

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

c-Fos transzkripció faktor hetero- és homodimerizációjának kvantitatív vizsgálata élő HeLa sejtekben

Szalóki Nikoletta Margit



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2015

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

c-Fos transzkripció faktor hetero- és homodimerizációjának kvantitatív vizsgálata élő HeLa sejtekben

Szalóki Nikoletta Margit

Témavezető: Dr. Vámosi György



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2015

c-Fos transzkripciós faktor hetero- és homodimerizációjának vizsgálata élő HeLa sejtekben

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

Írta: Szalóki Nikoletta Margit okleveles biológus/biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája (Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Vámosi György, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
	Dr. Szatmári István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Immunológiai Intézet
Diskussziós terem, 2014. június 11. 12 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Garab Győző, az MTA doktora
Dr. Balkay László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Garab Győző, az MTA doktora
	Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
	Dr. Balkay László, PhD
	Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme, 2015. december 15 13:30.

1. Bevezetés

1.1. Fos és Jun család tagjai és szerkezetük

A Fos és Jun fehérjék családjába számos transzkripció faktor tartozik. A c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB és splice variánsai a Jun család tagjaival együtt (c-Jun, JunB és JunD) az aktivátor fehérje-1 (AP-1) csoportot alkotják, amelyek dimerizáció után a célgénnek promóter illetve enhanszer régióiban levő tetradekanoil-forbol-acetát (TPA) válaszadó elemhez kötődnek. A c-Jun fehérje nemcsak heterodimert, hanem homodimert is képes alkotni, míg számos korábbi *in vitro* vizsgálat szerint az emlős c-Fos fehérje nem alkot homodimert a negatívan töltött aminosavak között fellépő taszítóerők miatt. Mikromólos koncentrációban azonban az izolált c-Fos leucin cipzár stabil dimert alkot; disszociációs állandója 25°C-on 5,6 μM -nak adódott. Kimutatták, hogy a c-Fos leucin cipzárban egyetlen aminosav cseréje elegendő a megrövidített c-Fos fehérje homodimerizációjához és DNS-hez való kötődéséhez c-Jun fehérje hiánya esetén is. Ez a típusú c-Fos homodimer specifikusan felismeri a DNS-en lévő válaszadó elemet *in vitro*.

A c-Fos–c-Jun transzkripció faktorok 4 fő doménből épülnek fel: az N-terminális transzaktivációs doménből, a DNS-kötő doménből, a dimerizációs doménből, amit egy öt leucinből álló cipzár alkot és a C-terminális doménből. Mind a két családba tartozó fehérje dimerizációs és DNS-kötő doménje α -hélixet alkot, és a bázikus régió specifikus hidrogénkötéseket és Van der Waals kölcsönhatásokat alakít ki a DNS-sel. Mivel a transzkripció faktorok DNS-kötő és dimerizációs doménje igen konzervált, a c-Fos és c-Jun család tagjainak hasonló DNS-kötő és dimerizációs tulajdonságaik vannak. A c-Fos–c-Jun heterodimer nagy affinitással kötődik az aszimmetrikus, hét nukleotidból álló TGA(C/G)TCA és kisebb affinitással a szimmetrikus, nyolc nukleotidból álló TGACGTCA szekvenciához *in vitro*.

1.1. A c-Fos és c-Jun fehérjék transzkripció aktivitásának szabályozása

A c-fos és c-jun a korai válasz génnek közé tartoznak, átíródásuk a sejt stimulációja után gyorsan indukálódik. A c-Jun a sejtekben alacsony szinten folyamatosan kifejeződik, aktivációja során a promóter régiójában levő AP-1 kötőhelyhez kapcsolódik, majd tovább növeli saját indukcióját, amikor egy másik transzkripciós faktorhoz, az aktiváló transzkripciós faktor 2-höz (ATF-2) kapcsolódik. A c-Fos transzkripcióját az Elk-1 és a ciklikus AMP válaszadó elem-kötő fehérje /ATF transzkripciós faktorok szabályozzák. Emellett a promóter régiójában megtalálhatók a szérum válaszadó elem (SRE) és a jeltovábbító és transzkripciós aktivátor (STAT) kötőhelyei is.

1.2. A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok aktivációja

c-Fos és c-Jun aktivációjában számos receptor, citokin és aktivátor vesz részt, többek közt G fehérjéhez kapcsolt receptorok, transzformáló növekedési faktor béta, növekedési faktor receptorok, illetve ultraibolya sugárzás és onkofehérjék is. A c-Fos és c-Jun fehérjék aktiválódásának egyik fő útvonala a mitogén aktivált protein kináz út. Az aktiváló jel a sejtmagba jut, ahol a c-Jun és c-Fos fehérjék is foszforilálódnak és aktiválódnak. A c-Jun aktivációja esetén az aktivált Jun N terminális kináz foszforilálja a c-Jun szabályozó régiójában a 63-as és 73-as pozícióban levő szerezket. A c-Fos szabályozó régiójának aktiválásához a MAP kináz foszforilálja a 232-es treonint.

Számos cisz szabályozó elem (DNS szakasz) közvetít c-Fos indukciót. c-Fos regulátorként működik a Sis-indukálható enhanszer, amelyet a STAT3 ismer fel. c-Fos expresszió a tiroid hormon magreceptor $\alpha 1$ -en keresztül is szabályozható, amely bél tumort indukálhat. Gyors és tranzien c-Fos transzkripció váltható ki növekedési faktorok, illetve citokinek által stimulált sejtosztódás esetén is.

c-Fos kifejeződése három fázisra osztható: alapszintű expresszió, indukált expresszió, amely TPA kezelés hatására 15 percen belül éri el maximumát és a lecsengés, ahol a transzkripciós szint 2 órán belül visszatér az alapszintre.

