

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Szalóki Nikoletta Margit**

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



**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2015**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**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**

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	3
1. BEVEZETÉS .....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	6
2.1. Fos és Jun család tagjai .....	6
2.2. A c-Fos és c-Jun szerkezete .....	7
2.3. A bázikus leucin cipzár kölcsönhatása a DNS-sel .....	8
2.4. A c-Fos és c-Jun fehérjék transzkripció aktivitásának szabályozása .....	9
2.5. A c-Fos és c-Jun transzkripció faktorok aktivációja .....	11
2.6. A Fos és Jun családba tartozó fehérjék patológiai vonatkozásai .....	12
2.7. Fluoreszcens fehérjék.....	14
2.8. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) .....	16
2.9. Az akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET mérés elméleti háttere.....	17
2.10. Intenzitás alapú FRET elméleti háttere .....	17
2.11. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) .....	18
2.12. Képképző fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópia (SPIM-FCCS).....	20
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	22
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	23
4.1. Pufferek, oldatok molekuláris biológiai módszerekhez .....	23
4.2. Sejtvonalak, sejtenyésztés.....	23
4.3. Plazmidok.....	24
4.4. Klónozás.....	25
4.5. FRET hatások meghatározása konfokális mikroszkóppal .....	27
4.5.1. Akceptor fotoelhalványítás módszer.....	28
4.5.2. Arányalapú módszer.....	28
4.6. FRET hatékonyság meghatározása áramlási citometriával.....	32
4.7. FRET hatékonyság meghatározása lézer pásztázó citométerrel (LSC) .....	32
4.8. Diffúziós állandó meghatározása fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (FCS)	33
4.9. Fluoreszcencia intenzitás kalibrálása FCS használatával .....	34
4.10. A kalibráció hordozhatóvá tétele .....	35
4.11. Endogén c-Fos és c-Jun fehérjék abszolút koncentrációjának meghatározása .....	35
4.12. Disszociációs egyensúly meghatározása citometriás FRET adatokból .....	36
4.13. Képképző fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópia .....	41
5. EREDMÉNYEK .....	44

5.1.	c-Fos-c-Fos és c-Fos-c-Jun dimerek FRET hatásfokának meghatározása konfokális mikroszkóppal .....	44
5.1.1.	Eredmények arányalapú módszerrel .....	44
5.1.2.	Akceptor fotoelhalványításos módszerrel kapott eredmények .....	47
5.2.	Koncentráció meghatározása a fluoreszcencia intenzitásból FCS-sel végzett kalibráció segítségével .....	48
5.3.	A c-Fos homoasszociációjának és DNS-hez kötődésének igazolása FCS-sel.....	51
5.4.	Endogén és transzfektált c-Fos és c-Jun fehérjék koncentrációjának meghatározása	54
5.5.	c-Fos-c-Jun heterodimer és a c-Fos homodimer disszociációs állandójának meghatározása .....	55
5.6.	c-Fos fehérjék homoasszociációja és DNS-hez való kötődése .....	62
5.7.	FRET kiértékelés szuboptimális mérési körülmények között.....	67
6.	MEGBESZÉLÉS.....	71
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	75
8.	SUMMARY .....	76
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	77
9.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke .....	77
9.2.	Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények.....	84
10.	TÁRGYSZAVAK.....	86
11.	KEYWORDS .....	86
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	87

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACF:	autokorrelációs görbe
AP-1:	aktivátor fehérje 1
ATF-2:	aktiváló transzkripció faktor 2
BR:	leucin cipzár bázikus régiója
BSA:	marha szérum albumin
bZIP:	bázikus leucin-cipzár
CCF:	keresztkorrelációs görbe
CRE:	ciklikus AMP válaszadó elem
CREB:	ciklikus AMP válaszadó elem-kötő fehérje
DAMIG:	szamár anti-egér immunglobulin
EGFR:	epidermális növekedési faktor receptor
EMSA:	elektroforetikus mobilitás shift assay
ERK:	extracelluláris szignál-regulált kinázt
FBS:	foetalis borjú szérum
FCS:	fluoreszcens korrelációs spektroszkópia
FCCS:	fluoreszcens keresztkorrelációs spektroszkópia
c-Fos <sup>215</sup> :	C végen 164 aminosavval lerövidített c-Fos fehérje
c-Fos <sup>ΔΔ</sup> :	DNS-kötő és dimerizációs domén nélküli c-Fos fehérje
FRET:	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
GDP:	guanozin difoszfát
GEF:	guanin kicserélő faktor
GFP:	zöld fluoreszcens fehérje
GTP:	guanozin trifoszfát
HBSS:	Hank-féle pufferált sóoldat
JNK:	Jun N terminális kináz
Kd:	disszociációs állandó
LB:	Luria-Bertani médium
LZ:	leucin cipzár
LSC:	Lézer pásztázó citométer
NFATc1:	aktivált T sejt nukleáris faktor, citoplazmatikus 1-es komponens
MAPK:	mitogén aktiválta protein kináz
mRFP1:	vörös fluoreszcens fehérje

PBS:	foszfát puffer oldat
PMT:	fotoelektron-sokszorozó cső
RB:	retinoblasztóma
ROI:	Kiválasztott terület (Region of interest)
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute médium
SIE:	Sis-indukálható enhanszer
SOC:	Super Optimal Broth with catabolite repression
SPIM:	Szelektív sík megvilágítású mikroszkópia
SPIM-FCCS:	Képkeltő fluoreszcens keresztkorrelációs mikroszkópia
SRE:	szérum válaszadó elem
STAT:	jeltovábbító és transzkripció aktivátor
TAE:	Tris-acetát-EDTA puffer
TBS:	TRIS puffer oldat
TE:	Tris-EDTA puffer
TGF $\beta$ :	transzformáló növekedési faktor béta
TPA:	tetradekanoil-forbol-acetát
TR $\alpha$ 1:	tiroid hormon receptor $\alpha$ 1
TRE:	TPA válaszadó elem
VEGF:	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

„Előbb csináld azt, ami szükséges, utána  
azt, ami lehetséges, és máris azt fogod  
csinálni, ami lehetetlen.”  
(Assisi Szent Ferenc)

## 1. BEVEZETÉS

A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok, melyek az aktivátor protein-1 (AP-1) családba tartoznak [1], különböző sejtfolymatok szabályozásában vesznek részt, mint például a sejtproliferáció, differenciáció, apoptózis és onkogenezis. A c-Fos és c-Jun család fehérjéi leucin cipzárral összekapcsolódó dimerként működnek és számos emlős gén promóter és enhanszer régióiban az AP-1 szabályozó elemeihez kötődnek [2]. A c-Jun fehérjék homodimert, illetve c-Fos fehérjékkel heterodimert alkothatnak [3]. Ezzel szemben korábban számos közleményben leírták, hogy az izolált c-Fos leucin cipzár *in vitro* nem alkot stabil homodimert [2-4]. Élő sejtben nem álltak rendelkezésre adatok a c-Fos homodimerizációval kapcsolatban. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a túltermelt mennyiségben jelenlevő c-Fos transzkripciós faktor képes-e homodimert alkotni, ugyanis egyes tumorok a c-Fos-t önmagában túltermelik [5, 6]. A dimerizáció létrejöttét fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) technikával konfokális mikroszkóp és áramlási citométer segítségével, illetve fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (FCS) vizsgáltuk élő HeLa sejtekben. Vizsgálatainkhoz ECFP-EYFP, illetve EGFP-mRFP1 donor-akceptor párral jelölt c-Fos, c-Jun fúziós fehérjéket, illetve ezek mutánsait használtuk. Dimer transzkripciós faktorok létrejöttének feltétele, hogy legyen asszociáció, ami függ a koncentrációtól és a disszociációs állandótól. Kidolgoztunk egy „FRET titrálási” módszert, melynek segítségével meghatároztuk a c-Fos–c-Jun heterodimerek és a c-Fos homodimerek disszociációs állandóját élő sejtekben. Emellett kidolgoztunk egy eljárást a fluoreszkáló transzfektált, és nem fluoreszkáló endogén fehérjék abszolút koncentrációjának mérésére élő sejtekben, amely koncentrációkat figyelembe vettük a disszociációs állandók meghatározásánál.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gének aktivitását szabályozó transzkripciós faktorok általában több szerkezeti elemből (doménből) álló fehérjék, amelyek igen változatos komplex kölcsönhatásokra képesek. Az egyes domének egy vagy több partnerrel való kapcsolat megteremtésére alkalmasak, tehát sok fehérjéből álló, változatos felépítésű és működésű szabályozó komplexek is kialakulhatnak [7]. A transzkripciós faktorok a DNS-kötő fehérjék nagyszámú és változatos osztályát alkotják, amelyek specifikus DNS szekvenciával rendelkező kötőhelyei a szabályozott gének promóter és enhanszer régióban találhatóak meg. Kritikus szerepet játszanak a transzkripció szabályozásában, ezáltal számos sejtleletani folyamatban, pl. a sejtfejlődésben, növekedésben és differenciációban. Ezért a transzkripciós faktorok abnormális kifejeződése, illetve nem megfelelő érése hozzájárulhat különböző betegségek kialakulásához, beleértve a fejlődési rendellenességeket és a rákos megbetegedéseket is [8].

### 2.1. Fos és Jun család tagjai

A Fos transzkripciós faktorok családjába tartozik a c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB és splice variánsai, például a FosB2 és  $\Delta$ FosB2. Ezek a Jun család tagjaival együtt (c-Jun, JunB és JunD) az AP-1 csoport fehérjéit alkotják, amelyek dimerizáció után a célgének promóter illetve enhanszer régióiban levő tetradekanoil-forbol-acetát (TPA) válaszadó elemhez (TRE, TGAC/GTCA) kötődnek [9]. A c-Fos egy 62 kDa tömegű fehérje, amely a c-Jun fehérjéjével heterodimert alkot [2]. A c-Jun fehérjék nemcsak heterodimert [10, 11], hanem homodimert is képesek alkotni [12], míg korábbi *in vitro* vizsgálatok szerint az izolált emlős c-Fos fehérje nem képes homodimert létrehozni és kötődni a DNS-hez egy másik protein, például a c-Jun fehérje jelenlétében [3, 4, 13]. Számos munkacsoport szerint a c-Fos fehérjék homodimerizációja valószínűleg a negatívan töltött aminosavak között fellépő tasztító erők miatt instabil [4, 14]. O'Shea és munkatársai mikromólos koncentrációban vizsgálták az izolált c-Fos leucin cipzár dimerizációját és meghatározták a disszociációs állandóját, ami 25°C-on 5,6  $\mu$ M-nak adódott. Szerintük más munkacsoportok azért nem tudtak eddig kimutatni c-Fos homodimerizációt, mert alacsony fehérje koncentrációban (0,1  $\mu$ M) mértek [15]. Nicklin és Casari elektroforetikus mobilitás technikával (EMSA) kimutatta, 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 konszenzus TRE-t *in vitro* [16]. A Fos-Jun család tagjai 18 különböző homo- és heterodimert képesek alkotni számos sejttypusban. A



fibroblaszt főleg Jun homodimert tartalmaz, amelyet a c-Jun-c-Jun és JunD-JunD homodimer hoz létre, de szérummal való kezelést követően először a c-Fos fehérjével, majd a FosB fehérjével alkot heterodimert, később pedig a Fra-1 a c-Junnal és a JunB-vel hoz létre dimert, amely meghatározóvá válik az AP-1 kötésben [17, 18]. A c-Fos-c-Jun fehérjecsald funkciója függ a sejtípustól, amelyben kifejeződnek, így a specifikus szignálok hatással vannak a fehérjecsald aktivitására és az általuk szabályozott célfehérjékre.

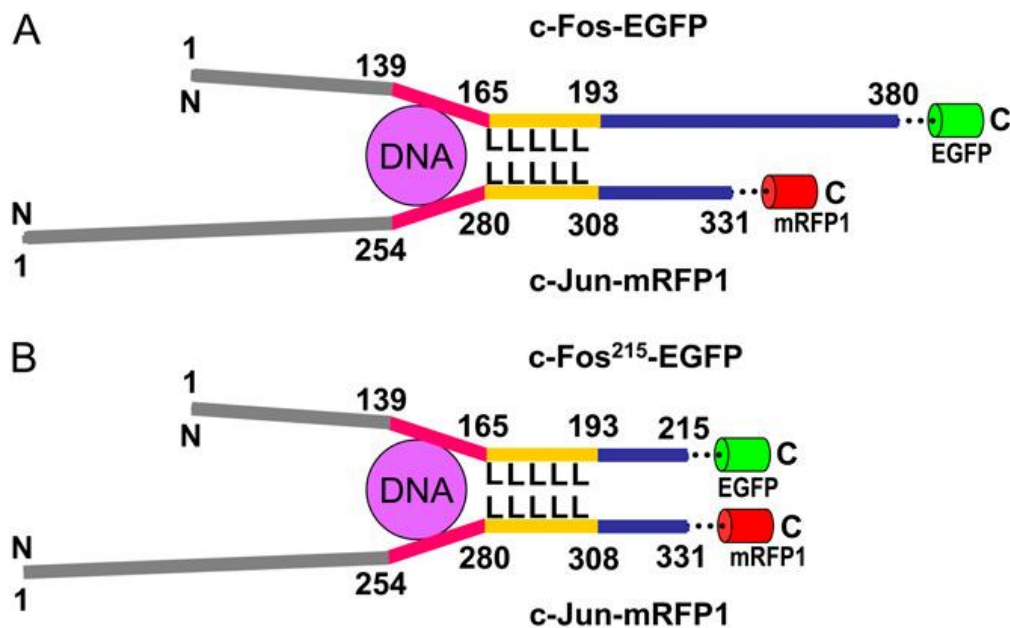
## 2.2. A c-Fos és c-Jun szerkezete

A c-Fos-c-Jun heterodimerek felépítését a 1/A. ábrán láthatjuk. A transzkripciós 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 (LLLLL) és a C-terminális doménből [19-21]. Newman és munkatársai tanulmányozták a bázikus leucin cipzár (bZIP) régiót tartalmazó fehérjék kötődési viszonyait és azt találták, hogy a c-Jun 13, míg a c-Fos 9 bZIP domént tartalmazó fehérjéhez képes kötődni [3, 22].

