DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Magreceptorok kölcsönhatásainak vizsgálata kvantitatív fluoreszcencia mikroszkópiás eszközökkel

Dr. Rehó Bálint

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

A tézisben használt rövidítések jegyzéke5				
1.	. Bevezetés			
2.	Irodalm	i áttekintés	8	
	2.1. Géne	k és a génszabályozás	8	
	2.2. Magr	eceptorok	9	
	2.2.1.	Magreceptorok szupercsaládja	9	
	2.2.2.	Magreceptorok doménszerkezete10	0	
	2.2.3.	Magreceptorok csoportosítása szerkezetük alapján 12	2	
	2.2.4.	Magreceptorok csoportosítása élettani szerepük szerint 14	4	
	2.2.5.	Kofaktorok1	5	
	2.2.6.	Molekuláris kapcsoló modell10	6	
	2.2.7.	Magreceptor-működés dinamikus modelljei10	6	
	2.3. Fluor	eszcenciás vizsgálati módszerek1	8	
	2.3.1.	Fluoreszcencia1	8	
	2.3.2.	Fluoreszcens fehérjék1	9	
	2.3.3.	Mikroszkópia22	2	
	2.3.4.	Konfokális mikroszkópia24	4	
	2.3.5.	Szelektív sík-megvilágítású mikroszkópia (SPIM)24	4	
	2.3.6.	Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)22	5	
	2.3.7.	Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS)	7	
	2.3.8.	Förster rezonancia energia transzfer (FRET)29	9	
3.	Célkitű	zések3	1	
4.	Anyago	ok és Módszerek	2	
	4.1. Plazn	nid konstruktok	2	
	4.2. Sejtte	enyésztés	3	
	4.3. Konf	okális mikroszkópia	4	

	4.4. Pont FCS mérések	5
	4.5. SPIM mikroszkópia	6
	4.6. Alternáló gerjesztés (ALEX)	8
	4.7. Imaging FCCS mérések kiértékelése	0
	4.8. SPIM-FRET mérések kiértékelése	-1
	4.9. Ligandkezelés	.3
	4.10. Statisztikai módszerek	4
5.	Eredmények	-6
	5.1. Fluoreszcensen jelölt magreceptorok eloszlásának és diffúziós paramétereine meghatározása HEK293 sejtekben	ek •6
	5.2. Agonista kezelés, vagy ko-expresszált heterodimerizáló partner fokozza az RA kromatin kötését	R .9
	5.3. A VDR mobilitása csak heterodimerizáló partner és agonista ligand együttes jelenlét esetén csökken	te 2
	5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója5	6
	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 0
	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 0 52
	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 50 52 1-
	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	56 50 52 1- 57
6.	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 50 52 1- 57 71
6.	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	56 50 52 1- 57 71 73 8k 73
6.	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	56 50 52 1- 57 71 73 k 73 k 73
6.	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 50 52 1- 57 7 1 3 k 3 in 6
6.	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 10 2 1- 7 1 3 k 3 in 6 9
6. 7. 8.	 5.4. Az RAR és VDR ligand-mediált kompetíciója	6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7

10.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	91
11.	Tárgyszavak	.93
12.	Keywords	.94
13.	Köszönetnyilvánítás	.95
14.	Függelék	.96

A TÉZISBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ada2p	Alteration/deficiency of activation 2 protein
ACF	autokorrelációs függvény
AF-1	Activation function-1
AF-2	Activation function-2
ALEX	Alternáló gerjesztés
AR	Androgén receptor
BFP	Kék fluoreszcens fehérje
Caco-2	Humán kolorektális adenokarcinóma sejt
CAR	Konstitutív androsztán receptor
CCF	Keresztkorrelációs függvény
ChIP	Kromatin immunprecipitáció
CLSM	Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
DBD	DNS kötő domén
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DR	Direct repeat
DRIP 150	Vitamin D receptor-interacting protein 150
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EM	Electron multiplying
EMCCD	Electron multiplying charge-coupled device
ER	Ösztrogén receptor
FCS	Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia
FCCS	Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster rezonancia energia transzfer
FXR	Farnezil X receptor
GCNF	Germ cell nuclear factor
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje
GR	Glükokortikoid receptor
HEK293	Humán embrionikus vese karcinóma sejt
HeLa	Humán méhnyakrák sejt
HIV-1	Humán immundeficiencia vírus 1
HNF-4	Hepatocyte nuclear Factor 4
LBD	Ligandkötő domén
LBP	Ligand kötő zseb
LED	Fénykibocsájtó dióda
LRH-1	Liver receptor Homolog-1
LXR	Liver X receptor
mCherry	Vörös fluoreszcens fehérje
MR	Mineralokortikoid receptor
MSD	Négyzetes elmozdulás

NA	Numerikus apertúra
NCOA2	Nuclear receptor koaktivátor 2
NGF1-B	Nuclear receptors nerve growth Factor 1B
NLS	Magi lokalizációs szignál
NMR	Mágneses magrezonancia
NOR-1	Neuron-derived orphan Receptor
NURR1	NURR-related Factor-1
PCR	Polimeráz láncreakció
PPAR	Peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor
PR	Progeszteron receptor
PXR	Pregnán X receptor
RAR	Reténsav receptor
RE	Válaszadó elem
RXR	Retioid X receptor
SARS-CoV- 2	Súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus 2
sCMOS	Scientific complementary metal-oxide-semiconductor
SF-1	Steroidogenic Factor 1
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SPAD	Single Photon Avalanche Diode
SPIM	Szelektív sík-megvilágítású mikroszkópia
TBP	TATA box-binding protein
TR	Sajzsmirigy hormon receptor
VDR	D-vitamin receptor

1. BEVEZETÉS

A magreceptorok szupercsaládjába olyan transzkripciós faktorok tartoznak, melyek ligandfüggő módon képesek célgénjeik átírására. Az általunk vizsgált reténsav (RAR) és D-vitamin receptoroknak (VDR) szerepe van olyan folyamatokban, mint a sejtek növekedése, fejlődése és halála. Az RXR magreceptornak központi szerepe van a magreceptorok működésében, mivel heterodimerizáló partnerként szolgál számos magreceptor, köztük az RAR és VDR számára is.

A magreceptorok működését a molekuláris kapcsoló modell írja le (1). A modell értelmében ezek a magreceptorok agonista ligand hiányában kromatinhoz kötődve gátolják célgénjeik átírását. Agonista ligand hatására konformációváltozás történik, mely során koaktivátorokat kötve a transzkripciós gépezet aktiválását idézik elő. Ezt a viszonylag statikus modellt a területen zajló intenzív kutatások eredményeképpen jóval dinamikusabb kép kezdi felváltani.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy RAR és RXR magreceptoroknak ligand hiányában két különböző mobilitású populációja fordul elő a sejtmagban: egy gyors populáció, mely a monomer és kis oligomer formában jelenlévő receptorokat reprezentálja; ezek a receptorok szabadon diffundálnak a sejtmagban, a kromatinhoz csak tranziensen kötődnek. A lassú populációt alkotó magreceptorok olyan komplexben helyezkednek el, melyek a kromatinhoz stabilabban kötődnek (2,3).

Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatás szintjén kompetíció van jelen az RXR kötéséért, mely magyarázhatja magreceptor támadáspontú terápiák mellékhatásait (4).

Jelenlegi kísérletink során arra voltunk kíváncsiak, hogyan változik a magreceptorok mobilitása, illetve egymáshoz való affinitása ligand jelenlétében és hiányában, élő sejtes környezetben. Modern mikroszkópos módszereket alkalmazva feltérképeztük az RAR és VDR diffúziós tulajdonságait és kíváncsiak voltunk arra is, hogy heterodimerizáló partner jelenléte hogyan módosítja ezen receptorok mobilitását. Választ kerestünk arra is, hogy megnyilvánul-e a magreceptorok között korábban fehérje-fehérje kölcsönhatás szintjén észlelt kompetíció a receptorok kromatinhoz való kötődésének szintjén is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. GÉNEK ÉS A GÉNSZABÁLYOZÁS

A szabad szemmel nem látható világ megismerésére a modern ember már évszázadok óta tesz komoly törekvéseket. 1665-ben Robert Hooke elkészítette az első optikai mikroszkópot, majd 1674-ban Anton Van Leeuwenhoek volt az első, aki élő sejteket (algákat) vizsgált. Az eltelt több mint 350 évben sikerült feltérképeznünk mind a prokarióta, mind az eukarióta sejtek szerveződését, valamint a működésüket befolyásoló alapvető folyamatokat.

A sejtek alapvető működését a sejtmagban tárolt örökítő anyag, és az általa kódolt gének határozzák meg. Ivaros szaporodású fajokban a gének öröklésével kapcsolatos első alapvető megfigyeléseket a német származású Gregor Mendel tette meg, akit emiatt méltán neveznek a "genetika atyjának". Munkássága során egyszer sem használja a gén szót, ennek első említése a dán botanikus és genetikus Wilhelm Johannsen nevéhez fűződik 1909-ben. A fogalom a görög *genos* szóból származik, melynek jelentése *eredet*.

A mendeli genetika bevezetése óta a gén fogalma sokat változott. Jelenleg legelfogadottabb definíció szerint génnek tekintjük az olyan bármilyen hosszúságú kromoszomális DNS szakaszt, amely funkcionális RNS molekulává, vagy fehérjét kódoló RNS molekulává íródik át.

A humán genom több mint hatmilliárd bázispárból szerveződik 22 pár autoszomális és 1 pár nemi kromoszómává. Habár a Humán Genom Projekt eredményeként sikerült feltérképeznünk a teljes humán genomot (5), az általa kódolt gének pontos számát máig nem ismerjük (6).

Az egyik legátfogóbb adatbázis, az Ensembl alapján eddig 20 440 fehérjét kódoló, 23 995 nem fehérjét kódoló és 15 222 pszeudogént ismerünk.

2.2. MAGRECEPTOROK

2.2.1. 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.

Az első magreceptort (ösztrogén receptor) 1958-ban Elwood Jensen azonosította (7,8), majd ezt követően Pierre Chambon, Ronald Evans, and Björn Vennström klónozta az ösztrogén-, glükokortikoid-, valamint pajzsmirigy hormon receptorokat (9). A területen zajló intenzív kutatások eredményeként emberben összesen 48 db magreceptort sikerült azonosítani (10).

Természetes ligandjaik közé olyan kis méretű, lipidoldékony molekulák tartoznak, melyek képesek szabadon átdiffundálni a sejtmembránon. Ezek a molekulák elsősorban zsíroldékony vitaminok (A és D vitamin), hormonok (pajzsmirigy hormon, ösztrogén), szteroidok (glükokortikoidok, mineralokotrikoidok) (11). Bizonyos magreceptorok endogén ligandjait nem ismerjük (vagy legalábbis egységes konszenzus nincs ezeket illetően), ezeket árva receptoroknak nevezzük (12). Néhány árva receptorként ismert fehérje ligandját a receptor felfedezését követően sikerült azonosítani, melyeket azóta "adoptált" árva receptoroknak nevezzük (13). Ilyenek például a PPAR, FXR és LXR, amelyek kis affinitással kötődnek zsírsavakhoz, epesavakhoz, szterolokhoz, ezáltal metabolikus szenzorként működnek. Egyéb "adoptált" árva receptorok, például a CAR és a PXR xenobiotikumokhoz kötődnek, serkentik a citokróm P450 rendszer működését, ezáltal a szervezet méregtelenítésében töltenek be jelentős szerepet (14).

Számos mesterségesen előállított magreceptor ligandot a gyógyszeripar használ, ilyen többek között az emlőrák kezelésében alkalmazott ösztrogén receptor modulátor tamoxifen (15), vagy a II-es típusú cukorbetegség kezelésében alkalmazott roziglitazon (16).

Ismerünk olyan természetes (például a fitoösztrögének), de nagy százalékban mesterségesen előállított anyagokat (például a ftalátok, dioxinok, vagy a biszfenol A), melyek magreceptorokon történő kötődésen keresztül az endokrin rendszer működését módosítják, ezáltal befolyásolják a szaporodóképességet, a gyermekek fejlődését, a tumorigenezist és az immunrendszer funkcióit. Az ilyen vegyületeket endokrin diszruptoroknak nevezzük (17).

9

2.2.2. Magreceptorok doménszerkezete

A magreceptorok móltömege 50-100 kDa közé esik. Legtöbbjük 5 doménre osztható (*1. ábra*), doménszerkezetük nagyfokú homológiát mutat (18).



1. ábra Teljes hosszúságú PPARy és RXRa DNS-hez kötődve 9-cisz-reténsav mellett NCOA2 koaktivátorral asszociálva. (Fehérjeszerkezet forrása: Protein DataBase, 3E00 entry)

A receptorok N-terminális végén található az **A/B domén**. Ez a legkevésbé konzervált szekvencia a magreceptorok szerkezetében (például a VDR (D-vitamin receptor) A/B doménje 23, a MR (mineralokortikoid receptor) A/B doménje 602 aminosav hosszúságú). Itt található a nem ligandfüggő aktivitásért felelős AF-1 (activation function-1) domén, mely számos kofaktor - többek között a TBP (TATA box-binding protein), az Ada2p (Alteration/deficiency of activation 2 protein) vagy a DRIP 150 (vitamin D receptor-interacting protein 150) – direkt kötéséért felelős (19–21). NMR és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai vizsgálatok szerint az AF-1 rendezetlen fehérjeszerkezetű, azonban kofaktor-kötődés hatására konformációváltozás

jön benne létre (22). Az AF-1 régió poszttranszlációs módosításai (foszforiláció, SUMOiláció) a magreceptor transzkripciós aktivitását befolyásolhatják (23,24).

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 válaszadó elem (leggyakrabban: 5'-RGKTCA-3', ahol R = G/A, K = G/T) a transzkripciós starthelytől messze, a promoter régióban helyezkedik el, "direct-repeat", "inverted-repeat", vagy "everted-repeat" szekvenciában (25). A magreceptor "direct-repeat" (DR) válaszadó elemeknek 6 fajtáját különböztetjük meg attól függően, hogy az ismétlődő szekvenciát hány nukleotid választja el egymástól (DR0-DR6).

A **D-régió** flexibilis hidat képez a DBD és a ligand-kötő domén (LBD) között. Akárcsak az A/B domén, a D-régió is erős aminosav variabilitást mutat egyes magreceptorok között. Vizsgálatok kimutatták, hogy a D-régió mutációja befolyásolja a DBD és az LBD működését (26), elősegíti az AF-1 és AF-2 transzaktivációs domének szinergizmusát (27), valamint jelentős szerepe van a magreceptorok szubcelluláris eloszlásának meghatározásában, mivel itt található a magi transzlokációért felelős magi lokalizációs szignál szekvencia (NLS) (28,29). A D-régió acetilációja, foszforilációja, vagy SUMOilációja befolyásolja a receptorok transzkripciós aktivitását (30–32).

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. Különböző magreceptorok ligand-kötő doménjének aminosav szekvenciája nagyfokú variabilitást mutat, mely lehetővé teszi ligandspecifikus kötőhelyek kialakítását, azonban ennek ellenére háromdimenziós szerkezetük nagyfokú hasonlóságot mutat (33). Kristályszerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy az LBD 12 darab α-helixből (H1-12) épül fel, melyek három párhuzamos síkba rendeződtek (34). Az első 11 hélix hozza létre a ligandkötő zsebet (ligand-binding pocket, LBP), melynek mérete 100 Å³ és 1400 Å³ között változhat. Azok a megreceptorok, melyek nagyméretű ligandkötő zsebbel rendelkeznek (ilyen például a PPARγ), többféle ligand megkötésére képesek. Vannak olyan magreceptorok is, melyek nem rendelkeznek ligandkötő zsebbel, ezáltal feltételezhető, hogy nincs endogén ligandjuk (35). Az LBD C-terminális részén található a ligandfüggő transzkripciós aktiválásért felelős AF-2 domén. Akárcsak az AF-1, az AF-2 is számos koaktivátort köthet (19). Az AF-1-gyel ellentétben azonban az AF-2-höz kötődő fehérjék konzervált leucinban gazdag régiót tartalmaznak (36) LxxLL konszenzus szekvenciában (L: leucin, X: bármilyen egyéb aminosav). Ligandkötés hatására az LBD konformációváltozáson megy keresztül, mely során a ligandkötő zsebet a H12 helix zárja le, ezáltal lehetővé téve koaktivátorok kötődését.

Az F-domén nagyfokú variabilitást mutat az egyes magreceptorok között, olyannyira, hogy egyes magreceptorok F-doménje hiányzik. Habár az F-domén pontos szerepe nem minden receptor esetében tisztázott, számos vizsgálat kimutatta, hogy deléciója vagy mutációja módosítja a magreceptorok transzkripciós aktivitását, illetve kofaktorokhoz való kötődését (37).

2.2.3. Magreceptorok csoportosítása szerkezetük alapján

Az emberben előforduló 48 féle magreceptort szekvencia homológia alapján 7 nagy csoportba oszthatjuk (38).

Az NR0 csoportban két egyedi felépítésű receptor szerepel (dosage-sensitive sex reversaladrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, Gene 1 -DAX, small heterodimer partner - SHP), melyek kizárólag ligand-kötő domént tartalmaznak. Ligand-kötő doménjük LxxLL szekvenciáján keresztül más magreceptorokhoz kötődnek és koaktivátorként működnek(39,40).

Az NR1 csoportba többek között a pajzsmirigy-hormon receptor (TR), a reténsav receptorok (RAR), a peroxiszóma-proliferátor aktiválta receptorok (PPAR), a liver X receptor (LXR), a D-vitamin receptor (VDR) tartoznak. Ezek a receptorok lipofil molekulákat kötnek.

Mivel vizsgálataink során elsősorban a reténsav receptorral és D-vitamin receptorral történtek, ezeket a receptorokat külön is ismertetem.

A reténsav receptort (2. *ábra*) először 1987-ben klónozták (41), azóta három szubtípusát sikerült elkülöníteni (RARα, RARß és RARγ), vizsgálataink minden eseteben az RARα izoformán történtek. 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 (42). 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 (43–45). Az RAR működése során RXR-rel dimerizálódik, és leggyakrabban DR5, DR2, vagy DR1 válaszadó elemhez kötődnek (11).