1.3. Fos és Jun családba tartozó fehérjék patológiai vonatkozásai

Az AP-1 által aktivált vagy inaktivált gének többek közt a differenciációt, proliferációt, a sejtek túlélését, a hipoxiára adott választ, az angiogenezist és az apoptózist szabályozzák. Az AP-1 specifikus hatása függ attól, hogy mely fehérjék alkotják a dimert, milyen a promóter régió szerkezete, illetve a transzkripciós faktoroktól és aktivátoroktól, melyek a promóterhez kötődnek. A c-Fos–c-Jun fehérjecsalád funkciója függ a sejtípustól, amelyben kifejeződnek, így a specifikus szignálok hatással vannak a fehérjecsalád aktivitására és az általuk szabályozott célfehérjékre. A Fra-1 túltermelődése megnöveli az emlőtumor és végbéltumor sejtek motilitását és invázióját, de gátolja méhnyakrák sejtek esetén a tumorigenitást. Emlőtumor esetén kimutatták, hogy a c-Fos, a Fra-1 és a Fra-2 indukálja az oszteopontin, trombospondin és CD44 kifejeződését, amik a humán emlőtumrok metasztázisában vesznek részt. Emlőkarcinómában a FosB és Fra-1 tumorszupresszorokkal kapcsolódik. Tumorképző sejtekben a c-Jun dimer partnere a c-Fos volt, míg nem tumorigén sejtek esetén a Fra-1. Szájüregi rák esetén a c-Fos az esetek túlnyomó többségében JunD-vel alkot heterodimert. A megemelkedett szintű c-Fos a ciklin D1-et a sejtmagban tartja, megakadályozva ezzel, hogy a glikogén szintetáz kináz 3 degradálja azt. A sejtmagban folyamatosan jelen levő ciklin D1 tumornövekedést indukál, és transzformáló hatással bír. A c-Fos jelenléte elengedhetetlen a G_0 – G_1 átmenethez. A c-Fos fehérje indukálhatóságának elvesztése a transzkripció gátlásához vezet.

c-Jun-nak a normális sejtnövekedésben van szerepe: csökkenti a p53 tumorszupresszor és szubsztrátja, a p21 kifejeződését azáltal, hogy képes bekötődni a p53 fehérje promóter régiójába, így meggyorsítja a sejtosztódást. Míg a c-Jun aktiválja, addig a JunB gátolja a ciklin D1 transzkripcióját: G_1 fázis kezdetén a c-Jun foszforilációja és a JunB szintjének csökkenése megnöveli a ciklin D1 transzkripcióját. Azokban a fibroblasztokban, ahol a c-Jun-t kiűtötték, a ciklin D1 alig aktiválódik, ami a G_1 –S fázis átmenet nem megfelelő progressziója következtében a sejtciklus terminálódásához vezet. A JunB dimerizációs hajlandósága alacsonyabb és

DNS-kötő aktivitása is gyengébb, mint a c-Jun-é, ezért a JunB kevésbé hatásos transzkripciós aktivátor. A JunD megemelkedett szintje lelassítja a fibroblasztok proliferációját és G₁ fázisban tartja őket, ezért a sejtosztódás egyik gátlójaként tartják számon.

Számos cikkben leírták izolált c-Fos fragmentumok homodimerizációját *in vitro*, ahol a fehérje főként a leucin cipzárat tartalmazta. A DNS-hez bekötődő c-Fos homodimerek jelenléte felvetíti annak lehetőségét, hogy ezek a faktorok transzkripciós szabályozóként szerepelhetnek, illetve magas szintjüknek fontos szerepe lehet a sejtosztódásnál és az onkogenezisben.

2. Célkitűzések

Korábban kimutatták, hogy a c-Jun képes önmagával homo-, illetve a c-Fos-szal heterodimert alkotni, azonban a c-Fos-ról azt tartották, hogy a kialakuló homodimer nem stabil. Izolált c-Fos leucin cipzárt magas koncentrációban vizsgálva leírták, hogy a csonkolt fehérje képes stabil homodimert alkotni *in vitro*, azonban egy közlemény sem vizsgálta a funkcionális fehérje viselkedését *in vivo*. Az irodalomban fellelhető információk alapján elmondható, hogy számos tumorban mértek megemelkedett c-Fos szintet, azonban ezek a közlemények nem adták meg a fehérje pontos mennyiségét. A c-Fos homodimer kialakulásáról szóló eltérő vélemények, illetve a számos tumorban magas expresszióval megjelenő c-Fos transzkripciós faktor jelentősége ösztönzött minket a c-Fos homodimerizáció jelenségének alaposabb vizsgálatára.

Kutatómunkánk során az alábbi kérdések fogalmazódtak meg bennünk:

- Alkot-e a c-Fos transzkripciós faktor stabil homodimert élő sejtben?
- Hogyan lehet a disszociációs állandót meghatározni FRET adatokból élő sejtekben?
- Mekkora a c-Fos homodimer és a c-Fos–c-Jun heterodimer disszociációs állandója?
- Kötődnek-e a Fos homo- és heterodimerek a kromatinhoz?

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Sejtvonal, sejtenyésztés

Méréseinket HeLa méhnyakrák sejtvonalon végeztük, amit a heidelbergi Német Rákkutató Központtól (DKFZ) kaptunk. A teljes hosszúságú c-Fos fehérjék mellett használtunk egy mutánst, amelynek C végéről eltávolítottak 164 aminosavat (Fos²¹⁵). Biológiai negatív kontrollként egy olyan deléciós mutánst használtuk, ahol a c-Fos fehérjéről eltávolították a DNS-kötő és dimerizációs domént (c-Fos^{ΔΔ}), így az nem képes sem dimerizációs partnereivel, sem a DNS-sel kölcsönhatni. A képkalkoló fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiai (SPIM-FCCS) mérések kivételével a pozitív kontroll egy olyan konstrukt volt, ahol a donor és akceptor festéket (ECFP-EYFP, illetve EGFP-mRFP1) egy 7 aminosavból álló linker köti össze, ami magas fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) hatásfokot eredményez. SPIM-FCCS mérésekhez a pozitív kontroll esetén egy harminc prolinból álló összekötőt illesztettünk a két fluoreszcens fehérje közé, amivel csökkentettük a FRET-et és megnöveltük a fehérje méretét, így növelve a molekula diffúziós idejét.

3.2. Transzfekció

Konfokális mikroszkóppal történő méréseinket 8 lyukú IBIDI kamrában végeztük. A vizsgálni kívánt fehérjéket plazmidként tranziens transzfekcióval juttattuk be a sejtekbe FuGene HD transzfekciós reagenst használva. A sejtek kitapasztása utáni napon elkészítettük a transzfekciós mixet, ami 25 µl FBS-mentes RPMI-ből, 0,8 µg DNS-ből és 2 µl transzfekciós reagensből áll. Húsz perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 5 µl transzfekciós mixet mértünk lyukanként a sejtekhez.

