is erősen különböznek egymástól. Ennek az az oka, hogy különböző fehérjéket szintetizálnak és halmoznak fel anélkül, hogy közben DNS szekvenciájuk megváltozna. A DNS-től a funkcióképes fehérjéig vezető út számos lépésből áll, s ezek közül az egyik legfontosabb a génexpresszió szabályozása.

Az eukarióta genom nukleoszómákba rendeződik, ami kromatint alkot. Ez a szerkezet határozza meg, hogy a szabályozó faktorok mennyire tudnak hozzáférni a DNS-hez. A kromatinba csomagolva a promóterek nagy része transzkripciósan represszált, s ez csökkenti a transzkripció faktorok hozzáférését a megfelelő kötőhelyekhez. A magreceptorok azonban olyan transzkripció faktorok, melyek képesek a represszált kromatinban is a DNS-hez kötödni, s így szabályozni a génexpressziót. Fontos jellegzetessége a magreceptoroknak, ami megkülönbözteti őket egyéb transzkripció faktoroktól, hogy képesek kis méretű, lipidoldékony ligandok, főleg hormonok és anyagcseretermékek megkötésére.

A szteroid hormonok tanulmányozása századokkal ezelőtt kezdődött, de a magreceptorok kutatásával csak az 1900-as évek közepén kezdtek mélyrehatóbban foglalkozni. A lipidoldékony hormonoknak és az anyagcseretermékeknek az emberi szervezetben betöltött nélkülözhetetlen szerepe a magreceptorok, ligandjaik és az őket befolyásoló, valamint az általuk befolyásolt útvonalak gyors megismeréséhez vezetett.

Ma már tudjuk, hogy a magreceptorok családja olyan molekulák csoportja, amelyek között szekvenciális, szerkezeti és funkcionális kapcsolat van. A tagjait 6 alcsaládba lehet sorolni. Bár általánosan megtalálhatók a metazoák körében, számuk mégis fajoként eltérő. A magreceptorok ligandjaik származása és jellemzője alapján is csoportosíthatók. Ezek a ligandok lehetnek agonista ill. antagonisták jellegűek, és a természetes ligandok mellett a szintetikus ligandok száma is dinamikusan nő. A magreceptorok a célgének promoterének megfelelő szekvenciájához monomer, homodimer ill. heterodimer formában kötődnek.

A magreceptorok ligandfüggő működését koregulator molekulák közvetítik. Általánosságban, ligand hiányában korepresszor molekulát kötnek, mely hiszton-

deacetiláz aktivitással bíró komplexet vonz magához. Ennek működése hipo-acetilált kromatint eredményez, amiről azt tartják, hogy transzkripciósan néma. Ezzel ellentétben, agonsita ligand hatására a magreceptorok koaktivátor komplexet vonzanak, ami hiszton-acetiltranszferáz aktivitása révén acetilálja a kromatint, s így transzkripciót idéz elő.

1.2. Retinoidok és receptoraik

Az A-vitamin és biológiailag aktív származékai (a retinoidok), s ezek közül is a reténsav (RA) központi szerepet tölt be számos alapvető biológiai folyamatban, így többek között hatással van a gerincesek fejlődésére, növekedésére, a sejt differenciálódásra és a homeosztázis fenntartására. Hosszú időn keresztül a retinoidok szerepére csak főként az A-vitamin hiányos állatok vizsgálatából tudtak következtetni. A retinoid receptor felfedezése (1987) azonban az ismeretek széles körű kiterjedéséhez vezetett.

1.2.1. Retinoid receptor. A reténsav hatását a megreceptorok két típusa közvetíti: a reténsav receptor (RAR) és a retinoid X receptor (RXR). Mindkét osztály 3-3 altípust tartalmaz (α , β , γ). Eltérő térbeli és időbeli expressziójuk a fejlődő embrióban és a felnőtt egyedek szöveteiben, működésük sokszintű kombinációját eredményezi.

1.2.2. Retinoidok. A természetes reténsav számos formája közül az all-transz-reténsav és a 9-cis reténsav (9-cis RA) rendelkezik a legfontosabb hatásokkal. Míg a ATRA az RAR-en keresztül fejti ki hatását, az 9-cis RA mind az RXR-hez, mind az RAR-hez képes kötődni. Bár a retinoidokat széles körben alkalmazzák terápiás célokra, daganatkeltő és toxikus hatásuk különböző szintetikus ligandok (mint pl. LG268, AM580) fejlesztéséhez vezetett. A ligandok szintézise és lebontása sejtenként eltérő lehet, így ez egy újabb szabályozási szintet jelent a magreceptorok működésében.