A D-vitamin receptor (2. *ábra*) 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 (46,47). Az aktivált VDR/RXR heterodimer leggyakrabban DR3 válaszadó elemhez kötődik. A VDR részt vesz a szervezet kalciumtranszportjában, de számos tanulmány utal arra, hogy az immunválaszban és a tumorigenezisben is jelentős szerepe van (48,49). Protektív szerepét leírták számos vírus által okozott - többek között HIV-1 és SARS-CoV-2 – infekcióban (50–53). A VDR gén variabilitásának szerepe van a magas életkor elérésében (54). A D-vitamin hiány többek között csontritkulást, vagy gyermekekben angolkórt okozhat (55).



humán RAR-LBDy

VDR-LBD

2. ábra Humán RAR-LBDy kristályszerkezeti modellje all-transz reténsavat kötő állapotban és humán VDR-LBD kristályszerkezeti modellje kalcitriolt kötő állapotban. (forrás: Protein DataBase, 2LBD, 7QPP)

Az NR2 csoportot olyan magreceptorok alkotják, melyek zsírsavakat kötnek. Ide tartoznak többek között a retinoid X (RXR) receptorok, a chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF), és hepatocyte nuclear Factor 4 (HNF-4).

Az RXR kiemelt szerepet kap a magreceptorok működésében, mivel számos magreceptorral képez heterodimert (56). Az RXR-nek három altípusát ismerjük: az RXR α és RXR β számos szövetben, többek között a vesében, a lépben, a bőrben és a placentában expresszálódik, míg az RXR γ elsősorban az izmokban és az agyban kerül kifejeződésre (57). Számos molekulát leírtak, mely RXR ligandként viselkedik – többek között a 9-cisz-reténsavat, az omega-3 zsírsav dokozahexaénsavat, vagy a mesterségesen előállított LG268-at – de specifikus endogén

ligandját nem ismertük. A közelmúltban egerekben azonosították az RXR első endogén ligandját, a 9-cisz-13,14-dihidroreténsavat, melyet A₅-vitaminként ismerünk (58).

Az NR3 csoportba a szteroid-hormon kötő receptorok tartoznak, mint például az androgén receptor (AR), a progeszteron receptor (PR), a glükokortikoid receptor (GR), a mineralokortikoid receptor (MR) és az ösztrogén receptorok (ER). Ezek a receptorok szterolvázas hormonokat kötnek, és kulcsszerepet játszanak különböző metabolikus, reprodukciós és fejlődési folyamatokban.

Az NR4 csoportba olyan árva receptorok tartoznak mint a nuclear receptors nerve growth factor 1B (NGF1-B), a nurr-related Factor-1 (NURR1), és a neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1), melyeknek döntő szerepe van az idegrendszer fejlődésében (59).

Az NR5 csoportban a steroidogenic Factor 1 (SF-1) és a liver receptor Homolog-1 (LRH-1) árva receptorok találhatóak, melyek fontos szerepet játszanak a szöveti differenciálódásban a szteroidogenezisben, az epesav-háztartásban és a koleszterin-transzportban (60,61).

Az NR6 csoport egyetlen magreceptorból, a germ cell nuclear factor-ból (GCNF) áll. A külön csoportba helyezést az indokolja, hogy a receptor LBD-je nem tartalmaz AF domént. A GCNF a fejlődés során szerepet játszhat a Oct4 és Nanog gének down-regulációjában (62).

2.2.4. Magreceptorok csoportosítása élettani szerepük szerint

Élettani szerepük és működésük szerint négy csoportba oszthatjuk őket. Az első csoportba azok a receptorok tartoznak, amelyek nagy affinitású ligandot (hormonokat) kötnek. Ilyen receptor például az ösztrogén receptor (ER), vagy az androgén receptor (AR). Ligand hiányában a citoplazmában lokalizálódnak, és hősokk-fehérjéhez kötődnek. Ligand hatására általában homodimereket képeznek és a sejtmagba transzlokálódnak, ahol leggyakrabban inverted-repeat szekvenciákhoz kötődnek.

A metabolit receptorok csoportjába olyan magreceptorok tartoznak, amelyek alacsony affinitású ($K_d \approx 10^{-6}$ M) ligandokat kötnek és általában RXR magreceptorral képeznek heterodimereket. Ezek a dimerek lehetnek permisszív heterodimerek (például az LXR-RXR dimer), melyek mindkét magreceptor oldaláról aktiválhatóak, a két receptor együttes aktiválása additiv hatást vált ki. A nem-permisszív heterodimerek (például a VDR-RXR dimer), az RXR oldaláról nem, csak a partner oldaláról aktiválhatóak. A kondícionálisan permisszív heterodimerek (például az RAR-RXR heterodimer) aktiválásához a partner ligandja szükséges, azonban az RXR ligandkötése fokozza a dimer transzkripciós aktivitását (63). Ligand

hiányában ezek a receptorok RGKTCA konszenzus válaszadó elemhez kötődnek, legtöbbször direct repeat elrendezésben, korepresszorokkal asszociálódnak és a kromatinhoz kötődve gátolják célgénjeik átírását. Agonista hatására konformációváltozás és koregulátorcsere történik.

A dimerképző árva receptorok homodimereket képeznek, és direkt-repeat elrendezésű válaszadó elemekhez kötődnek. Ebbe a csoportba tartozik a COUP-TF, a HNF-4 és az RXR (64).

A monomer árva receptorok monomer, vagy dimer formában kötődnek a kromatinhoz, azonban a kromatinkötésben egy válaszadó elem és egy DBD vesz részt. Ilyen receptor például SF-1 vagy az NGFI-B (65).

2.2.5. Kofaktorok

A magreceptorok a környező kromatinra kofaktorokon keresztül fejtik ki aktivitásukat. Ligand hiányában a receptorok általában korepresszor komplex-szel asszociálnak. A korepresszorok, mint például az SMRT, hiszton-deacetiláz aktivitással rendelkeznek, hisztonok N-terminális lizinjének deacetilálása révén a kromatint tömörítik, így gátolják célgénjeik átírását. A korepresszorok két LxxxIxxxI/L motívumon keresztül (corepressor–nuclear-receptor (CoRNR) box) a receptorok LBD-jével asszociálnak.

Agonista ligand hatására a receptorok konformációváltozáson mennek keresztül, mely során a magreceptorok korepresszorok iránti affinitása csökken, így koregulátorcsere történik, a receptorokhoz korepresszorok helyett koaktivátorok kötődnek. Ilyen koaktivátorok például ap160 fehérjék tagjai (NCoA1-3). Ligandkötés hatására a korepresszorok ubikvitinálódása révén azok degradációja is bekövetkezik (66,67).

Strukturális vizsgálatok kimutatták, hogy a koaktivátorok két LxxLL szekvencián keresztül az LBD egyik hidrofób zsebéhez kötődnek. Ezt követően az LxxLL lizinjeihez a H3 hélix C-terminális lizinje és a H12 hélix glutamátja hidrogén-kötéssel kötődik, ezáltal stabilizálva a magreceptorok ligandkötött formáját (68,69). Ezt követően a koaktivátorok további fehérjéket kötnek, melyek hiszton-acetiltranszferáz és hiszton-remodeling aktivitásuk révén a kromatinszerkezetet lazítják, lehetővé téve a transzkripciós gépezet kötődését, valamint mediátor komplexek segítségével a transzkripciót serkentik.

A kofaktorok interakciós felszínéhez kapcsolódó kötőhelyek átfedést mutatnak, így a magreceptorok egyszerre csak koaktivátort, vagy kofaktort köthetnek (70).

2.2.6. Molekuláris kapcsoló modell

A magreceptorok működését tradicionálisan a molekuláris kapcsoló modell írja le (1). 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 helix rácsukódik 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 fehérjéket kötnek, melyek hiszton-acetiltranszferáz aktivitásuk révén a kromatin szerkezetét lazítják, lehetővé téve a transzkripciós gépezet aktiválódását.

2.2.7. Magreceptor-működés dinamikus modelljei

A területen zajló intenzív kutatások eredményeként a fenti molekuláris kapcsoló modellt egyre dinamikusabb kép kezdi felváltani. Transzkripciós faktorok vizsgálata során kimutatták, hogy a transzkripciós faktorok a kromoszómán három dimenziós letapogatást végeznek, míg el nem érnek egy válaszadó elemet, ahol megfelelő feltételek esetén hosszabb időt tölthetnek, és elősegíthetik a transzkripció beindítását (71). 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 (72). A magreceptorokkal folytatott FRAP, ChIP és FCS vizsgálatok során (2,3,73–76) új dinamikus modellt alkottak, melyet "hit-and-run" modellnek neveztek el (*3. ábra*). A modell alapján a receptorok ligand hiányában korepresszorokat kötnek, majd a kromatint szkennelve tranziensen kötődnek. Specifikus válaszadó elemekhez. Ligand hatására koregulátorcsere történik, a magreceptorok az AF-2 doménen keresztül nagy tömegű koaktivátor komplexhez kötődnek és aktiválják a transzkripció gépezetet.



3. ábra Hit-and-run modell PPARy magreceptorral demonstrálva. (Gelman L, Feige JN, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. Nucl Recept Signal. 2006;4:e010. doi: 10.1621/nrs.04010. Epub 2006 Apr 28. PMID: 16741568; PMCID: PMC1472671. alapján)

2.3. FLUORESZCENCIÁS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

2.3.1. Fluoreszcencia

A nem termikus eredetű fénykibocsájtást lumineszcenciának nevezzük. A lumineszcencia azon formáját, amikor egy adott anyag fotonokat nyel el, és ezt követően fény formájában kisugározza, fotolumineszcenciának nevezzük.

A fotolumineszcenciának két típusát különböztetjük meg:

Fluoreszcencia során az anyag egy adott hullámhosszúságú fotont nyel el és ezt követően gerjesztett szinglett állapot jön létre. Femtoszekundumok alatt vibrációs relaxáció, illetve belső konverzió jön létre az S1 szinglett állapot legalacsonyabb energiaszintjére. Az ezután kibocsájtott foton hullámhossza általában nagyobb, mint a gerjesztő fotoné, ezt Stokes-féle eltolódásnak nevezzük. Amennyiben az S1 állapotból az elektron intersystem crossing során triplet állapotba kerül és ezt követi fotonemisszió, foszforeszcenciáról beszélünk. A foszforeszcencia élettartama mindig hosszabb, mint a fluoreszcenciáé, mert tiltott átmenet révén valósul meg. A fluoreszcens fehérjék esetében ez néhány µs alatt bekövetkezik.

Fentieken kívül előfordulhat olyan eset is, amikor a gerjesztett állapotból az elektron hőleadás révén kerül alacsonyabb energiaszintre, ekkor a fotonabszorbciót nem követi fénykibocsájtás. A fenti átmeneteket legegyszerűbben Jablonski diagramon szemléltethetjük (*4. ábra*).

A fluoreszcenciára képes anyagokat fluorofóroknak nevezzük. Ezek a vegyületek könnyen gerjeszthető elektronokat tartalmaznak, legtöbbször aromás szerkezetűek. Biológiai rendszerekben a fluoreszcens fehérjék kromofór (fluoreszcenciára képes) régióját leggyakrabban aromás aminovasak, triptofán, tirozin és fenilalanin építik fel.

A fluoreszcencia kvantumhatásfoka egyenlő az emittált és az abszorbeált fotonok számának hányadosával:

$$\Phi = \frac{N_{emit\hat{a}lt}}{N_{abszorbe\hat{a}lt}} \tag{1}$$

A kvantumhatásfok definiálható a sugárzással történő és sugárzás nélküli reakciók átmeneti valószínűségeinek a hányadosával is:

$$\Phi = \frac{k_{fluoreszcencia}}{k_{fluoreszcencia} + k_{isc} + k_{ic}}$$
(2)



4. ábra Különböző energiaszintek és az ezek közötti lehetséges átmenetek fluoreszcencia és foszforeszcencia képződése esetén.

A moláris extinkciós koefficiens (ε) meghatározza, hogy az adott fluorofór, adott hullámhosszon mennyire tud fotont elnyelni. Egy fluorofór fényességét a kvantumhatásfok, és a moláris extinkciós koefficiens szorzata határozza meg.

A fluoreszcencia élettartam azt az időtartamot jelenti, amíg a fluoreszcencia intenzitás a kezdeti érték e-ad részére csökken. A fluoreszcencia intenzitást rövid impulzusgerjesztés után a következő egyenlet írja le:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \tag{3}$$

ahol I_0 a gerjesztést követő fluoreszcencia intenzitás, a τ fluoreszcencia élettartam

2.3.2. Fluoreszcens fehérjék

Az első fluoreszcens fehérjét 1962-ben fedezték fel, a kristály medúza (*Aequorea victoria*) tanulmányozása során. A medúzából sikerült egy Ca²⁺ által aktivált, kék fényt kibocsátó lumineszcens fehérjét, az aequorin-t izolálni. A királymedúzában az aequorin által Ca²⁺-függő

módon kibocsájtott kék fény egy fluoreszcens fehérjét gerjeszt, amit zöld fluoreszcens fehérjeként ismerünk (wild type green fluorescent protein – wt-GFP) (77).

A fluoreszcens fehérjék móltömege 12-77 kDa közé esik (78), mely igen jelentős növekményt jelentett a korábban használt fluorofórokhoz képest (például a fluoreszcein-izotiocianát 389,3 Da, míg rhodamine 479 Da molekulatömegű).

1992-ben, a wt-GFP sikeres klónozását követően (79) igen jelentős eszközzel gyarapodott a molekuláris biológia eszköztára, melyet azóta is széles körben alkalmazunk in vitro és in vivo rendszerekben fluoreszcens markerként. A fluoreszcens fehérjék egyéb fehérjékhez fuzionálva molekuláris markerként funkcionálnak, ezáltal a célfehérjék élő sejtekben vizualizálhatók és vizsgálhatók (80).

A wt-GFP felfedezése óta számos fluoreszcens fehérjét sikerült létrehozni, azonban alapvető szerkezetük megegyezik. A fluoreszcens fehérjék 11 ß-redőből állnak, melyek egy α -hélix körül rendeződnek el (81), melyet gyakran "ß-hordónak" (ß-can/ß-barrel) neveznek. A kromofór az α -hélix 65. treonin, 66. tirozin és 67. glicin aminosavjának ciklizációjával, majd oxidációjával keletkezik a fehérje érése során. A 67. glicinnek a folyamatban döntő szerepe van és a legtöbb fluoreszcens fehérjében igen konzervált. A ß-hordó megvédi a kromofórt a fluoreszcenciát kioltó molekuláktól (quencherektől), valamint hidrogén-kötések révén stabilizálja azt.

A vad-típusú GFP felfedezése óta különböző aminosav módosításokkal sikerült egy gyorsabban érő, foto-, termo- és mechanostabilabb zöld fluoreszcens fehérjét létrehozni (EGFP – enchanced green fluorescent protein), mely mára szinte teljesen kiszorította a vad-típusú GFP-t a molekuláris biológia eszköztárából; kísérleteink során mi is ezt a változatot használtuk.

Az EGFP móltömege 26,9 kDa, gerjesztési spektrumának maximuma 488 nm-en, míg emissziós maximuma 507 nm-nél van. A vad típusú GFP-hez képest moláris extinkciós koefficiense magasabb, 55900 M⁻¹cm⁻¹, fluoreszcencia élettartama 2,6 ns (*5. ábra*).



5. ábra EGFP gerjesztési és emissziós spektruma (forrás: https://www.fpbase.org/spectra/)

A wt-GFP felfedezése óta számos egyéb fluoreszcens fehérjét izoláltak, mint például a Virágállatok osztályának Lapanemóna neméből származó DsRed fehérjét (82), melynek módosításával jött létre az általunk is használt mCherry (6. *ábra*) (83).



6. ábra mCherry gerjesztési és emissziós spektruma (forrás: https://www.fpbase.org/spectra/)

Az mCherry további módosításával hozták létre a fluoreszcencia élettartam vizsgálatainkhoz használt mScarlet3-at (7. *ábra*) (84,85).



7. ábra mScarlet gerjesztési és emissziós spektruma (forrás: https://www.fpbase.org/spectra/)

Szintén ilyen fehérje a hólyagos anemonából izolált eqFP578 (86), melynek módosításával jött létre a kompetíciós vizsgálataink során használt TagBFP (8. *ábra*) (87).



8. ábra TagBFP gerjesztési és emissziós spektruma (forrás: https://www.fpbase.org/spectra/)

Amennyiben a fluoreszcens fehérjéket gerjesztik, a molekulában lévő kovalens kötések hasítása vagy a környező molekulákkal történő reakciók révén a fluoreszcencia intenzitás irreverzibilis csökkenését figyelték meg, ezt fotoelhalványodásnak (photobleaching) nevezzük (88). A fotoelhalványodást a minta oxigéntartalma, a hőmérséklet, a gerjesztési fény hullámhossza és

intenzitása, a pH és a fluorofór környezete befolyásolja. Azt az időegység alatt elnyelt fotonszámot, amit a fluoreszcens fehérje még fotoelhalványodás nélkül átlagosan elvisel, "photon-budget"-nek nevezzük. A photobleaching következményeként reaktív szabad gyökök képződhetnek, melyek sejtkárosító hatása széles körben ismert, ezt fototoxicitásnak nevezzük (89,90).

Az EGFP gerjesztése során előfordulhat olyan átmeneti állapot is, amely során az nem bocsájt ki fluoreszcens fotont, hanem egy sötét, nem emittáló állapotba kerül - ezt "(photo)blinking"nek, pislogásnak nevezzük (91). Blinking-et előidézhet a molekula triplet állapotba kerülése, a fluorofór rotációja, polarizációs változások, a molekula spontán, vagy foton-indukált izomerizációja.

2.3.3. Mikroszkópia

A legrégebben ember által hegyikristályból készített lencsét Austen Henry Layard fedezte fel 1850-ben az asszír Nimrud palotában, Irakban. A lencse Kr.e. 750 körül készülhetett, valószínűleg nagyítóként, dekorációként, vagy - a napfény fókuszálása révén - tűzgyújtásra használhatták (92). Az első széles körben használt mikroszkópok a Kr. u. 17. században kezdtek megjelenni.

Az első széles körben használt mikroszkópokat Robert Hooke megrendelésére Christopher Cooke és Antonie van Leeuwenhoek készítette el. Hooke mikroszkópja 3 lencséből állt, míg Leeuwenhoek mikroszkópja egy apró lencsét tartalmazott. Leeuwenhoek fennmaradt mikroszkópjaival akár 266x-os nagyítás is elérhető (*9. ábra*).

A mai modern mikroszkópok bonyolult lencserendszerekből állnak, mivel így a nagyítás mértéke növelhető, valamint a különböző fénytörési hibák mértéke is csökkenthető.