Áramlási citométeren történő mérésekhez 24 lyukú sejtenyésztő edénybe tettük ki a sejteket, a transzfektálás menete és a kimért mennyiségek megegyeztek a konfokális mikroszkópnál leírtakkal.

SPIM-FCCS mérésekhez fedőlemezekből letörött darabokat tettünk Petri csészébe, majd ráértük a sejteket. Másnap 90 µl FBS-mentes médiumhoz hozzámértünk 0,1-6 µg DNS-t és 4 µl reagenst, majd a teljes mennyiséget a sejtekhez pipettáztuk.

3.3. FRET hatások meghatározása konfokális mikroszkóppal

FRET méréseinket Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópon végeztük. Sejtenkénti FRET meghatározás esetén az átlag fluoreszcencia intenzitásokkal történő számolások Microsoft Excel programban történtek. A FRET pixelenkénti meghatározásához az ImageJ szoftver RiFRET modulját használtuk, míg a FRET hatások térkép illetve hisztogram létrehozása Matlab program keretén belül történt.

Akceptor fotoelhalványítás módszer során a donor és az akceptor festék eloszlásáról kétsatornás képet vettünk fel, majd az akceptor festéket kiégettük az akceptoros lézer maximális intenzitáson történő ismételt használatával. A fotoelhalványítás után újra kétsatornás képet vettünk fel. A háttér intenzitás meghatározása a felvett képek egy sejtmentes területén történt. A zaj csökkentésére 2 pixel sugarú Gauss szűrést alkalmaztunk.

3.4. FRET hatások meghatározása áramlási citometriával

Az áramlási citometriás méréseket FACS Aria III műszeren végeztük. A sejttermelékek és az apoptotikus sejtek kikapuzásához az előre- és oldalszórás paramétereket használtunk. A FRET hatások meghatározását az intézetünkben fejlesztett Reflex szoftverrel végeztük.

3.5. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

FCS méréseinket módosított Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópon végeztük, melyben a lavina fotodiódákkal ellátott kétsatornás FCS modul a konfokális pásztázó egységhez kapcsolódik. Azért, hogy nagy koncentrációban is tudjunk mérni, neutrális szűrőt helyeztünk a lézer útjába. A mért fluoreszcencia fluktuációkból ALV-5000E korrelátor kártya használatával autokorrelációs görbéket kaptunk. Az FCS méréshez a konfokális képeken sejtenként egy mérési pontot jelöltünk ki. Mintánként harminc sejtet mértünk le szobahőmérsékleten, egy mérés 8×5 s-ig tartott. Az autokorrelációs görbéket két komponensű, három dimenziós

szabad diffúziós modellel illesztettük meg a Quickfit 3.0 programmal, figyelembe véve a triplet állapot jelenlétét és az EGFP “blinking” jelenségét is.

3.6. Fluoreszcencia intenzitás kalibrálása FCS-sel

A disszociációs állandó (K_d) FRET adatokból történő meghatározásához kidolgoztunk egy módszert, amivel a fluoreszcencia intenzitást abszolút koncentrációvá tudjuk átszámolni. Első lépésben meghatároztuk a mikroszkóp detektálási térfogatát, amihez 130 nM-os Alexa488 festékoldatot használtunk. A festékoldat autokorrelációs függvényéből megkaptuk a τ_d (diffúziós idő) és S (az ellipszis alakú detektálási térfogat tengelyeinek aránya) paramétereket, amelyek ismeretében meghatároztuk a laterális és axiális sugarakat, így kiszámolható a detektálási térfogat. Az EGFP autokorrelációs függvényéből meghatározható az érzékeny térfogatban lévő részecskék száma, majd a részecskeszám átszámolható koncentrációvá. Minden FCS mérés előtt az FCS mérés pontjában meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitást a konfokális mikroszkóp detektorával, majd az FCS mérésből kapott koncentrációt ábráztuk ezen fluoreszcencia intenzitás függvényében. Az így nyert kalibrációs görbe segítségével az EGFP-vel jelölt c-Fos koncentrációját ki tudtuk számolni az intenzitásból.

3.7. A kalibráció hordozhatóvá tétele

A különböző napokon és különböző műszereken történt mérések összehasonlításához kalibrációs gyöngyöket használtunk. A 6 μm -es zöld kalibrációs gyöngy fluoreszcencia intenzitásával normáltuk az EGFP fluoreszcenciáját. A gyöngy közepén mért fluoreszcencia intenzitással megegyező EGFP intenzitás a konfokális mikroszkópos méréseknél $\sim 15.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ EGFP koncentrációnak felelt meg.

A kalibráció áramlási citometriás mérésekre is átvihető. Számolások során figyelembe vettük a sejtmag és a gyöngy térfogatának arányát, amit konfokális mikroszkóppal történő szeleléssel határoztunk meg. Figyelembe vettük a két műszer eltérő emissziós szűrőit, illetve a gyöngy és az EGFP spektrumának ebből eredő eltérő

relatív detektálási hatékonyságát is. Ezen tényezőket figyelembe véve kiszámoltuk az egy gyöngy-egységnek megfelelő EGFP koncentrációt, ami 1 μM -nak adódott.

3.8. Endogén fehérjék koncentrációjának meghatározása

Az endogén és transzfektált fehérjék mennyiségét immunfluoreszcens technikával határoztuk meg. Az immunfluoreszcens jelöléshez a sejteket transzfektálás utáni napon PBS-sel mostuk, majd fixáltuk 3,7%-os formaldehiddel 10 percig 4°C-on. Permeabilizáltuk a sejteket 30 percen át szobahőmérsékleten Triton X/Tween oldattal, majd az aspecifikus kötőhelyeket 30 percig BSA/Tween oldattal blokkoltuk szobahőmérsékleten. A sejteket szobahőmérsékleten 20 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban 60 percig jelöltük egér anti-c-Fos illetve egér anti-c-Jun monoklonális antitesttel. NL637-DAMIG poliklonális másodlagos antitesttel inkubáltuk a sejteket 60 percen keresztül sötétben, szobahőmérsékleten, 50 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban. Az egymást követő lépések között a sejteket háromszor mostuk PBS-sel. Áramlási citometriás mérés esetén a sejteket feltripszineztük, mostuk PBS-sel, majd a fixálási lépéstől folytattuk a fenti protokollt. Az áramlási citometriás méréseket FACSria III műszeren végeztük.