A bZIP régió körülbelül 55 aminosav hosszúságú, ami két szomszédos doménből áll, a bázikus régióból (BR) az N végen és a leucin cipzárból (LZ) a C végen. Az  $\alpha$  helikális szerkezetű, amfipatikus LZ domének egymáson körbetekeredve képesek a c-Fos és c-Jun között heterodimerizációt, illetve a c-Jun esetében homodimerizációt indukálni [2, 10]. Minden egyes heptádban lévő hét aminosavat betűkkel jelölnek, ABCDEFG, ahol a leucinok a D, a hidrofób aminosavak A, és a töltéssel rendelkező aminosavak az E és G pozícióban vannak [14]. Ez az elrendezés lehetővé teszi az A és D aminosavak közti hidrofób felület kialakulását, ami Van der Waals és hidrofób kölcsönhatások révén stabilizálja a cipzarat [23, 24]. A hidrofil aminosavak a vizes közeggel állnak kölcsönhatásban. Az E és G aminosavak közötti elektrosztatikus kölcsönhatások nem csak a stabilizálásért, hanem a specificitásért is felelnek. c-Fos esetén az E és G pozíciókban levő glutamátok között elektrosztatikus tasztító erő lép fel, ami destabilizálja a homodimert, de lehetővé teszi erős kölcsönhatás kialakulását a c-Jun azonos régiójában levő lizinnel, és így a heterodimer létrejöttét [25]. A BR domén szerkezete is  $\alpha$  helikális, amely a bázikus aminosavak (lizin, arginin) segítségével a DNS nagy árkába kötődik szekvensspecifikusan [26].

A korábbi krisztallográfias vizsgálatok csak a DNS-kötő és a dimerizációs domént tárták fel, nem adtak információt a C terminális régiókról, melyek szintén transzaktivációs funkcióval rendelkezhetnek [27]. Munkacsoportunk korábban a C-terminális domén konformációját vizsgálta. A C-terminális domén a teljes hosszúságú c-Fos fehérje esetén 164

aminosavval hosszabb a vad típusú c-Jun fehérjénél. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer vizsgálatokhoz létrehozták a C-végen lerövidített c-Fos<sup>215</sup> fehérjét (1/B. ábra), melyből a C-terminális domén utolsó 164 aminosavát eltávolították. FRET kísérletek alapján, a C végen elhelyezkedő fluoreszcens festékek közötti átlagos távolság a teljes hosszúságú c-Fos és c-Jun fehérjék esetében  $8 \pm 1$  nm, míg a c-Fos<sup>215</sup> és c-Jun fehérjék között  $6,1 \pm 1$  nm. A C végen megrövidített c-Fos<sup>215</sup> fehérje alkalmasabb a dimerizáció FRET technikával történő vizsgálatára, mert a rövidebb C terminális domén miatt a két autofluoreszcens fehérje közelebb kerülhet egymáshoz [21].



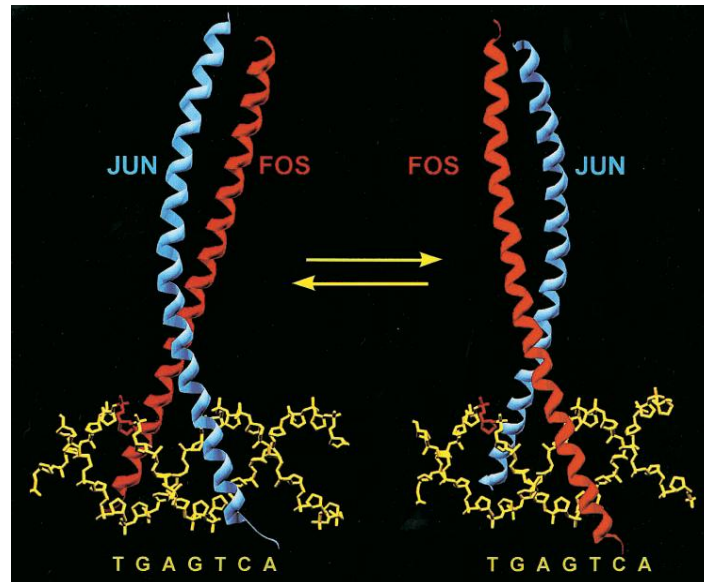
**1. ábra: c-Fos–c-Jun heterodimer sematikus ábrázolása**

Dimer szerkezet balról jobbra: N-terminális transzaktivációs domén, DNS-kötő domén, leucin cipzárral rendelkező dimerizációs domén, C-terminális domén, 5–7 aminosav hosszúságú összekötő szakasz és a fluoreszcens fehérje. **(A)** A teljes hosszúságú c-Fos-EGFP fehérje C terminális régiója 164 aminosavval hosszabb, mint a c-Jun-mRFP1. **(B)** c-Fos<sup>215</sup>-EGFP fehérje lerövidített C terminálisa ugyanakkora, mint a c-Jun-mRFP1-é [21].

### 2.3. A bázikus leucin cipzár kölcsönhatása a DNS-sel

A TRE konszenzus szekvenciához kötődő c-Jun-c-Fos heterodimer szerkezetét 1995-ben publikálták [26]. A 2. ábrán látható, hogy mind a két fehérje  $\alpha$  hélixet alkot és a bázikus régió specifikus hidrogénkötéseket és Van der Waals kölcsönhatásokat alakít ki a DNS-sel. Mivel a transzkripciós faktorok DNS-kötő és dimerizációs doménje igen konzervált, a c-Fos

és c-Jun család tagjainak is hasonló DNS-kötő és dimerizációs tulajdonságaik vannak [3]. 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* [11, 28].



**2. ábra: c-Fos–c-Jun heterodimer kötődése az AP-1 kötéshelyhez**

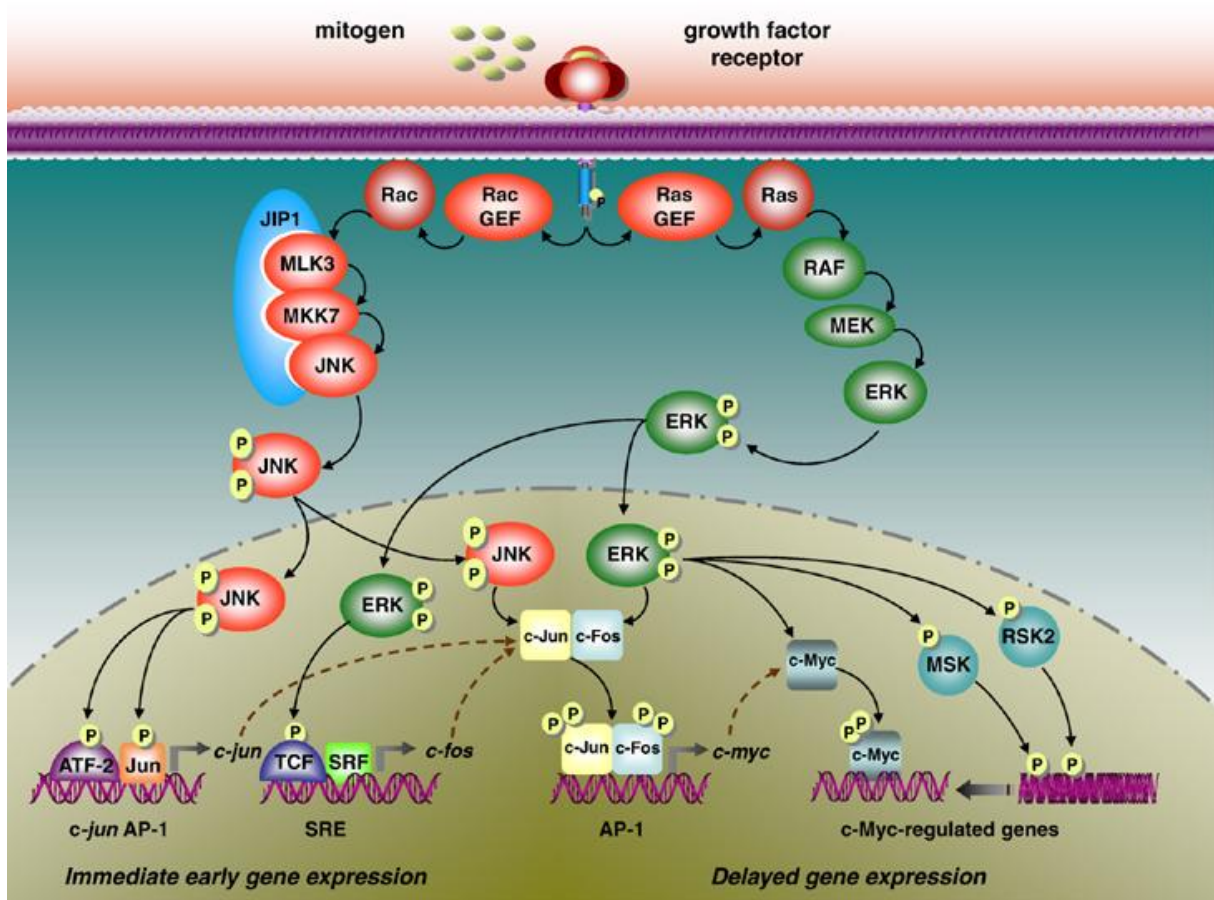
A c-Fos–c-Jun heterodimer kétféle orientációban tud bekötődni az aszimmetrikus AP-1 kötéshelyhez. A két helyzet a komplex tengelyéhez képest 180°-kal el van forgatva [26].

#### 2.4. A c-Fos és c-Jun fehérjék transzkripciós aktivitásának szabályozása

A c-Fos és c-Jun a korai válasz gének közé tartoznak, átíródásuk a sejt stimulációja után, *de novo* fehérje szintézistől függetlenül, gyorsan indukálódik. A c-Jun alapszinten folyamatosan kifejeződik, amíg más jelek hatására tovább nem indukálódik. Aktiváció során a c-Jun saját promóter régiójában levő AP-1 kötéshelyhez kapcsolódik, majd tovább növeli saját indukcióját, amikor egy másik transzkripciós faktorhoz, az aktiváló transzkripciós faktor 2-höz (ATF-2) kapcsolódik [29, 30]. A c-Fos transzkripcióját az Elk-1 és ciklikus AMP válaszadó elem-kötő fehérje (CREB) /ATF transzkripciós faktorok szabályozzák [31]. Emellett a promóter régiójában megtalálhatók a szérum válaszadó elem (SRE) és a jeltovábbító és transzkripciós aktivátor (STAT) kötéshelyei is [32].

A c-Fos és c-Jun aktivációjában számos receptor, citokin és aktivátor vesz részt, többek közt G fehérjéhez kapcsolt receptorok, transzformáló növekedési faktor béta (TGF $\beta$ ), növekedési faktor receptorok (EGFR), illetve ultraibolya sugárzás és onkofehérjék (Ras) is [30, 31, 33]. A c-Fos és c-Jun fehérjék aktiválódásának fő útvonalát mutatja a 3. ábra. A

növekedési faktorok hatásukat a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalon fejtik ki. Ha a növekedési faktorok tirozin kináz aktivitással rendelkező receptorokhoz kötődnek, előidézik azok dimerizációját és a citoplazmatikus végen levő tirozin oldalláncok transzfoszforilációját. A GRB2 adaptor fehérje SH2 doménje a foszforilált tirozin oldalláncokat, míg SH3 doménje prolinban gazdag régiókat ismer fel, így hozzákötődik a következő adaptor fehérjéhez, az SOS-hez, ami egy guanin kicserélő faktor (GEF). A membránnál lévő SOS elősegíti a Ras-hoz kötött GDP kicserélődését GTP-re, amivel a Ras fehérje aktiválódni fog.

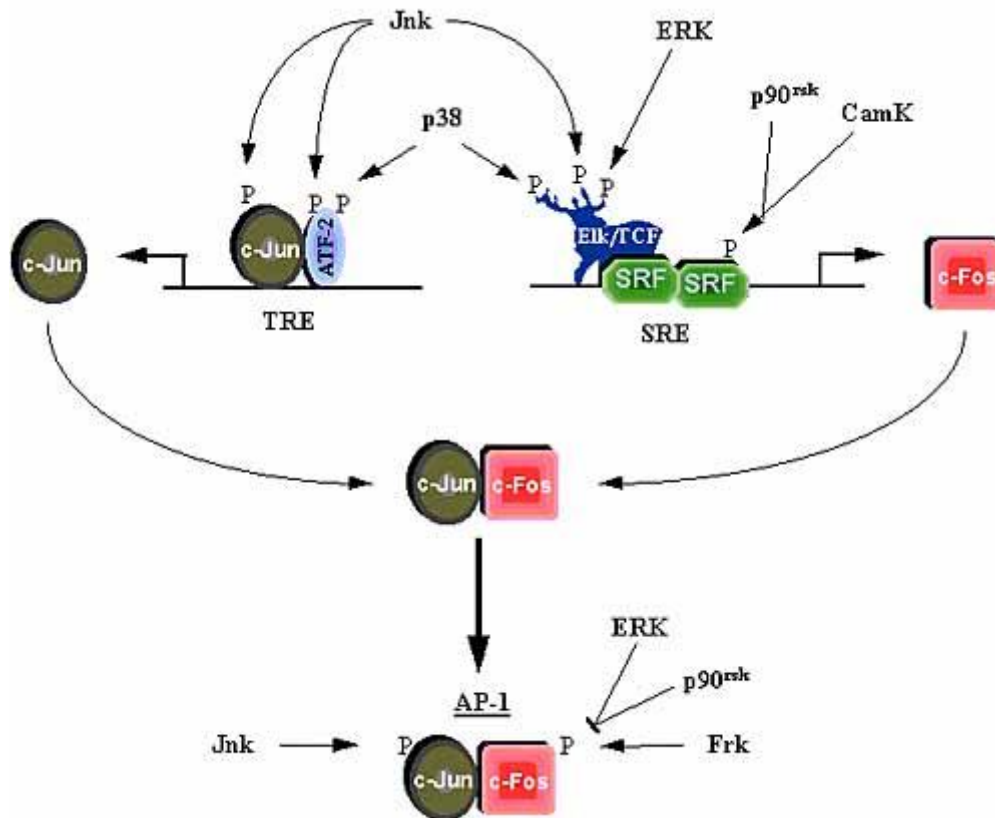


**3. ábra: A MAP kináz jelátviteli útvonal főbb lépései**

Mitogén stimuláció hatására a tirozin kináz aktivitással rendelkező növekedési faktor receptorok Ras és Rho családba tartozó kis GTP-ázokat aktiválnak, majd a jel több foszforilációs lépésen keresztül eljut a MAP kinázig, ami a sejtmagba jut, és génátíródást szabályoz [34].