1.2.3. Az RXR heterodimer. A megreceptorok között az RXR egyedülálló szerepet tölt be, mert számos más magreceptorral képes heterodimer kapcsolatot létesíteni. A ligand indukálta aktivitás alapján ezeket a heterodimereket permisszív (önmagában az RXR liganddal is aktiválható) és nem-permisszív (olyan heterodimer, mely az aktiváláshoz a partner receptor ligandját is igényli) heterodimer csoportokba soroljuk.

1.2.4. Szabályozó molekulák. Mint a legtöbb magreceptor az RAR és RXR is számos szabályozó molekulával lép kölcsönhatásba, melyek eltérő sejt- és szövet-specifikus expressziót mutatnak.

1.3. A megreceptorok szerkezete és funkcióik

Az összes magreceptor több szerkezeti és funkcionális egységre tagolható. Az N-terminális A/B régió ligand-független aktiválási képességgel rendelkezik. Ez felelős az izoforma-specifikus válaszok közvetítéséért. A DNS-kötő domén, amely a legkonzerváltabb régió, két cink-ujjat tartalmaz. Ez felelős a nagy affinitású DNS-kötésért és a specifikus hormon válaszadó elemek felismeréséért. Az „összekötő” (hinge) régió köti össze a DNS-kötő domént a ligand kötő doménnel. A ligand-kötő domén egy 11-13 hélixből álló, 3 rétegű, antiparallel „szendvics” szerkezet. A C-terminális H12 hordozza a ligandfüggő aktivitást, s egyben különböző konformációk kialakítására is képes a receptor ligandjának természetétől függően. Ez a régió a legkonzerváltottabb a magreceptor családon belül.

1.4. A ligandkötő domén funkciója

A ligandkötő domén (LBD) 4 funkcionális régióval rendelkezik. Az egyik kulcsfontosságú területe felelős a dimerizációért. Emellett ez tartalmazza a ligandkötő zsebet, mely érzékenyen és specifikusan képes a megfelelő ligandot felismerni. A specificitást a méret mellett a ligandkötő zseb alakja is befolyásolja. A C-terminális rész, az AF-2 vagy H12 hordozza a ligandfüggő aktiválás képességét. A negyedik terület pedig egy felszíni hidrofób rész, mely a koregulátor molekulák (aktivátorok és represszorok) kötésére szolgál.

1.5. Koregulátorok

A koregulátorok olyan sejten belüli molekulák, melyek a magreceptorokhoz kötődve közvetítik és átalakítják az endokrin szignálokat. Biokémiai és expressziós klónozó technikák segítségével már számos koregulátor molekulát azonosítottak.

1.5.1. DRIP205/TRAP22, mint koaktivátor molekulák

A DRIP/TRAP komplex 14-16 fehérjéből áll, melyek mérete 70-240 kDa között változik, s a receptor H12-höz a DRIP205/TRAP220 alegység interakciós doménjén keresztül (ID) kötődik.

1.5.2. SMRT/NCoR, mint korepresszor.

Mivel a kromatin számos helyen nem-specifikusan képes gátolni a transzkripciót, a korepresszorok jelentősége abban nyilvánul meg, hogy célzottan végzik el ezt a gátló funkciót. A SMRT számos, nem magreceptor jellegű transzkripciós faktor működésének szabályozásában is részt vesz.

1.5.3. Az LXXLL motívum.

A koaktivátorok interakciós doménjeinek vizsgálatakor kiderült, hogy mindegyik hordoz egy leucinban gazdag LXXLL motívumot. Hasonló domént azonosítottak a korepresszoroknál is, de erről kiderült, hogy egy hélix fordulattal hosszabb, mint a koaktivátor domén. Ez az LXXLL motívum a két leucinnal a felszínén egy hidrofób felszínt hoz létre, amely nélkülözhetetlen a magreceptor-koregulátor komplex kialakításához.