Tradicionálisan kétfajta fénymikroszkópos módszert különíthetünk el.

Transzmissziós mikroszkópia során a megvilágító fényforrás és a detektor a minta két oldalán helyezkedik el, így a képalkotás során – a hátteret is tartalmazó – szummációs kép jön létre. Mivel a vizsgált sejtek általában kevés fényt abszorbeálnak, a keletkezett képekre alacsony kontraszt jellemző, így transzmissziós vizsgálatok során a vizsgált sejteket általában különböző festési eljárásoknak vetik alá. Kontrasztosabb képek érhetőek el fázis-kontraszt megvilágítással.



9. ábra Cooke és Leeuwenhoek által készített mikroszkópok. Forrás: National Museum of Health and Medicine / Utrecht University Museum.

Fluoreszcencia mikroszkópiával fluoreszcens festékek vizsgálhatóak (*10. ábra*). A sejtekben és a sejtek felszínén található molekulák immunfluoreszcens, vagy molekuláris genetikai módszerekkel specifikusan jelölhetőek fluorofórokkal. Több fluorofór használatával egyszerre számos molekula megjelölhető, ezáltal vizualizálható és kvantifikálható ezek egymáshoz való affinitása vagy térbeli helyzete.

Tradicionális epifluoreszcens mikroszkópia során a fluorofórt gerjesztő, valamint a fluorofór által emittált fényt dikroikus tükrök és szűrők segítségével választjuk szét. Megvilágító fényforrás lehet higany-gőz, xenon, wolfram-halogén vagy LED izzó, melyek széles hullámhossztartományban emittálnak, a megvilágításra használt hullámhossztartományt gerjesztési szűrőkkel szűkítjük. A megvilágítást biztosíthatjuk lézerek segítségével, melyek szűk hullámhossztartományban emittálnak.

A dikroikus tükör bizonyos hullámhossztartományban áteresztő, míg egyes hullámhosszokon a ráeső fotonokat visszaveri, ezáltal a gerjesztésre használt fényt a mintára tükrözi, majd a minta által kibocsájtott fotonokat átereszti. Emissziós szűrőkkel tovább szűkíthetjük a detektorra jutó hullámhossztartományt.



10. ábra Fluoreszcencia mikroszkóp jellemző elrendezése.

2.3.4. Konfokális mikroszkópia

Az epifluoreszcens mikroszkópia legnagyobb hátránya, hogy mivel a gerjesztő fényforrás a minta teljes vastagságában gerjeszti a fluorofórokat, 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 lézerfénnyel világítjuk meg, majd ezt követően az emittált fotonok egy szűk résen, pinhole-on haladnak keresztül. A pinhole biztosítja, hogy csak a fókuszsíkból érkező fotonok érkezzenek 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 (93).

2.3.5. Szelektív sík-megvilágítású mikroszkópia (SPIM)

Az tradicionális konfokális mikroszkópiával szemben a szelektív sík-megvilágítású mikroszkópia a minta vékony síkját világítja meg. A gerjesztés során hengeres lencsével egy lézerfény-síkot képezünk, mely a detektálás irányára merőleges (*11. ábra*). A gerjesztés szinte

kizárólag a fókuszsíkban történik, ezáltal a háttér gerjesztése minimális. A fenti módszerrel lehetőségünk van optikai szeletelésre, 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.



11. ábra Szelektív sík-megvilágítású mikroszkóp mintatartójának fényképe és sematikus rajza.

2.3.6. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

A konfokális mikroszkópia kifejlesztésével lehetőség adódott igen kis térfogatokban detektálni a fluorofórok által kibocsájtott fluoreszcencia jelet.

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia során konfokális mikroszkóppal mérjük a kicsiny, femtoliteres gerjesztett térfogatba be- és kilépő fluorofórok által okozott fluoreszcencia intenzitás változását (94–96). Más mikroszkópos módszerekkel ellentétben itt nem a minél nagyobb jelintenzitásra törekszünk, mivel elsődleges célunk a fluoreszcencia intenzitásban bekövetkezett fluktuációk rögzítése. A detektálási térfogat csökkentésével vagy a térfogatban található fluoreszcens molekulák koncentrációjának csökkentésével a fluorofórok mozgása során keletkezett fluktuációk relatív értéke az átlagos jelintenzitáshoz képest növelhető.

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 időben fluktuáló jelből az alábbi képlettel számítható az autkorrelációs függvény, melynek alakja függ a fluoreszcens molekulák fotofizikai és diffúziós tulajdonságaitól:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau)\rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} - 1$$
(4)

ahol F(t) a t időpontban mért fluoreszcencia intenzitás, $F(t+\tau)$ a $t+\tau$ időpontban mért fluoreszcencia intenzitás. A (•) az összes τ esetén számított értékek számtani közepét jelenti



12. ábra Autkorrelációs függvény származtatása konfokális mikroszkópos FCS mérések során

Az autokorrelációs függvény különféle modellfüggvényekkel illeszthető, és az illesztési paraméterekből a diffúziót jellemző fizikai tulajdonságok kinyerhetőek (*12. ábra*). A modellválasztás során a rendszert a lehető legegyszerűbben, de megfelelő pontossággal leíró modellt keressük.

A diffúzió a részecskék hőmozgás révén történő vándorlása. A diffúziót jellemezhetjük az átlagos négyzetes elmozdulással (MSD), mely egy részecskének a kezdőponttól történő átlagos elmozdulását jelenti:

$$MSD = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} (x_0 - x_i)^2$$
(5)

ahol N a részecskeszám, x_0 a kezdőpont, x_i a kezdőponttól való távolság.

Normál (szabad) diffúziót feltételezve Fick II. törvénye alapján az MSD az idő (t) függvényében lineárisan növekszik a diffúziós állandóval (D) arányosan:

$$MSD = 6Dt \tag{6}$$

Ha az MSD növekedése az idő múlásával nem lineárisan növekszik, anomális diffúzióról beszélünk, ekkor az MSD a következő képlettel adható meg:

$$MSD = K_{\alpha} t^{\alpha} \tag{7}$$

ahol K_{α} az ún. "generalizált" diffúziós állandó, t az eltelt idő, α az anomalitási faktor.

Ha α >1, akkor szuperdiffúzióról beszélünk, mely sejteken belül aktív transzportfolyamatok következtében jön létre. Amennyiben α <1, szubdiffúzió vagy gátolt diffúzió jön létre, mely során a molekulák szabad mozgása akadályozott (*13. ábra*).



13. ábra MSD értéke különböző diffúziós modellek esetében az idő függvényében (MSD: átlagos négyzetes elmozdulás)
 A magreceptorok vizsgálata során 4 alapvető modellt alkalmaztunk:

- Egy-komponensű normál diffúziós modell
- Két-komponensű normál diffúziós modell
- Egy-komponensű anomális diffúziós modell
- Két-komponensű anomális diffúziós modell,

melyek közül a legkevesebb paramétert az egy-komponensű normál diffúziós modell, míg a legtöbb paramétert a két-komponensű anomális diffúziós modell tartalmazta.

Modelljeinkben figyelembe vettük az alkalmazott fluoreszcens fehérje fotofizikai tulajdonságait, a triplet állapotot és a blinking-et is.

2.3.7. Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS)

Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával vizsgálhatjuk két együtt diffundáló, különböző fluorofórral megjelölt molekula asszociációját (97,98). FCCS során a

fókusztérfogatot két átfedő lézernyalábbal gerjesztjük, a beérkező fluoreszcencia jeleket pedig két különálló detektorral detektáljuk (*14. ábra*).

A keresztkorrelációs függvényt a következő képlet írja le:

$$G_{\chi}(\tau) = \frac{\langle F_1(t)F_2(t+\tau)\rangle}{\langle F_1(t)F_2(t)\rangle} - 1$$
(8)

ahol $F_i(t)$ az i-edik csatornában t időpontban mért fluoreszcencia intenzitás, $F_2(t+\tau)$ a második csatornában a t+ τ időpontban mért fluoreszcencia intenzitás. A (•) az összes τ esetén számított értékek számtani közepét jelenti

Amennyiben a két fluorofórral megjelölt molekula egymással asszociál, a kereszt-korrelációs függvény amplitúdója magas lesz, így a függvény amplitúdójából következtethetünk az asszociáció mértékére.



14. ábra Autokorrelációs és keresztkorrelációs függvények származtatása konfokális mikroszkópos FCCS mérések során (Krieger JW, Singh AP, Bag N, Garbe CS, Saunders TE, Langowski J, Wohland T. Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. Nat Protoc. 2015 Dec;10(12):1948-74. doi: 10.1038/nprot.2015.100. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26540588. alapján)

A keresztkorrelációs függvény amplitúdóját számos faktor befolyásolhatja. FCCS mérések során törekednünk kell a két gerjesztési térfogat egységes méretére, valamint ezek minél tökéletesebb átfedésére. A magas háttér fluoreszcencia is a keresztkorrelációs amplitúdó csökkenéséhez vezet, de számításba kell venni a festékek fotoelhalványodását is.

A csatornák közötti átvilágítás fals-pozitív keresztkorrelációt idézhet elő, amit munkám során alternáló gerjesztés bevezetésével zártunk ki.

2.3.8. 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. A jelenséget először Theodor Förster írta le (99).

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 (100,101).

Annak valószínűségét, hogy egy donor FRET révén kerül alapállapotba, a FRET hatásfok fejezi ki:

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_f + k_{FRET} + \sum_i k_i} \tag{9}$$

ahol k_{FRET} a FRET során létrejövő energiatranszfer sebességi állandója, k_f a donor fluoreszcenciájának sebességi állandója, a k_i az egyéb legerjesztődéssel járó folyamatok sebességi állandója.

A FRET hatásfok függ a két molekula távolságától:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$
(10)

ahol R a molekulák közötti távolság, R_0 pedig az ún. Förster-távolság, amely azt a távolságot adja meg, melynél a FRET hatásfok 50%.

Az R₀ a következő képlettel kiszámítható:

$$R_0^{\ 6} = \frac{20,7}{128} \frac{\kappa^2 Q_D}{^5N_A} \frac{\kappa^2 Q_D}{n^4} J \tag{11}$$

ahol κ a dipól-orientációs faktor, Q_D a donor kvantumhatásfoka, n a közeg törésmutatója, N_A az Avogadro-szám, J a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedési integrálja. Az R_0 értéke EGFP-mCherry esetében 5,4 nm (102).

Mivel a FRET hatásfok a két kölcsönható molekula távolságának hatodik hatványával fordítottan arányos, így a módszer "molekuláris vonalzóként" is használható (103). A FRET felfedezése óta számos módszer került kidolgozásra, mely alkalmas többek között fehérjék

közötti asszociáció, membrán fluiditás mértékének, molekulák összerendeződésének vizsgálatára is (104–106).

3. Célkitűzések

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

Egyre több eredmény utal arra, hogy a magreceptorok egymással való kölcsönhatása és mobilitása az eredeti molekuláris kapcsoló modell által leírt képnél jóval dinamikusabb, melyet számos tényező befolyásol.

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 kötéséért folytatott versengés a VDR és RAR között a kromatinkötődés szintjén?

A fenti kérdések megválaszolásához elsősorban konfokális mikroszkóppal végeztünk fluoreszcencia korrelációs vizsgálatokat, de létrehoztunk 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 kifejlesztett új mikroszkópos módszer más fehérjék esetében is segíthet a molekuláris kölcsönhatások és mobilitás feltérképezésében.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. PLAZMID KONSTRUKTOK

A teljes hosszúságú RARα és RXRα plazmidokat a cDNA Resource Centertől (Bloomsberg, PA, USA) vásároltuk. PCR amplifikációt követően a cDNS-t módosított pEGFP-C3 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) és pmCherry-C3 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) vektorokba klónoztuk XhoI és HindIII restrikciós endonukleázok alkalmazásával.

A magreceptorok ligand-kötő doménjének szekvenciáját az UniProt adatbázis (107) segítségével kerestük meg. Az NR-LBD szekvenciáját PCR amplifikációval sokszorosítottuk, majd a korábban ismertetett módon pEGFP-C3 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) és pmCherry-C3 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) vektorokba klónoztuk

Korábbi vizsgálataink tapasztalatiból kiindulva a fluorofórok térbeli orientációjából adódó alacsony FRET hatásfok miatt SPIM-FRET-FCCS vizsgálatokhoz a fenti magreceptor plazmidokat úgy módosítottuk, hogy a fluorofór és a magreceptor közé egy erősen flexibilis, 10 aminosavból álló, (GGGGS)₂ szekvenciájú "linker"-t illesztettünk. Először a (GGGGS)₂ szekvenciát (GGGGS)₂ BsrGI és XhoI restrikciós endonukleázok felhasználásával a pEGFP-C3 és pmCherry-C3 vektorokba klónoztuk. Ezt követően a módosíott vektorokba a teljes hosszúságú receptorok esetében XhoI és SacII endonukleázokat, LBD-k esetén XhoI és HindIII endonukleázokat felhasználva klónoztuk az RAR, RXR, RAR-LBD és RXR-LBD szekvenciákat.

A fluorofórral fúzionált magreceptorokat tartalmazó plazmidot DH5α E. coli sejtekbe transzformáltuk, majd GenElute Plasmid Miniprep/Maxiprep Kit-et (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) használtunk a plazmidok tisztítására. A plazmidok tisztaságát és koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) ellenőriztük.

A konfokális FCS mérések során használt EGFP-VDR magreceptor konstruktot már korábban létrehozták munkacsoportunkban (4).

A magreceptorok arányának meghatározásához, valamint FRET és FCCS mérésekben pozitív kontrollként használt EGFP-mCherry, valamint EGFP-mRFP1 fúziós fehérjéket

munkacsoportunkban korábbi vizsgálatok során már széles körben alkalmaztuk. A két fluorofórt a CGG GAT CCA CCG GTA ATG szekvencia által kódolt 6-tagú peptid linker választja el egymástól.

Létrehoztunk egy olyan EGFP-mCherry fúziós plazmidot is, melyben a fluorofórokat egy 30 aminosavból álló poliprolin lánc választja el egymástól, így a két fehérje ugyan együtt mozog pozitív FCCS amplitúdót generálva, de a két fluorofór nagy távolsága miatt az EGFP és az mCherry között nem jön létre FRET.

4.2. SEJTTENYÉSZTÉS

A mikroszkópos vizsgálatok során humán embrionális vese karcinóma (HEK293), humán méhnyakrák sejteket (HeLa) és humán kolorektális adenokarcinóma (Caco-2) sejteket használtunk. A sejteket fenolvörös festéket tartalmazó, 10% FBS-el (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 mg/l gentamycinel (KARA, Novo Mesto, Szlovénia) és GlutaMax-al (Fisher Scientific, Tokió, Japán) kiegészített DMEM-ben növesztettük 37°C-os inkubátorban 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában. A sejteket hétfő-szerda-pénteki napokon passzáltuk.

48 órával a konfokális mikroszkópiai méréseket megelőzően a sejteket 8-lyukú ibidi kamrákban (ibidi, München, Németország) szélesztettük 15000 sejt/lyuk koncentrációban. 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 (Promega, Mannheim, Németország), 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 (Sigma Aldrich Saint Louis, MO, USA) tartalmazó oldattal kezelt fedőlemezekre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) szélesztettük. Ehhez 48 órával a mikroszkópos vizsgálatok előtt 3 db, előzetesen poli-lizinezett fedőlemezt tartalmazó, 35 mm-es petri-csészékre 120000 sejet 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.

4.3. KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPIA

Konfokális mikroszkópiai méréseinket Zeiss LSM880 – AiryScan (Carl Zeiss, Jéna, Németország) konfokális lézer pásztázó mikroszkópon végeztük, 40-szeres nagyítású, 1,2 numerikus apertúrával rendelkező vízimmerziós objektívvel.

A képfelvételek 70,85 μm×70,85 μm látómezőről 512×512 pixel felbontásban 16 bit mélységben készültek.

Fluorofór	Gerjesztés	Detektálás
TagBFP	405 nm dióda lézer	415-490 nm
EGFP	488 nm Ar-ion lézer	500-534 nm
mCherry	543 nm He-Ne lézer	578-696 nm

A gerjesztési és detektálási hullámhossztartományokat az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Konfokális mikroszkópia során alkalmazott gerjesztési és detektálási hullámhossztartományok.

A flurofórral megjelölt magreceptorok relatív expressziós szintjét EGFP-mCherry és TagBFP-EGFP fúziós fehérjék használatával határoztuk meg. Először meghatároztuk az EGFP-mCherry és TagBFP-EGFP fehérjék zöld/piros és kék/zöld csatornáiban mért fluoreszcencia intenzitás háttér- és FRET-korrigált hányadosát:

$$Q = \frac{(I_2 - B_2) \times (1 - E)}{(I_1 - B_1)}$$
(12)

ahol I_2 az akceptor csatornában mért fluoreszcencia intenzitás, B_2 az akceptor csatornában mért autofluoreszcencia intenzitás, E a FRET hatásfok, I_1 a donor csatornában mért fluoreszcencia intenzitás B_1 a donor csatornában mért autofluoreszcencia intenzitás.

Ezt követően a két fluorofórral jelölt magreceptor koncentrációinak hányadosa a következő képlettel meghatározható:

$${N_2}/_{N_1} = \frac{(I_2 - B_2) \times (1 - E)}{(I_1 - B_1) \times Q}$$
(13)

HEK293 sejtekben az endogén és transzfektált magreceptorok expressziós szintjének meghatározásához Western-blottal kombinált konfokális mikroszkópiai méréseket végeztünk. Ehhez a sejteket a korábban ismertetett módon transzfektáltuk, majd ugyanazon a sejtpopuláción egyszerre történtek a Western-blot vizsgálatok és a konfokális képalkotás. A Western-blot vizsgálatokat Dr. Hegedüs Éva végezte, mely során meghatározta a transzfektált és endogén magreceptorok arányát a teljes sejtpopulációra nézve.