A c-Fos-EGFP mennyiségét a zöld gyöngy fluoreszcencia intenzitásához hasonlítottuk, amit a koncentráció kalibrációhoz is használtunk. Az NL637-DAMIG antitest vörös csatornában mért jele arányos a c-Fos teljes mennyiségével, vagyis a transzfektálatlan sejteknél az endogén c-Fos szinttel, illetve transzfektált minták esetén az endogén c-Fos és a c-Fos-EGFP együttes szintjével. A Fos-EGFP abszolút koncentrációját a fluoreszcens gyöngyökkel végzett kalibráció után a zöld fluoreszcens jelből számoltuk, majd a vörös fluoreszcens jelek összehasonlításával megkaptuk az endogén c-Fos abszolút koncentrációját is.

3.9. Disszociációs állandók meghatározása

Donoros és akceptoros festékkel jelölt fehérjék dimerizációja esetén FRET lép fel, amivel nyomon lehet követni az asszociációt. Méréseinket áramlási citométeren

végeztük, így kellő számú adat állt rendelkezésünkre a c-Fos homodimer és a c-Fos–c-Jun heterodimer disszociációs állandójának megállapításához.

A heterodimer disszociációs egyensúlyának meghatározása során feltételeztük, hogy a c-Fos–c-Jun heterodimerek sokkal stabilabbak, mint a c-Fos homodimerek, ezért a c-Fos homodimerek jelenlétét elhanyagoltuk. A homodimerek koncentrációját kifejeztük a teljes c-Fos koncentráció és a disszociációs állandó függvényében, majd a FRET hatásfokot felírtuk a teljes c-Fos koncentráció és az akceptor/donor arány függvényeként. A modellfüggvény kiszámításakor figyelembe vettük, hogy csak azok a donor molekulák adnak nullától különböző FRET hatásfokot, amelyek komplexet képeznek az akceptorral, a donor-donor, illetve donor+endogén c-Fos párok nem. A c-Fos–c-Fos egyensúly meghatározásánál a c-Fos–c-Jun heterodimer kialakulását is figyelembe vettük. Mivel a heterodimer sokkal stabilabb, ezért feltételezzük, hogy magas c-Fos koncentráció esetén az összes c-Jun molekula komplexet képez a c-Fossal, vagyis nincs jelen szabad c-Jun. Csak azok a c-Fos homodimerek fognak hozzájárulni a FRET-hez, amelyek donoros és akceptoros festékkel jelölt fehérjepárokat tartalmaznak.

A sejtenkénti FRET hatásfokokat a donorral jelölt c-Fos koncentráció függvényében ábrázolva FRET titrálási görbéket kaptunk, melyekből a fent leírt modellfüggvény illesztésével megkaptuk a c-Fos homodimer disszociációs állandóját és a FRET hatásfokot egy donor-akceptor pár között.

3.10. Képzőképző fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópia

SPIM-FCCS méréseinkhez használt rendszer felépítése a Krieger és mtsai (Optics Express, 2014. 22(3):p2358-2375) cikkben található meg részletesen. 491 nm-es és 561 nm-es lézernyalábok egy hengerlencsén keresztül egy objektívre kerülnek, ami egy $\sim 1,3 \mu\text{m}$ vastagságú síkban fókuszált nyalábot hoz létre, ami megvilágítja a sejteket. A mintát csipesz rögzíti a Hanks' oldatot tartalmazó mintakamrában úgy, hogy a mintára kb. 45° -os szögben esik a gerjesztő fény. A fluoreszcens fényt $60\times$ NA=1 vizes objektív gyűjti össze, majd a mintáról származó fluoreszcenciát egy

dikroikus tükör két csatornába osztja. A képeket EM-CCD kamera rögzíti, melynek pixelmérete a tárgysíkban $400 \times 400 \text{ nm}^2$.

A méréshez és a kiértékeléshez a QuickFit 3.0 szoftvert használtuk. Minden mérés esetén kb. százezer képet vettünk fel, $530 \text{ }\mu\text{s}$ -os ismétlési idővel. A háttérlevonáshoz megvilágítás nélküli képet vettünk fel, majd ennek intenzitását levontuk az egyes képekből. A fotoelhalványításra pixelenként korrigáltunk exponenciális lecsengést illesztve és ezzel a lecsengési görbével osztva az intenzitást, kiszámoltuk a két csatorna auto- és keresztkorrelációs görbéit. A zaj csökkentése érdekében a 2×2 pixelből származó intenzitásokat összevontuk és ezekből az adatokból számoltuk ki a korrelációs függvényeket. Az adatok illesztéséhez olyan modellfüggvényt használtunk, ami két diffúziós komponenst illeszt a zöld és a vörös autokorrelációs függvényekre és egy komponenst a keresztkorrelációs függvényre (mivel az utóbbi mindig jól illeszthető volt egy komponenssel).

4. Eredmények

4.1. Dimerek FRET hatásfokának meghatározása

Konfokális mikroszkópiás méréseink során teljes hosszúságú c-Fos és c-Jun, illetve a C végen megrövidített c-Fos²¹⁵ mutáns fehérjéket használtunk, amikhez ECFP és EYFP fehérjéket kapcsoltunk.

4.1.1. Arányalapú módszerrel

A donor, transzfer és akceptor jeleket három független csatornában rögzítettük és meghatároztuk a FRET hatásfok értékeit, illetve az akceptor-donor arányt sejtenként és pixelenként is. A teljes hosszúságú c-Fos fehérje esetén pixelenkénti kiértékeléssel az átlagos FRET hatásfok $5,0 \pm 0,5\%$, míg a c-Fos²¹⁵-nél ez az érték $10,0 \pm 0,5\%$ volt. Lemértük a FRET hatásfokot c-Fos-ECFP + c-Jun-EYFP és c-Fos²¹⁵-ECFP + c-Jun-EYFP fehérjék között is, ahol az átlagos FRET hatásfok $7,9 \pm 0,4\%$ és $15,0 \pm 1,1\%$ volt. A negatív kontroll (ECFP és EYFP külön transzfektálva) és a pozitív kontroll (ECFP-EYFP fúziós fehérje) esetén az átlag FRET hatásfok $2,8 \pm 0,4\%$ és $48,6 \pm 0,8\%$ volt.