1.6. A koregulátorkötés meghatározói

1.6.1. A H12 elhelyezkedése agonista kötéskor és az „egércsapda” model

A ligand nélküli és ligandot kötő magreceptorok szerkezetének vizsgálatából kiderült, hogy a H12 ligandfüggő konformációs változást szenvedhet. Agonista bekötődésével a H12 „egércsapdaként” lezárja a ligandkötő zsebet, se egyes esetekben meg közvetlen kölcsönhatást is kialakít a liganddal, ezáltal tovább stabilizálva azt. Ezek a szerkezeti változások olyan felszín kialakítását eredményezik, amely kedvező a koaktivátor kötésének.

1.6.2. A „töltött kapocs” és a kofakorcsere.

Szerkezeti vizsgálatokból az is ismert, hogy a H12 egy konzerválódott glutamátja és a H3 konzerválódott lizinje hidrogénkötést létesít az LXXLL motívum 1. és 5. helyzetben lévő leucinjával. A glutamát és a leucin közösen egy „charge clamp”-et hoznak létre, mely pozicionálja az LXXLL hélixet. Az LXXLL motívum hossza és orientációja nélkülözhetetlen a megfelelő kapcsolatok kialakításához és a koaktivátor pozicionálásához. Másrészt, a H12 pozíciója a korepresszorkötést is alapvetően meghatározza. A korepresszor LXXLL motívumában található extra helix fordulat kinyúlik abba térbe, amit egyébként a receptor H12-je foglalna el az aktív konformáció fevétele során. A korepresszor és az aktív H12 forma egyidejű kötődése ezáltal teljesen kizárja egymást.

1.6.3. Az LBD funkcionális területeinek térbeli kapcsoltsága.

Számos magreceptor kristályszerkezetét már meghatározták. Ezek között található agonista ill. antagonisták kötött szerkezet, némelyik pedig koaktivátor vagy korepresszor peptidrészletet is tartalmaz. A szerkezetek nyújtotta gazdag információ lehetővé tette, hogy a magreceptorok ligandkötését és a ligand közvetítette szabályozó folyamatokat modellezhessük. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a magreceptorok működése komplex allosztérikus összhangot feltételez az LBD 4 funkcionális területe között. A ligandkötés például konformáció-változást indukál a koregulátor kötő helyben és a H12 –ben, ami végül a korepresszor molekula koaktivátorra történő cseréjéhez vezet. Az intramolekuláris folyamatsor, mely a ligand kötődésével kezdődik és a koregulátor cseréjében végződik, a H12 pozicionálásán keresztül valósul meg.

A génexpresszió szabályozása a transzkripció kontrollján keresztül az élőlények megfelelő fejlődésének számos sejtfolyamatában nélkülözhetetlen. A magreceptorok jelentőségét az egészséges folyamatok fenntartásában jól illusztrálja az a számos terápiás módszer, amit az olyan betegségekkel való küzdelem érdekében fejlesztettek ki, amik hátterében a magreceptorok nem megfelelő működése áll. Ezek a betegségek az orvoslás szinte minden területét érintik, így megemlíthető többek között a szaporodás, a gyulladások, a daganatok, a cukorbetegség, a szív-és érrendszeri betegségek és a kövérség. Ezért a magreceptorok mind normál, mind patológiás működési mechanizmusának megértése a biológiai és orvosi kutatások egyik fontos célja.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A magreceptorok és azok szabályozó molekuláinak biokémiai és szerkezeti vizsgálatai közelebb vittek bennünket működésük megismeréséhez. Úgy tűnik, hogy működésük feltétele, hogy komplex allosztérikus összhang legyen az LBD funkcionális területei között. Egy kritikus kérdés azonban továbbra is megválaszolatlan maradt, konkrétan, hogy mi határozza meg a gátlás és az aktiválás közötti egyensúlyt. Az nyilvánvaló, hogy nagy különbség tapasztalható az egyes magreceptorok között ebben a tekintetben.

Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk ezekre a szabályozó folyamatokra RAR-RXR heterodimerek tanulmányozása segítségével a következő kérdésekre kerestük a választ:

1) Egymással átfedő felültre kötődik-e a korepresszor ill. koaktivátor molekula az RAR-LBD felszínén?

A felfedezés, hogy mind a korepresszor, mind a koaktivátor hasonló LXXLL motívumot tartalmaz az interakciós doménjükben, felveti a lehetőséget, hogy ezek a koregulátorok egymással átfedő régióba kötődnek a receptor LBD felszínén. Ezért mutagenézis vizsgálatok segítségével meghatároztuk az RAR-LBD korepresszor kötő felszínét. Ezen kívül, összehasonlítottuk a receptor korepresszor kötő felszínét a koaktivátor kötő felszínével, továbbá olyan mutációkat is kerestünk, amelyek eltérően befolyásolják a receptor korepresszor ill. koaktivátor kötését.