Mivel az FCS vizsgálatok egy meghatározott, alacsony fluoreszcencia intenzitású sejtpopuláción történtek, a Western-blot vizsgálatokkal párhuzamosan nagy látótérben ($212 \times 212 \mu m$) számos sejtről (~150 sejt/minta) vettünk fel konkokális képeket, majd meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitásokat az egész sejtpopulációra (a transzfektálatlan sejteket is beleértve), valamint a tipikusan az FCS-vizsgálatokra használt sejtekre. Ezek ismeretében az FCS-sel vizsgált sejtpopulációban a fluoreszcens és endogén magrecptorok aránya megbecsülhető:

$$\frac{c(NR_{FP})}{c(NR_{endog.})} = \frac{I_{NR_{FP}}^{WB}}{I_{NR_{endog.}}^{WB}} \times \frac{\langle F_{FCS} \rangle}{\langle F_{total} \rangle}$$
(14)

ahol $c(NR_{FP})/c(NR_{endog.})$ a transzfektált és endogén magreceptorok átlagos aránya az FCS-el vizsgált sejtekben, $I_{NR_{FP}}^{WB}$ és $I_{NR_{endog.}}^{WB}$ a Western-blot-ból Image J programmal meghatározott háttérkorrigált, integrált biolumineszcencia intenzitás a floreszcensen jelölt és endogén magreceptorok esetében, $\langle F_{FCS} \rangle$ az FCS vizsgálathoz felhasznált sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása, $\langle F_{total} \rangle$ pedig a látótérben látható összes sejt átlagos fluoreszcencia intenzitása a konfokális képek alapján.

4.4. 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 μW-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 (108). Először az összes autokorrelációs görbe átvizsgálásra került. A sejtek mozgásából, nagy aggregátumok által generált fluoreszcencia fluktuációkból adódó műtermékeket tartalmazó görbéket kizártuk a kiértékelésből. Az egy mérésből származó, fennmaradó görbéket átlagoltuk, majd a keletkezett korrelációs függvényt szórásokkal súlyozva különböző modellekkel illesztettük a legkisebb négyzetek módszere szerint, szimulált lágyítás (simulated annealing) algoritmus

segítségével. A modellfüggvény, mely a diffúzió mellett triplet és blinking komponenst is tartalmaz, a következő képlettel írható le:

$$G(\tau) = \frac{1 - T - \Phi_c + T e^{-\tau/\tau_{tr}} + \Phi_c e^{-\tau/\tau_c}}{1 - T - \Phi_c} G_{diff}(\tau)$$
(15)

ahol

$$G_{diff}^{normal}(\tau) = \frac{1}{N} \left[\rho_1 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_1} \right)^{-1/2} + \rho_2 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_2} \right)^{-1/2} \right] \quad (16)$$

és

$$G_{diff}^{anom}(\tau) = \frac{1}{N} \left[\rho_1 \left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_1} \right)^{\alpha_1} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\tau}{S^2 \tau_1} \right)^{\alpha_1} \right)^{-1/2} + \rho_2 \left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_2} \right)^{\alpha_2} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\tau}{S^2 \tau_2} \right)^{\alpha_2} \right)^{-1/2} \right]$$
(17)

ahol $G(\tau)$ $G(\tau)$ az autokorrelációs függvény értéke, N a fluoreszkáló molekulák átlagos száma a mérési térfogatban, S az ellipszoid alakú detektálási térfogat axiális és laterális sugarának aránya, T a triplet állapotban lévő molekulahányad, τ a késleltetési idő, τ_{tr} a triplet állapot korrelációs ideje (3 µs-ra fixálva) (109), Φ_c a protonált, sötét állapotban lévő molekulahányad, τ_c a protonáció korrelációs ideje (320 µs-ra fixálva) (110), ρ_1 és ρ_2 a gyors és a lassú diffúziós komponens hányada, τ_1 és τ_2 pedig a komponensek diffúziós ideje. A receptorok diffúziós állandója (D) fordítottan arányos a diffúziós idejükkel, és meghatározható ismert diffúziós állandójú sztenderd (Alexa 488 festékoldat) diffúziós idejével történő összevetéssel:

$$D_i = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_i} \tag{18}$$

$$\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_D} = \sqrt{4 \times 414\mu m^2 / s \times \tau_D}$$
(19)

ahol D_i a kalkulált diffúziós állandó, ω_{xy} a detektálási térfogat laterális szélessége, τ_i a magreceptorok diffúziós ideje, D az Alexa 488 festék irodalomból ismert (111) diffúziós állandója, τ_D az Alexa 488 festékoldat diffúziós ideje a mérésekhez használt konfigurációban mérve.

4.5. 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 (MLD 488-60 and Jive
25, both Cobolt SE, Solna, Sweden) gerjesztettük, a fókusztérfogatban síkkal közelíthető gerjesztési nyalábot cilinderes lencsékkel és egy objektívvel hoztuk létre (LJ1629RM-A, Thorlabs, Newton, NJ, Plan Fluor $10\times/0.3$, Nikon). 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) Optical Setup Andor iXon X3 860 EMCCD camera emision filter **DualView DV2** 191nm lase 561nm lase mirrors for alignment dichroic splitter adjustable slit beam expanders tube lens beam combiner x detection objective 60x NA1.0 sample top view chamber gimbal-mounted mirror (move light-sheet) LED transmission illumination side view relay telescope cylindrical lens projection objective

15. ábra Szelektív sík-megvilágítású mikroszkóp sematikus képe. (Krieger JW, Singh AP, Bag N, Garbe CS, Saunders TE, Langowski J, Wohland T. Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. Nat Protoc. 2015 Dec;10(12):1948-74. doi: 10.1038/nprot.2015.100. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26540588. alapján)

A fluorofórok által kibocsájtott fluoreszcens fotonokat a gerjesztésre merőlegesen, 60x-os nagyítású vízimmerziós objektívvel gyűjtöttük össze (CFI Apo-W NIR 60x/1.0W, Nikon, Tokio, Japan). A fluoreszcens fotonokat spektrálisan kettéosztottuk (500-550 nm, >593 nm) egy DualView nyalábosztóval (Optical Insights, LLC, USA), majd a zöld és vörös fotonokból alkotott képeket egyazon EMCCD kamerával (iXon X3 860 EMCCD camera, Andor Technology) rögzítettük egymás mellett a fényérzékeny chip két térfelén 530 μ s-os mintavételezéssel, 51 μ m × 8 μ m (128 × 20 pixel) méretben (*15. ábra*).

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 (200 miliszekundumos expozíciós idő, 50x EM gain) 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 (*16. ábra*).



16. ábra SPIM-FRET-FCCS vizsgálatok során zöld és vörös csatornában felvett reprezentatív mikroszkópos képek. (a képek mérete: 51 μm × 8 μm)

4.6. 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 fotoelhalványodásból 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 (17. ábra).



17. ábra SPIM-FRET-FCCS workflow folyamatos gerjesztés (A) és ALEX (B) használatával. Először mindkét módszer esetében gerjesztés nélkül képek készültek, ezeket a háttér-korrekcióhoz használtuk fel. Ezt követően előnézeti képeket vettünk fel, melyek alkalmasak FRET számításra. Folyamatos gerjesztés (A) során 100000 képet vettünk fel, mely során a mintát mindkét lézerrel gerjesztettük, ezáltal FRET vizsgálatokra ez a képsorozat alkalmatlan volt. ALEX gerjesztés során külön vettük fel 530 ns különbséggel a donor, akceptor és transzfer képeket melyek alkalmasak FRET és FCCS vizsgálatokra is. A mintavételezés végén utónézeti képek készültek, melyekből a fluorofórok kiégésének mértékét határoztuk meg.

4.7. IMAGING FCCS MÉRÉSEK KIÉRTÉKELÉSE

A SPIM-FCCS mérések kiértékelése is a QuickFit 3 programmal történt. Először a felvett képek háttér- és kiégés korrekción mentek keresztül, majd a mozgási műtermékes sejteket kizártuk az analízisből. Ezt követően a pixelenkénti időben fluktuáló fluoreszcencia intenzitásokból minden egyes pixelre kiszámítottuk a zöld és vörös jel autokorrelációs (ACF0, ACF1), illetve a két jel kereszkorrelációs (CCF) függvényét. Szemellenőrzéssel és intenzitás alapú kapuzással kiválasztottuk a sejtek megfelelő intenzitású pixeleit, majd azokat a sejten belüli pixeleket, melyek műtermékre utaló korrelációs görbékkel rendelkeztek, kizártuk az analízisből.

A pixelenkénti korrelációs függvény $g_{\gamma,\chi}(\tau)$ γ csatornára és χ komponensre a következő képlettel fejezhető ki:

$$g_{\gamma,\chi}(\tau) = \frac{V_{eff,\gamma}}{\langle N_{\chi} \rangle} \frac{1}{4a^4 \omega_{z,\gamma} \sqrt{\pi}} \cdot g_{xy,\gamma,\chi}(\tau) \cdot g_{z,\gamma,\chi}(\tau)$$
(20)

ahol

$$g_{xy,\gamma,\chi}(\tau) = \left\{ 2a \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{a}{\sqrt{4D_{\chi}\tau + \omega_{xy,\gamma}^2}}\right) + \frac{2\sqrt{4D_{\chi}\tau + \omega_{xy,\gamma}^2}}{\sqrt{\pi}} \left[\exp\left(-\frac{a^2}{4D_{\chi}\tau + \omega_{xy,\gamma}^2}\right) - 1\right] \right\}^2$$
(21)

és

$$g_{z,\gamma,\chi}(\tau) = \left(1 + \frac{4D_{\chi}\tau}{\omega_{z,\gamma}^2}\right)^{-1/2}$$
(22)

ahol *a* a kamera effektív pixelmérete, $\langle N \rangle$ az átlagos molekulaszám a V_{eff} detektálási térfogatban, $\omega_{xy,\gamma}$, $\omega_{z,\gamma}$, a pixelek PSF értékei a laterális és axiális irányban, a D a diffúziós koefficiens.

A V_{eff} a következő képlettel definiálható:

$$V_{eff} = \frac{\sqrt{\pi} \cdot a^2 \cdot \omega_{z,\gamma}}{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{a}{\omega_{xy,\gamma}}\right) + \frac{\omega_{xy,\gamma}}{\sqrt{\pi} \cdot a} \left(\exp\left(-\frac{a^2}{\omega_{xy,\gamma}^2}\right) - 1 \right) \right]^2}$$
(23)

A $\omega_{xy,\gamma}$, $\omega_{z,\gamma}$ értékeket minden mérési nap elején meghatároztuk 100 nm-es Tetraspeck gyöngyöket (Invitrogen, Waltham, MA, USA) és a Quickfit 3 beépített modulját használva.

A komplexben együtt mozgó, zöld és vörös fluoreszcens fehérjét is tartalmazó molekulahányadot mindegy egyes pixelre a keresztkorrelációs és autokorrelációs görbék minimumában mért amplitúdók arányával becsültük meg:

$$rCCF = \frac{CCF(\tau_{min})}{\min(ACF0(\tau_{min}), ACF1(\tau_{min}))}$$
(24)

Az *rCCF* értékének pontosabb meghatározása érdekében az ALEX mérések során az auto- és keresztkorrelációs függvények első 8, míg a folyamatos gerjesztéssel mért adatok első 16 adatpontját átlagoltuk.

4.8. SPIM-FRET MÉRÉSEK KIÉRTÉKELÉSE

A SPIM-FRET méréseket kétféleképpen értékeltük ki:

- Az FCCS mérések előtt előnézeti képeket vettünk fel a donor, transzfer és akceptor csatornákban 200 milliszekundumos expozíciós idővel, 50x EM gaint alkalmazva, 488 nm-es, majd 561 nm-es gerjesztést követően (18. ábra).
- Az ALEX gerjesztés során minden egyes pixelről 1000 időpillanatban felvett képek intenzitását pixelenként összeadtuk, majd ezt a képet használtunk a további kiértékelés során. Ebben az esetben 530 mikroszekundumos expozíciós időt alkalmaztunk 50x EM gain mellett.

A képek kiértékeléséhez egyedileg megírt Matlab (Mathworks, Natick, MA) scriptet használtunk, mellyel meghatároztuk az átlagos háttérintenzitást, az átvilágítási faktorokat és az α faktort. A képeket 3 csatornára osztottuk fel:

- Donor csatorna (I1): 488 nm-es gerjesztés során a zöld csatornában detektált fluoreszcencia intenzitás
- Transzfer csatorna (I2): 488 nm-es gerjesztés során a vörös csatornában detektált fluoreszcencia intenzitás
- Akceptor csatorna (I2): 561 nm-es gerjesztés során a vörös csatornában detektált fluoreszcencia intenzitás



18. ábra SPIM-FRET-FCCS módszerrel a sejt egy síkjának minden pixelében mérhető FRET és FCCS (Krieger JW, Singh AP, Bag N, Garbe CS, Saunders TE, Langowski J, Wohland T. Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. Nat Protoc. 2015 Dec;10(12):1948-74. doi: 10.1038/nprot.2015.100. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26540588. alapján)

Az egyes csatornák fluoreszcencia intenzitás értékei a következő módon írhatóak fel:

$$I_1(488_{ex}, 500 - 550_{det}) = I_D(1 - E)$$
⁽²⁵⁾

$$I_2(488_{ex}, > 593_{det}) = I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha$$
⁽²⁶⁾

$$I_3(561_{ex}, > 593_{det}) = I_A \tag{27}$$

ahol I_D a donor csatornában mért fluoreszcencia intenzitás elméleti értéke a donor csatornában abban az esetben, ha nincs FRET, I_A az akceptor intenzitása az akceptor csatornában, E a FRET hatásfok, S_1 és S_2 a spektrális átvilágítási faktorok.

Az átlagos autofluoreszcencia intenzitásokat nem transzfektált HeLa sejtekben mértük, az I_{1-3} értékeket ezeket felhasználva korrigáltuk. A sejten kívül eső pixelek, valamint a sejtben mért kiugróan magas és alacsony intenzitású pixelek nem kerültek kiértékelésre

A spektrális átvilágítási faktorokat csak EGFP-t, vagy csak mCherry-t kifejező sejteken határoztuk meg a következő módon:

$$S_1 = \frac{I_2}{I_1}$$
(28)

$$S_2 = \frac{I_2}{I_3}$$
(29)

Az α faktor adott számú gerjesztett mCherry által kibocsájtott, transzfer csatornában mért fluoreszcencia intenzitás és ugyanannyi gerjesztett EGFP által kibocsájtott, donor csatornában mért fluoreszcencia intenzitás aránya, melyet EGFP-mCherry fúziós protein vizsgálata során határoztunk meg (112). Ez a fehérje a két fluorofórt 1:1 arányban tartalmazza. Az α faktor elméleti értéke a fúziós fehérjével mért intenzitásokkal kifejezve:

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D} \frac{\varepsilon_{488}^D}{\varepsilon_{488}^A}$$
(30)

ahol $\varepsilon_{488}^D/\varepsilon_{488}^A$ az EGFP és az mCherry extinkciós koefficiensének aránya 488 nm-es gerjesztés mellett.

Mivel I_D és I_A nem ismert, az α a gyakorlatban a következő módon számítható a fúziós fehérje intenzitásainak segítségével (112):

$$\alpha = \frac{I_1 S_1 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{488}^D}{\varepsilon_{488}^A}\right) I_3 S_2 - I_2}{I_1}$$
(31)

A FRET hatásfokot minden pixelre a következő képlettel határoztuk meg:

$$E = \frac{I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2}{I_2 + I_1 (\alpha - S_1) - I_3 S_2}$$
(32)

4.9. LIGANDKEZELÉS

Ligandkezeléshez a magreceptorok szintetikus ligandjait használtuk, AM580-at (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) az RAR, LG268-at (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Németország) az RXR és kalcitriolt (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA)) a VDR aktiválásához (*19. ábra*).



19. ábra A vizsgálataink során használt ligandok szerkezete. AM580: az RAR szintetikus ligandja, LG268: az RXR szintetikus ligandja, kalcitriol: a VDR természetes ligandja

A törzsoldatokat DMSO-ban oldottuk fel. Ezt követően kis kiszerelésű oldatokat készítettünk, melyek 50-50%-ban etanolt és DMSO-t tartalmaztak, ezeket -20°C-on tároltuk, kiolvasztást követően a maradék oldatokat már nem használtuk további kísérlethez. 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.

4.10. STATISZTIKAI MÓDSZEREK

Statisztikai számításainkat GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) szoftverrel végeztük. Az FCS során használt modellek (egykomponensű normál diffúziós modell, kétkomponensű normál diffúziós modell, egykomponensű anomális diffúziós modell, kétkomponensű anomális diffúziós modell) összehasonlításához először az illesztés χ^2 értékeit számítottuk ki, meghatároztuk a modellek Akaike információs kritériumát (113), majd a modelleket F-teszttel hasonlítottuk össze webes applikáció használatával (GraphPad QuickCalcs Website). Ennek alapján a teljes hosszúságú magreceptorok ACF-jeinek illesztésére a kétkomponensű szabad diffúziós, míg a DNS-kötő képességgel nem rendelkező ligandkötő domének esetében az egykomponensű szabad diffúziós modellt találtuk legalkalmasabbnak.

A p2 és CCF értékeit Student-féle egymintás t-próbával hasonlítottuk össze.

A diffúziós idők és diffúziós koefficiensek összehasonlításához előbb az értékeket a komponenseik arányában súlyoztuk, majd eloszlásukat F-teszttel hasonlítottuk össze. Az összehasonlításhoz egyedileg írt C++ programot használtunk.

SPIM méréseink során a E és az rCCF értékek között Pearson-féle korrelációs koefficienst saját Matlab szkripttel számoltuk ki. Először a FRET képek kiértékelése során használt maszkot QuickFit3 kompatibilis formában exportáltuk, így ugyanazok a pixelek kerültek kiértékelésre a FRET és FCCS képeken. A Pearson-féle korrelációs koefficiens a következő módon számolható:

$$C(E, rCCF) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{\overline{E_i - \mu_E}}{\sigma_E} \right) \left(\frac{\overline{rCCF_i - \mu_{rCCF}}}{\sigma_{rCCF}} \right)$$
(33)

ahol μ és σ az E és rCCF értékek átlaga és szórása, i a vizsgált pixel azonosítója.

A box-plotok ábrázolása során a box-ok a 25., 50. és 75. percentilis értékeket, míg a vonalak a 10. és 90. percentilist jelölik. Az átlagot a + jellel ábrázoltuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. FLUORESZCENSEN JELÖLT MAGRECEPTOROK ELOSZLÁSÁNAK ÉS DIFFÚZIÓS PARAMÉTEREINEK MEGHATÁROZÁSA HEK293 SEJTEKBEN

Az RAR sejten belüli eloszlásának és diffúziós paramétereinek vizsgálatához HEK293 sejteket EGFP-vel jelölt RAR magreceptorokkal transzfektáltunk. A Human Protein Atlas (114) adatai szerint HEK293 sejtben az általunk vizsgálat magreceptorok relatív expressziós szintje igen alacsony, ezáltal kiváló modellként szolgált vizsgálatainkhoz.