A Ras egy kis GTPáz, ami a Raf (MAP kináz kináz kináz) konformáció változását idézi elő, majd az így aktivált Raf foszforilálja a MEK fehérjét (MAP kináz kináz). Az aktivált MEK foszforilálja a Jun N terminális kinázt (JNK)-t illetve az extracelluláris szignál-regulált kinázt

(ERK=MAP kináz) (4. ábra). Az aktivált MAP kináz a sejtmagba jut, ahol számos transzkripciós faktort foszforilál és aktivál, többek között a c-Jun és c-Fos fehérjéket is [35]. A c-Jun aktivációja esetén az aktivált JNK foszforilálja a c-Jun szabályozó régiójának a 63-as és 73-as pozíciójában levő szerineket [36]. A c-Fos szabályozó régiójának aktiválásához az ERK foszforilálja a 232-es treonint [37].



**4. ábra: Az AP-1 a MAP kináz jelátviteli útvonalak egyik szabályozó pontja**

A transzkripciós faktorok lehetséges módosításait a kinázoktól a faktorok felé mutató nyilak jelzik. A JNK a c-Jun, míg az ERK a c-Fos aktivációját segíti elő [38].

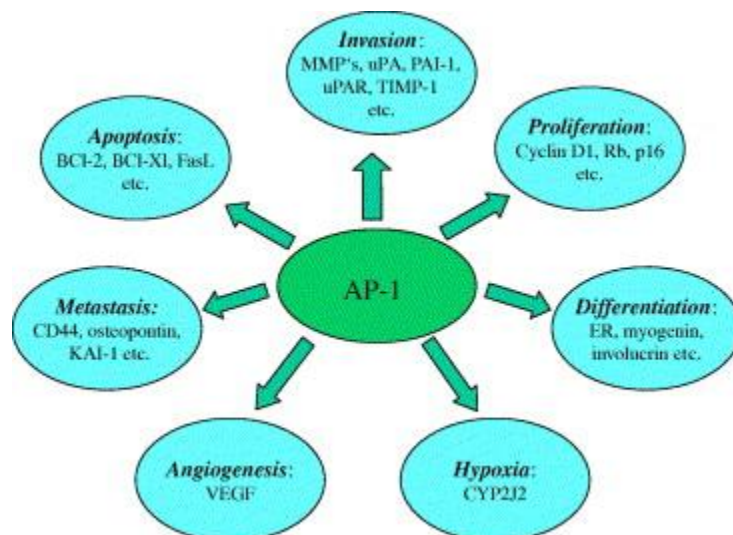
## 2.5. A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok aktivációja

A c-Fos és c-Jun aktivációja számos receptor, citokin és aktivátor hatására bekövetkezhet. Ide tartoznak a G fehérjéhez kapcsolt receptorok, az interleukin-1 receptor, a TNF $\alpha$ , a növekedési faktor receptorok (VEGF, EGFR), a szérum, az UV sugárzás és az onkofehérjék, úgymint a v-Src vagy a Ras [31]. Számos cisz szabályozó elem (DNS szakasz) közvetít c-Fos indukciót neurotranszmitterek és polipeptid hormonok által aktivált cAMP- és Ca<sup>2+</sup>-függő jelátviteli útvonalakon keresztül [39]. c-Fos regulátorként működik a Sis-indukálható enhanszer (SIE), amelyet a STAT ismer fel [40]. Plateroti és munkacsoportja kimutatta, hogy a c-Fos expresszió a tiroid hormon magreceptor  $\alpha$ 1-en (TR $\alpha$ 1) keresztül is

szabályozható, amely béltumort indukálhat [6]. Gyors és tranziens c-Fos transzkripció váltható ki növekedési faktorok, citokinek által stimulált sejtosztódás esetén [41, 42]. A 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 transzkripció szint 2 órán belül visszatér az alapszintre [43].

## 2.6. A Fos és Jun családba tartozó fehérjék patológiai vonatkozásai

A plazmamembránon keresztül történő jelátvitel fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül valósul meg, ami a transzkripciós faktorok aktivitásához is vezethet. Az AP-1 által aktivált vagy inaktivált gének számos folyamatot szabályoznak, például a differenciációt, proliferációt, a sejtek túlélését, a hipoxiára adott választ, az angiogenezist és az apoptózist [3, 29, 44].



### 5. ábra: AP-1 által szabályozott folyamatok

Az AP-1 általa szabályozott gének fontos szabályozói az invázióknak és a metasztázisnak, a proliferációnak, a differenciációnak és az apoptózisnak, a hipoxiás válasznak és az angiogenezisnek [9].

Az AP-1 specifikus hatása függ attól, hogy mely fehérjék alkotják a dimert, a dimer mely gének szabályozó régiójához kötődik, ott milyen további, a DNS-hez kötődő transzkripciós faktorokkal, aktivátorokkal hat kölcsön, és ezáltal aktiválja vagy gátolja a transzkripciót [45]. Egy adott dimer kötődése függ a promóter/enhanszer régió szerkezetétől. Napjainkban számos tanulmányban vizsgálták ezen transzkripciós faktorokat és tumor



típusonként változó hatást tapasztaltak. Például a Fra-1 túltermelődése megnöveli az emlőtumor és végbéltumor sejtek motilitását és invázióját, de gátolja méhnyakrák sejtek esetén a tumorigenitást [9]. Emlőtumor esetén kimutatták, hogy a c-Fos, a Fra-1 és a Fra-2 indukálja az oszteopontin, trombospondin és CD44 kifejeződését, amik a humán emlőtumorsejtek metasztázisában vesznek részt [46]. Emlő karcinómában a FosB és Fra-1 tumorszupresszorokkal kapcsolódik: a FosB a retinoblasztómával (Rb), míg a Fra-1 a p21 ciklin-dependens kináz inhibitor fehérjével [47]. Méhnyakrákban a Fra-1 transzkripciós faktornak tumorszupresszor hatása van. Tumorképző sejtekben a c-Jun dimer partnere a c-Fos volt, míg nem tumorigén sejtek esetén a Fra-1 [48]. Szájüregi rák esetén a c-Fos az esetek túlnyomó többségében JunD-vel alkot heterodimert [49]. Alt és munkatársai kimutatták, hogy a túltermelt c-Fos a ciklin D1-et a sejtmagban tartja, megakadályozva ezzel, hogy a glikogén szintetáz kináz 3 foszforilálja, ezáltal degradálja azt. A sejtmagban folyamatosan jelenlevő ciklin D1 tumor növekedést indukál, és transzformáló hatással bír [50]. Kovary és Bravo kimutatták, hogy a c-Fos jelenléte elengedhetetlen a G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> átmenethez, illetve a c-Fos fehérje indukálhatóságának elvesztése a transzkripció gátlásához vezet [17]. A c-Fos/NFATc1 útvonal a csontreszorpció kulcsfontosságú szabályozója, és a túlzott oszteoklaszt irányú differenciálódással járó csontbetegségek potenciális célpontja lehet [51]. Johnston és munkatársai néhány tamoxifen-rezisztens emlőtumorban megnövekedett c-Fos overexpressziót mutattak ki [5].

c-Jun-nak a normális sejtnövekedésben van szerepe: csökkenti a p53 tumorszupresszor és szubsztrátja, a p21 kifejeződését azáltal, hogy képes bekötödni a p53 fehérje promóter régiójába, így meggyorsítja a sejtosztódást [52]. Míg a c-Jun aktiválja, addig a JunB gátolja a ciklin D1 transzkripcióját; G<sub>1</sub> fázis kezdetén a c-Jun foszforilációja és a JunB szintjének csökkenése és megnöveli a ciklin D1 transzkripcióját [53]. Azokban a fibroblasztokban, ahol a c-Jun-t kiütötték, a ciklin D1 alig aktiválódik, ami a G<sub>1</sub>-S fázis átmenet nem megfelelő progressziója következtében a sejtciklus terminálódásához vezet [54]. A JunB dimerizációs hajlandósága alacsonyabb és DNS-kötő aktivitása is gyengébb, mint a c-Jun-é, ezért a JunB kevésbé hatásos transzkripciós aktivátor [55]. A JunD túltermelődése lelassítja a fibroblasztok proliferációját és G<sub>1</sub> fázisban tartja őket [56], ezért a sejtosztódás egyik gátlójaként tartják számon.

## 2.7. Fluoreszcens fehérjék

A fluoreszcens fehérjék fejlesztése körül-belül húsz évvel ezelőtt kezdődött el, amikor először használták az *Aequorea victoria* medúzából izolált zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) [57]. Később az eredeti fehérje néhány aminosavát megváltoztatták, amivel számos új változatot állítottak elő, amelyeknek megváltozott a színe, gyorsabb lett az érésük, nagyobb fotostabilitást mutattak és a pH-tól való érzékenységük is csökkent, de a fejlesztés napjainkban is folytatódik. Medúza mellett más organizmusokból is izoláltak fluoreszcens fehérjéket, ilyen például a DsRed, amit egy korallban (*Discosoma* sp.) találtak [58]. Ez a fehérje tetramer szerkezetű és lassú az érése is, így mutációkat indukáltak, hogy kedvezőbb tulajdonságú fehérjéket hozzanak létre. Az elsőgenerációs monomer vörös fehérje az mRFP1 volt [59], melynek érése tízszer gyorsabban megy végbe, mint a DsRed-é, azonban a fotostabilitása és a kvantumhatásfoka alacsonyabb. Az egyik legjobb vörös fluoreszcens fehérjeként tartják számon az mCherry-t, aminek az mRFP-hez képest nagyobb a fényessége és a fotostabilitása is jobb [60].

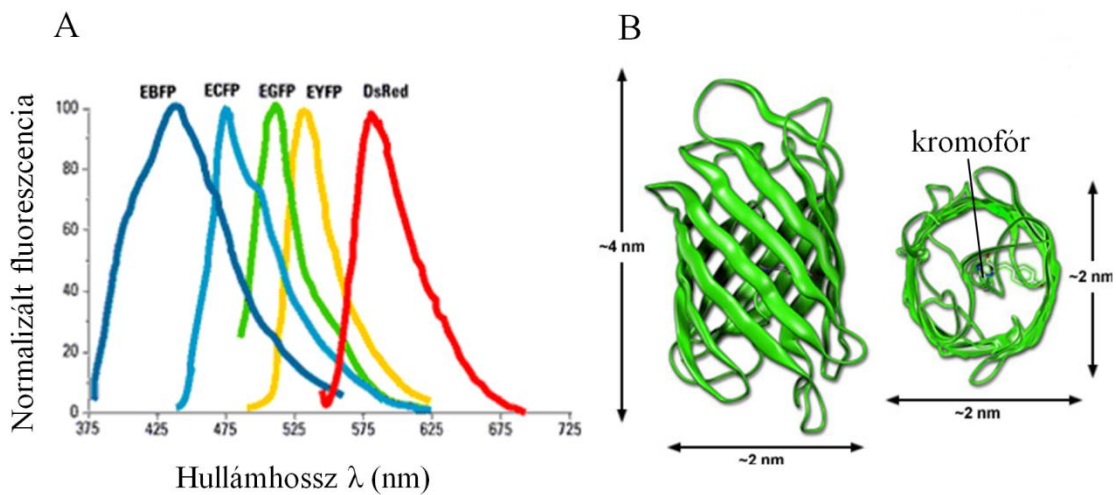
Fehérje	Gerjesztési maximum (nm)	Emissziós maximum (nm)	EGFP-hez viszonyított relatív fényesség (%)
kék fluoreszcens fehérje (EBFP)	402	457	99
cián fluoreszcens fehérje (ECFP)	433	475	39
zöld fluoreszcens fehérje (EGFP)	488	507	100
sárga fluoreszcens fehérje (EYFP)	514	527	151
monomer vörös fluoreszcens fehérje (mRFP1)	584	607	37
monomer Cherry fehérje (mCherry)	587	610	47



### 1. táblázat: Fluoreszcens fehérjék néhány spektroszkópai tulajdonsága

A leggyakoribb fluoreszcens fehérjék gerjesztési és emissziós maximuma és EGFP-hez viszonyított relatív fényessége [61-63]. A relatív fényességet a kvantumhatásfokból és az extinkciós együtthatókból határozták meg.

A változatok, mint a kék (BFP), a cián (CFP), a sárga (YFP) és a vörös fluoreszcens fehérjék (DsRed, mRFP1, mCherry) a látható spektrum széles tartományát lefedik (6A ábra) [62, 63]. A GFP szerkezetét a 6B ábra szemlélteti, ahol a közepén elhelyezkedő kromofórt egy 11 db béta redős lemezből álló hordó veszi körül, amely 3 nm széles és 4 nm magas. Ez a hordó védi meg a fluoreszcenciáért felelős kromofórt a környezeti hatásoktól.



6. ábra: Néhány fluoreszcens fehérje emissziós spektruma és a GFP szerkezete

A.) BFP, CFP, GFP, YFP és DsRed emissziós spektruma [64]. B.) Az *Aequorea victoria* medúzából izolált zöld fluoreszcens fehérje szerkezete [65].

A fluoreszcens fehérjékre jellemző egyik fotofizikai tulajdonság, hogy fluoreszcenciájuk ki-be tud kapcsolni a vizsgálat során, amit az irodalomban „pislogás”-nak (blinking, flickering) hívnak. A fluoreszcens állapotból nem-fluoreszcens állapotba tartó átmenet időtartama mikroszekundum-perc skálán változik [66]. Ez a folyamat leginkább egyedi molekula érzékenységgű módszerekkel vizsgálható. A fluoreszcens fehérjék képesek reverzibilis protonációra, mely során az abszorpciós spektrumuk megváltozik, a GFP és az YFP sötét állapotba kerül [67, 68]. A sötét állapot mennyisége függ az oldat pH-jától [67]. Az EGFP-vel ellentétben az mRFP1 gyakrabban és hosszabb ideig van sötét állapotban, ha a pH

értéke a lúgos tartományba tolódik [69 ], míg a DsRed esetén ilyen hatást nem igazoltak [70]. A vörös fehérjék spektruma jól elkülönül a GFP-étől és a sejtek autofluoreszcenciája kisebb ebben az emissziós tartományban, viszont a GFP-hez képest jelentős részük kerül sötét állapotba [69].

Az irodalomban leggyakrabban használt FRET párok az ECFP-EYFP ( $R_0=4,9$  nm [71]) illetve az EGFP-mRFP1/mCherry ( $R_0=4,7$  nm [59, 72]), mert a legtöbb műszeren elérhető lézerekkel jól gerjeszthetőek. Az autofluoreszcens fehérjék nagy előnye, hogy az őket kódoló DNS plazmid formájában transzfekcióval az élő sejtekbe juttatható és a kromofór eloszlása a sejtet károsító hatások nélkül vizsgálható.