2) Hogyan befolyásolják az RAR mutánsok az RAR-RXR alapaktivitását és található-e összefüggés az aktivitás és a megváltozott koregulátorkötés között?

Ha feltételezzük, hogy a magreceptorok aktivitása megegyezik a koregulátorkötés eredőjével, tudni akartuk hogyan korrelál a mutánsok aktivitása a koregulátorkötő képességükkel.

3) Hogyan befolyásolja az RXR-H12 a korepresszor. ill koaktivátor kötést?

Ismert, hogy az RAR-RXR heterodimer nem-permisszív heterodimerként működik, így az RXR szelektív ligand nem képes aktiválni a heterodimert. Míg úgy tűnik, hogy

az RAR-RXR működésének szabályozása lényegében az RAR szerepétől függ, az RXR szerepéről nem sokat lehet tudni. H12 deléciós RXR mutánsokat használva munkánk során megvizsgáltuk, hogy milyen szabályozó szerepe van a az RXR-H12-nek a korepresszor és koaktivátor molekulák kötésére.

4) Hogyan befolyásolja a H12 deléciója az RXR heterodimere aktivitását?

Az RXR-H12 deléciójának a heterodimerek aktivitásra kifejtett hatását részben transzfekciós vizsgálatokban, részben pedig vírussal fertőzött, RXR- Δ H12-t stabilan expresszáló sejtvonalon vizsgáltuk.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejttenyésztés és reagensek

A transziens transzfekciós kísérletekhez CV-1 és 293T fibroblaszt sejteket használtunk. Az RXR-DH12 stabil expressziójához MonoMac6 makrofág sejtvonalat fertőztünk vírussal.

3.2. Transziens transzfekció és luciferáz/B-galaktozidáz mérés

A sejteket 60-80% sűrűségnél transzfektáltuk. Ezt követően 6-8-óra múlva történt a ligandkezelés, majd 36 óra elteltével a sejteket feltártuk és luciferáz ill β -galaktozidáz mérést végeztünk a sejtlyázátumból.

3.3. Plazmidok és mutagenézis.

A mutáns plazmidokat irányított mutagenézissel állítottuk elő. A H12 hiányos plazmidokat szintén irányított mutagenézis során, STOP-kodon beépítésével állítottuk elő.

3.4. Transzformálás, baktérium növesztés, plazmid termelés és pucolás

A plazmidokat DH5 α típusú, ultrakompetens E.coli törzsben termeltettük.

3.5. Fehérje expresszió és tisztítás

A GST-fúziós fehérjét BL21 Gold típusú *E.coli* törzsben expresszáltattuk, majd a sejtfeltárás után Glutathione-Sepharose 4B affinitás oszlopon tisztítottuk.

3.6. GST-pull-down

A hRAR α -LBD mutáns fehérjét TNT *in vitro* Traskripció/Transzláció Kit felhasználásával termeltük. Az így előállított ³⁵S fehérjét ligand jelenlétében ill. hiányában inkubáltuk a GST-fúziós expresszált fehérjével, majd SDS-PAGE segítségével választottuk szét a mintákat.

3.7. EMSA

A teljes hosszúságú hRAR α és hRXR α receptorokat TNT *in vitro* Traskripció/Transzláció Kit felhasználásával termeltük. A DNS próbákat ³²-P-dCTP-vel jelöltük. A jelölt próbát, a receptort és a baktériumban termelt SMRT fehérjét ligand jelenlétében ill. hiányában inkubáltuk, majd agaróz gélen futtatuk.

3.8. Vírus termelés és MonoMac sejtek fertőzése

A vírus termeléshez 293T sejteket használtunk, melyeket a vírus előállításához szükséges vektorokkal transzfektáltunk. A vírus részecskeszámot p24 Elisa kit felhasználásával mértük.