A fenti mérést kiértékeljük sejtenként is, ahol a sejt fluoreszcens régiójából meghatároztuk az átlagos pixelintenzitásokat. Az adatokat növekvő donor intenzitás szerint három csoportba soroltuk; alacsony (<800), közepes ($800-1200$) és magas (>1200). Az adatokat 0,25-ös akceptor-donor arány (N_A/N_D) intervallumonként csoportosítottuk, majd a c-Fos-ECFP+c-Fos-EYFP és c-Fos²¹⁵-ECFP+c-Fos²¹⁵-EYFP mintáknál a FRET hatásfok értékeit ábrázoltuk az N_A/N_D függvényében. Mind a két fehérjepárnál elmondható, hogy növekvő akceptor-donor aránnyal nőtt a FRET hatásfok is, mert több akceptor fehérjéhez kapcsolt c-Fos molekula lesz elérhető a donor fehérjéhez kapcsolt molekulák számára.

4.1.2. Akceptor fotoelhalványításos módszerrel

Az egyik legegyszerűbb intenzitás alapú FRET meghatározási módszer az, amikor a kétszeresen jelölt minta (donor-akceptor) donor intenzitását hasonlítjuk össze az akceptor jelenlétében illetve az akceptor kiegészése után. A pozitív kontroll (ECFP-EYFP fúziós fehérje) kiértékelése során meghatározott FRET hatásfok értéket ($E=48,5\%$) sztenderdként használtuk az ECFP-EYFP festékpár esetén. Az arányalapú mérés kiértékelésekor több segédparaméter meghatározására is szükség van. Az egyik kritikus és nehezen mérhető paraméter az ún. „alfa faktor”, ami a donor és akceptor jelek relatív detektálási hatékonyságát adja meg. Ennek értékét mindig úgy állítottuk be, hogy a pozitív mintánál megkapjuk az $E=48,5\%$ értéket, amivel biztosítottuk a különböző napokon végzett mérések összehasonlíthatóságát. Ezzel a módszerrel a c-Fos-ECFP + c-Jun-EYFP és c-Fos²¹⁵-ECFP + c-Jun-EYFP fehérjék közötti átlagos FRET hatásfok $8,0\pm3,6\%$ és $21,2\pm3,3\%$ volt. A negatív kontroll esetén az átlag FRET hatásfok $1,0\pm1,5\%$ volt.

4.2. Abszolút koncentráció meghatározása fluoreszcencia intenzitásból

Munkánk során kidolgoztunk egy, az élő sejtekben egymással kölcsönható fehérjék K_d értékének meghatározását lehetővé tevő FRET titrálási módszert, ahol a citometriás FRET hatásfok adatokat ábrázoltuk a dimereket alkotó fehérjék koncentrációjának függvényében. Ehhez szükséges volt a fluoreszcencia intenzitás, mint az abszolút koncentrációval arányos mennyiség kalibrációjára. A kalibrációt konfokális mikroszkópia és FCS kombinációjával végeztük. EGFP fehérjét kifejező HeLa sejtekről konfokális képeket vettünk fel, így meghatározva a fluoreszcencia intenzitásokat minden egyes pixelben. Ezután a sejtmag kiválasztott pontjaiban FCS méréseket végeztünk, és az autokorrelációs függvények illesztésével kapott N értékekből meghatároztuk a helyi EGFP koncentrációkat. Az EGFP koncentrációt a fluoreszcencia intenzitás függvényében ábrázoltuk, majd a kapott pontokra kalibrációs egyenest illesztettünk, így a meredekségből megkaptuk a fluoreszcencia intenzitás egységét koncentrációban kifejezve. Azonos műszerbeállításokkal zöld fluoreszcens

kalibrációs gyöngyök intenzitását is lemértük, és az EGFP intenzitásokat a gyöngy intenzitásával normáltuk. Ez lehetővé tette, hogy a más napokon mért, gyönggyel normált intenzitásokat (újabb kalibráció nélkül) koncentrációvá konvertáljuk.

4.3. A c-Fos homodimer kialakulásának és DNS-hez kötődésének igazolása FCS-sel

A diffundáló részecskék koncentrációját a fluoreszcencia intenzitás függvényében ábrázolva a c-Fos^{ΔΔ}-EGFP és az EGFP esetén ugyanakkora meredekséget kaptunk. Ugyanakkora intenzitás ugyanannyi részecskeszámnak felel meg, ami azt mutatja, hogy a mutáns monomer. A teljes hosszúságú c-Fos-EGFP fehérje esetén a meredekség kb. feleakkora, mint a monomer fehérjéknél, ami azt jelzi, hogy a c-Fos molekulák feltehetően homodimert alkotnak.

A molekulák fényessége, ami a fluoreszcencia intenzitás (F) és a részecskeszám (N) hányadosa, arányos az együtt diffundáló komplexben levő fluorofórok számával, így a jelölt fehérjék homoaggregációjának mértékét jellemzi. Az F/N értékeket a koncentráció függvényében ábrázolva azt kaptuk, hogy a c-Fos-EGFP fényessége nagyobb, mint az EGFP, a c-Fos^{ΔΔ}-EGFP illetve a c-Fos-EGFP + c-Jun-mRFP1 mintáé, ami megerősíti a c-Fos-EGFP homodimerizációját.

Az autokorrelációs görbékéből a molekulák diffúziós tulajdonságait is meghatároztuk. Az autokorrelációs görbéket két diffundáló komponenst feltételezve illesztettük meg. A lassú komponens hányada a c-Fos^{ΔΔ}-EGFP esetén, ami nem képes a DNS-hez kötődni, jóval alacsonyabb, mint a heterodimer (c-Fos-EGFP+c-Jun-mRFP1) és a c-Fos homodimer esetén, ami arra utal, hogy ezek a fehérje komplexek bekötődnek a kromatinhoz, ami a lassulásukat okozza.