## 2.8. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

FRET egy sugárzásmentes dipól-dipól kölcsönhatás, mely során az energia a gerjesztett donor molekuláról egy megfelelő orientációjú, nem feltétlenül fluoreszcens akceptor molekulára tevődik át. A folyamat egyik alapfeltétele, hogy a két molekula 2-10 nm távolságban legyen egymástól [73]. A folyamat feltételei még, hogy a donor emissziós és az akceptor gerjesztési spektruma egymással kellően átfedjen, illetve a molekulák relatív orientációja megfelelő legyen [74, 75].

A FRET sebességi állandóját az alábbi egyenlet írja le:

$$k_{FRET} = konst \cdot J \cdot n^{-4} \cdot k_f \cdot R^{-6} \cdot \kappa^2 \quad (1)$$

ahol  $J$  a donor emissziós és az akceptor gerjesztési spektrumainak átfedési integrálja,  $n$  a közeg törésmutatója,  $k_f$  a donor fluoreszcencia átmenet sebességi állandója,  $R$  a két molekula távolsága és  $\kappa^2$  a donor és akceptor molekulák relatív orientációját leíró faktor. A  $\kappa^2$  értékét 2/3-nak tekintjük, ha a molekulák gyorsan forognak és orientáltságuk kiátlagolódik, vagyis véletlenszerű lesz [76, 77]. Ilyenkor a FRET sebességi állandója a spektroszkópiai paramétereken kívül csak a két molekula távolságának a függvénye.

A FRET hatásfok ( $E$ ) megadja azon gerjesztett donor molekulák hányadát, amelyek FRET révén relaxálódnak.  $E$  a donor és akceptor molekulák távolságának hatodik hatványával csökken:

$$E = \frac{1}{(1 + R/R_0)^6} \quad (2)$$

ahol  $R_0$  (Förster távolság) az a távolság, amelynél a FRET hatásfok 50%. Mivel a FRET érzékenyen függ a távolsági viszonyoktól, ezért molekuláris vonalzóként használható az intra- és intermolekuláris távolságok meghatározására [78].

A FRET hatással van a donor és az akceptor fluoreszcencia számos paraméterére, amelyek segítségével az  $E$  meghatározható [79, 80]. A donor fluoreszcencia élettartama és kvantumhatásfoka csökken, ami a donor fluoreszcenciájának csökkenését okozza (donor quenching), míg az akceptor emissziója megnő (szenzitizált emisszió).  $E$  meghatározható a donor vagy az akceptor festék fotoelhalványításával is (photobleaching) [81-84].

## 2.9. Az akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET mérés elméleti háttere

Az akceptor fotoelhalványítás egy önkontrollos FRET módszer [85]. Mérés során meghatározzák a donor molekula intenzitását akceptor jelenlétében ( $F_{DA}$ ), majd az akceptort nagy intenzitású lézerral kiégetik. Ezáltal megszűnik az akceptor abszorpciós képessége és az akceptor kiégetése után mért donor intenzitás megfelel az akceptorral nem jelölt minta ( $F_D$ ) intenzitásának [85-87]. A donor fluoreszcencia növekedése arányos a FRET hatásfokkal:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (3)$$

A technika előnye, hogy a mérés és az adatok kiértékelése gyors és egyszerű. Hátrányai közé tartozik, hogy az akceptor elhalványítása időigényes és visszafordíthatatlan folyamat, illetve nem alkalmas nagy mobilitású fehérjekomplexek vizsgálatára [88], mivel a kiégetés során a vizsgált objektum elmozdul. A donor nem kívánt, illetve az akceptor nem tökéletes kiégetése a folyamat alatt a FRET hatásfok alulbecslésével jár [89]. Az akceptor kiégetése a donor hullámhosszán is emittáló fototerméket eredményezhet, ami fals pozitív eredményt adhat. A fenti problémák a kiértékelés során megfelelő kontrollok használatával korrigálhatók, ehhez szükség van egyszeresen jelölt donoros, illetve akceptoros mintára is [82]. Az egyszeresen jelölt donoros minta használatával a donor nem kívánt kiégetésének mértékét tudjuk megállapítani, míg az akceptoros minta segítségével meghatározható az akceptor illetve az akceptor fototermék átvilágítása a donor csatornába.

## 2.10. Intenzitás alapú FRET elméleti háttere

Az intenzitás alapú FRET módszerrel molekuláris kölcsönhatások követhetőek nyomon. A FRET mérés gyorsabban kivitelezhető, mint az akceptor fotoelhalványítás technikával, és a mérés során a fluorofórok nem veszítik el fluoreszcens tulajdonságukat [90, 91]. Mivel ez a

módszer minimálisan destruktív, élő, nem fixált sejtek is vizsgálhatók, illetve fiziológiai folyamatok időbeni követésére is van lehetőség. Az intenzitás alapú technikával három csatorna (donor, transzfer és akceptor) jelét detektálják. A csatornák közötti átvilágítási korrekciós faktorok meghatározása után lehetővé válik a tiszta donor és akceptor intenzitások, illetve a FRET hatásfok pixelenkénti, illetve sejtenkénti meghatározása mikroszkóppal [92] vagy áramlási citométerrel [93]. Az áramlási citometriás technikát nagy statisztikai pontosság jellemzi [91, 94, 95], míg a képalkotó mikroszkópia segítségével a fluoreszcensen jelölt molekulák expressziójának és kölcsönhatásának sejten belüli eloszlását lehet detektálni *in situ* [92].

A módszer használatához szükséges tudni a megegyező számú donor, illetve akceptor festékből eredő fluoreszcencia intenzitást, amit elég nehéz meghatározni, ha a két fehérje egymástól függetlenül fejeződik ki. A megoldás a fluoreszcens fehérjékből álló fúziós fehérje használata, melyben a donor (ECFP/EGFP) és akceptor (EYFP/mRFP1) között egy néhány aminosavas linker található, és így a két festék egyetlen polipeptid láncként egyenlő számban fejeződik ki ugyanazon promóterről.

## 2.11. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

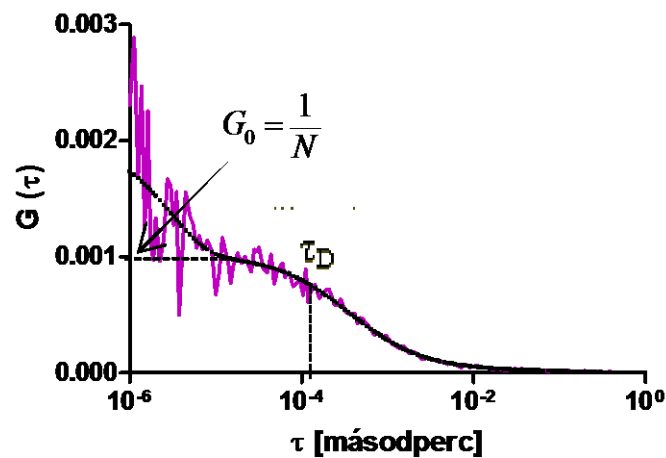
Az FCS használatával lehetővé válik fluoreszcensen jelzett intracelluláris molekulák dinamikájának detektálása oldatban vagy élő sejtekben nM-os, illetve annál kisebb koncentrációtól [96]. A mérés során egy konfokális mikroszkóp szubfemtoliteres detektálási térfogatában a keresztüldiffundált fluoreszcensen jelzett molekulák fluoreszcencia fluktuációját mérjük. Az  $F(t)$  intenzitás időfüggő fluktuációjából meghatározható az autokorrelációs függvény ( $G(\tau)$ ).

Ha a diffúzió kívül más folyamat nem járul hozzá a fluoreszcencia intenzitás fluktuációjához, akkor a normalizált autokorrelációs függvényt (ACF) három dimenzióra a következő egyenlet írja le:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} \quad (4)$$

ahol  $t$  a mérési időt, a  $\langle \rangle$  zárójel időbeli átlagolást,  $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$  a fluoreszcencia pillanatnyi értékének átlagtól való eltérését jelöli. A  $\tau$  a késleltetési idő (lag time), az átlagolást pedig minden  $t$ ,  $t+\tau$  értékre elvégezzük.  $\tau_D$  a diffúziós idő, ami a diffundáló részecskék által átlagosan az érzékeny térfogatban eltöltött időt jelenti. A  $G(\tau)$  függvény

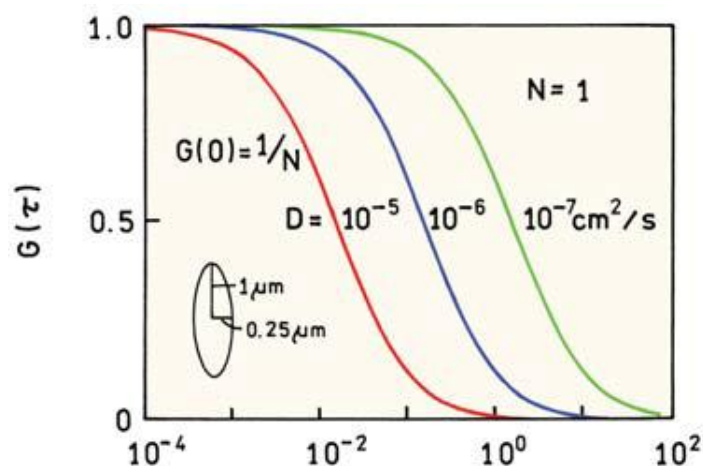
amplitúdója az érzékeny térfogatban átlagosan jelenlévő részecskék számának ( $N$ ) reciproka [97-99].  $S$  az ellipszoid alakú érzékeny térfogat axiális ( $\omega_z$ ) és laterális ( $\omega_{xy}$ ) sugarának hányadosa. Az átlagos intenzitás és a részecskeszám hányadosa- ( $F/N$ ) megadja az együttdiffundáló egységek specifikus fluoreszcenciáját, tehát arányos az aggregátumokat alkotó molekulák számával, az aggregáció fokával. Az autokorrelációs görbe különféle diffúziós modellekkel illeszthető meg, amiből megkaphatjuk a komponensek diffúziós idejét és az érzékeny térfogatban levő részecskeszámot is (lásd Anyagok és Módszerek).



**7. ábra: Az EGFP fehérje autokorrelációs görbéje**

A fluoreszcencia intenzitás jelek korrelációját kiszámítja a hardver korrelátor. A görbe a diffúziós időről, így a diffúziós állandóról, és az érzékeny térfogatban levő részecskeszámról is tartalmaz információt.

Az FCS technika alkalmas molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára is, így kimutatható, ha egy fehérje más fehérjékhez vagy a DNS-hez kötődik. Ha a fluoreszcensen jelölt molekula a sejtben hozzákötődik egy nagyobb makromolekulához, akkor a diffundáló részecske tömege megnő, ezáltal a mobilitását jellemző diffúziós állandó szignifikánsan csökken, a diffúziós ideje megemelkedik.



**8. ábra: Három különböző diffúziós állandójú részecske szimulált autokorrelációs függvénye [100], ahol a diffúziós állandó  $10^{-5}$ - $10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  között változik. Az érzékeny térfogat ellipszoid alakú, 0,25 és 1  $\mu\text{m}$ -es  $e^{-2}$  sugarakkal.**

Az FCS kétszatórnás változata, a fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) esetén két, az érzékeny térfogatokban diffundáló molekula együttes mozgását detektáljuk, ahol a két érzékeny térfogat egymással átfed. Mérés során a két molekulát spektrálisan eltérő fluorofórokkal jelöljük meg, fluoreszcencia fluktuációjukat két különböző csatornában detektáljuk. A keresztkorrelációs függvény definíciója [101]:

$$G_x(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \cdot \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \cdot \langle F_j(t) \rangle} \quad (5)$$

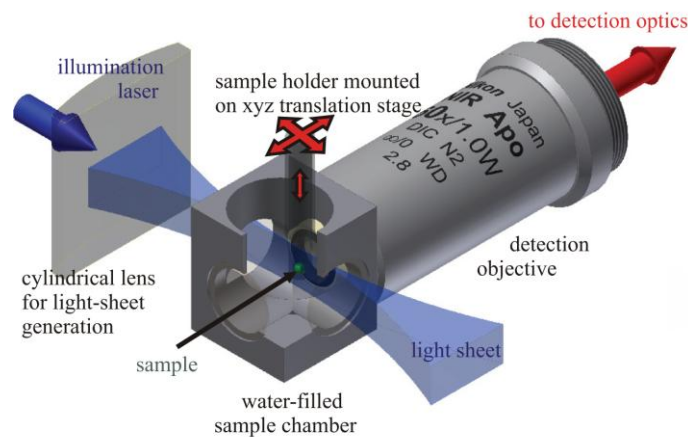
ahol  $F_i$  és  $F_j$  a két molekula külön csatornában mért fluoreszcencia intenzitása. Ha a két részecske összekapcsolódik, és együtt mozog, a két fluoreszcencia fluktuáció korrelál egymással és a generált keresztkorrelációs görbe amplitúdója nullától különböző. A keresztkorrelációs és autokorrelációs függvények amplitúdóinak hányadosából megbecsülhető az asszociált molekulák hányada.

## 2.12. Képkalkotó fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópia (SPIM-FCCS)

A szelektív sík megvilágítású mikroszkópban (SPIM) egy hengerlencsével vékony diffrakció-limitált fénysíkot hoznak létre a mintában a detektáló objektív fókuszsíkjában. Ez a széles látómezejű megvilágításhoz képest vékonyabb detektálási térfogatot hoz létre. A mintára eső gerjesztő fény mennyisége is jelentősen lecsökken, ami csökkenti a fototoxicitást

mértékét. A SPIM a gerjesztett molekulák emisszióját a teljes fókusz síkban egyszerre rögzíti egy kamera segítségével, míg a konfokális rendszerek egyszerre csak adott pontban (vagy esetleg pontokban, illetve vonal mentén) detektálnak [102].

A SPIM-FCCS a klasszikus FCCS továbbfejlesztett változata, melyben a SPIM mikroszkóp által megvilágított  $\sim 2 \mu\text{m}$  vastagságú optikai szeletben gerjesztett fluorofórok objektívvel összegyűjtött fluoreszcens fotonjait egy gyors CCD kamera  $\sim 500$  mikroszekundumos gyakorisággal rögzíti.



### 9. ábra: SPIM sematikus ábrája

Néhány mikrométer vastagságú szeletben gerjesztjük a mintát. A detektálás a gerjesztésre merőlegesen történik [103].