3.9. RNS pucolás és Q-PCR

A sejtől történő RNS izolálását Trizol reagens felhasználásával végeztük, majd a transzkriptek mennyiségének meghatározását Q-PCR segítségével, Taqman próbák felhasználásával végeztük. A transzkriptek szintjének meghatározásához h36B4 referencia gént használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Mutáns RAR-LBD-k korepresszor kötésének vizsgálata és az RAR korepresszor kötő régiójának meghatározása

Az RAR-LBD korepresszor kötő felszínének meghatározásához az RAR-LBD felszínén pontmutációkat tartalmazó receptorokat állítottunk elő. A hozzáférhető kristályszerkezetek vizsgálata után 17 oldalláncot választottunk a mutagenézishez. Ebből 15 mutáció a H3, H4 és H5 hélixen, 2 mutáció pedig a H11 hélixen helyezkedik el. A kölcsönhatásokat mind monomer RAR-en, mind RAR:RXR heterodimerben vizsgáltuk. Ezek az eredmények, hasonlóan mások által más receptorokon végzett kísérletekhez, azt mutatják, hogy a receptor elsődleges korepresszor kötő felszíne a H3 és H4 közötti hidrofób árokban található.

4.2. Az RAR korepresszor kötő felszíne megegyezik a koaktivátor kötő felszínnel

Kísérleteink egyik célja az volt, hogy kiderítsük vajon a korepresszor ill. a koaktivátor kötő felszínek egymással átfedő régióban helyezkednek-e el. Ezért a következő lépésként a mutáns receptorok koaktivátor kötését vizsgáltuk. A mutánsok fele úgy viselkedett mint a vad típusú receptor, míg a másik részét csökkent aktivátorkötés jellemezte.

Összehasonlítva a koaktivátor kötésből származó eredményeket a korepresszor kötésből származó eredményekkel megállapíthatjuk, hogy a H3-ban és H4-ben található mutációk mindkét koregulátor kötéséhez szükségesek. Ez azt jelenti, hogy a korepresszor és a koaktivátor kötő felszínek egymással átfedő területen találhatók. Munkánkkal egyidőben, más kutatócsoportok más receptorokon hasonló kísérleteket végezve a mi eredményeinkkel megegyező eredményekre jutottak, melyek ezáltal megerősítették az általunk mért eredményeket és következtetéseket.

4.3. Az RAR alapaktivitását meghatározó oldalláncok

Míg a mutációk nagy része kisebb változást eredményezett a korepresszor és koaktivátor kötés egyensúlyában, néhány „másodrendű“ mutáció drámai változásokat eredményezett. Meglepő és közös ezekben a mutációkban, hogy ezek nem a kofaktor kötő felszínen találhatók, hanem attól távolabb, a H12 közelében. A H3-en található W225 mutáns erős korepresszor kötését és emellett nagyon gyenge koaktivátor kötését

mutat. Az RAR γ szerkezetének vizsgálatából kiderül, hogy ez az oldallánc van der Waals kölcsönhatást létesít az L398, I402, M406 és P407 oldalláncokkal. Az oldallánc kicserélése alaninra megszünteti ezeket a stabilizáló kölcsönhatásokat a H11-t és H12-t összekötő hurkon belül és nagy valószínűséggel destabilizálja a H12 aktív pozícióját. Ez ugyanakkor kedvez a korepresszor kötésnek, s még ligand hatására sem lehet ebből a kedvező konformációból kimozdítani. Ez a mutáció így a korepresszor kötés irányába mozdítja el a kofaktor kötés egyensúlyát, miközben teljesen elveszti koaktivátor kötő képességét.

A másik mutáció, amely teljesen megváltoztatja az RAR α alap aktivitását az A392R. Ez a mutáns receptor minimális korepresszor kötést mutat, miközben koaktivátor kötése erősen fokozódott. Az RAR γ szerkezet vizsgálata azt mutatja, hogy a nagyobb méretű arginin oldallánc könnyen beilleszthető ebbe a pozícióba, s közben kedvező kölcsönhatásokat alakít ki a H4 és H12 egyes oldalláncaival. Ez tartalmazza az L266-tal és L414-gyel kialakított van der Waals kölcsönhatást, valamint egy hidrogén kötés létrejöttét a H12-ön található N416 oldallánccal. A mért aktivitással megegyezően, ez a mutáns valószínűleg ligand hiányában is stabilizálja a H12 aktív konformációját.