4.4. Endogén és transzfektált fehérjekoncentrációk meghatározása

A fehérjék összmennyiségének meghatározására immunfluoreszcens jelölést használtunk, ahol a transzfektálatlan és c-Fos-EGFP-vel illetve c-Jun-EGFP-vel transzfektált sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel, illetve konfokális

mikroszkóppal mértük le. Meghatároztuk a c-Fos-EGFP illetve c-Jun-EGFP EGFP-től származó zöld jelét, amit a kalibrációs gyöngy fluoreszcenciájával összevetve meghatároztuk a transzfektált fehérje abszolút koncentrációját. A transzfektálatlan minta immunfluoreszcens jele arányos az endogén koncentrációval, míg a transzfektált mintánál ez az endogén és transzfektált fehérjék együttes mennyiségének felel meg. A c-Fos-EGFP koncentrációjának ismeretében az endogén koncentrációt is meg tudtuk határozni, így a c-Fos fehérje endogén koncentrációja 113 ± 11 nM-nak, a c-Jun fehérjéé pedig 94 ± 10 nM-nak adódott.

4.5. A c-Fos–c-Jun heterodimer és a c-Fos homodimer disszociációs állandójának meghatározása

A dimerek kialakulásának mértéke arányos a mért FRET hatásfokkal, így ezt a paramétert használtuk az asszociáció kimutatására. Az EGFP-vel illetve mRFP1-gyel jelölt fehérjéket kifejező sejteket áramlási citométerrel mértük le, ahol változtattuk a donoros és akceptoros fehérjék koncentrációját. Mérés során meghatároztuk a sejtenkénti FRET hatásfokot (E), a donor koncentrációt, ami a FRET-re korrigált és a gyöngyre normalizált donor intenzitásból származik, és az akceptor-donor arányt. A sejteket az akceptor-donor arány alapján csoportokba soroltuk, majd ábráztuk a FRET hatásfok értékeit a donor koncentráció függvényében. Az adatok illesztésére használt modellfüggvényben figyelembe vettük a jelöletlen endogén c-Fos és c-Jun fehérjék jelenlétét is. Az illesztésből származó látszólagos disszociációs állandó (K_d) értéke heterodimer esetén 10-370 nM között változik különböző akceptor-donor arányoknál a Fos²¹⁵-EGFP+c-Jun-mRFP1, illetve a c-Jun-EGFP+c-Fos²¹⁵-mRFP1 pár esetén.

Az akceptor-donor arány szerint csoportosított adatokat donor intenzitás alapján 0,25-ös intervallumokba soroltuk, majd az adatsorok illesztéséből kapott disszociációs állandókat ábráztuk mindkét irányú donor-akceptor esetében a c-Fos:c-Jun arány függvényében. A disszociációs állandó a c-Fos–c-Jun arány növekedésével csökken,

nagyobb c-Fos:c-Jun arányánál, ahol több c-Fos volt jelen, alacsonyabb disszociációs állandót kaptunk mindkét heterodimer esetén.

A c-Fos homodimerizáció FRET titrálási görbéinek illesztésénél figyelembe vettük, hogy a c-Fos önmagával, illetve az endogén c-Junnal is képes összekapcsolódni. Feltételeztük, hogy az összes c-Jun molekula komplexet alkot a c-Fos fehérjével, mivel a c-Fos–c-Jun komplex sokkal stabilabb, mint a c-Fos homodimer. Az illesztett modellfüggvény figyelembe veszi a donor-donor, a donor-akceptor és az akceptor-akceptor jelölt c-Fos–c-Fos komplexeket, amelyek közül egyedül a donor-akceptor jelölt komplexek adnak FRET-et. Az illesztés az endogén c-Fos fehérjék jelenlétével is számol, hiszen ezek szintén összekapcsolódhatnak a jelölt c-Fos illetve c-Jun fehérjékkel. A különböző akceptor-donor arányú adatsortokat úgy is megillesztettük, hogy az adatsortokra azonos K_d és E_0 értékeket illesztettünk. Az összekapcsolt illesztés eredményeként a $K_d=6,7\pm1,7$ μM -nak, míg az $E_0=9,5\pm0,8\%$ -nak adódott. Amikor a különböző akceptor-donor arányú csoportokat függetlenül illesztettük meg, a K_d és az E_0 értéke 5,4 és 9,7 μM illetve 9,1% és 11,9% között változott.

4.6. A c-Fos homodimer kialakulásának és DNS-hez kötődésének igazolása SPIM-FCCS-sel

A SPIM-FCCS mérés során egyszerre két, különböző spektrumú festékkel jelölt molekula mozgását tudjuk detektálni és meghatározhatjuk a fluoreszcencia autokorrelációs (ACF) és kereszt-korrelációs (CCF) függvényeit. A duplán jelölt sejtek esetén nullától eltérő CCF amplitúdó a molekulák legalább egy részének együttmozgását jelzi, míg a CCF és ACF amplitúdók aránya a komplexet alkotó molekulák hányadával arányos. A mérés során kétdimenziós térképek formájában kapunk információt az együtt mozgó molekulák mobilitásáról és kölcsönhatásáról.

Méréseinkhez a sejteket az alábbi kombinációkban kotranszfectáltuk: c-Fos²¹⁵-EGFP+c-Fos²¹⁵-mRFP1, c-Fos²¹⁵-EGFP+Jun-mRFP1, c-Fos ^{$\Delta\Delta$} -EGFP+c-Fos²¹⁵-mRFP1 (negatív kontroll) és EGFP-P30-mRFP1 (pozitív kontroll, ahol az EGFP és

mRFP1 fehérjét 30 prolinból álló polipeptidlánc köti össze). A méréshez azokat a sejteket választottuk ki, amelyek körül-belül azonos mennyiségű zöld és vörös molekulát fejeztek ki és a fehérjék koncentrációja a FRET méréseknél használt koncentráció tartományba estek (300 nM – 9,6 μ M). Minden egyes pixelben elvégeztük az illesztést, így pixelenként volt zöld és vörös ACF illetve CCF adatunk. A negatív kontroll (c-Fos^{ΔΔ}-EGFP+c-Fos²¹⁵-mRFP1) esetén kaptuk a legalacsonyabb (0,06), míg a pozitív kontrollnál (EGFP-P30-mRFP1) a legmagasabb (0,32) dimer hányadot. A c-Fos–c-Jun heterodimer szintén magas dimer hányadot mutatott (0,22), míg a c-Fos²¹⁵ homodimer kicsit alacsonyabbat (0,16), mint a heterodimer, de még mindig szignifikánsan magasabb értéket, mint a negatív kontroll.