Mikroszkópos vizsgálataink kimutatták, hogy az RAR ligand hiányában főként a sejtmagban helyezkedik el (20. ábra).



20. ábra HEK293 sejtek EGFP-RAR-rel és mCherry RXR-rel traszfektálva. Reprezentatív hamis-színezésű konfokális képek (a képek mérete 71x71 μm)

A sejtmagban elhelyezkedő magreceptorok szabadon diffundálhatnak, tranziensen 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 (*21. ábra*). 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 modellekkel történt illesztéseket "goodness of fit" analízisnek is alávetettük, eredményeinket az 2. táblázatban részleteztük.

Eredményeink alapján teljes hosszúságú magreceptorok esetében a továbbiakban a 2komponensű normál diffúziós modellt alkalmaztuk (21/C ábra).



21. ábra: Különböző modellfügvények alapján végzett illesztések EGFP-RAR esetében. A: 1-komponensű normál diffúziós modell, B: 1-komponensű anomális diffúziós modell, C: 2-komponensű normál diffúziós modell, D: 2-komponensű anomális diffúziós modell.

Munkacsoportunkban zajló korábbi vizsgálatok során (3) megbecsülték a két diffundáló magreceptor populáció látszólagos móltömegét a monomer EGFP-hez viszonyítva. A gyors komponens látszólagos móltömege az EGFP-RAR móltömeg 5-10-szeresének adódott, mely nagy valószínűséggel a szabadon diffundáló, kisméretű komplexben előforduló, valamint a kromatinhoz tranziensen kötődő magreceptorokat reprezentálja. Ez a populáció rövid ideig kötődik a kromatinhoz, átlagos diffúziós idejük (a konfokális térfogatban eltöltött idejük) 2 ms. Ez felelhet meg a kromatint pásztázó egydimenziós mozgásnak.

Ezzel szemben a lassú komponens látszólagos móltömege az EGFP-RAR móltömegének 10⁶szorosa, átlagos diffúziós ideje 50 ms. A lassú populációba tartozó magreceptorok hosszabb ideig kötődnek a kromatinhoz, feltehetően specifikus módon a válaszadó elemekhez.

Kutatócsoportunkban korábban EGFP-RAR-rel végzett FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) vizsgálatok kimutatták (115), hogy kiégetést követően 40 másodpercig vizsgálva, ligand hiányában és ligand jelenlétében sem mérhető számottevő immobilis frakció, amely arra utal, hogy az RAR nem kötődik tartósan a kromatinhoz, még a lassú komponens kötődése is tranziens, már ezen a néhányszor 10 s-os időskálán is.

Sample name	Ligand	One component, normal	One component, anomalous	Two component, normal	Two component, anomalous
RAR		49.92	16.84	15.18	13.03
RAR	+AM580	21.65	17.50	13.90	12.22
RAR+RXR		67.98	18.15	17.57	17.76
RAR+RXR	+AM580	47.53	20.33	12.65	11.69
RAR+RXR-LBD		59.24	16.75	14.63	13.61
RAR+RXR-LBD	+AM580	61.65	16.92	13.78	12.01
VDR		41.58	14.29	14.88	12.78
VDR	+Calcitriol	44.17	15.42	14.09	11.91
VDR+RXR		43.98	13.75	13.21	10.71
VDR+RXR	+Calcitriol	47.71	18.50	15.02	12.71
RAR+RXR+VDR		62.07	20.48	14.38	11.87
RAR+RXR+VDR	+AM580	68.63	19.85	14.60	13.32
RAR+RXR+VDR	+Calcitriol	51.83	16.89	14.05	12.20
RAR+RXR+VDR	+LG268	51.51	24.94	14.92	12.77
RAR+RXR+VDR	+AM580 +LG268	41.84	19.93	16.15	14.14
RAR+RXR+VDR	+LG268 +Calcitriol	53.64	21.63	13.19	13.15
RAR+RXR+VDR	+AM580 +Calcitriol	58.58	20.72	14.92	13.06
VDR+RXR+RAR		49.76	17.87	14.10	12.37
VDR+RXR+RAR	+AM580	42.18	16.00	13.75	12.21
VDR+RXR+RAR	+Calcitriol	62.88	19.65	15.64	13.30
VDR+RXR+RAR	+LG268	45.59	16.24	15.61	13.53
VDR+RXR+RAR	+AM580 +LG268	43.22	16.78	13.54	12.51
VDR+RXR+RAR	+LG268 +Calcitriol	54.97	18.38	17.06	14.93
VDR+RXR+RAR	+AM580 +Calcitriol	52.10	20.61	15.94	13.24

2. táblázat: χ^2 ("goodness of fit") értékek különböző illesztési modellek alkalmazásával az átalunk mért minták esetében

5.2. 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 (3). Amennyiben a sejteket 10⁻⁷ M koncentrációjú AM580 liganddal kezeltük, a lassú populáció aránya 34%-ra növekedett, míg a lassú populáció diffúziós állandója (D_2) csökkent, mely a kromatinhoz történő erősebb kötődés, a kromatinhoz kötött állapot meghosszabbodásának következménye lehet (*22., 23. ábra*). Fentiekből arra következtethetünk, hogy az RAR ligandkötése önmagában olyan konformációváltozást idéz elő, mely fokozza annak kromatinkötő képességét.



22. ábra EGFP-RAR lassú populációjának aránya (ρ_2) box-and-whiskers plot-on és eloszlásdiagramon ábrázolva. A sejteket 100 nM koncentrációjú RAR agonistával kezeltük (+AM580) és/vagy teljes hosszúságú mCherry-RXR-rel (+RXR), vagy ennek ligand-kötő doménjével kotranszfektáltuk. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. A ρ_2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ns, nem szignifikáns.

A mérések 40, 37, 30, 25, 25, 26 sejten történtek az RAR, +AM580, +RXR, +RXR+AM580, +RXR-LBD, +RXR-LBD+AM580 esetében.

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 (*22., 23. ábra*), ez a fokozott heterodimerizációra, valamint fokozott kromatinkötésre utal. Western-blot vizsgálataink alapján a transzfektált RXR mennyisége körülbelül 1,2-szerese volt az endogén RXR mennyiségének. AM580 ligandkezelés additív módon növelte a lassú populáció arányát.

A gyors populáció – mely a szabadon diffundáló, illetve kromatinhoz kevésbé kötődő magreceptorokat reprezentálja - diffúziós állandója (D_I) érdemben nem változott ligandkezelés vagy agonista ligand hozzáadásának hatására.

Az RAR dinamkájában bekövetkező változásokat a 22/B. ábra foglalja össze: a lassú populáció diffúziós ideje ligandkezelés és heterodimerizáló partner hatására megnyúlt, míg aránya növekedett (ezt a görbe alatti terület írja le).



23. ábra EGFP-RAR gyors (A) és lassú populációjának (B), ezek arányával súlyozott átlagos diffúziós állandói box-and-whiskers plot-on ábrázolva. A sejteket 100 nM koncentrációjú RAR agonistával kezeltük (+AM580) és/vagy teljes hosszúságú mCherry-RXR-rel (+RXR), vagy ennek ligand-kötő doménjével kotranszfektáltuk. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. A diffúziós időket F-próbával hasonlítottuk össze. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ns, nem szignifikáns. A mérések 40, 37, 30, 25, 25, 26 sejten történtek az RAR, +AM580, +RXR, +RXR+AM580, +RXR-LBD, +RXR-LBD, +RXR-LBD, +AM580 esetében.</p>

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 elő (22. ábra). Ebből következik, hogy az RAR RXR-rel történő dimerizációja csak akkor fokozza a komplex kromatinkötését, ha az RXR is rendelkezik DNS-kötő képességgel.

Mivel a magreceptorok kifejeződése nem egyforma különböző szövetekben, vizsgálatainkat HeLa sejtekben is elvégeztük. A Human Protein Atlas (114) adatai szerint az endogén RAR/RXR és VDR/RXR aránya 4-5-ször alacsonyabb mint HEK293 esetében. Ennek ellenére HeLa sejtekben is hasonló tendenciát tapasztaltunk: ligandkezelés és a heterodimerizáló partner ko-transzfekciója emelte a lassú popouláció arányát *(24. ábra)*



24. ábra EGFP-RAR lassú populációjának aránya HEK293 és HeLa sejteken vizsgálva heterodimerizáló partner (+RXR) és agonsita ligand (+AM580) hozzáadását követően. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentileket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg A ρ2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. ***, p<0,001</p>

A molekuláris fényesség (*F/N*) a komplexben együtt mozgó fluorofórok számával egyenesen arányos, magas értéke aggregációra utalhat. Az egyes minták molekuláris fényességét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy RXR ko-transzfekció és ligandkezelés hatására sem növekedett az EGFP-RAR molekuláris fényessége (*25. ábra*), ezáltal a komplexben együtt diffundáló RAR molekulák száma.

Az EGFP-RAR F/N értéke a monomer EGFP-hez képest alacsonyabbnak adódott, ami nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy az EGFP-RAR-ben található linker peptid, az RAR vagy az EGFP-RAR-rel kölcsönható egyéb fehérjék csökkentik az EGFP-RAR kvantumhatásfokát.



25. ábra EGFP-RAR molekuláris fényességének értékei különböző kezeléseket követően. Az első két oszlopban a monomer és dimer EGFP fényessége is feltüntetésre került. Az F/N értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. ***, p<0,001. A mérések 72, 65, 40, 37, 30, 25, 25, 26 sejten történtek az 1xEGFP, 2xEGFP, RAR, +AM580, +RXR, +RXR+AM580, +RXR-LBD, +RXR-LBD+AM580 esetében.

5.3. 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 (*26. ábra*), ahogy ezt korábban munkacsoportunk, illetve egyéb kutatócsoportok is kimutatták (4,116,117).



26. ábra HEK293 sejtek EGFP-VDR-rel és mCherry RXR-rel traszfektálva. Reprezentatív hamis-színezésű konfokális képek (a képek mérete 71x71 μm). Kalcitriol és RXR kotranszfekció hatására a VDR a sejtmagban halmozódik fel. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. Az arányokat t-próbával hasonlítottuk össze. *, p <0,05; ***, p <0,001; ns, nem szignifikáns. A mérések 49, 39, 46, 40 sejten történtek a VDR, +CALC, +RXR, +RXR+CALC esetében.

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 vagy mCherry-RXR kotraszfekció 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 (27., 28. *ábra*), ami a kromatinkötés megnövekedett időtartamára utal.



EGFP-VDR

27. ábra EGFP-VDR lassú populációjának aránya (ρ2) box-and-whiskers plot-on ábrázolva. A sejteket 100 nM koncentrációjú VDR agonistával kezeltük (+CALC) és/vagy teljes hosszúságú mCherry-RXR-rel (+RXR) kotranszfektáltuk. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. A ρ2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; ***, p<0,001. A mérések 49, 39, 46, 40 sejten történtek a VDR, +CALC, +RXR, +RXR+CALC esetében.</p>



28. ábra EGFP-VDR gyors és lassú populációjának, ezek arányával súlyozott átlagos diffúziós állandói box-and-whiskers plot-on ábrázolva. A sejteket 100 nM koncentrációjú VDR agonistával kezeltük (+CALC) és/vagy teljes hosszúságú mCherry-RXR-rel (+RXR), vagy ennek ligand-kötő doménjével kotranszfektáltuk. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. A diffúziós időket F-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; ***, p<0,001; ns, nem szignifikáns. A mérések 49, 39, 46, 40 sejten történtek a VDR, +CALC, +RXR, +RXR+CALC esetében.</p>

Hasonló eredményeket kaptunk, amennyiben az EGFP-VDR-t Caco-2 kolorectalis karcinóma sejtvonalba transzfektálva vizsgáltuk, melyek a bél mukóza sejtekhez hasonlóan D-vitamin hatására részt vesznek a kalcium transzportjában. A Human Protein Atlas adatai alapján az endogén VDR és RXR expressziója a Caco-2 sejtekben magasabb a HEK293 sejtekhez viszonyítva.



29. ábra EGFP-VDR lassú populációjának aránya HEK293 és Caco-2 sejteken vizsgálva heterodimerizáló partner (+RXR) és agonsita ligand (+CALC) hozzáadását követően. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg A ρ₂ értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p < 0,001; ns, nem szignifikáns.</p>

5.4. AZ RAR ÉS VDR LIGAND-MEDIÁLT KOMPETÍCIÓJA

Munkacsoportunkban korábban magi transzlokációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy különböző magreceptorok versengenek az RXR kötődéséért (4). Ligand hiányában az RAR affinitása magasabb volt az RXR-hez mint a VDR-é, ligand jelenlétében azonban mindig a ligandkötött receptor dominált az RXR kötésében.

Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a fehérje-fehérje kölcsönhatások szintjén az RXR kötéséért fent leírt kompetíció megjelenik-e a DNS-kötés szintjén is RAR és VDR között.

Ennek megállapításához mindhárom, különböző fluoreszcens fehérjével megjelölt magreceptort (BFP-RXR, EGFP-RAR mCherry-VDR vagy BFP-RXR, EGFP-VDR mCherry-RAR) ko-expresszáltattuk HEK293 sejtekben. A ko-transzfekció megkönnyítése céljából a munkacsoportunkban korábban létrehozott, BFP-RXR-t konstitutívan kifejező HEK293 sejtekkel dolgoztunk. Az EGFP előnyös fotofizikai tulajdonságai miatt az FCS mérés mindig EGFP-vel jelölt magreceptorral történt.



30. ábra Reprezentatív hamis-színezésű konfokális képek EGFP-VDR, mCherry-RAR ko-transzfekciójával BFP-RXR-t konstitutívan kifejező HEK293 sejtekben (a képek mérete 41x41 μm)

Kompetíciós FCS vizsgálatainkhoz olyan sejteket választottunk, melyekben a magreceptorok expressziós aránya hasonló volt egymáshoz (arányuk 0,75 és 1,25 közé esett).

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom magreceptor jelenléte esetén az RAR lassú populációjának aránya kissé alacsonyabb volt ($\rho_2 \sim 0.32$; *31. ábra 1. oszlop*), mint csak RAR és RXR jelenlétében ($\rho_2 \sim 0.38$; *22. ábra 3. oszlop*). 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 (27. ábra 2. oszlop), és ugyanezt az eredményt kaptuk mindhárom magreceptor együttes jelenléte esetén is (32. ábra 1. oszlop).



31. ábra Az EGFP-RAR lassú populációjának aránya mCherry-VDR-rel ko-expresszálva TagBFP-RXR-t kifejező HEK293 sejtekben. A sejtek 100 nM koncentrációjú AM580-al, LG268-al, kalcitriollal, vagy ezek kombinációjával voltak kezelve. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg A ρ₂ értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, nem szignifikáns. A mérések 74, 55, 68, 25, 69, 32, 29 sejten történtek a "ligand nélkül", +AM580, +CALC, +AM+CALC, +LG268, +AM+LG, +CALC+LG esetében.

AM580 ligand hozzáadására nem tapasztaltunk szignifikáns változást az RAR lassú populációjának arányában, míg kalcitriol hatására a lassú populáció aránya kissé csökkent *(31. ábra 2-3 oszlop)*. AM580 és kalcitriol együttes alkalmazása esetén nem tapasztaltunk érdemi változást a liganddal nem kezelt mintához képest *(31. ábra 4 oszlop)*.

A VDR lassú populációja kalcitriol hatására jelentősen emelkedett (*32. ábra 3. oszlop*), míg AM580 hatására mérsékelten csökkent (*32. ábra 2. oszlop*). AM580 és kalcitriol együttes alkalmazásakor a lassú populáció aránya a két külön-külön végzett kezelés értéke közé esett (*32. ábra 4. oszlop*).

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



 32. ábra Az EGFP-VDR lassú populációjának aránya mCherry-RAR-rel ko-expresszálva TagBFP-RXR-t kifejező HEK293 sejtekben. A sejtek 100 nM koncentrációjú AM580-al, LG268-al, kalcitriollal, vagy ezek kombinációjával voltak kezelve. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg A p2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, nem szignifikáns. A mérések 91. 84. 79. 52. 91. 46. 38 sejten történtek a "ligand nélkül", +AM580, +CALC, +AM+CALC, +LG268, +AM+LG, +CALC+LG esetében.

Vizsgálatainkat RXR agonista jelenlétében is elvégeztük, mivel munkacsoportunkban kimutattuk, hogy RXR agonista alkalmazásakor fokozódik az RAR/RXR heterodimerizáció mértéke (*41. ábra, 7.1. fejezet*). Ligandkezeléshez az RXR szintetikus szelektív agonistáját, az LG268-at használtuk.

Mindhárom magreceptor jelentlétében 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 (*31. ábra 5. oszlop*), ellentétben a VDR-rel, melynél csökkenést tapasztaltunk (*32. ábra 5. oszlop*); 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 (*31. ábra 6. oszlop*), míg VDR esetében kalcitriol és LG268 dupla kezelés hatására csökkenést tapasztaltunk a kalcitriol kezeléshez képest (*32. ábra 7. oszlop*).

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 (*31. ábra 3. vs. 7. oszlop*); ezzel szemben a VDR lassú komponensének aránya LG268 és AM580 kezelés mellett érdemben nem változott a csak AM580 kezeléshez képest (*32. ábra 2. vs. 6. oszlop*).



33. ábra Az RAR és a VDR ligand-vezérelt kompetíciója a DNS kötéséért. Kalcitriol jelenlétében (fent jobbra) a VDR dominál a DNS kötéséért, míg AM580 (bal fent), vagy mindkét ligand jelenlétében (bal alul) az RAR. LG268 jelenléte az RXR kötődésének kedvez (jobb lent).

Összességében mérési adataink arra utalnak, hogy a ligand-vezérelt kompetíció az RAR és VDR között nem csak 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 (*33. ábra*).

5.5. A VDR ÉS AZ RAR NEM KÉPES EGYMÁSSAL HETERODIMERT KÉPEZNI

Hogy a VDR és RAR közötti potenciális dimerizációt kizárjuk, olyan kísérleteket is végeztünk, melyekben HEK293 sejteket különböző fluorofórokkal megjelölt RAR-rel és VDR-rel kotranszfektáltuk (EGFP-RAR/mCherry-VDR vagy EGFP-VDR/mCherry-RAR), az FCS vizsgálatokat mindig az EGFP-vel jelölt magreceptorral folytattuk. Az RXR minden esetben csak alacsony endogén koncentrációban volt jelen.