4.4. A mutáns receptorok transzkripció aktivitása

Lényeges annak a ténynek a megállapítása, hogy vajon a receptorok aktivitását egyszerűen azok koregulátor kötéséből le lehet-e vezetni. Ezért úgy döntöttünk, megvizsgáljuk, hogyan befolyásolják a mutációk a receptorok transzkripció aktivitását. 6 mutánst hasonlítottunk össze, melyek közül három mind a korepresszor, mind a koaktivátor kötésben deficiensnek mutatkozott, továbbá három olyan mutánst, melyek a koregulátor kötésben ellentétes változásokat mutatott (W225A, A392R, V395A). Ezen mutáns receptorok transzkripció vizsgálatát azt mutatta, hogy azok a mutánsok, amik a koregulátor kötésben deficiensek voltak, nem voltak aktiválhatók. Ezzel ellentétben, az A392R mutáns, amely ligand hiányában is képes volt koaktivátor kötésére, konstitutívan aktívnek bizonyult, míg a W225A mutáns, mely folyamatos korepresszor kötését mutatott a korábbi vizsgálatokban, konstitutívan represszált állapotban volt az aktiválási vizsgálatainkban.

4.5. Az RXR gyengíti az RAR korepresszor kötését és ez az RXR-H12 jelenlétét igényli

Korábbi eredményekből ismert, hogy az RXR nem mutat alapállapotban repressziót, ellentétben számos más receptorral (RAR, TR, LXR), melyek erősen represszálnak alapállapotban is. Megvizsgáltuk, hogy az RXR korepresszor kötése párhuzamba állítható-e az alaprepresszióval. Azt találtuk, hogy az RXR korepresszor kötése jóval gyengébb a többi receptor korepresszor kötésénél. Így ezek az eredmények azt mutatják, hogy van párhuzam az RXR korepresszorkötése és alapaktivitása között.

Kíváncsiak voltunk arra, hogyan változik a korepresszor kötés egy olyan heterodimerben, ahol az egyes receptorok (RAR és RXR) ennyire eltérő kötést mutatnak. Azt találtuk, hogy az RXR jelenléte kb. 35-50%-kal gyengítette az eredetileg erős RAR – korepresszor kölcsönhatást. Mivel eredetileg a korepresszor interakciós doménjeinek additív kötődését vártuk az RAR-RXR heterodimer esetében, a kapott eredmény azt mutatja, hogy a receptorok között létezik egyfajta allosztérikus kommunikáció és egymással együttműködve kötik a korepresszort.

Bár a szerkezeti vizsgálatokból és a molekula felszíni térképezéséből ismert, hogy a heterodimerizáló felszín és a korepresszor kötő felszín külön-külön régióban található, azt is feltételezik, hogy a nem-permisszív heterodimernek számító RAR-RXR heterodimerben, az egyik receptor befolyásolni képes a másik receptor koregulátor kötését. Eredményeink azt mutatják, hogy az RAR-korepresszor kölcsönhatás gyengítése az RXR-H12 jelenlétét igényli, így ez alátámasztja azt a hipotézist, miszerint a heterodimerek közötti kommunikáció mediátora az RXR-H12.

4.6. Az RXR-H12 deléciója lehetséges, hogy egy kriptikus korepresszor kötőhelyet nyit meg a az RXR felszínén

Az elmúlt években számos erőfeszítés történt abba az irányba, hogy valahogyan modellezzék az RXR és H12-je szerepét a koregulátor kötésben. Lazar és kollégái feltételezése szerint az RXR azért köti gyengén a korepresszort, mert a H12 térben akadályozza a korepresszor kötődését. Úgy tűnik két módja van az RXR korepresszor kötésének. Az egyik, hogy az RAR-rel ill. TR-ral heterodimerizáció során az RXR-

H12 pozíciót vált, s ezáltal hozzáférhetővé válik a korepresszor kötő felület az RXR-LBD felszínén. A másik lehetőség, hogy az RXR-H12 deléciójával táru fel a korepresszor kötő felszín. Ezek azt feltételezik, hogy a két eltérő körülmény azonos kötőhelyeket tárna fel. Eredményeink alapján azonban azt feltételezzük, hogy a korepresszor kötő felszín H12 deléció állapotban ill. heterodimerizációs állapotban eltérőek. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy a H12 deléciójával egy kriptikus kötőhelyet nyitunk meg, mely bár lehetővé teszi a korepresszor kötést, de ez a kötőhely eltér a H12 heterodimerizációjából eredő korepresszor kötő felszínnel.