Eltérően a konfokális FCS-től, SPIM-FCCS esetén képi információt is kapunk a fluorofórok eloszlásáról és (ko)mobilitásáról. Minden egyes pixelre ki tudjuk számolni az auto- és keresztkorrelációs görbéket és különböző diffúziós modellek szerint elemezhetjük őket. SPIM-FCCS technikával sejtenként nagyon jó statisztikát kaphatunk. Emellett csökken a fotoelhalványítás és a fototoxicitás mértéke is, mivel csak a megvilágított síkban levő fluorofórok gerjesztődnek. A technika hátránya az, hogy a detektálási térfogatelem mérete nagyobb, mint a konfokális FCS/FCCS esetében, de többnyire a vizsgált fehérjék mobilitása sejtekben elég alacsony ahhoz, hogy megbízható információt adjon.

A technika első alkalmazási területei közé tartozik az embriológia területe [102] és a sejtmagfehérjék kölcsönhatásainak vizsgálata [103].

### 3. 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 transzkripció faktor jelentősége ösztönzött minket a c-Fos homodimerizáció jelenségének alaposabb vizsgálatára.

Munkánk alapvető célkitűzései, illetve vizsgálni kívánt kérdései ezek alapján a következők voltak:

- Alkot-e a c-Fos transzkripció 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 c-Fos homo- és heterodimerek a kromatinhoz?
- Hogyan lehet szuboptimális gerjesztési hullámhosszakkal mért FRET adatokat kiértékelni?



## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Pufferek, oldatok molekuláris biológiai módszerekhez

Puffer/oldat neve	Összetevők	pH
BSA/Tween	2% BSA, 0.1% Tween TBS-ben	7,4
Formaldehid	3.7% PBS-ben	7,4
HBSS	1mM CaCl <sub>2</sub> , 5.36mM KCl, 0.44mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 136.9mM NaCl, 0.75mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 0.33mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 5.55333mM D-glükóz, 10nM Hepes	7,4
LB médium	20 g/l LB	7,0
LB agar	20/l g LB, 16 g/l agar	7,0
10x PBS	1.5 M NaCl, 32.18 M KCl, 85.96mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 16.9mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8
SOC	10 mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 20mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 20 g/l LB, 20 mM glükóz	7,0
50x TAE	242 g/l TRIS, 57.1 ml/l ecetsav, 14.61 g/l EDTA	8,5
TBS	20 mM TRIS, 150 mM NaCl	7,4
1x TE	10 mM TRIS, 1 mM EDTA	8,0
Triton X/Tween	0.25% Triton X, 0.1% Tween TBS-ben	7,4
1x TE (FCS méréshez)	10 mM TRIS, 0.1 mM EDTA	7,4

### 4.2. Sejtvonalak, sejtenyésztés

Méréseinket minden kísérletünkben HeLa méhnyakrák sejtvonalon végeztük, amit a heidelbergi Német Rákkutató Központtól (DKFZ) kaptunk. A HeLa sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/l Penicillin és 100mg/l Sztreptomicin mellett. A sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett tartottuk fenn, minden 2-3. nap passzáltuk.

### 4.3. Plazmidok

A teljes hosszúságú c-Fos fehérjék mellett használtunk egy mutánst, amelynek C végéről eltávolítottak 164 aminosavat (c-Fos<sup>215</sup>). Így a c-Fos esetén a C terminális hossza a leucin cipzártól számítva ugyanakkora lett, mint a c-Jun-nál, ami FRET mérésekben nagyobb transzfer hatásfokot eredményezett [104]. Biológiai negatív kontrollként egy olyan deléciós mutáns fehérjét használtuk, ahol a c-Fos fehérjéről eltávolították a DNS kötő és dimerizációs domént (c-Fos<sup>ΔΔ</sup>), így az nem képes sem dimerizációs partnereivel, sem a DNS-sel kölcsönhatni. A pozitív kontroll egy olyan fehérje 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 hatásfokot eredményez. Konfokális mikroszkópos FRET vizsgálatokhoz az ECFP-EYFP donor-akceptor párt használtuk, ami a magas R<sub>0</sub> érték miatt (4,9 nm [71]) magas FRET hatásfokokat eredményezett. Az áramlási citométerrel és SPIM-FCCS-sel történő mérésekhez az EGFP-mRFP1 párt használtuk a rendelkezésre álló lézer gerjesztési hullámhosszak miatt.

A képkalkuló fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiai (SPIM-FCCS) mérésekhez a pozitív kontroll esetén 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. Erre a SPIM-FCS időbeli felbontása (0,5 ms) miatt volt szükség.

A konstruktok a következők voltak:

- pSV-c-Fos-FP
- pSV- c-Fos<sup>215</sup>-FP
- pSV-c-Jun-FP
- pSV-ECFP-EYFP illetve pSV-EGFP-mRFP1 (RNPPVAT linker)
- pSV-EGFP-GPVAT-P30-GPVAT-mRFP1
- pSV-c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-FP

#### **4.4. Klónozás**

A konfokális mikroszkópos FRET mérések esetén a heidelbergi kollaborációs partnerünktől kapott plazmidoknál a c-Fos-hoz kapcsolt fluoreszcens fehérjét ECFP és EYFP festékpárra cseréltük, illetve elkészítettük az EGFP-mRFP1 párhoz a c-Fos-mRFP1/ c-Fos<sup>215</sup>-mRFP1 konstruktokat. A fluoreszcens fehérjét AgeI és NotI enzimekkel hasítottuk ki a vektorból és összekapcsoltuk az ugyanezekkel az enzimekkel meghasított c-Fos/c-Fos<sup>215</sup> fehérjét kódoló vektorokkal.

#### **Agaróz gélelektroforézis**

A DNS fragmenseket 1% agaróz gélen választottuk el. Az agarózt 1x TAE pufferben forralással oldottuk fel, majd ethidium-bromidot kevertünk hozzá, hogy a DNS-t láthatóvá tegyük. A mintákhoz 6x loading puffert kevertünk (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham), felvittük a géltre és a DNS fragmenseket 100 V feszültségen 1x TAE pufferben futtattuk meg. A gél darabok kivágása UV transzilluminátor felett történt.

#### **DNS kinyerése agaróz gélből**

A DNS gélből való kitisztításához fenolos kinyerést használtunk. A kivágott gél eppendorf csőbe tettük, aminek az alját előzőleg eltávolítottuk. Ezt a csövet egy új eppendorf csőbe tettük és 7500 rpm-en centrifugáltuk 5 percig. A feldarabolt géltre annyi  $\mu$ l fenolt mértünk, amennyi a gél tömege (mg) volt, majd fél órára  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra tettük. Amint a gél teljesen kiolvadt 13.000 g-n centrifugáltuk a csövet 5 percig. A felülúszót új eppendorf csőbe pipettáztuk és 1:1 arányban fenolt és kloroformot mértünk hozzá. 5 perc 13.000 g-n történő centrifugálás után a felülúszót új csőbe mértük majd hozzáadtunk 1/10 térfogatnyi 3 M-os Na-acetátot és 2,5 térfogatnyi 99%-os etanolt. 30 perces  $-20^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubáció után 15 percig centrifugáltuk a mintát 13.000 g-n. A felülúszót eltávolítottuk, majd 500  $\mu$ l 70%-os etanollal mostuk a DNS-t. Újabb 13.000 g-n 15 percig tartó centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót és beszárítottuk a mintát. A DNS-t nukleáz-mentes vízben vettük fel, a minőségét és mennyiségét NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) határoztuk meg.

#### **Restríciós emésztés**

Az restrikiós endonukleázokat a Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham cégtől rendeltük, 20  $\mu$ l végtérfogathoz 1-1  $\mu$ l (10U/ $\mu$ l) enzimet használtunk.

## **Ligálás**

Ligáció során a vektor: inzert arány 1:5 volt. 20 µl reakcióelegybe 5 egység T4 DNS ligázt (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) mértünk. A ligáció 16°C-on egész éjszaka tartott. A kész konstruktokat megfuttattuk gélen illetve szekvenálással is ellenőriztük.

## **Kompetens sejtek készítése**

DH5α kompetens sejt készítéséhez először éjszakai kultúrát készítettünk. Másnap az éjszakai kultúrát 200 ml LB-be oltottuk át és addig rázattuk, míg az OD<sub>600</sub> elérte a 0,4 értéket; ekkor a kultúrát 4°C-on 1800 g-n 7 percig centrifugáltuk. A sejteket felszuszpendáltuk 60 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Pipes és 15% glicerol összetételű oldatban. A szuszpenziót 5 percig 4°C-on 1200 g-n centrifugáltuk majd újra felszuszpendáltuk a fent említett CaCl<sub>2</sub>-os oldatban és 30 percig jégen állni hagytuk. A sejteket 1200 g-n 4°C-on 5 percig centrifugáltuk és a pelleteket 2-2 ml CaCl<sub>2</sub>-os oldatban szuszpendálva jégen állni hagytuk másnapig. A szuszpenziót 200 µl-enként szétmértük és -80°C-on tároltuk.

## **Transzformáció**

200 µl kompetens DH5α-t jégen kiolvastottunk, majd hozzáadtuk az összeligált plazmidot. 30 perc jégen történő inkubáció után 1,5 percre 42°C-ra tettük, majd a hősokk után 5 percre visszatettük jégre. Az inkubáció után 1 ml SOC-ban rázattuk a sejteket 37°C-on fél órán át. 3 perces 500 g-n történő centrifugálás után a SOC-ot eltávolítottuk úgy, hogy körülbelül 30 µl folyadék maradjon az eppendorf csőben és 25 µg/ml-es kanamicines agaros LB-re szélesztettük a sejteket. A Petri csészéket 37°C-on egész éjszaka inkubáltuk.

## **DNS plazmid kinyerése**

Transzformáció után felnőtt telepekből egyet 5 ml LB-be leoltottunk, ami tartalmazta az antibiotikumot is és egész éjszaka rázattuk 37°C-on. Plazmid DNS kitisztításához GenElute™ Plazmid Miniprep Kit-et (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) használtunk. Nagyobb mennyiségű DNS kinyeréséhez 250 ml LB-be oltottuk az éjszakai kultúrát, egész éjszakán át rázattuk, majd PureYield™ Plazmid Maxiprep System-et (Promega, Madison, Wisconsin, USA) alkalmaztunk.

## **Plazmidok transzfekciója**

A konfokális mikroszkóppal történő méréseket 8 lyukú IBIDI kamrában (Ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Németország) végeztük, ahol 15.000 sejtet tettünk ki 300 µl 10% RPMI-be. A vizsgálni kívánt fehérjéket plazmidként tranziens transzfekcióval juttattuk be a sejtekbe transzfekciós reagenst használva. A sejtek kitapasztása után 1 nappal elkészítettük a transzfekciós mixet, ami az alábbi komponensekből áll:

- 25 µl FBS-mentes RPMI
- 0,8 µg DNS
- 2 µl FuGeneHD reagens (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Húsz perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 5 µl transzfekciós mixet mértünk lyukanként a sejtekhez.

Áramlási citométeren történő mérésekhez 24 lyukú sejttenyésztő edénybe 50.000 sejtet tettünk ki, a transzfektálás menete és a kimért mennyiségek megegyeztek a konfokális mikroszkópnál leírtakkal.

SPIM-FCCS mérésekhez 3-as számú fedőlemezekből letörött darabokat (5×8 mm<sup>2</sup>) tettünk 35 mm átmérőjű Petri csészébe, majd ráértünk 100.000 sejtet 2 ml médiumban. Másnap 90 µl FBS-mentes médiumhoz hozzámértünk 0,1-6 µg DNS-t és 4 µl FuGeneHD reagenst, majd a teljes mennyiséget a sejtekhez pipettáztuk. A méréskor a fedőlemezt erre szolgáló rögzített csipesz tartotta a HBSS pufferrel töltött mintatartó kamrában.

### **4.5. FRET határfok meghatározása konfokális mikroszkóppal**

FRET méréseket Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Germany) végeztük. A donor és transzfer jelet Argon ion lézer 458 nm-es vonalával gerjesztettük, a detektáláshoz 475-525 nm-es és 530-600 nm-es sávszűrőket használtunk, míg az akceptor festék gerjesztéséhez az Argon ion lézer 514 nm-es vonalát és a detektáláshoz 530-600 nm-es sávszűrőt alkalmaztunk. A mikroszkóp 458 és 514 nm-es hullámhossza optimális az ECFP és EYFP gerjesztésére, ami nagyon jó jel/zaj arányt ad. A sejtenkénti átlag fluoreszcencia intenzitások egyes csatornában történő meghatározásához a mikroszkóp szoftverét használtunk. A kifejezett fluoreszcens fehérjét tartalmazó területet kiválasztottuk és a program megadott pixelenkénti átlagos fluoreszcencia intenzitásokat Microsoft Excel programba másoltuk. A további számolásokat itt végeztük el. A konfokális mikroszópiai méréseinkhez ECFP (donor) és EYFP (akceptor) fluoreszcens fehérjéket használtunk.

#### 4.5.1. Akceptor fotoelhalványítás módszer

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 kiégetése után. Első lépésként a donor és az akceptor festék eloszlásáról egy kétsatornás képet vettünk fel, majd az akceptor festéket kiégettük az 514 nm-es lézerrel maximális intenzitáson történő többszöri pásztázással. A fotoelhalványítás után újra kétsatornás képet vettünk fel. A FRET hatásfok meghatározása során figyelembe vettük az akceptor nem tökéletes kiégetését, a donor fotoelhalványítását az akceptort gerjesztő lézerrel és az akceptor, illetve az akceptor fototermék emissziójának megjelenését a donor csatornában [87]. A háttér intenzitás meghatározása csatornánként a felvett képek egy sejtmentes területén történt, aminek az átlagos intenzitása levonásra került a többi pixel intenzitásából. A zaj csökkentésére 2 pixel sugarú Gauss szűrést alkalmaztunk. A FRET hatásfok  $E_{ij}$  pixelenkénti meghatározása az alábbi képlettel történt:

$$E_{ij} = 1 - \frac{(1 - \alpha)(F_{ij}^{D1} - \delta F_{ij}^{A1})}{\gamma(F_{ij}^{D2} - (\alpha\delta + (1 - \alpha)\varepsilon)F_{ij}^{A1}) - \alpha(F_{ij}^{D1} - \delta F_{ij}^{A1})} \quad (6)$$

ahol  $F_{ij}^{D1}$  és  $F_{ij}^{D2}$  a háttérrel korrigált donor fluoreszcencia intenzitások a fotoelhalványítás előtt és után, míg  $F_{ij}^{A1}$  ugyanazon pixel háttérrel korrigált akceptor fluoreszcenciája a fotoelhalványítás előtt. Az  $\alpha$ -val jelölt tényező az akceptor nem tökéletes kiégetését korrigálja (ez az  $\alpha$  faktor különbözik az arányalapú FRET egyenletekben lévőttől).  $\gamma$  jellemzi a donor fotoelhalványítását, amit csak donorról jelölt mintán mértünk meg,  $\delta$  és  $\varepsilon$  pedig az akceptor, illetve az akceptor fototermék bevilágítását a donor csatornába, amely faktorokat egyszeresen akceptor festékkel jelölt minta használatával határoztunk meg. A pozitív kontrollal (ECFP-EYFP fúziós fehérje RNPPVAT linker-rel a két fehérje között) kapott FRET hatásfok eredményét arányalapú FRET méréseknél referenciaként használjuk.