34. ábra A lassú populáció aránya HEK293 sejtekben RAR-rel és VDR-rel kotranszfektálva. Az első három oszlop az EGFP-RAR lassú populációjának arányát adja meg önmagában, VDR-rel ko-transzfektálva, valamint VDR-rel ko-transzfektálva és 100 nM AM580-al és 100 nM kalcitriollal kezelve. Az utolsó három oszlop az EGFP-VDR lassú populációjának arányát adja meg önmagában, RAR-rel ko-transzfektálva, valamint RAR-rel ko-transzfektálva és 100 nM AM580-al és 100 nM kalcitriollal kezelve. Az utolsó három oszlop az EGFP-VDR lassú populációjának arányát adja meg önmagában, RAR-rel ko-transzfektálva, valamint RAR-rel ko-transzfektálva és 100 nM AM580-al és 100 nM kalcitriollal kezelve. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg A p2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, nem szignifikáns. A mérések 40, 44,20, 49, 20, 24 sejten történtek a "RAR önmagában", +VDR, +VDR+AM580+CALC, "VDR önmagában", +RAR, +RAR+AM580+CALC esetében.

Ligand hiányában mind az RAR, mind a VDR lassú populációjak aránya kissé alacsonyabb volt, mint önmagában, ez az endogén RXR-ért történő kompetíció eredményének tudható be (*34. ábra 1. vs. 2. oszlop és 4. vs. 5. oszlop*).

Ligandkezelés hatására a két magreceptor között nem alakult ki heterodimerizáció; a ligandindukált fokozott kromatinkötés nem növekedett tovább, amennyiben a másik liganddal aktivált magreceptor volt jelen (*22. ábra 2. oszlop* vs. *34. ábra 3. oszlop* és *27. ábra 2. oszlop* vs. *34. ábra 6. oszlop*). Az RAR VDR feletti dominanciája áttételesen ebben a kísérletsorozatban is megmutatkozott: VDR kotranszfekciója és dupla ligandkezelés növelte az RAR lassú populációjának arányát a kezeletlen RAR-hez képest (*34. ábra 1. vs. 3. oszlop*), míg VDR esetén hasonló körülmények között nem tapasztaltunk szignifikáns változást (*34. ábra 4. vs. 6. oszlop*).

5.6. ALTERNÁLÓ GERJESZTÉS BEVEZETÉSE SPIM MÉRÉSEINK SORÁN (SPIM-ALEX-FRET-FCCS)

SPIM-FRET-FCCS vizsgálataink során a FRET hatásfok kiszámítását először előnézeti képeken végeztük, melyek időben elkülönültek az FCCS analízis során használt képsorozattól. Ez az időbeli különbség nem teljesen összehasonlítható képeket eredményez, többek között a sejtek mozgása és a fotoelhalványítás miatt.

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 (*17. ábra*).

Ezen problémák kiküszöbölésére a SPIM mikroszkópot alkalmassá tettük alternáló gerjesztés (ALEX) használatára (*17. ábra*). 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:

- GC⁺: EGFP-mCherry fúziós fehérjével transzfektált sejtek, ahol a két fluorofórt egy 6 aminosavból álló linker választja el, ezáltal pozitív kontrollként szolgál a FRET és FCCS mérésekhez egyaránt.
- GC⁻: szintén EGFP-mCherry fúziós fehérjével transzfektált sejtek, azonban a két fluorofórt egy hosszú, rigid linker választja el egymástól, így a két fluorofór közötti FRET hatásfok alacsony, azonban együtt diffundálnak, így pozitív FCCS jelet adnak.
- G/C: az EGFP és az mCherry ko-transzfekciójával létrehozott sejtek, ezekben a két flurofór egymástól függetlenül diffundál, így a minta negatív FRET és FCCS kontrollként szolgál.

A fenti sejtekről készített reprezentatív pixelenkénti FRET és FCCS térképek és hisztogramok a 35. ábrán láthatóak.

A GC⁺ sejtekben magas *E* FRET hatásfok és magas *rCCF* keresztkorrelációs amplitúdó észlelhető, ezzel szemben GC⁻ sejtekben a FRET igen alacsony, míg az *rCCF* magas értéket



adott. G/C sejtekben – mivel a két fluorofór diffúziója egymástól független – egyaránt alacsony FRET és *rCCF* értékeket kaptunk.

35. ábra SPIM-ALEX-FRET-FCCS mérés során kapott reprezentatív sejttérképek. A) Kiválasztott sejtek FRET térképei, valamint a pixelek FRET értékeinek eloszlása. B) FCCS térképek, valamint az átlagos autokorrelációs (ACF0, ACF1) és keresztkorrelációs (CCF) görbék. GC⁺: EGFP-mCherry fúziós fehérjével transzfektált sejt, ahol a két fluorofórt egy 6 aminosavból álló linker választja el egymástól, pozitív FRET és FCCS kontroll; GC⁻: EGFP-mCherry fúziós fehérjével transzfektált sejt, ahol a két fluorofórt egy hosszú, rigid linker választja el egymástól, negatív FRET és pozitív FCCS kontroll. G/C: EGFP és mCherry kotranszfekciója, FRET és FCCS negatív kontroll

A rövid donor-akceptor távolság miatt a GC⁺ minta esetén magas FRET hatásfokot mértünk (32,9% az előnézeti képekből számolva, míg 21,4% alternáló gerjesztés alkalmazásával – 36./A ábra). Az előnézeti képekből számított magasabb FRET hatásfok nagy valószínűséggel a rövidebb gerjesztés, ezáltal alacsonyabb mértékű akceptor kiégés következménye. Ezzel szemben a GC⁻ esetében igen alacsony FRET hatásfok értékeket kaptunk (0,8% az előnézeti képekből számolva, valamint -2,5%-ot ALEX-et használva). G/C minta esetében a két fluorofór diffúziója független, mind a FRET hatásfok, mind az *rCCF* értéke alacsonynak adódott. Mint látható, az ALEX alkalmazásával számított *E* értékek szórása magasabb, mint az előnézeti

képekből számolt *E* értékeké. Ez a kisebb jel/zaj arány következménye, azonban javítható több ALEX mérés során keletkezett kép szummázásával (*37. ábra*).

A különböző módszerekkel kapott *rCCF* értékeket a *36. ábra B panelja* szemlélteti. Látható, hogy folyamatos gerjesztéssel még a G/C negatív kontroll esetében is viszonylag magas értéket kapunk, a csatornák közötti átvilágításból adódóan. Amennyiben az átvilágítást szoftveresen korrigáljuk (foly. korrigált), az *rCCF* értéke alacsonyabb lesz.



36. ábra A) A FRET hatásfok sejtenkénti mediánjai box-ploton ábrázolva, előnézeti és ALEX képekből számolva.B) Sejtek rCCF érékei, folyamatos gerjesztés, átvilágítási faktorral szoftveresen korrigált folyamatos gerjesztés és ALEX gerjesztés mellett. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. A) A mérések oszloponként 21, 20, 21, 23, 28, 24 sejten történtek. .B) A mérések oszloponként 28, 25, 70, 24, 23, 89, 36, 26, 73 sejten történtek.

ALEX alkalmazásával a pozitív kontrollok esetén a korrigált *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.



37. ábra ALEX képkockák összeadásának hatása a FRET hatásfok értékére és eloszlására GC⁺ mintákban.

A folyamatos gerjesztéssel jelentkező átvilágítási műtermékek kiküszöbölésére további donor fluorofórral végzett mérések szükségesek, valamint a számítás során számos korrekciós faktort kell alkalmazunk, melyek ALEX alkalmazásával elhagyhatóak. Mivel a gerjesztés időtartama rövidebb, ALEX alkalmazásával a kiégés mértéke is csökkenthető (*38. ábra*).



38. ábra Kiégés mértéke GC⁻ mintán mérve folyamatos és ALEX gerjesztést alkalmazva a zöld és vörös csatornában egyaránt. ALEX gerjesztés a kiégést kb. 55%-al csökkentette. (n_{ALEX}=22, n_{cont}=21)

Mivel az rCCF értéke kismértékben függ a mikroszkóp napi beállításától, a magreceptor mintákkal végzett kísérleteink során ezek értékét mindig az aktuális napon mért GC^+ minta értékéhez normalizáltuk.



39. ábra Sejtek átlagos E értékei az rCCF függvényében ábrázolva ALEX gerjesztést használva. A kétdimenziós ábrázolás használatával egyértelműen elkülöníthetőek a magas FRET-magas rCCF értékű (GC⁺), alacsony FRET-magas rCCF értékű (GC) és alacsony FRET-alacsony rCCF (G/C) értékű populációk.

Mivel az alternáló gerjesztés során a FRET és FCCS mérések időben egymástól nem különülnek el, lehetőségünk van az *E* és *rCCF* paramétert közös koordináta rendszerben ábrázolni, ezáltal egyszerre kvantifikálható a molekuláris távolság és a ko-diffúzió mértéke. A 39. ábrán láthatóan jól elkülönülnek a kontroll minták populációi. FRET vagy FCCS külön-külön történő alkalmazásával ezek a populációk nem különíthetőek el megbízhatóan.

5.7. MAGRECEPTOROK DIMERIZÁCIÓJÁNAK ÉS KROMATIN KÖTÉSÉNEK EGYIDEJŰ VIZSGÁLAT SPIM-ALEX-FRET-FCCS ALKALMAZÁSÁVAL

Az új módszer használhatóságát először EGFP-vel és mCherry-vel megjelölt magreceptorokon teszteltük HeLa sejtekben. SPIM-ALEX-FRET-FCCS használatával egyidejűleg mérhetjük a sejt minden egyes pontján a két magreceptor közötti dimerizáció mértékét és információt kaphatunk a magreceptorok és magreceptor komplexek diffúziós paramétereiről is (*41. ábra*).



40. ábra Reprezentatív FRET és FCCS sejttérképek SPIM-ALEX-FRET-FCCS alkalmazásával. Felső panel: FRET hatásfok térképek és a FRET hatásfokok eloszlása EGFP-RAR és mCherry-RXR magreceptorok (RAR/RXR), valamint ezek ligand-kötő-doménjei (RARL/RXRL) esetében, továbbá 100 nM AM580 ligand hozzáadását követően (+AM580). Alsó panel: a fenti sejtek rCCF térképei, valamint átlagos korrelációs és keresztkorrelációs függvényei. A két autokorrelációs függvényt (ACF0, ACF1) két komponensű normál diffúziós, míg a kereszkorrelációs függvényt (CCF) egy komponensű normál diffúziós modellel illesztettük.

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



41. ábra SPIM-ALEX-FRET-FCCS mérés során kapott FRET hatásfok magreceptor mintákon.
 RAR/RXR: teljes hosszúságú EGFP-RAR és mCherry-RXR kotranszfekciója, RARL/RXRL EGFP-RAR-LBD és mCherry-RXR-LBD kotranszfekciója A kezelések100 nM AM580-al és 100 nM LG268-al történtek. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentiliseket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg. A ρ2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; A mérések 27, 26, 17, 42 sejten történtek az RAR/RXR kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében, míg 28, 33, 23, 24 sejten az RARL/RXRL kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében

Az *E* értékével ellentétben a magreceptorok közötti komobilitás (*rCCF*) már ligand hiányában is magas volt (*42. ábra*). AM580 hozzáadásakor az rCCF értékében markáns, míg LG268 esetében kisebb növekedést tapasztalunk. Dupla ligandkezelés hatására szignfikáns 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 kétkomponensű normál diffúziós modellel illesztettük. A gyors populáció diffúziós állandója (D_1) 4-9 μ m²/s-nak, míg a lassú populációé (D_2) 0,2 μ m²/s-nak adódott. Ezek az eredmények korábbi konfokális FCS vizsgálatainkkal megegyeznek (*23. ábra*). A keresztkorrelációs függvényeket egykomponensű normál diffúziós modellel illesztettük, a sejtek diffúziós állandója 0,3 μm²/s körül alakult, mely a dimer kromatinkötésére utal (*43.ábra*).



42. ábra SPIM-ALEX-FRET-FCCS mérés során kapott keresztkorrelációs amplitúdó magreceptor mintákon.
 RAR/RXR: teljes hosszúságú EGFP-RAR és mCherry-RXR kotranszfekciója, RARL/RXRL EGFP-RAR-LBD és mCherry-RXR-LBD kotranszfekciója A kezelések100 nM AM580-al és 100 nM LG268-al történtek. A box-ok a 25. és 75., míg a whisker-ek a 10. és 90. percentileket jelölik. A box-ban látható vízszintes vonal a minta mediánját, míg a kereszt a minta átlagát adja meg A ρ2 értékeit kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; A mérések 27, 26, 17, 42 sejten történtek az RAR/RXR kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében, míg 28, 33, 23, 24 sejten az RARL/RXRL kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében

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 (*44. ábra*). RXR esetében azonban a lassú komponens aránya 23%-ról AM580 hozzáadásakor 29%-ra, míg LG268 hozzáadására 35%-ra növekedett. Kísérleteinkben az akceptor-donor arány (az mCherry-RXR/EGFP-RAR aránya) 1 és 1,5 között volt, tehát több mCherry-RXR volt jelen, mint EGFP-RAR. Ez azt eredményezi, hogy az mCherry-RXR molekulák egy része nem kötődik EGFP-vel jelölt RAR-hez. RXR esetében a ligand hatására bekövetkező mobilitás csökkenés annak köszönhető, hogy az RXR fluorofórral nem jelölt, endogén magreceptorokkal dimerizálódik. 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 nem csak az EGFP-vel jelölt RAR-rel, hanem más jelöletlen, endogén magreceptorokkal is dimerizálódik és így kötődik a kromatinhoz.



43. ábra SPIM-ALEX-FRET-FCCS mérés során kapott diffúziós állandók magreceptor mintákon. RAR/RXR: teljes hosszúságú EGFP-RAR és mCherry-RXR kotranszfekciója, RARL/RXRL EGFP-RAR-LBD és mCherry-RXR-LBD kotranszfekciója.. ACF0: zöld csatorna, ACF1: vörös csatorna, CCF: keresztkorrelációs csatorna. A kezelések100 nM AM580-al és 100 nM LG268-al történtek. A mérések 27, 26, 17, 42 sejten történtek az RAR/RXR kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében, míg 28, 33, 23, 24 sejten az RARL/RXRL kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében

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.

5.8. MAGRECEPTOROK LIGAND-KÖTŐ 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.



44. ábra SPIM-ALEX-FRET-FCCS mérés során kapott lassú komponens arányok magreceptor mintákon. RAR/RXR: teljes hosszúságú EGFP-RAR és mCherry-RXR kotranszfekciója, RARL/RXRL EGFP-RAR-LBD és mCherry-RXR-LBD kotranszfekciója. ACF0: zöld csatorna, ACF1: vörös csatorna, CCF: keresztkorrelációs csatorna. A kezelések100 nM AM580-al és 100 nM LG268-al történtek. A mérések 27, 26, 17, 42 sejten történtek az RAR/RXR kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében, míg 28, 33, 23, 24 sejten az RARL/RXRL kontroll, +AM580, +LG268, és dupla kezelés esetében

AM580 kezelés hatására a FRET hatásfok közel kétszeresére nőtt, azonban az *rCCF* nem növekedett szignifikáns mértékben, ami arra utal, hogy a FRET hatásfok növekedését részben a két fluorofór 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 hatásfok 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.
6. MEGBESZÉLÉS

6.1. FLUORESZCENSEN JELÖLT MAGRECEPTOROK ELOSZLÁSÁNAK ÉS DIFFÚZIÓS PARAMÉTEREINEK MEGHATÁROZÁSA HEK293 SEJTEKBEN

A magreceptorok működését leíró statikus molekuláris kapcsoló modellt a területen zajló intenzív kutatások eredményeképpen egyre dinamikusabb kép kezdi felváltani. Az eredeti modell értelmében a magreceptorok a kromatinon található válaszadó elemekhez statikusan kötődnek, ligand hatására elsősorban koregulátorcsere történik, mely felelős a biológiai válaszért. Biofizikai vizsgálatok kimutatták, hogy a magreceptorok sokkal dinamikusabbak és több különböző mobilitású populációjuk fordul elő a sejtekben (2,3,72–74,118–120).

Munkacsoportunkban végzett FCS vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy agonista ligand hatására koaktivátor-dependens módon fokozódik az RAR és RXR magreceptorok DNS-kötődése (2,3). Bebizonyítottuk továbbá azt is, hogy néhány vizsgált magreceptor – RAR, VDR és PPAR γ – esetében fehérje-fehérje szinten kompetíció figyelhető meg az RXR kötéséért. Ligand hiányában (vagy mindkét receptor agonistája jelenlétében) az RAR mutatta a legerősebb affinitást az RXR-hez, melyet a PPAR γ és végül a VDR követett; agonista ligand jelenlétében mindig a liganddal aktivált receptor mutatta a legerősebb affinitást az RXR-hez (4).

A fenti kompetíció felelős lehet néhány magreceptort célzó terápia mellékhatásaiért. Kimutatták, hogy a PPAR agonista thiazolidinedione kezelés fokozza a csontritkulás valószínűségét, mely D-vitamin adjuváns adásával mérsékelhető (121). Egyéb kutatócsoportok bebizonyították, hogy a szintén PPAR agonista rosiglitazon a preosteoblastok adipocita irányú differenciálódását indukálják PPARγ szignalizáción keresztül (122), míg a VDR aktivációja in vitro körülmények között az osteoblast irányú differenciálódást segítette (123). Fentiek alapján a rosiglitazon mellékhatásai részben magyarázhatóak a PPARγ és VDR között kompetícióval. A rosiglitazon a retinoid szignalizáció befolyásolásával makulaödéma kialakulásához is vezethet (124,125).

Kísérleteink során arra voltunk kíváncsiak, hogy megnyilvánul-e az RXR-ért folytatott kompetíció a receptorok kromatinhoz való kötődésében is.

FCS vizsgálataink kimutatták, hogy az RAR kromatinhoz és RXR-hez való affinitása is magasabb, mint a VDR esetében. Ligand hiányában az RAR lassú populációjának aránya kb. 23% volt, míg a VDR esetében csak 15%-ot mértünk. Az RAR lassú populációjának aránya

ligandkezelés hatására növekedett, míg VDR esetében alig változott. Fentiek alapján elmondható, hogy mind az RAR, mind pedig a VDR dimerizálódik az RXR-rel ligand hiányában, de RAR esetében erősebb kötődés észlelhető. Korábban fehérje szintű kompetíciós vizsgálataink is hasonló eredményre jutottak (4).