Vizsgáltuk a fehérje dimerek sejtmagbeli mobilitását is, amit a CCF-ek illesztéséből kaptunk meg. Egykomponensű illesztést használva meghatároztuk azon komplexek átlagos mozgékonyosságát, amelyek zöld és vörös fluorofórokat is tartalmaztak. EGFP-P30-mRFP1 fúziós fehérje átlagos diffúziós állandója $\sim 4,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$, míg c-Fos²¹⁵–c-Fos²¹⁵ homodimer és a c-Fos–c-Jun heterodimer esetén $\sim 0,3$ és $0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ volt. A homo- és heterodimer esetén csak lassú komponens tudunk illeszteni az adatokra, ami arra utalhat, hogy a komplexek egy lassan mozgó sejtmag komponenshez, nagy valószínűséggel a kromatinhoz kötődhetnek.

4.7. FRET kiértékelés szuboptimális mérési körülmények között

FRET egy spektroszkópos technika, amelyet gyakran használnak molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára. Arányalapú FRET számolásnál az analízis egyik kulcsfontosságú része az α faktor meghatározása, ami az akceptor és a donor fluoreszcens jelének hányadosa a molekulaszámra és a gerjesztési hatékonyságra normalizálva. Az α faktor a festékekre és a műszer beállításra jellemző tényező, ami kiszámolható, ha az adott számú, transzfer csatornában detektált gerjesztett akceptor molekula fluoreszcens jelét arányítjuk az azonos számú, donor csatornában detektált gerjesztett donor molekula jeléhez. Méréseinkhez donor-akceptor fúziós fehérjét használtunk, ahol a festékek 1:1 arányban fejeződnek ki, a gerjesztési hatékonyságra

normalizáláshoz a donor és akceptor festékeket ugyanazzal a lézervonallal gerjesztettük és figyelembe vettük a festékek abszorpciós együtthatóját ezen a hullámhosszon.

ECFP és EYFP gerjesztésére a konfokális mikroszkóp 458 és 514 nm-es lézervonalait használtuk, ami kitűnő jel-zaj arányt biztosít. Lézer pásztázó citométer és FACSria áramlási citométer esetén a 458 és 514 nm-es lézerek nem voltak elérhetőek. A 405 nm-es lézerrel az ECFP jól gerjeszthető, de az EYFP gerjesztődése alacsony, ezért az α faktor pontos meghatározása nem volt lehetséges. Sztenderdként az ECFP-EYFP fúziós fehérjét használtuk, aminek FRET hatásfokát konfokális mikroszkópon mért akceptor fotoelhalványítás technikával határoztuk meg ($E=48,5\%$). A lézer pásztázó és áramlási citometriás adatok kiértékelése során a pozitív kontroll esetén az α értékét úgy állítottuk be, hogy a FRET hatásfok átlaga 48,5% legyen. Ezt az α értéket használtuk a továbbiakban a többi minta kiértékeléséhez. Méréseinket c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok között végeztük. A különböző műszereken mért FRET hatásfok adatok ezt a módszert alkalmazva nagyon jó egyezést mutattak.

5. Megbeszélés

Az AP-1 aktivitása lehet anti-onkogén, amikor apoptózist indukál, illetve viselkedhet onkogénként is, amikor a sejt túlélését indukálja. Az AP-1 dimerek, amelyek a Fos, Jun és ATF családok fehérjéiből állnak, sejttípusonként eltérően fejeződnek ki és szabályozásuk is különböző, ezért minden sejttípus AP-1 dimer keveréket tartalmaz, melyek funkciója is eltérő lehet.

Számos cikkben leírták az izolált c-Fos leucin cipzár homodimerizációját *in vitro*. Ezekben a tanulmányokban azt állították, hogy a homodimerek stabilitása alacsony, és feltehetően az élő sejtekben nem fordulnak elő. FRET mikroszkópia, áramlási citometria, FCS és képalkotó FCCS kombinálásával élő sejtekben kimutattuk, hogy a c-Fos transzkripciós faktor homodimert alkot. A látszólagos disszociációs állandó értéke HeLa sejtekben $6,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$ volt. A c-Fos–c-Jun heterodimernél ez 10-370 nM-nak adódott, és nagyban függött a c-Fos:c-Jun aránytól és attól, hogy melyik fehérje melyik festéket hordozza. A K_d értékében tapasztalható nagy szórás abból is adódhat, hogy c-Jun homodimerek is létrejönnek, amelyek kompetálnak a heterodimerizáció folyamatával. Alacsony c-Fos:c-Jun arány esetén, ahol nagyobb mennyiségű c-Jun van jelen, a c-Jun homodimerek relatív mennyisége magas, ezért kevés szabad c-Jun érhető el a c-Fos számára, így a heterodimerek kialakulása magasabb koncentráció felé tolódik el. Magasabb c-Fos:c-Jun aránynál a c-Jun homodimerek kialakulása kevésbé jelentős. A zöld csatornában mérhető autofluoreszcencia $\sim 50 \text{ nM}$ EGFP intenzitásnak felel meg, ami csökkenti a heterodimer esetén meghatározott K_d értékek pontosságát, tekintve, hogy a heterodimer disszociációs állandója összemérhető ezzel az értékkel. Az általunk bemutatott K_d számolási módszer FCS-sel végzett koncentráció kalibráció utáni FRET titráláson alapszik, ami élő sejtekben történt. A számolás során figyelembe vettük a transzfektált, fluoreszcens és az endogén, nem fluoreszcens fehérjék koncentrációját is. A koncentráció kalibráció a sztenderdként használt fluoreszcens gyöngy használatával különböző napokon illetve műszereken történt mérésekre is átvihető.

FRET alkalmazásának egyik fő területe a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata. Az ECFP és EYFP fehérjék a FRET mérésekben gyakran használt festékpár, mert jelentős a spektrális átfedésük. Kimutattuk, hogy a nem ideálisan gerjesztett ECFP és EYFP fluoreszcenciáját kellően nagy pontossággal és érzékenységgel tudjuk detektálni lézer pásztázó és áramlási citométeren, és egy ismert FRET hatásfokú referencia minta használatával más minták FRET mérése is lehetségessé válik. Összehasonlítottuk konfokális mikroszkóppal (optimális ECFP és EYFP gerjesztés) illetve lézer pásztázó citométerrel és áramlási citométerrel (szuboptimális gerjesztés) mért FRET hatásfokokat és mindhárom műszerrel közel azonos eredményeket kaptunk. Kidolgoztunk egy új számolási módszert, ahol az α faktor és a FRET hatásfok meghatározását egyidejűleg meg tudtuk határozni ugyanazt az egyenletrendszert használva.