#### 4.5.2. Arányalapú módszer

Sejtenkénti FRET meghatározás esetén a képek felvételéhez a konfokális mikroszkóp szoftverének “Multi Track” opcióját használtuk, ahol a használt lézereket a pásztázás során soronként ki-be kapcsolva egymás után alkalmaztuk, így minimalizálva a csatornák közti átvilágítást. A FRET pixelenkénti meghatározásához az ImageJ szoftver RiFRET modulját használtuk [105], míg a sejtenkénti kiértékelést Excel program segítségével végeztük. A FRET hatásfok térkép, illetve hisztogram létrehozása Matlab program keretén belül történt. A

módszer használatával egyszerre három csatornában rögzítjük a fluoreszcencia intenzitásokat:  $I_1$  (donor),  $I_2$  (transzfer) és  $I_3$  (akceptor). Ezek az intenzitások kifejezhetőek a gyengítetlen donor intenzitás ( $I_D$ ), az akceptor intenzitás ( $I_A$ ), a FRET hatások ( $E$ ), az átvilágítási faktorok ( $S_1$ - $S_4$ ), a relatív fluoreszcencia hatások ( $\alpha$ ) és az extinkciós állandók hányadosai ( $\varepsilon$ ) függvényében:

$$\begin{aligned} I_1 &= I_D (1 - E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2} \\ I_2 &= I_D (1 - E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \\ I_3 &= I_D (1 - E) S_3 + I_A + I_D E \alpha \frac{\varepsilon_4}{S_2} \end{aligned} \quad (7)$$

Az egyenletekben szereplő fluoreszcencia intenzitások autofluoreszcenciára korrigáltak, amit a transzfektálatlan sejtekből határoztunk meg. Az  $S_1$  és  $S_3$  átvilágítási tényezők megállapítása csak ECFP-t kifejező sejtek használatával történt.

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D} \quad S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D} \quad (8 \text{ és } 9)$$

Konfokális mikroszkópiás méréseink esetén az  $S_3$  tényező elhanyagolható volt az akceptor csatornában használt emissziós szűrő miatt, illetve mert az ECFP 514 nm-en gyengén gerjeszhető.  $S_2$  és  $S_4$  faktorok meghatározásához csak EYFP-t kifejező sejteket használtunk:

$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A} \quad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A} \quad (10 \text{ és } 11)$$

Az  $\varepsilon_4$  az ECFP és EYFP festékek a donor és az akceptor gerjesztési hullámhosszán meghatározott extinkciós együtthatóiból számítható:

$$\varepsilon_4 = \frac{\varepsilon_{514}^{ECFP} \varepsilon_{458}^{EYFP}}{\varepsilon_{458}^{ECFP} \varepsilon_{514}^{EYFP}} \quad (12)$$

Konfokális mikroszkópnál ez a tényező elhanyagolható volt. A FACS Aria és az LSC esetén használt gerjesztési hullámhosszakkal a faktor becsült értéke a következő tartományba esik:

$$\varepsilon_4 = \frac{\varepsilon_{488}^{ECFP} \varepsilon_{405}^{EYFP}}{\varepsilon_{405}^{ECFP} \varepsilon_{488}^{EYFP}} = 0,0029 - 0,0066 \quad (13)$$

A FRET hatások meghatározásához szükséges az ún.  $\alpha$  faktor megállapítása, ahol az adott számú, transzfer csatornában detektált gerjesztett EYFP molekula fluoreszcens jelét arányítjuk az azonos számú, donor csatornában detektált gerjesztett ECFP molekula jeléhez:

$$\alpha = \frac{Q_{EYFP}\eta_{EYFP}}{Q_{ECFP}\eta_{ECFP}}, \quad (14)$$

ahol  $Q_{ECFP}$  és  $Q_{EYFP}$  az ECFP és EYFP fluoreszcencia kvantumhatásfoka,  $\eta_{ECFP}$  és  $\eta_{EYFP}$  az ECFP és EYFP fluoreszcencia emissziójának detektálási hatékonysága a donor és transzfer csatornában. Az  $\alpha$  értéke meghatározható két minta segítségével, ahol ismert mennyiségű ECFP és EYFP fejeződik ki:

$$\alpha = \frac{I_2^{EYFP}}{I_1^{ECFP}} \frac{N^{ECFP}}{N^{EYFP}} \varepsilon_2, \quad (15)$$

ahol  $I_1^{ECFP}$  és  $I_2^{EYFP}$  458 nm-en (konfokális mikroszkóp) illetve 405 nm-en (FacsAria és LSC) gerjesztett ECFP és EYFP fluoreszcencia intenzitása,  $N^{ECFP}/N^{EYFP}$  az ECFP és EYFP fluorofórok hányadosa és  $\varepsilon_2$  a donor gerjesztési hullámhosszán meghatározott extinkciós együtthatók hányada. Áramlási citométeren és LSC-n ez kifejezhető az alábbi egyenlettel:

$$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{405}^{ECFP}}{\varepsilon_{405}^{EYFP}} = 9,5 - 42,6 \quad (16)$$

míg konfokális mikroszkópon:

$$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{458}^{ECFP}}{\varepsilon_{458}^{EYFP}} = 3,18 - 3,97 \quad (17)$$

A paraméter bizonytalanságát az extinkciós együtthatók értékeinek bizonytalansága okozza. Egy fúziós minta segítségével, ahol az ECFP és EYFP fehérjéket egy hét aminosavas linker köti össze és így a fehérjék 1:1 arányban fejeződnek ki, az  $\alpha$  faktort az alábbi képlettel írhatjuk le:

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D} \varepsilon_2 \quad (18)$$

A 7. egyenletrendszer és a 18. egyenlet a négy ismeretlennel ( $I_D$ ,  $I_A$ ,  $E$  és  $\alpha$ ) megoldható, amennyiben az egyszerűen jelölt sejtekből meghatározzuk az  $S$  tényezőket. A megoldás  $\alpha$ -ra:

$$\alpha = \frac{S_2 \left( I_1 \left( (1 + \varepsilon_2) S_2 S_3 - (1 + \varepsilon_2 \varepsilon_4) S_1 \right) - (1 + \varepsilon_2) I_3 (S_2 - S_1 S_4) + I_2 (1 - S_3 S_4 + \varepsilon_2 (\varepsilon_4 - S_3 S_4)) \right)}{(\varepsilon_4 - 1) (I_1 S_2 - I_2 S_4)} \quad (19)$$



Ebből az egyenletből megkapjuk a teljes sejtpopulációra vonatkoztatott sejtenkénti átlagos  $\alpha$  értékét a fúziós (ECFP-EYFP) minta esetén, ahol a donor és akceptor festékek 1:1 arányban fejeződnek ki. Ezt az  $\alpha$  értéket visszahelyettesítjük az egyenletrendszerbe, majd meghatározzuk a FRET hatásfokokat a fúziós, illetve a kotranszfectált minták esetén a következő képlettel:

$$E = \frac{S_2 (I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3 + I_3 S_1 S_4 - I_2 S_3 S_4)}{\alpha (1 - \varepsilon_4) (I_1 S_2 - I_2 S_4) + S_2 (I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3 + I_3 S_1 S_4 - I_2 S_3 S_4)} \quad (20)$$

A teljes gyengítetlen donor ( $I_D$ ) és az akceptor fluoreszcencia kiszámolható az alábbi két egyenlettel:

$$I_D = \frac{\alpha (\varepsilon_4 - 1) (I_1 S_2 - I_2 S_4) + S_2 (I_1 S_1 + I_3 S_2 - I_1 S_2 S_3 - I_3 S_1 S_4 + I_2 (S_3 S_4 - 1))}{\alpha (\varepsilon_4 - 1) (S_2 - S_1 S_4)} \quad (21)$$

$$I_A = \frac{\varepsilon_4 (I_2 - I_1 S_1) - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3 + I_3 S_1 S_4 - I_2 S_3 S_4}{(\varepsilon_4 - 1) (S_2 - S_1 S_4)} \quad (22)$$

FRET számolásaink során egy másik paramétert, az akceptor-donor arányt is felhasználtuk, ami a két molekulafajta számaránya. Első lépésként a pozitív kontroll donor-akceptor (ECFP-EYFP vagy EGFP-mRFP1) fúziós minta használatával meghatároztuk a  $Q = I_A / I_D$  akceptor-donor intenzitás hányadost a 21. és 22. egyenletek felhasználásával. A fúziós minta esetén a donor-akceptor expresszió arányát 1:1-nek tekintjük. A kétszeresen jelölt, donorral és akceptorral kotranszfectált minták esetén az akceptor-donor molekula-arány értéke:

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{I_A}{I_D Q} \quad (23)$$

A donor intenzitását FRET-re úgy korigáltuk, hogy a háttér intenzitásra korigált donor intenzitást elosztottuk a fehérjék közt mért FRET hatásfok egyből kivont értékével (1-E). Az arányalapú kiértékelés egyik sarokpontja az extinkciós koefficiensek arányának pontos meghatározása. Ehhez tudnunk kell a gerjesztési maximumnál mért extinkciós koefficiensek értékét, illetve hogy az adott gerjesztési hullámhossznál a festék extinkciója a maximumnak

hány százaléka. Ha bármely adat meghatározásában pontatlanság van, akkor a FRET értékek kiszámolásában ez a hiba meg fog jelenni. Hogy elkerüljük az ebből adódó bizonytalanságot, akceptor fotoelhalványítás technikával is meghatároztuk a FRET hatásfokot a fúziós fehérje esetén. Mivel azonos plazmiddal történt a FRET hatásfok meghatározása, ezért a két különböző technikával kapott eredménynek elvileg ugyanannyinak kell lennie. Az ECFP-EYFP FRET pár esetén a 20. képlettel meghatározott FRET hatásfok 37,9-47,3% között változott, az átlagos akceptor fotoelhalványítással kapott eredmény pedig 48,5% volt ( $48,5 \pm 1,8\%$ ). Mi az utóbbit fogadtuk el és azt használtuk számolásainkban sztenderdként. A fúziós minta esetén az  $\alpha$  értékét úgy állítottuk be, hogy az átlagos FRET hatásfok a 20. képlettel 48,5% legyen, és ezzel az  $\alpha$  értékkel számoltunk a kotranszfektált mintáknál [106].

#### **4.6. FRET hatékonyság meghatározása áramlási citometriával**

Az áramlási citometriás méréseket FACSAria III műszeren (Becton Dickinson, San Jose, CA) végeztük. A sejttermelékek és az apoptotikus sejtek kikapuzásához az előre- és oldalszórás paramétereket használtunk. ECFP és EYFP festékpár esetén a donor és transzfer jelet 405 nm-es szilárdtest lézerral gerjesztettük és 430-470 nm illetve 515-545 nm között detektáltuk, míg az akceptor jel gerjesztéséhez 488 nm-es szilárdtest lézert alkalmaztunk és 515-545 nm között gyűjtöttük az emittált jelet. EGFP és mRFP1 festékpár esetén a donor és transzfer csatornában 488 nm-es szilárdtest lézert alkalmaztunk a gerjesztéshez, míg a detektáláshoz 515-545 nm sávszűrőt illetve 561 nm felüáteresztő szűrőt használtunk. Az akceptor gerjesztéséhez 561nm-es szilárdtest lézert, míg az emisszió detektálásához 561 nm-es felüáteresztő szűrőt használtunk. A csatornák közti spektrális átfedés minimális annak köszönhetően, hogy a két lézerral történő gerjesztés egymáshoz képest időben késleltetett. A FRET hatásfok meghatározását az intézetünkben fejlesztett Reflex szoftverrel végeztük [84].

Az EGFP/mRFP1 festékpár esetén az  $S_3$  mellett az  $S_4$  átvilágítási faktor is elhanyagolható volt, mert az EGFP nem gerjeszthető 561 nm-en, az mRFP1 fehérje gyengén gerjeszthető 488 nm-en, illetve az  $\varepsilon_4$  értéke nulla volt, így a fenti egyenletek egyszerűsödnek. A festékpár esetén az  $\varepsilon_2$  értéke 13,9 volt.

#### **4.7. FRET hatékonyság meghatározása lézer pásztázó citométerrel (LSC)**

A tárgylemez alapú méréseinket iCys képalkotó citométeren (CompuCyte Corporation, Westwood, MA) végeztük. A műszer egy Olympus IX-71 invertált mikroszkópon alapul, amit három lézerral, fotodiódákkal és négy fotoelektron-sokszorozó csővel (PMT) szereltek fel. A méréshez  $40\times$  (NA 0,75) objektívet használtunk. A 405nm-es szilárdtest lézert és a 488 nm-es

Argon ion lézert „multi-track” módban használtuk az ECFP és EYFP gerjesztéséhez, így minimalizálva a csatornák közti átvilágítást. Területeket jelöltünk ki a minták adott részein (ROI), majd a műszer automatikusan pontról pontra végigpásztázta azokat. A szoftver minden egyes ROI-t kisebb mezőkre osztott, amik nagysága 1024×768 pixel volt. Az emisszió detektálása donor és transzfer jel esetén 460-500 és 520-580 nm-es sávszűrőkkel, míg az akceptor jel esetén 520-580 nm-es szűrővel történt. A fluoreszcenciát fotoelektron-sokszorozókkal, míg a transzmissziós fényt fotodiódával detektáltuk. A FRET sejtenkénti kiértékeléséhez az átlagos fluoreszcencia intenzitásokat az Image Profiler szoftver használatával kaptuk meg, majd ezeket az adatokat Microsoft Excel-ben értékeltük tovább. A kiértékelésnél az  $S_4$  faktor elhanyagolható a donor szűk emissziós sávszűrője miatt, így a 20-22. egyenletek egyszerűsödnek.