FCS eredményeink arra utalnak, hogy az RXR-rel történő dimerizáció az RAR kromatinkötő képességét is fokozza. RAR esetében a ligandkezelés önmagában fokozott kromatinkötődéshez vezetett, VDR esetében az agonista ligand hozzáadása mellett ehhez szükség volt az RXR koexpressziójára is.

Megvizsgáltuk az általunk mért eredmények sejtvonal specificitását is: az RAR viselkedését HeLa méhnyakrák sejtvonalon, míg a VDR viselkedését Caco-2 kolorektális adenocarcinoma sejtvonalban mértük fel. A Human Protein Atlas adatai alapján a Caco-2 sejtek nagyjából kétszer annyi VDR-t expresszálnak mint a HEK293 sejtek, nagy valószínűséggel a VDR válaszadó elemeit is nagyobb számban tartalmazzák. FCS vizsgálataink nem mutattak szignifikáns különbséget a magreceptorok viselkedésében egyik sejtvonalon sem, eredményeink több sejttípusra is általánosíthatóak.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy agonista ligand hozzáadása, vagy az RXR-rel történő dimerizáció milyen mechanizmussal fokozza az RAR kromatin kötését. Az RXR ligandkötő doménjének ko-transzfekcióját követően az RAR lassú populációjának aránya nem növekedett még ligand jelenlétében sem, ezáltal arra következtethetünk, hogy az RXR DNS-kötő doménje is szükséges az RAR/RXR dimer stabil kromatinkötéséhez.

Az RAR és a VDR közötti kompetíció vizsgálatához különböző fluorofórokkal megjelölt RAR, VDR és RXR magreceptorokat ko-transzfektáltunk, majd az EGFP-vel megjelölt magreceptor lassú populációjának arányát meghatározva következtettünk a kromatin-kötött magreceptor hányadra. Korábbi vizsgálataink során a fehérje-fehérje kölcsönhatás szintjén az RAR/RXR heterodimer aránya csökkent VDR jelenlétében (4). Ezt megfordítva a VDR kismértékű DNSkötése – mely csak kismértékben fokozódott RXR jelenlétében – nem változott RAR jelenlétében, míg a korábbi mérések szerint a VDR/RXR dimer mennyisége jelentősen csökkent. Fenti eredményeink arra utalnak, hogy az RAR és VDR közötti kompetíció nem csak fehérje-fehérje szinten, hanem a receptorok kromatinkötő képességének mértékében is megnyilvánul. Míg azonban az RAR/RXR dimer ligand hiányában is jelentős mértékben kötődik a DNS-hez, addig a VDR/RXR dimer csak kismértékben, ezért a DNS-kötésének mértéke alig változik a kompetáló magreceptor jelenlétében. RAR agonista kezelés hatására az RAR lassú komponensének aránya minimálisan növekedett, míg VDR esetében csökkenés volt észlelhető. VDR agonista kezelés hatására a VDR lassú komponensének aránya jelentősen növekedett, az RAR lassú populációjának arányát csökkentette. Mindkét ligand együttes alkalmazása RAR esetében ugyanakkora hatást váltott ki, mintha az RAR ligandját egyedül alkalmaztuk volna, VDR esetében a kezeletlen populációhoz képest ugyan növekedést észleltünk, de a hatás elmaradt a szimpla VDR agonista kezeléshez képest. RXR agonista kezelés tovább növelte az RAR AM580 ligand indukálta DNS kötését, valamint kompenzálta a kalcitriol negatív hatását, míg VDR esetében csökkentette a kalcitriol kromatin-kötés fokozó hatását, mely arra utal, hogy LG268 hatására az RXR az RAR-rel történő dimerizációt preferálja.

Kompetíciós vizsgálatainkat HEK293 sejtekben végeztük el, egyéb sejttípusokban a három vizsgált magreceptor aránya nagyban különbözhet. Azokban az esetekben, ahol az RXR jóval nagyobb mennyiségben van jelen, mint a két kompetáló magreceptor, nem alakul ki kompetíció az RXR-ért. A magreceptorok közötti kötődés nagy valószínűséggel sejttípustól független, azonban a magreceptorok különböző sejttípusokban észlelhető eltérő expressziós szintje, a koregulátorok és a rendelkezésre álló válaszadó elemek száma befolyásolhatják a magreceptorok DNS-kötését. Fentieket figyelembe véve kompetíciós méréseink során a fluorofórral jelölt magreceptorok arányát úgy állítottuk be, hogy expressziós szintjük nagyjából azonos legyen, ezáltal lehetőséget adva a kompetícióra.

Mint ahogy azt korábban Dr. Nagy László kutatócsoportja kimutatta, a magreceptorok közötti kompetíció nem csak azonnali hatásokban mutatkozik meg, hanem jelentősége van a sejt sorsának meghatározásában is. Differenciálatlan embrionális őssejtek reténsavval történő kezelése csökkentette a LXR által indukált gének expresszióját, míg fokozta az RAR/RXR célgének átírását (126). Az ilyen RXR dimerizációs preferenciáit módosító ligand-indukált változás a sejtek differenciációja során kritikus lehet.

A magreceptorok RXR-ért és a DNS-kötésért folytatott, ligand-vezérelt kompetíciója legalábbis részben megmagyarázza a magreceptorokra irányuló terápiák mellékhatásait, melyek a terápiák időszakos alkalmazásával és más magreceptor ligandokkal történő kombinációjával esetleg kiküszöbölhetővé válhatnak.

6.2. ALTERNÁLÓ GERJESZTÉS BEVEZETÉSE SZELEKTÍV SÍK- MEGVILÁGÍTÁSÚ Mikroszkópia során (SPIM-ALEX-FRET-FCCS)

Hagyományos konfokális mikroszkóppal végzett FCS méréseink során az adatgyűjtés egy adott sejt egy pontjából történt. Ezzel a módszerrel sajnos nem kapunk időben átfedő információt a sejt különböző kompartmentjeiben történő folyamatokról, illetve az egy ponton történő gerjesztés a fluorofór gyors kiégését is eredményezi. Fentiek miatt a konfokális mikroszkópia során végzett FRET és FCS mérések közvetlenül nem voltak összehasonlíthatóak.

Sikerült egy olyan módszert kifejlesztenünk, mellyel lehetővé vált a molekulák közelségének és ko-mobilitásának egyidőben történő vizsgálata. Szelektív sík-megvilágítású mikroszkópia alkalmazásával – mivel a gerjesztés a mintának csak egy síkjában történik - jelentősen csökkenthető a fluoreszcens molekulák kiégése, valamint egyszerre kaphatunk adatokat sejt minden egyes pontjáról (127).

Mikroszkópos módszerünket alternáló gerjesztés (ALEX) bevezetésével fejlesztettük tovább. Korábban ALEX módszert csak konfokális FCS során alkalmaztak (128–130). A folyamatos gerjesztéssel szemben az ALEX-nek számos előnye van: csökkenti a fluorofórok – esetünkben főként a vörös fluoreszcens fehérje – kiégését, illetve kiküszöböli a csatornák közötti átvilágítást, ezáltal kevesebb szoftveres korrekcióra van szükség.

SPIM-ALEX-FRET-FCCS alkalmazásával egyszerre mérhetjük a két molekula ko-diffúzióját (FCCS), valamint a két molekula közötti távolságot (FRET), ezáltal lehetőségünk van a két paramétert közös koordináta rendszerben ábrázolni, így egyszerre kvantifikálható a molekuláris távolság és a ko-diffúzió mértéke. A módszer a fentiek alapján lehetőséget ad a molekulák közelsége és ko-diffúziója alapján különböző szubpopulációk elkülönítésére, melyek a két módszer külön-külön történő alkalmazásával nem választhatóak szét egymástól megbízhatóan.

Módszerünk megbízhatóságát három féle kontroll mintán teszteltük. Először egy EGFPmCherry fúziós fehérjét vizsgáltunk, ahol a két fluorofórt rövid linker választotta el egymástól, ezáltal pozitív kontrollként szolgál a FRET és FCCS mérésekhez egyaránt. Egy olyan EGFPmCherry fúziós fehérjét is megvizsgáltunk, ahol a két fluorofórt egy hosszú, rigid linker választotta el egymástól, így a két fluorofór közötti FRET hatásfok alacsony, azonban együtt diffundálnak, így pozitív FCCS jelet adnak. További vizsgáltunk olyan sejteket is, ahol a két fluorofórt külön-külön transzfektáltuk, így negatív kontrollként szolgáltak. SPIM-ALEX- FRET-FCCS alkalmazásával kapott eredményeinket koordináta rendszerben ábrázolva a három kontroll populáció szignifikánsan elkülönült egymástól.

SPIM-ALEX-FRET-FCCS módszert használva lehetővé vált magreceptorok а dimerizációjának és (ko-)mobilitásának egyidőben történő mérése, valamint a magreceptor populációk diffúziós paramétereinek meghatározása a sejt egy adott síkjában. Eredményeink azt mutatták, hogy a két módszer kombinálásával lehetőségünk volt olyan interakciók megfigyelésére, melyek FRET vagy FCCS külön-külön történő alkalmazásával félrevezetőek lehettek volna: a molekulák között mért alacsony FRET adódhat a két fluorofór nem megfelelő orientációjából, vagy a nagyméretű fehérjék miatt a túl nagy donor-akceptor távolságból; a FRET negatív értéke nem zárja ki a dimerizáció lehetőségét. FCCS alkalmazásával a falsnegatív FRET esetén is következtethetünk a fehérjék ko-mobilitásából azok asszociációjának mértékére.

SPIM-ALEX-FRET-FCCS eredményeink azt sugallják, hogy a magreceptorok mobilitása komplexebb, mint ahogy az eredeti molekuláris kapcsoló modell alapján várnánk. Vizsgálataink kimutatták, hogy az RAR-RXR heterodimerek többsége a kromatinhoz kötődik, AM580 ligandkezelés hatására mind a heterodimerizáció mértéke, mind pedig a kromatinkötés fokozódik.

A teljes hosszúságú magreceptorok és ezek ligand-kötő doménjeinek összehasonlítása alapján elmondható, hogy a kromatinkötés és a dimerizáció szoros pozitív korrelációt mutat: a válaszadó elemekhez való kötődés stabil alapot biztosít a dimerizációhoz, a képződött dimer pedig szorosabban kötődik a kromatinhoz.

Módszerünk alkalmazhatósága nem kérdéses, azonban a későbbiekben további fejlesztését tervezzük. ALEX esetében a rövid mintavételezés miatt a jel-zaj arány (SNR: signal to noise ratio) meglehetősen alacsonynak adódott. Az SNR javítható lenne az erősebb gerjesztési intenzitással, azonban a fluorofórok kiégése – főként vörös fluoreszcens fehérjék esetében – gátat szab a gerjesztési intenzitás növelésének. A vörös csatornában észlelhető fokozott kiégés látszólag alacsonyabb lassú populációs arányt, valamint alacsonyabb FRET hatásfokot eredményez. A vörös fluorofór fotostabilitásának növelésével a gerjesztési intenzitás is növelhető lenne, ezzel javítva a jel-zaj arányt.

Az objektívek numerikus apertúrájának (NA) növelése szintén javíthatja az jel-zaj arányt, mivel nagyobb térszögben detektálhatóak az emittált fotonok. Az NA növelésével azonban az objektív

fókusztávolsága csökken, ami megakadályozza az NA további emelését. Megoldás lehetne a nagyobb átmérőjű frontlencsével rendelkező objektívek alkalmazása.

A módszer időbeli felbontása javítható lenne gyorsabb kamerák alkalmazásával, azonban ez a fejlesztés is a jel-zaj arányt csökkentené. Erre megoldás lehet majd EMCCD és sCMOS detektorok helyett SPAD (single photon avalanche diode) detektorok alkalmazása, mely egyedi fotonok detektálására is képes, jóval magasabb jel-zaj arány mellett.

7. Összefoglalás

A magreceptorok működését leíró viszonylag statikus molekuláris kapcsoló modellt a területen zajló intenzív kutatások eredményeképpen egyre dinamikusabb kép kezdi 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 kiégése 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.

8. SUMMARY

According to the intensive research on the field, the previously outlined molecular switch model being replaced by a more dynamic one.

Our FCS studies showed that there are two distinct populations of nuclear receptor with different diffusion properties are present in the nucleus: a fast population, in which nuclear receptors are bound to the chromatin with lower residence times, these receptors are scanning the DNA for specific response elements, but the stability of chromatin binding is low. Contrary, the receptors in the slow population are bound to the DNA (especially to response elements) with much longer residence times.

In the case of RAR, agonist treatment or RXR cotransfection increased the amount of the slow population which is due to the increased stability of chromatin-binding or increased residence time. In contrast to RAR, the slow population of the VDR only increased in the presence of both agonist and RXR, so the chromatin binding of the VDR stable only in liganded, RXR-bound form. By triple co-transfection of RAR, VDR and RXR, we showed that the competition between RAR and VDR for the binding of RXR is appeared on the level of chromatin-binding, which is at least partly responsible for the side effects of nuclear receptor targeted therapies. Without ligands, the RXR showed higher preference for RAR than VDR. In the presence of ligands, always the liganded receptor dominated. We also showed that RAR and VDR cannot heterodimerize with each other in living cells.

During the second part of my work, we further developed a microscopic method, which is capable of measuring the diffusion properties of molecules and their association at the same time in a plane of the cell. By using SPIM-FRET-FCCS we measured the dimerization a co-mobility of nuclear receptors at the same time. The combination of the two methods, showed interactions between nuclear receptors, that couldn't be seen by just using FRET of FCCS separately. The application of ALEX made our method more precise by decreased photobleaching and increased dynamic range.

The results of this dissertation can help in the search for nuclear receptor-based therapies and raise attention to the importance of competition between nuclear receptors. The new microscopic method can be used in the investigation of other molecular systems as well.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. Trends in biochemical sciences. 2004 Jun;29(6):317–24.
- Brazda P, Krieger J, Daniel B, Jonas D, Szekeres T, Langowski J, et al. Ligand Binding Shifts Highly Mobile Retinoid X Receptor to the Chromatin-Bound State in a Coactivator-Dependent Manner, as Revealed by Single-Cell Imaging. Mol Cell Biol. 2014 Apr;34(7):1234–45.
- 3. Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Toth K, Vamosi G*, Nagy L*, et al. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. Journal of cell science. 2011 Nov 1;124(Pt 21):3631–42.
- 4. Fadel L, Rehó B, Volkó J, Bojcsuk D, Kolostyák Z, Nagy G, et al. Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. J Biol Chem. 2020 Jul 17;295(29):10045–61.
- 5. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304–51.
- 6. Salzberg SL. Open questions: How many genes do we have? BMC Biology. 2018 Aug 20;16(1):94.
- 7. Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. Perspect Biol Med. 1962;6:47-59.
- 8. Jensen EV, Desombre ER, Hurst DJ, Kawashima T, Jungblut PW. Estrogen-receptor interactions in target tissues. Arch Anat Microsc Morphol Exp. 1967;56(3):547–69.
- 9. Tata JR. One hundred years of hormones. EMBO Rep. 2005 Jun;6(6):490-6.
- 10. Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. Genome Res. 2004 Apr;14(4):580–90.
- 11. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. Cell. 1995 Dec 15;83(6):835–9.
- 12. Shi Y. Orphan Nuclear Receptors in Drug Discovery. Drug Discov Today. 2007 Jun;12(11–12):440–5.
- 13. Nanduri R, Bhutani I, Somavarapu AK, Mahajan S, Parkesh R, Gupta P. ONRLDB manually curated database of experimentally validated ligands for orphan nuclear receptors: insights into new drug discovery. Database (Oxford). 2015 Nov 4;2015:bav112.
- 14. Mullican SE, DiSpirito JR, Lazar MA. The Orphan Nuclear Receptors at Their 25th Year Reunion. J Mol Endocrinol. 2013 Dec;51(3):T115–40.
- 15. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. Perez DM, editor. Pharmacol Rev. 2013 Apr 1;65(2):710–78.

- 16. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. Annu Rev Physiol. 2010;72:247–72.
- 17. Monneret C. What is an endocrine disruptor? C R Biol. 2017;340(9–10):403–5.
- 18. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. Steroids. 1999 May 1;64(5):310–9.
- Wärnmark A, Treuter E, Wright APH, Gustafsson JÅ. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. Molecular Endocrinology. 2003 Oct 1;17(10):1901–9.
- 20. Hittelman AB, Burakov D, Iñiguez-Lluhí JA, Freedman LP, Garabedian MJ. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. EMBO J. 1999 Oct 1;18(19):5380–8.
- 21. Henriksson A, Almlöf T, Ford J, McEwan IJ, Gustafsson JA, Wright AP. Role of the Ada adaptor complex in gene activation by the glucocorticoid receptor. Mol Cell Biol. 1997 Jun;17(6):3065–73.
- 22. Wärnmark A, Wikström A, Wright AP, Gustafsson JA, Härd T. The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. J Biol Chem. 2001;276(49):45939–44.
- Diezko R, Suske G. Ligand Binding Reduces SUMOylation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) Activation Function 1 (AF1) Domain. PLOS ONE. 2013 jún;8(6):e66947.
- 24. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of Activation Function-1 Regulates Proteasome-Dependent Nuclear Mobility and E6-Associated Protein Ubiquitin Ligase Recruitment to the Estrogen Receptor β. Molecular Endocrinology. 2008 Feb 1;22(2):317–30.
- 25. Gronemeyer H, Miturski R. Molecular mechanisms of retinoid action. Cellular & molecular biology letters. 2001 Feb 1;6:3–52.
- 26. Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. J Biol Chem. 2003;278(1):104–10.
- Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. J Cell Sci. 2010 Apr 15;123(Pt 8):1253–61.
- 28. Shaffer PL, McDonnell DP, Gewirth DT. Characterization of transcriptional activation and DNA-binding functions in the hinge region of the vitamin D receptor. Biochemistry. 2005 Feb 22;44(7):2678–85.
- 29. Liu MH, Li J, Shen P, Husna B, Tai ES, Yong EL. A Natural Polymorphism in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α Hinge Region Attenuates Transcription due

to Defective Release of Nuclear Receptor Corepressor from Chromatin. Mol Endocrinol. 2008 May;22(5):1078–92.