4.7. Az RXR korepresszor kötésének megszüntetése mind a ligand, mind a koaktivátor együttes jelenlétét igényli

Korábbi vizsgálatok megmutaták, hogy a koaktivátor kötés feltétele a H12 aktív pozíciójának felvétele, s ezzel parhuzamosan a korepresszor kötés feltétele, hogy a H12 ne legyen az aktív pozícióban. Arról is vannak elméletek, hogy a H12 aktívan is képes részt venni a hormon indukálta korepresszor eltávolításban. Ezek szerint az RXR úgy tűnik, hogy kivételes helyen áll a magreceptorok között, mivel az LG268 kötött hRXR β szerkezetében a H12 nem veszi fel az aktív pozíciót. Ezeket az eredményeket EMSA és emlős kettős hibrid vizsgálatokkal is megerősítettük. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy ellentétben más receptorokkal (TR, RAR), melyekben a ligandkötés hatására megszűnik a korepressor kötés, az RXR ligand jelenlétében továbbra is köti a korepresszort. Ugyanakkor azt találtuk, hogy a koaktivátor és a ligand együttes jelenléte képes volt leszorítani a korepresszort.

4.8. Az RXR-H12 nem szükséges az LG268 indukálta korepresszor kölcsönhatás megszüntetésére

Tudni szeretnénk volna, milyen hatással van a ligand jelenléte a mutáns RXR-korepresszor kölcsönhatásra. Meglepő módon azt találtuk, hogy az LG268 megszüntette a mutáns RXR és korepresszor közötti kölcsönhatást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a az RXR-DH12 korepresszor elengedéséhez nem szükséges az RXR-H12 jelenléte. A szintetikus agoinsta (LG268) hatásához hasonló

eredményeket kaptunk természetes agonista (9-cisRA) és szintetikus antagonisták kezelésre is (LG1208).

4.9. Az RXR-H12 deléciója megváltoztatja az RAR-RXR heterodimer koregulátor kötő egyensúlyát és gyengített RAR választ eredményez

Mivel a H12 szükséges a koaktivátor kötéshez, valamint az az eredmény, amely azt mutatja, hogy az RXR-H12 deléciója megváltoztatja a korepresszor kötését felveti azt a kérdést, hogy változik a mutáns RXR esetében a koaktivátor kötés. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az RXR-H12 deléciója csökkenti a koaktivátor kötését. Ugyanakkor meglepő, hogy ezt a hatást tapasztaljuk partner receptor, vagyis RAR-specifikus ligand kezelés hatására is, ami azt jelenti, hogy RAR-RXR a heterodimerben a funkcionális RXR-H12 szükséges az RAR megfelelő koaktivátor kötéséhez. Összegezve a koaktivátor és korepresszor vizsgálatainkat azt mondhatjuk, hogy az RXR-H12 deléciója megváltoztatja a korepresszor és koaktivátor egyensúlyt olyan irányba, ahol a korepresszor kötés válik dominánssá a koaktivátor kötéssel szemben.

4.10. Az RXR-H12 deléciója a partner receptor gyengített választ eredményezi

A méréseink során tapasztalt, megváltozott koregulátor kötő egyensúly vezetett minket arra, hogy vizsgáljuk a mutáns receptorok aktivitását. Ehhez kétféle rendszert választottunk: kotranszekciós rendszert, valamint vírusfertőzéssel megkíséreltünk előállítani egy olyan sejtvonalat, mely stabilan expresszálja az általunk vizsgálni kívánt RXR-H12 receptort. Eredményink azt mutatják, hogy a heterodimerben az aktiválási válaszok gyengébbek voltak, még a partner receptor specifikus ligandjának jelenlétében is.

4.11. A koregulátor kötésben bekövetkező kis mértékű változások a transzkripciós aktivitás nagy mértékű változásait eredményezheti

Az RAR pontmutáns és az RXR deléciós mutáns receptorok vizsgálataiból kiderül, hogy a koregulátor kötés ismeretéből meglehetősen jól megjósolható a receptorok aktiválási képessége. Különösen meglepő, hogy a koregulátorban bekövetkező kis mértékű változások, a transzkripció meglehetősen nagy mértékű változását

eredményezheti. Ebben az értelemben a receptorok LBD-je egy biológiai erősítőhöz hasonlít, ahol a kis strukturális változások, melyek a koregulátor iránti affinitást befolyásolják, jelentős biológiai következményekkel járnak. Ez még nagyobb jelentőséget ad a koregulátor egyensúly-szabályozás ismeretének.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A génexpresszió szabályozásának transzkripciós kontrollja az élőlények megfelelő fejlődése szempontjából nélkülözhetetlen. A magreceptorokon és azok koregulátorain végzett biokémiai és szerkezeti vizsgálatok segítséget nyújtottak működésük mechanizmusának megértésében. A módszerekkel nyert információ világossá tette, hogy a magreceptorok megfelelő működése egy komplex, allosztérikus összhangot feltételez az LBD funkcionális doménjei között.