#### 4.8. Diffúziós állandó meghatározása fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (FCS)

FCS méréseinket módosított Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópon (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) végeztük, melyben a lavina fotodiódákkal (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) ellátott kétcsatornás FCS modul a konfokális pásztázó egység negyedik detektálási csatornájához kapcsolódik. A mérésekhez UPlanAPO 60x (NA 1.2) víz immerziós objektívet használtunk. Az EGFP fluoreszcenciáját egy Argon ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, míg a detektálás 500-550 nm-es tartományban történt. Azért, hogy nagy koncentrációban is tudjunk mérni, egy neutrális szűrőt (OD 1) helyeztünk a lézer útjába, ami az intenzitást  $P=0.2 \mu\text{W}$ -ra gyengítette. A mért fluoreszcencia fluktuációkból ALV-5000E korrelátor kártya (ALV Laser, Langen, Germany) használatával autokorrelációs görbéket (ACF) kaptunk. Az FCS méréshez a konfokális képeken sejtenként egy mérési pontot jelöltünk ki, amely pont nem volt túl közel sem a sejt, sem a sejtmagvacskák határához. Mintánként harminc sejtet mértünk le szobahőmérsékleten, egy mérés  $8 \times 5$  s-ig tartott. Az autokorrelációs görbéket két komponensű, három dimenziós szabad diffúziós modellel illesztettük meg a Quickfit 3.0 programmal [107], figyelembe véve a triplet állapot jelenlétét és az EGFP “blinking” jelenségét is:

$$G(\tau) = \frac{1 - T - \Theta_c + T_e^{-\tau/\tau_r} + \Theta_c e^{-\tau/\tau_c}}{1 - T - \Theta_c} \frac{1}{N} \left[ r_1 \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_1} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_1} \right)^{-1/2} + r_2 \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_2} \right)^{-1/2} \right], \quad (24)$$

ahol  $\tau$  a késleltetési idő,  $T$  a triplet hányada,  $\tau_{tr}$  a triplet korrelációs ideje,  $\theta_c$  a sötét állapot hányada és  $\tau_c$  a sötét állapot korrelációs ideje,  $\tau_1$  és  $\tau_2$  a gyors és lassú komponens diffúziós ideje (a fluoreszcens molekulák által a detektálási térfogatban töltött átlag tartózkodási idő),  $r_1$  és  $r_2$  a két komponens hányada,  $N$  a detektálási térfogatban levő átlagos molekulaszám és  $S$  az ellipszoid alakú detektálási térfogat tengelyeinek aránya.

#### 4.9. Fluoreszcencia intenzitás kalibrálása FCS használatával

A disszociációs állandó ( $K_d$ ) meghatározásához továbbfejlesztettünk egy módszert [108], amivel a fluoreszcencia intenzitást abszolút koncentrációvá tudjuk átszámolni. Első lépésben meghatároztuk a mikroszkóp detektálási térfogatát, amihez 130 nM-os Alexa488 festékkoldatot használtunk. A festékkoldat autokorrelációs függvényéből megkaptuk a  $\tau_d$  és  $S$  paramétereket, amelyek ismeretében meghatároztuk a laterális és axiális sugarakat az alábbi képletek segítségével,

$$\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_d}, \omega_z = \omega_{xy}S. \quad (25)$$

ahol  $\tau_d$  a festék mért diffúziós idejét, míg  $D$  ( $435 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) a festék  $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mért diffúziós állandóját jelöli [109]. A detektálási térfogat megadható az alábbi képlettel:

$$V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z. \quad (26)$$

Az EGFP autokorrelációs függvényéből meghatározható az érzékeny térfogatban lévő részecskék száma, majd a részecskeszám átszámolható koncentrációvá a 27. képlet használatával

$$c = N / (N_A V_{\text{eff}}), \quad (27)$$

ahol  $N_A$  az Avogadro szám. Minden FCS mérés előtt az FCS mérés pontjában meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitást a konfokális mikroszkóp detektorával, majd az FCS mérésből kapott koncentrációt ábrázoltuk ezen fluoreszcencia intenzitás függvényében. Az így kapott kalibrációs görbe lehetővé teszi az abszolút koncentráció kiszámítását az intenzitásból.

#### **4.10. A kalibráció hordozhatóvá tétele**

A különböző napokon és különböző műszereken történt mérések összehasonlításához kalibrációs gyöngyöket használtunk. A 6 µm-es 1%-os relatív intenzitású zöld kalibrációs gyöngy (InSpeck Green Microscope Image Intensity Calibration Kit, Molecular Probes, Life Technologies, Inc.) fluoreszcencia intenzitásával normáltuk az EGFP (azonos műszerbeállításokkal mért) fluoreszcenciáját. A gyöngy közepén mért fluoreszcencia intenzitással megegyező EGFP intenzitás a konfokális mikroszkópos méréseknél  $\sim 15.4 \pm 0.7$  µM EGFP koncentrációnak felelt meg.

A kalibráció áramlási citometriás mérésekre is átvihető. A gyönggyel történt kalibráció a lokális intenzitás értékeket hasonlítja össze, míg az áramlási citométer a fluoreszcencia-terület mérése esetén a gyöngy vagy a sejt teljes intenzitását méri. Ezért a számolások során figyelembe vettük a sejtmag és a gyöngy térfogatának arányát, amit konfokális mikroszkóppal történő szeleteléssel határoztunk meg. Figyelembe vettük két műszer eltérő emissziós szűrőit, a gyöngy és az EGFP spektrumának ebből eredő eltérő relatív detektálási hatékonyságát, illetve korrigáltunk arra is, ha a fehérje nem csak a sejtmagban található, hanem citoplazmatikus frakció is detektálható. A konfokális mikroszkóppal készült szeletekből Imaris programmal meghatároztuk a sejtmagban és a citoplazmában levő Fos<sup>215</sup>-EGFP frakciót, ami  $85 \pm 5\%$  és  $15 \pm 5\%$ , volt. Ezen tényezőket figyelembe véve a kiszámoltuk az egy gyöngy-egységnek megfelelő EGFP koncentrációt ( $c_{\text{konfokális mikroszkóp}}/13$ ), ami 1 µM-nak adódott.

#### **4.11. Endogén c-Fos és c-Jun fehérjék abszolút koncentrációjának meghatározása**

Az endogén és transzfektált fehérjék mennyiségét immunfluoreszcens technikával határoztuk meg. A transzfektált fehérjék abszolút koncentrációjának ismeretében meghatározható az endogén fehérjeszint is, ezért az immunfluoreszcens technikát kombináltuk az FCS alapú EGFP koncentráció kalibrálással, amivel meg tudtuk határozni a c-Fos és c-Jun fehérjék endogén koncentrációját.

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 µg/ml végkoncentrációban 60 percig jelöltük egér anti-c-Fos (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA) illetve egér anti-c-Jun monoklonális antitesttel

(Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). NL637-DAMIG poliklonális másodlagos antitesttel (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) inkubáltuk a sejteket 60 percen keresztül sötétben, szobahőmérsékleten, 50 µg/ml végkoncentrációban. Az egymást követő lépések között a sejteket háromszor mostuk 1x PBS-sel. Áramlási citometriás mérés esetén a sejteket feltripszineztük, mostuk PBS-sel, majd a fixálási lépéstől folytattuk a fenti protokollt.

Az áramlási citometriás méréseket FACSAria III műszeren (Becton Dickinson, San Jose, CA) végeztük. A sejtörmelék és az apoptotikus sejtek kikapuzásához az előre és oldalra szórást használtuk. EGFP ( $I^{öld}$ ) gerjesztéséhez 488 nm-es, míg a NL637-DAMIG ( $I^{örös}$ ) esetén 633 nm-es szilárd test lézert használtunk, a detektáláshoz 515-545 nm-es sávszűrőt, illetve 655 felül áteresztő szűrőt alkalmaztunk.

A c-Fos-EGFP mennyiségét a koncentráció kalibrációhoz használt zöld gyöngy fluoreszcencia intenzitásához ( $I^{öld}$ ) hasonlítottuk. Az NL637-DAMIG antitest vörös csatornában mért jele ( $I^{örös}$ ) 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. Az endogén c-Fos ( $c_{Fos-endogén}$ ) és a c-Fos-EGFP ( $c_{Fos-EGFP}$ ) koncentrációját transzfektált és transzfektálatlan sejtek segítségével a zöld és vörös csatornák jeléből számoltuk ki:

$$c_{Fos-EGFP} = \frac{I_{transzfektált}^{öld}}{I_{gyöngy}^{öld}} \times c_{gyöngy\ egység} \quad (28)$$

$$\frac{c_{Fos-EGFP} + c_{Fos-endogén}}{c_{Fos-endogén}} = \frac{I_{transzfektált}^{örös}}{I_{transzfektálatlan}^{örös}} \quad (29)$$

$$c_{Fos-endogén} = \frac{c_{Fos-EGFP}}{\left(\frac{I_{transzfektált}^{örös}}{I_{transzfektálatlan}^{örös}}\right) - 1} = \frac{\left(\frac{I_{transzfektált}^{öld}}{I_{gyöngy}^{öld}}\right) \times c_{gyöngy\ egység}}{\left(\frac{I_{transzfektált}^{örös}}{I_{transzfektálatlan}^{örös}}\right) - 1} \quad (30)$$

Az  $I^{örös}$  jeleket fixált sejtekből kaptuk (immunfluoreszcens jelölés), míg az  $I_{transzfektált}^{öld}$  jelet fixálatlan, élő sejtekből nyertük (ugyanabból a transzfektált mintából). Fixálás során az EGFP fluoreszcenciája csökken, de a fenti módszert használva elkerülhetjük az ebből származó hibát.

#### 4.12. Disszociációs egyensúly meghatározása citometriás FRET adatokból

Donoros és akceptoros festékekkel 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 tömeghatás törvénye heterodimerizáció esetén:

$$[F][J]/[FJ] = K_d^{FJ}, \quad (31)$$

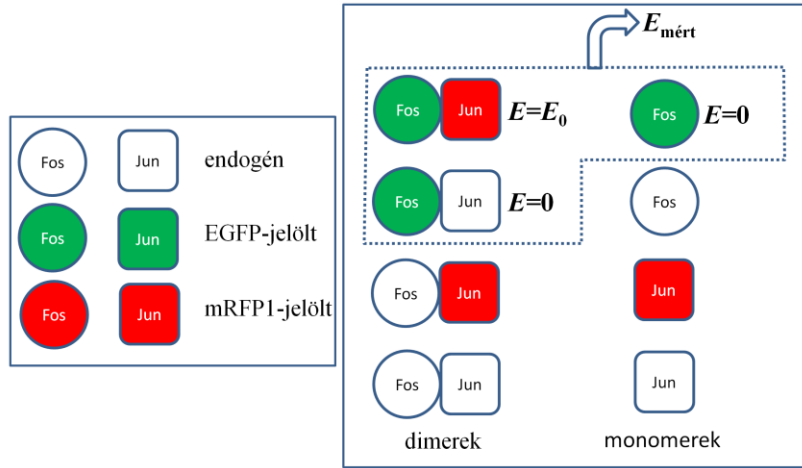
ahol a szögletes zárójel a szabad monomerek és a heterodimer koncentrációját, míg  $K_d^{FJ}$  a heterodimer disszociációs állandóját jelöli. A c-Fos illetve c-Jun teljes koncentrációja a szabad monomerek és a heterodimerek koncentrációinak összegeként írható fel:

$$[F]_t = [F] + [FJ]; \quad [J]_t = [J] + [FJ]. \quad (32)$$

A heterodimer koncentráció kifejezhető az alábbi képlet szerint:

$$[FJ] = \frac{1}{2} \left( [F]_t + [J]_t + K_d^{FJ} - \sqrt{[F]_t^2 - 2[F]_t \times ([J]_t - K_d^{FJ}) + ([J]_t + K_d^{FJ})^2} \right) \quad (33)$$

Az EGFP-hez és mRFP1-hez kapcsolt fehérjék között mért FRET hatásfok egy átlag érték, ami azoktól a donor molekuláktól is származik, amelyek zérus FRET-et adnak, mert monomerek vagy endogén fehérjével dimerizálódnak. Csak azok a donor molekulák járulnak hozzá pozitív értékkel a FRET-hez, amelyek komplexet képeznek az akceptorral, míg a monomer állapotú, illetve az endogén, jelöletlen fehérjékhez kapcsolódó donor molekulák zérus FRET-et adnak (10. ábra).



### 10. ábra: Monomer-heterodimer egyensúly

Fluoreszcensen jelölt és endogén, jelöletlen c-Fos és c-Jun molekulák is részt vesznek az egyensúly kialakításában. Csak a fluoreszcensen jelölt donortól származó intenzitás ad pozitív járulékot a mért FRET hatásfok értékéhez. A duplán jelölt heterodimerek esetén a FRET hatásfok az  $E_0$ -al egyezik meg, míg a donorral jelölt c-Fos –endogén c-Jun heterodimer és donorral jelölt c-Fos monomer nulla FRET-et ad.

A jelölt és endogén c-Fos és c-Jun fehérjék teljes koncentrációja kifejezhető az alábbiak szerint:

$$[F]_t = [F_D]_t + [F_e]_t \quad \text{és} \quad [J]_t = [J_A]_t + [J_e]_t, \quad (34-35)$$

ahol  $[F_D]_t$  és  $[F_e]_t$  a teljes donorral jelölt és endogén c-Fos koncentrációkat jelölik, (melyek monomerként vagy a c-Fos–c-Jun heterodimerben vannak jelen), míg  $[J_A]_t$  és  $[J_e]_t$  az akceptorral jelölt és endogén c-Jun molekulát jelenti (melyek szintén monomerként vagy pedig c-Fos–c-Jun dimerben vannak jelen). A donorral jelölt c-Fos ( $p_D$ ) és akceptorral jelölt c-Jun ( $p_A$ ) molekula hányada:

$$p_D = \frac{[F_D]_t}{[F_D]_t + [F_e]_t} \quad \text{és} \quad p_A = \frac{[J_A]_t}{[J_A]_t + [J_e]_t} \quad (36-37)$$

A duplán jelölt c-Fos<sub>D</sub>–c-Jun<sub>A</sub> dimerek koncentrációja:

$$[F_D J_A] = [FJ] \times p_D \times p_A = [FJ] \times \frac{[F_D]_t}{[F_D]_t + [F_e]_t} \times \frac{[J_A]_t}{[J_A]_t + [J_e]_t} \quad (38)$$



A donorral jelölt c-Fos és akceptorral jelölt c-Jun közötti FRET hatásfokot  $E_0$ -al jelöljük. A mért FRET hatásfok az az energia hányad, amit a gerjesztett donor molekulák a szomszédos akzeptornak adnak át, ha az jelen van, ami az alábbiak szerint számolható ki:

$$E_{meas} = \frac{[F_D J_A]}{[F_D]_t} \times E_0 + \frac{[F_D]_t - [F_D J_A]}{[F_D]_t} \times 0 = \frac{[F_D J_A]}{[F_D]_t} \times E_0 \quad (39)$$

ahol  $[F_D J_A]$  a donorral jelölt c-Fos fehérje akceptorral jelölt c-Jun molekulával alkotott komplexének koncentrációja és  $[F_D]_t$  a donorral jelölt c-Fos molekula teljes koncentrációja.  $[F_D]_t - [F_D J_A]$  azon donorral jelölt c-Fos molekulák koncentrációja, melyek nem alkotnak komplexet akceptorral jelölt c-Jun-nal (monomerek vagy endogén c-Jun-nal dimerizáltak), így zérus FRET hatásfokkal jellemezhetők. A mért FRET hatásfok az  $E_0$  és a zérus hatásfokok koncentrációkkal súlyozott átlaga. Az  $N_A/N_D = [J_A]/[F_D]$  akceptor-donor arány bevezetésével és a 33., a 38. és a 39. egyenletek kombinálásával a mért FRET hatásfok az alábbi képlettel fejezhető ki:

$$E = \frac{[F]_t + [J]_t + K_d^{FJ} - \sqrt{[F]_t^2 - 2[F]_t([J]_t - K_d^{FJ}) + ([J]_t + K_d^{FJ})^2}}{2[F]_t[J]_t} \times [F_D]_t \frac{N_A}{N_D} E_0 =$$

$$= \frac{[F_D] \left( 1 + \frac{N_A}{N_D} \right) + [F_e] + [J_e] + K_d^{FJ} - \sqrt{([F_D] + [F_e])^2 - 2([F_D] + [F_e]) \left( [F_D] \frac{N_A}{N_D} + [J_e] - K_d^{FJ} \right) + \left( [F_D] \frac{N_A}{N_D} + [J_e] + K_d^{FJ} \right)^2}}{2([F_D] + [F_e]) \left( [F_D] \frac{N_A}{N_D} + [J_e] \right)} \times$$

$$\times [F_D]_t \frac{N_A}{N_D} E_0 \quad (40)$$

Ezt az  $[F_D]_t$  független változójú és  $N_A/N_D$  paraméterű modellfüggvényt használtuk a mért FRET hatásfok nemlináris illesztésére.