FRET használatával a fehérjék egy bizonyos hányadának kölcsönhatásairól kapunk információt, de a kapcsolat stabilitásáról nem. A molekulák közötti stabil kapcsolatot fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával igazoltuk. Az FCS adatokból kiderült, hogy a c-Fos-EGFP molekuláris fényessége kétszer akkora, mint a DNS-kötő és a dimerizációs domén hiányos mutánsé (Fos ^{$\Delta\Delta$}), vagy, mint a szabad EGFP molekuláé. Két komponenszt illesztve az adatokra a lassú komponens hányada közel azonos volt a c-Fos homodimer és a c-Fos-c-Jun heterodimer esetén, míg a Fos ^{$\Delta\Delta$} mutánsé szignifikánsan alacsonyabb volt. Ez az adat azt mutatja, hogy a c-Fos fehérje homo- és heterodimerként is bekötődik a DNS-hez.

A SPIM-FCCS technika lehetővé tette számunkra, hogy megerősítsük a c-Fos homodimer jelenlétét, láthassuk sejtmagbéli eloszlását és mobilitását. Méréseinkből kiderült, hogy a homodimer legalább néhány tizedmásodpercig stabilak voltak. Az illesztett keresztkorrelációs görbékéből kiszámolt diffúziós állandó $\sim 0,26 \mu\text{m}^2/\text{s}$ volt, ami hasonló ahhoz, amit a c-Fos-c-Jun heterodimer esetén kaptunk ($\sim 0,41 \mu\text{m}^2/\text{s}$), illetve amit munkacsoportunk és mások kaptak egyéb DNS-hez kötött fehérjéknél. A hetero- és homodimerre kapott diffúziós állandó értékek kisebbek az EGFP-P30-

mRFP1 fúziós fehérjére kapott értéknél ($\sim 4,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$) annak megfelelően, hogy az utóbbi fehérje nem kötődik a DNS-hez.

A stabil, DNS-hez kötődő c-Fos homodimerek jelenléte felvetíti annak lehetőségét, hogy ezek a faktorok transzkripció szabályozóként szerepelhetnek, a funkcionális c-Fos homodimer akadályozhatja a c-Fos–c-Jun heterodimer DNS-hez való kötődését és így a működését is, illetve magas szintjüknek fontos szerepe lehet a sejtosztódásnál és az onkogenezisben.

6. Összefoglalás

A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok az aktivátor fehérje 1 (AP-1) családba tartoznak. Heterodimert alkotnak, majd a bázikus leucin cipzár régiójukkal bekötődnek a DNS-hez és számos folyamatot szabályoznak, például a sejtciklust, a differenciációt és az apoptózist. A tisztított c-Jun leucin cipzár önmagával is tud stabil dimert alkotni, míg a c-Fos leucin cipzár homodimerek sokkal kevésbé stabilak. A c-Fos fehérje tumoros sejtekben megemelkedett szintje és az irodalomban talált homodimerizációval kapcsolatos ellentmondások arra ösztönöztek minket, hogy élő sejtekben is megvizsgáljuk a c-Fos homodimerizáció lehetőségét. HeLa sejteket fluoreszcens fehérjékhez kapcsolt c-Fos-szal és c-Junnal transzfektáltuk majd fluoreszcencia rezonancia energia transzferrel (FRET) illetve fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópiával vizsgáltuk a homo- és heterodimerizációjukat. A FRET és a molekuláris fényesség analízis eredményei azt mutatták, hogy a c-Fos homodimereket alkot. Kidolgoztunk egy az FCS technikát és az immunfluoreszcenciát kombináló módszert, melynek segítségével meg tudtuk határozni a transzfektált és endogén c-Fos és c-Jun fehérjék abszolút koncentrációját. Ez a módszer lehetővé teszi a fehérje asszociációk kvantitatív elemzését. Donor és akceptor festékkel jelölt fehérjéket különféle koncentrációban kifejező sejteken végzett FRET titrálás segítségével meghatároztuk a c-Fos homodimerek és a c-Fos-c-Jun heterodimerek látszólagos disszociációs állandóját, ami $6,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$ -nak illetve $<100 \text{ nM}$ -nak adódott. Képkötő fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával megerősítettük, hogy a c-Fos fehérjék stabil homodimereket alkotnak és kötődnek a kromatinhoz. Molekuláris dinamikai modellezés szintén megerősítette, hogy a c-Fos fehérjék stabil homodimereket alkothatnak. Eredményeink felvetítik annak lehetőségét, hogy a c-Fos homodimer mint az AP-1 komplex egy új formája autonóm transzkripciós faktorként működhetnek a c-Fos-t túltermelő tumorokban és szerepet játszhatnak a tumorok kialakulásában.



Nyilvántartási szám: DEENK/211/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szalóki Nikoletta
Neptun kód: R17YB9
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037769

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szalóki, N.**, Krieger, J.W., 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. 35 (21), 3785-3798, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00346-15>
IF: 4.777 (2014)
2. **Szalóki, N.**, Doan-Xuan, Q.M., Szöllösi, J., Tóth, K., Vámosi, G., Bacsó, Z.: High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry.
Cytometry A. 83 (9), 818-829, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22315>
IF: 3.066





További Közlemények

3. Doan-Xuan, Q., **Szalóki, N.**, Tóth, K., Szöllősi, J., Bacsó, Z., Vámosi, G.: FRET Imaging by Laser Scanning Cytometry on Large Populations of Adherent Cells.
Curr. Protoc. Cytom. Suppl. 70., 1-29, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/0471142956.cy0223s70>
4. Bodnár, A., Nizsalóczki, E., Mocsár, G., **Szalóki, N.**, Waldmann, T.A., Damjanovich, S., Vámosi, G.: A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: Localization, conformation and interactions.
Immun. Lett. 116 (2), 117-125, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2007.12.014>
IF: 2.858
5. Vámosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C., **Szalóki, N.**, Mocsár, G., Müller, G., Brázda, P., Waldeck, W., Damjanovich, S., Langowski, J., Tóth, K.: Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study.
Biophys. J. 94 (7), 2859-2868, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120766>
IF: 4.683

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,384

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkezés alapján szolgáló közleményekre): 7,843

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

Debrecen, 2015. 10. 07.