Doktori munkám során azt a célt tűztük ki, hogy tanulmányozzuk az RAR és RXR molekulák koregulátor kötő képességét, a tényezőket melyek meghatározzák és befolyásolják működésüket, továbbá megkíséreltünk kapcsolatot találni a koregulátor kötés és a transzkripciós szabályozás között. Ezen munkák során lehetőségem volt számos modern molekuláris biológiai és biokémiai módszer elsajátítására és felhasználására. Ezen technikák segítségével (1) meghatároztuk az RAR-LBD felszínén a korepresszor kötő területet. Összehasonlítva a korepresszor- és koaktivátor kötő felszínt

(2) megállapítottuk, hogy ezek átfedő régióban kötődnek egymáshoz. A koregulátor kötőhely mellett (3) olyan oldalláncokat is azonosítottunk, melyek a H12 pozicionálásán keresztül befolyásolják a koregulátor kötődését. H12 deléciók után RXR molekulát használva (4) azt találtuk, hogy az RXR csökkenti a partner receptor korepresszor kötését. Eredményeink továbbá azt is mutatják, hogy (5) az RXR-H12 deléciója megváltoztatja a koregulátorkötő egyensúlyt és (6) ez a partner receptor aktivitásának gyengítését eredményezi.

Végeredményben azt mondhatjuk, hogy vizsgálataink hozzájárultak ahhoz az erősödő nézethez, miszerint a H12 pozíciója, dinamikája és stabilitása jelentős szerepet játszik magreceptorok transzkripciós aktivitásának szabályozásában. Eredményeink továbbá megegyeznek azokkal a korábbi eredményekkel, melyek bizonyítják a H12 szükségességét a transzaktivációban, a koaktivátor kötő felszín kialakításában, valamint a H12 delécióját ill. mutációját célzó kísérletek igazolják olyan domináns negatív receptor létrejöttét, mely fokozott korepresszor kötő képességgel bír. Eredményeink bizonyítják, hogy a H12 aktív pozícióját befolyásoló oldalláncok szintén nagy mértékben hozzájárulnak a korepresszor és koaktivátor kötés egyensúlyának kialakításához. Ezek az eredmények a későbbiekben hozzájárulhatnak olyan mutáns receptorok tervezéséhez, melyek jóval szélesebb spektrumú aktiválásra képesek, mint amit korábban feltételeztek.

A tézis alapjául szolgáló közlemények:

1. Love, J.D., Gooch, J.T., **Benko, S.**, Li, C., Nagy, L., Chatterjee, V.K., Evans, R.M., Schwabe, J.W.: The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12.
J Biol Chem., 277(13): 11385-91 (2002) IF: 6,696
2. **Benko, S.**, Love, J.D., Beladi, M., Schwabe, J.W., Nagy, L.: Molecular determinants of the balance between co-repressor and co-activator recruitment to the retinoic acid receptor
J Biol Chem., 278(44): 43797-806 (2003) IF: 6,696

3. Benko, S., Oros, M., Schwabe, J.W., Nagy, L.: Role of RXR-H12 in the equilibrium of coregulator binding and receptor activation

Előkészületben

Egyéb közlemények:

1. Szanto, A., **Benko, S.**, Szatmari, I., Balint, B.L., Furtos, I., Rühl, R., Molnar, S., Csiba, L., Garuti, R., Calandra, S., Larsson, H., Diczfalusy, U., Nagy, L.:

Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, PPAR and LXR signaling leading to cholesterol efflux from macrophages

Publikációra beküldve

2. Balint, B. L., Gabor, P., **Benko, S.**, Szanto, A., Puskás, G.L., Davies, P.J.A., Nagy, L.: Histone tail methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid induced differentiation in myeloid cells

Publikációra beküldve

3. **Benko, S.**, Brazda, P., Szanto, A., Balint, B.L., XY, XY, Schwabe, J.W., Nagy, L.: Characterization of a novel RXR antagonist

In preparation