- 30. Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, et al. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. J Biol Chem. 2001 May 25;276(21):18375–83.
- Pourcet B, Pineda-Torra I, Derudas B, Staels B, Glineur C. SUMOylation of Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Inhibits Its Trans-activity through the Recruitment of the Nuclear Corepressor NCoR. J Biol Chem. 2010 Feb 26;285(9):5983–92.
- 32. Delmotte MH, Tahayato A, Formstecher P, Lefebvre P. Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. J Biol Chem. 1999;274(53):38225–31.
- 33. Weatherman RV, Fletterick RJ, Scanlan TS. Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains. Annu Rev Biochem. 1999 Jun;68(1):559–81.
- 34. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. Nature. 1995 Jun 1;375(6530):377–82.
- 35. Jin L, Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Oct 30;62(13):1218–26.
- 36. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. Nature. 1997 Jun 12;387(6634):733–6.
- 37. Patel SR, Skafar DF. Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. Mol Cell Endocrinol. 2015;418 Pt 3:298–305.
- 38. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. Cell. 1999 Apr 16;97(2):161–3.
- Nedumaran B, Kim GS, Hong S, Yoon YS, Kim YH, Lee CH, et al. Orphan Nuclear Receptor DAX-1 Acts as a Novel Corepressor of Liver X Receptor α and Inhibits Hepatic Lipogenesis. J Biol Chem. 2010 Mar 19;285(12):9221–32.
- 40. Johansson L, Båvner A, Thomsen JS, Färnegårdh M, Gustafsson JÅ, Treuter E. The Orphan Nuclear Receptor SHP Utilizes Conserved LXXLL-Related Motifs for Interactions with Ligand-Activated Estrogen Receptors. Mol Cell Biol. 2000 Feb;20(4):1124–33.
- 41. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. Nature. 1987 Dec;330(6149):624–9.
- 42. A Z, Cd K, Ad V, T K, Li S. Expression of Retinoic Acid Receptor (RAR) α Protein in the Synovial Membrane from Patients with Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. Int J Biomed Sci. 2007 Mar;3(1):46–9.

- 43. di Masi A, Leboffe L, De Marinis E, Pagano F, Cicconi L, Rochette-Egly C, et al. Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. Molecular Aspects of Medicine. 2015 Feb 1;41:1–115.
- 44. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Retinoic Acids in the Treatment of Most Lethal Solid Cancers. J Clin Med. 2020 Jan 28;9(2):360.
- 45. di Martino O, Welch JS. Retinoic Acid Receptors in Acute Myeloid Leukemia Therapy. Cancers (Basel). 2019 Dec 1;11(12):1915.
- 46. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? Archives of Biochemistry and Biophysics. 2012 Jul 1;523(1):123–33.
- 47. Zmijewski MA, Carlberg C. Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? Experimental Dermatology. 2020;29(9):876–84.
- 48. Adorini L, Daniel KC, Penna G. Vitamin D Receptor Agonists, Cancer and the Immune System: An Intricate Relationship. Current Topics in Medicinal Chemistry. 6(12):1297–301.
- 49. Fleet JC, Schoch RD. Molecular Mechanisms for Regulation of Intestinal Calcium Absorption by Vitamin D and Other Factors. Crit Rev Clin Lab Sci. 2010 Aug;47(4):181–95.
- 50. Laplana M, Sánchez-de-la-Torre M, Puig T, Caruz A, Fibla J. Vitamin-D pathway genes and HIV-1 disease progression in injection drug users. Gene. 2014 Jul 15;545(1):163–9.
- 51. Elamir YM, Amir H, Lim S, Rana YP, Lopez CG, Feliciano NV, et al. A randomized pilot study using calcitriol in hospitalized COVID-19 patients. Bone. 2022 Jan;154:116175.
- 52. Rastogi A, Bhansali A, Khare N, Suri V, Yaddanapudi N, Sachdeva N, et al. Short term, high-dose vitamin D supplementation for COVID-19 disease: a randomised, placebocontrolled, study (SHADE study). Postgrad Med J. 2020 Nov 12;postgradmedj-2020-139065.
- 53. Sabbagh EE, El-Sayed M, Elbaz T. Vitamins and minerals: A means for surviving the COVID-19 pandemic or just a myth? The Journal of Infection in Developing Countries. 2022 May 30;16(05):782–6.
- 54. Laplana M, Sánchez-de-la-Torre M, Aguiló A, Casado I, Flores M, Sánchez-Pellicer R, et al. Tagging long-lived individuals through vitamin-D receptor (VDR) haplotypes. Biogerontology. 2010 Aug 1;11(4):437–46.
- Abouzid M, Karazniewicz-Lada M, Glowka F. Genetic Determinants of Vitamin D-Related Disorders; Focus on Vitamin D Receptor. Current Drug Metabolism. 19(12):1042– 52.
- 56. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell. 1995;83(6):841–50.
- 57. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. Genes Dev. 1992 Mar;6(3):329–44.

- 58. Rühl R, Krężel W, de Lera AR. 9-Cis-13,14-dihydroretinoic acid, a new endogenous mammalian ligand of retinoid X receptor and the active ligand of a potential new vitamin A category: vitamin A5. Nutrition Reviews. 2018 Dec 1;76(12):929–41.
- Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, Yamaguchi K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). Int J Oncol. 1998 Jun;12(6):1237– 43.
- 60. Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. Trends Cell Biol. 2004 May;14(5):250–60.
- 61. Val P, Lefrançois-Martinez AM, Veyssière G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl Recept. 2003 Sep 18;1:8.
- 62. Okumura LM, Lesch BJ, Page DC. The Ligand Binding Domain of GCNF Is Not Required for Repression of Pluripotency Genes in Mouse Fetal Ovarian Germ Cells. PLoS One. 2013 Jun 7;8(6):e66062.
- 63. Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R. Structural Determinants of Allosteric Ligand Activation in RXR Heterodimers. Cell. 2004 Feb 6;116(3):417–29.
- 64. Yang Z, Muccio DD, Melo N, Atigadda VR, Renfrow MB. Stability of the Retinoid X Receptor-alpha Homodimer in the Presence and Absence of Rexinoid and Coactivator Peptide [Internet]. bioRxiv; 2020 [cited 2023 Jan 3]. p. 2020.10.21.333849. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.21.333849v1
- 65. Calgaro MR, Neto M de O, Figueira ACM, Santos MAM, Portugal RV, Guzzi CA, et al. Orphan nuclear receptor NGFI-B forms dimers with nonclassical interface. Protein Sci. 2007 Aug;16(8):1762–72.
- 66. Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. Cell. 2004 Feb 20;116(4):511–26.
- 67. Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW. SMRT Derepression by the IκB Kinase α: A Prerequisite to NF-κB Transcription and Survival. Molecular Cell. 2004 Oct 22;16(2):245–55.
- 68. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Nature. 1998 Sep 10;395(6698):137–43.
- 69. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. Genes Dev. 1998;12(21):3343–56.
- 70. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jul;6(7):542–54.
- 71. Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerová J, Dey A, Ozato K, et al. Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning

and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins. Mol Cell Biol. 2004 Jul;24(14):6393-402.

- Jankevics H, Prummer M, Izewska P, Pick H, Leufgen K, Vogel H. Diffusion-Time Distribution Analysis Reveals Characteristic Ligand-Dependent Interaction Patterns of Nuclear Receptors in Living Cells. Biochemistry. 2005 Sep 1;44(35):11676–83.
- 73. van Royen ME, Farla P, Mattern KA, Geverts B, Trapman J, Houtsmuller AB. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to study nuclear protein dynamics in living cells. Methods Mol Biol. 2009;464:363–85.
- 74. van Royen ME, Dinant C, Farla P, Trapman J, Houtsmuller AB. FRAP and FRET methods to study nuclear receptors in living cells. Methods Mol Biol. 2009;505:69–96.
- 75. Gelman L, Feige JN, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. Nucl Recept Signal. 2006 Apr 28;4:e010.
- 76. Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. J Biol Chem. 2005 May 6;280(18):17880–90.
- 77. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. Journal of Cellular and Comparative Physiology. 1962;59(3):223–39.
- 78. Lambert TJ. FPbase: a community-editable fluorescent protein database. Nat Methods. 2019 Apr;16(4):277–8.
- 79. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene. 1992 Feb 15;111(2):229–33.
- 80. Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. Biophysical Journal. 1997 Nov 1;73(5):2782–90.
- 81. Tsien RY. The Green Fluorescent Protein. Annual Review of Biochemistry. 1998;67(1):509-44.
- 82. Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nat Biotechnol. 1999 Oct;17(10):969–73.
- 83. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol. 2004 Dec;22(12):1567–72.
- 84. Bindels DS, Haarbosch L, van Weeren L, Postma M, Wiese KE, Mastop M, et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. Nat Methods. 2017 Jan;14(1):53–6.

- 85. [submitted] Theodorus W.J. Gadella Jr, Laura van Weeren, Jente Stouthamer, Mark A. Hink, Anouk H.G. Wolters, Ben N.G. Giepmans, Sylvain Aumonier, Jérôme Dupuy, Antoine Royant. mScarlet3: a brilliant and fast maturating red fluorescent protein. 2022;[Manuscript submitted for publication].
- 86. Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nat Methods. 2007 Jul;4(7):555–7.
- 87. Subach OM, Gundorov IS, Yoshimura M, Subach FV, Zhang J, Grüenwald D, et al. Conversion of Red Fluorescent Protein into a Bright Blue Probe. Chemistry & Biology. 2008 Oct 20;15(10):1116–24.
- 88. Demchenko AP. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection*. Methods Appl Fluoresc. 2020;8(2):022001.
- 89. Icha J, Weber M, Waters JC, Norden C. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. BioEssays. 2017;39(8):1700003.
- 90. Kiepas A, Voorand E, Mubaid F, Siegel PM, Brown CM. Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity. J Cell Sci. 2020 Feb 21;133(4):jcs242834.
- 91. Bagshaw CR, Cherny D. Blinking fluorophores: what do they tell us about protein dynamics? Biochemical Society Transactions. 2006 Oct 1;34(5):979–82.
- 92. Die Fortschritte der Physik. G. Reimer; 1855. 878 p.
- 93. Inoué S. Handbook of biological and confocal microscopy (ed. Pawley, JB) 1–19. Plenum; 1990.
- 94. Elson EL. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. Biophys J. 2011;101(12):2855-70.
- 95. Magde D, Elson E, Webb WW. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System---Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. Phys Rev Lett. 1972 Sep 11;29(11):705–8.
- 96. Medina MA, Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. Bioessays. 2002;24(8):758–64.
- 97. Szalóki N, Krieger JW, Komáromi I, Tóth K, Vámosi G. Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. Mol Cell Biol. 2015;35(21):3785–98.
- 98. Baudendistel N, Müller G, Waldeck W, Angel P, Langowski J. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. Chemphyschem. 2005 May;6(5):984–90.
- 99. Förster Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Annalen der Physik. 1948;437(1-2):55-75.

- 100. Schneckenburger H. Förster resonance energy transfer–what can we learn and how can we use it? Methods Appl Fluoresc. 2019;8(1):013001.
- 101. Helms V. Principles of Computational Cell Biology: From Protein Complexes to Cellular Networks. John Wiley & Sons; 2008. 296 p.
- 102. Lam A, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, et al. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. Nat Methods. 2012 Oct;9(10):1005–12.
- Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. Annu Rev Biochem. 1978;47:819–46.
- 104. Truong K, Ikura M. The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo. Current Opinion in Structural Biology. 2001 Sep 1;11(5):573–8.
- 105. Loura LMS, Prieto M. FRET in Membrane Biophysics: An Overview. Front Physiol. 2011 Nov 15;2:82.
- Pollok BA, Heim R. Using GFP in FRET-based applications. Trends in Cell Biology. 1999 Feb 1;9(2):57–60.
- 107. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Research. 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.
- 108. Jan Wolfgang Krieger, Jörg Langowski. QuickFit 3.0: A data evaluation application for biophysics [Internet]. 2022. Available from: http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/
- Widengren J, Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1998 Jul;44(5):857–79.
- 110. Vámosi G, Friedländer-Brock E, Ibrahim SM, Brock R, Szöllősi J, Vereb G. EGF Receptor Stalls upon Activation as Evidenced by Complementary Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching Measurements. Int J Mol Sci. 2019 Jul 9;20(13):E3370.
- 111. Petrášek Z, Schwille P. Precise Measurement of Diffusion Coefficients using Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy. Biophys J. 2008 Feb 15;94(4):1437–48.
- 112. Szalóki N, Doan-Xuan QM, Szöllősi J, Tóth K, Vámosi G, Bacsó Z. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. Cytometry A. 2013 Sep;83(9):818–29.
- 113. Akaike H. A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control. 1974;19(6):716–23.
- 114. Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. Science. 2020 Mar 6;367(6482):eaay5947.

- 115. Bosire R, Fadel L, Mocsár G, Nánási P, Sen P, Sharma AK, et al. Doxorubicin impacts chromatin binding of HMGB1, Histone H1 and retinoic acid receptor. Sci Rep. 2022 May 16;12(1):8087.
- 116. Prüfer K, Barsony J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. Mol Endocrinol. 2002;16(8):1738–51.
- 117. Prüfer K, Racz A, Lin GC, Barsony J. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. J Biol Chem. 2000;275(52):41114–23.
- 118. Hendrix J, Gijsbers R, De Rijck J, Voet A, Hotta J ichi, McNeely M, et al. The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. Nucleic Acids Res. 2011 Mar;39(4):1310–25.
- 119. McNally JG, Müller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. Science. 2000 Feb 18;287(5456):1262–5.
- 120. Royer CA. Characterizing proteins in their cellular environment: Examples of recent advances in quantitative fluorescence microscopy. Protein Sci. 2019 Jul;28(7):1210–21.
- 121. Wang LX, Wang N, Xu QL, Yan W, Dong L, Li BL. Effects of vitamin D combined with pioglitazone hydrochloride on bone mineral density and bone metabolism in Type 2 diabetic nephropathy. Biosci Rep. 2017 Mar 27;37(2):BSR20160544.
- 122. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone Causes Bone Loss in Mice by Suppressing Osteoblast Differentiation and Bone Formation. Endocrinology. 2005 Mar 1;146(3):1226–35.
- 123. van Driel M, van Leeuwen JPTM. Vitamin D endocrine system and osteoblasts. Bonekey Rep. 2014 Feb 5;3:493.
- 124. Kendall C, Wooltorton E. Rosiglitazone (Avandia) and macular edema. CMAJ. 2006 Feb 28;174(5):623.
- 125. Pollock LM, Xie J, Bell BA, Anand-Apte B. Retinoic acid signaling is essential for maintenance of the blood-retinal barrier. FASEB J. 2018 Oct;32(10):5674–84.
- 126. Simandi Z, Horvath A, Cuaranta-Monroy I, Sauer S, Deleuze JF, Nagy L. RXR heterodimers orchestrate transcriptional control of neurogenesis and cell fate specification. Molecular and Cellular Endocrinology. 2018 Aug 15;471:51–62.
- 127. Cella Zanacchi F, Lavagnino Z, Perrone Donnorso M, Del Bue A, Furia L, Faretta M, et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples. Nat Methods. 2011 Oct 9;8(12):1047–9.
- 128. Kapanidis AN, Laurence TA, Lee NK, Margeat E, Kong X, Weiss S. Alternating-laser excitation of single molecules. Acc Chem Res. 2005 Jul;38(7):523–33.
- 129. Muller BK, Zaychikov E, Brauchle C, Lamb DC. Pulsed interleaved excitation. Biophysical journal. 2005 Nov;89(5):3508–22.

130. Thews E, Gerken M, Eckert R, Zapfel J, Tietz C, Wrachtrup J. Cross talk free fluorescence cross correlation spectroscopy in live cells. Biophysical journal. 2005 Sep;89(3):2069–76.

10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



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

Jelölt: Rehó Bálint Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 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)
- 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

 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





DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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 alapjául 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.



11. TÁRGYSZAVAK

DNS-kötés, FCS, FCCS, SPIM, FRET; RAR; RXR; VDR; kompetíció; fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia; magreceptorok

12. KEYWORDS

DNA-binding; FCS, FCCS, SPIM, FRET; RAR; RXR; VDR; competition; fluorescence correlation spectroscopy; nuclear receptors

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vámosi Györgynek a munkám során nyújtott maximális támogatását, emberségét, szakmai hozzáértését és türelmét. Nemcsak doktorjelölti, hanem TDK-s munkásságom alatt is számíthattam rá, módszertani tanácsait nem felejtem el.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és volt vezetőinek, Prof. Dr. Panyi Györgynek és Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy lehetővé tették számomra az intézetben történő kutatómunkát TDK-s korom óta.

Külön köszönöm kollaborációs partnereinknek, Dr. Tóth Katalinnak, Prof. Dr. Jörg Langowskinak, hogy lehetővé tették a heidelbergi DKFZ-ben történő kutatómunkát, valamint, hogy emberségükkel és szakmai tudásukkal mindvégig támogattak munkám során. Köszönöm Prof. Dr. Nagy Lászlónak a disszertációt megalapozó közlemények létrejöttében nyújtott segítségét, hasznos tanácsait.

Szeretném megköszönni TDK-s témavezetőmnek és szerzőtársamnak, Dr. Brázda Péternek, hogy segített a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában és hogy ötleteivel, tanácsaival végig hozzájárult a disszertáció elkészítéséhez. Köszönet illetti munkatársamat és szerzőtársamat, Dr. Lina Fadelt is a méréshez használt plazmidok elkészítésében nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Mocsár Gábornak a mikroszkópiai módszerek elsajátításában nyújtott segítségét és hogy mindig számíthattam rá, amennyiben technikai nehézségekkel küzdöttem. Az SPIM-ALEX-FRET-FCCS mérések nem jöhettek volna létre Lukas Lau szerteágazó fotonikai és műszaki ismeretei nélkül.

Köszönöm továbbá közvetlen jelenlegi és volt munkatársaimnak, Dr. Volkó Juliannának, Dr. Hegedüs Évának, Dr. Szalóki Nikolettának, Dr. Borbás-Sebestyén Veronikának és Dr. Kenesei Ádámnak, akik a munkám során mindenben támogattak és számos tanáccsal elláttak. Külön köszönöm Nagy Edinának a labormunka során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét, sejtlaborban végzett rendíthetetlen munkáját, valamint Gabriele Müllernek a plazmidok előállításában nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsait.

Köszönet illeti továbbá a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet minden munkatársát.

Köszönöm továbbá feleségemnek, családomnak, barátaimnak a végtelen türelmet és támogatást, melyet munkám során nyújtottak.

14. FÜGGELÉK