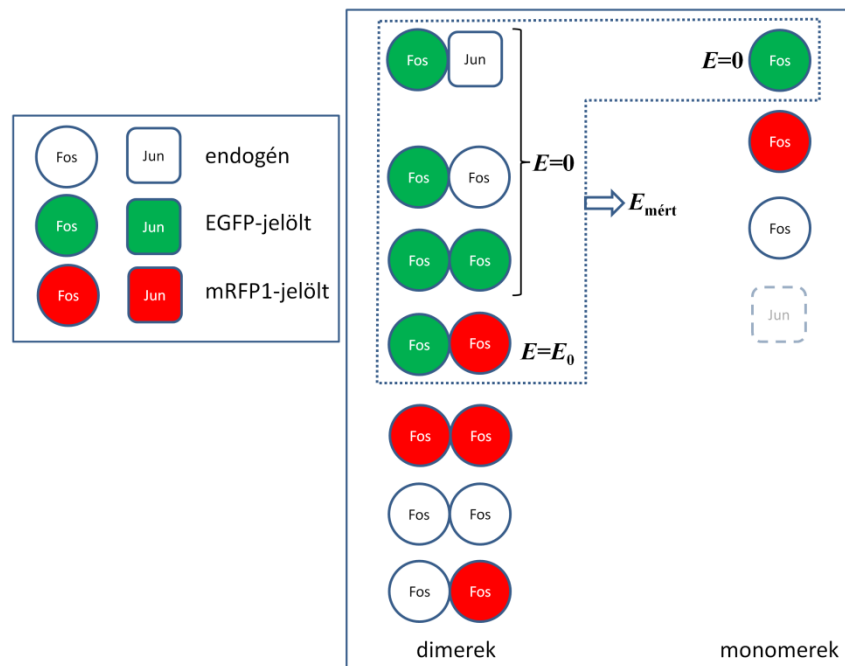
A c-Fos–c-Fos egyensúly meghatározásánál a c-Fos–c-Jun heterodimer kialakulását is figyelembe vettük. Mivel a heterodimer sokkal stabilabb, ezért feltételezzük, hogy magas c-Fos koncentráció esetén az összes c-Jun molekula komplexet képez a c-Fos-szal, vagyis nincs jelen szabad c-Jun. Csak azok a c-Fos homodimerek fognak hozzájárulni a FRET-hez, amelyek donoros és akceptoros festékkel jelölt fehérjepárokat tartalmaznak. Ebben az esetben a következő egyensúly írható fel:

$$\begin{aligned}
[F][F]/[FF] &= K_d^{FF}, \\
[J]_t &= [FJ], \quad [F]_t = [F] + [FJ] + 2[FF]
\end{aligned}
\tag{41}$$

ahol  $K_d^{FF}$  a disszociációs állandó, FF és FJ jelöli a homo- és heterodimert. A c-Fos homodimer mennyisége kifejezhető az alábbi képlettel:

$$[FF] = \frac{1}{8} \left( 4[F]_t - 4[J]_t + K_d^{FF} - \sqrt{8K_d^{FF} [F]_t - 8K_d^{FF} [J]_t + (K_d^{FF})^2} \right)
\tag{42}$$

A c-Fos molekulák lehetnek donor vagy akceptor festékekkel jelöltek illetve jelöletlenek, vagyis endogének. Csak azok a c-Fos homodimerek fognak pozitív járulékot adni a FRET-hez, amelyek donoros és akceptoros festékekkel jelölt fehérjepárokat tartalmaznak (11. ábra).



### 11. ábra: Monomer-homodimer-heterodimer egyensúly

A c-Fos homodimer kialakulása esetén donorral, akceptorral jelölt és endogén c-Fos és c-Jun molekulákat vettünk figyelembe. Négy különféle dimer és a donorral jelölt c-Fos monomer is megjelenik a FRET hatásfokban, de egyedül a duplán jelölt c-Fos homodimer az, ami zérustól különböző járulékot ad a mért FRET hatásfokhoz, a többi molekula járuléka zérus.

A duplán jelölt párok hányada leírható az alábbi egyenlettel:

$$p_{D,A} = 2p_D p_A,
\tag{43}$$

ahol  $p_D = [F_D]/([F_D]_t + [F_A]_t + [F_e]_t)$  és  $p_A = [F_A]/([F_D]_t + [F_A]_t + [F_e]_t)$  a donorral illetve akceptorral jelölt c-Fos molekulák hányadát jelentik. Az előbbiek ismeretében a mért FRET hatások kifejezhető, mint:

$$E_{mért} = \frac{[F_D F_A]}{[F_D]_t} \times E_0 = \frac{[FF] p_{D,A}}{[F_D]_t} \times E_0 \quad (44)$$

A  $F_D$ ,  $F_A$  és  $F_e$  összes kombinációját és a c-Fos–c-Jun heterodimer jelenlétét (endogén c-Junnal) figyelembe véve, a 42. és 44. képletek felhasználásával, a mért FRET hatások felírható az alábbiak szerint:

$$E_{mért} = \frac{1}{4} \left( 4[F]_t - 4[J_e]_t + K_d^{FF} - \sqrt{K_d^{FF} \sqrt{8[F]_t - 8[J_e]_t + K_d^{FF}}} \right) \frac{[F_D]_t \frac{N_A}{N_D} E_0}{[F]_t^2} \quad (45)$$

ahol

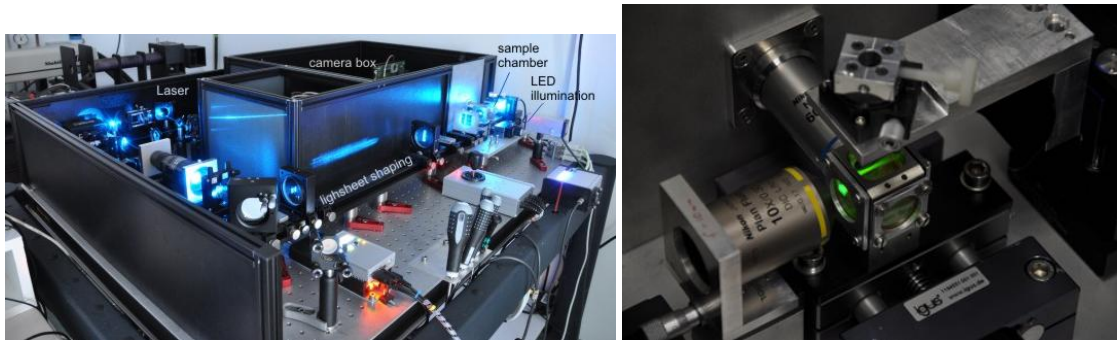
$$[F]_t = [F_D]_t + [F_A]_t + [F_e]_t = [F_D]_t \left( 1 + \frac{N_A}{N_D} \right) + [F_e]_t. \quad (46)$$

$[F]_t$  jelöli a teljes c-Fos koncentrációt (beleértve a donor jelölt c-Fos<sup>215</sup>-EGFP-t, az akceptor jelölt c-Fos<sup>215</sup>-mRFP1-et és az endogén teljes hosszúságú c-Fos-t, tekintet nélkül arra, hogy monomerek vagy dimerek).  $E_{mért}$  jelöli a mért, látszólagos FRET hatásfokot és  $E_0$  a donor-akceptor pár közötti valódi FRET hatásfokot. A sejtenkénti FRET hatásfokokat a donorral jelölt c-Fos koncentráció függvényében ábrázolva FRET titrálási görbéket kaptunk, melyekből a fent leírt,  $[F_D]_t$  független változójú modellfüggvény illesztésével megkaptuk a c-Fos homodimer disszociációs állandóját és az  $E_0$  FRET hatásfokot. A függvényillesztéseket a GraphPad Prism szoftverrel végeztük.

#### 4.13. Képképző fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópia

SPIM-FCCS méréseinkhez használt rendszer felépítése az alábbi cikkekben található meg részletesen [41, 110]. 491 nm-es és 561 nm-es lézernyalábok (Calypso/Jive Lasers, Cobolt AB, Solna, Sweden) egy hengerlencsén keresztül egy objektívre kerülnek, ami egy ~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.



**12. ábra: Aktuális SPIM beállítás (Heidelberg, DKFZ)**

A bal oldali ábra a SPIM műszer felépítését mutatja, míg a jobb oldali ábrán a két objektív (megvilágító és detektálási) és a mintakamra látható.

A fluoreszcens fényt  $60\times$  NA=1 vizes objektív gyűjti össze (CFI Apo-W NIR  $60\times/1.0W$ , Nikon, Hamburg), majd a mintáról származó fluoreszcenciát egy dikroikus tükör (DualView DV2, Photometrics, Tucson, USA) két csatornába osztja (zöld: 500-550 nm, vörös:  $>600$  nm). A képeket EM-CCD kamera (iXon X3 860, Andor, Belfast) rögzíti, melynek pixelmérete a tárgysíkban  $400\times 400$  nm<sup>2</sup> (DualView DV2, Photometrics, Tucson, USA). A rendszer napi beállítását és a fókuszterefogat kalibrációját a [110] cikkben leírtak szerint végeztük, amihez 100 nm-es többszínű fluoreszcens mikrogöngyöket (T7279 Microspheres, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) illetve Alexa488 és Alexa594 festékekkel duplán jelölt 170 bázispár hosszúságú duplaszálú DNS-t használtunk. A zöld és vörös fókusz közötti eltolódás 100 nm alatt volt, így erre az eltolódásra nem tartalmaztak korrekciót az illesztendő függvények, míg a két fókusz eltérő méretét figyelembe vettük. A c-Fos-EGFP minta használatával megállapítottuk, hogy az EGFP fluoreszcenciája megjelenik a vörös csatornában is, melynek mértéke 3,35%, amit szintén figyelembe vesz a modell.

A méréshez és a kiértékeléshez a QuickFit 3.0 szoftvert használtuk a leírtak szerint [110]. Minden mérés esetén körül-belül százezer képet vettünk fel, 530  $\mu$ 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 [111] és ezzel a lecsengési görbével osztva az intenzitást, majd kiszámoltuk a két csatorna auto- és keresztkorrelációs görbéit. A zaj csökkentése érdekében a  $2\times 2$  pixelből származó intenzitásokat összevontuk („binning”) és ezekből az adatokból számoltuk ki a korrelációs függvényeket. Az adatok illesztéséhez olyan modellfüggvényt használtunk, ami

két diffúziós komponenszt illeszt a  $g_{gg}$  zöld és a  $g_{rr}$  vörös autokorrelációs függvényekre és egy komponenszt a  $g_{gr}$  keresztkorrelációs függvényre (mivel az utóbbi mindig jól illeszthető volt egy komponenssel) [110].

$$\begin{aligned}
g_{gg}(\tau) &= \frac{\eta_g^2 c_A + \eta_g^2 c_{AB}}{\eta_g^2 \cdot (c_A + c_{AB})^2} \cdot G_{gg}^G(\tau) \\
g_{rr}(\tau) &= \frac{\eta_r^2 \cdot [c_B + c_{AB}] + \kappa_{gr}^2 \eta_g^2 \cdot [c_A + c_{AB}] + 2\kappa_{gr} \eta_r \eta_g c_{AB}}{(\kappa_{gr} \eta_g c_A + (\eta_r + \kappa_{gr} \eta_g) \cdot c_{AB} + \eta_r c_B)^2} \cdot G_{rr}^R(\tau) \\
g_{gr}(\tau) = g_{rg}(\tau) &= \frac{\eta_g \eta_r c_{AB} + \kappa_{gr} \eta_g \eta_r c_A + \kappa_{gr} \eta_g^2 \cdot c_{AB}}{(\eta_g c_A + \eta_g c_{AB}) \cdot (\kappa_{gr} \eta_g c_A + (\eta_r + \kappa_{gr} \eta_g) \cdot c_{AB} + \eta_r c_B)} \cdot G_{gr}^{GR}(\tau)
\end{aligned} \tag{47}$$

ahol  $\eta_g$  és  $\eta_r$  az A fluorofór molekuláris fényességét jelöli a zöld, illetve a B fluorofórért a vörös csatornában, ami meghatározható, ha a pixelenkénti fluoreszcencia intenzitást elosztjuk a detektálási térfogatban lévő részecskeszámmal.  $\kappa_{gr}$  jelöli a zöld jel átvilágítását a piros csatornába.  $G(\tau)$  felel meg a nem-normalizált auto- és keresztkorrelációs görbéknek [110], míg  $c_A$ ,  $c_B$  és  $c_{AB}$  csak zöld és csak piros molekulák és a zöld-piros komplexek koncentrációjának felel meg.

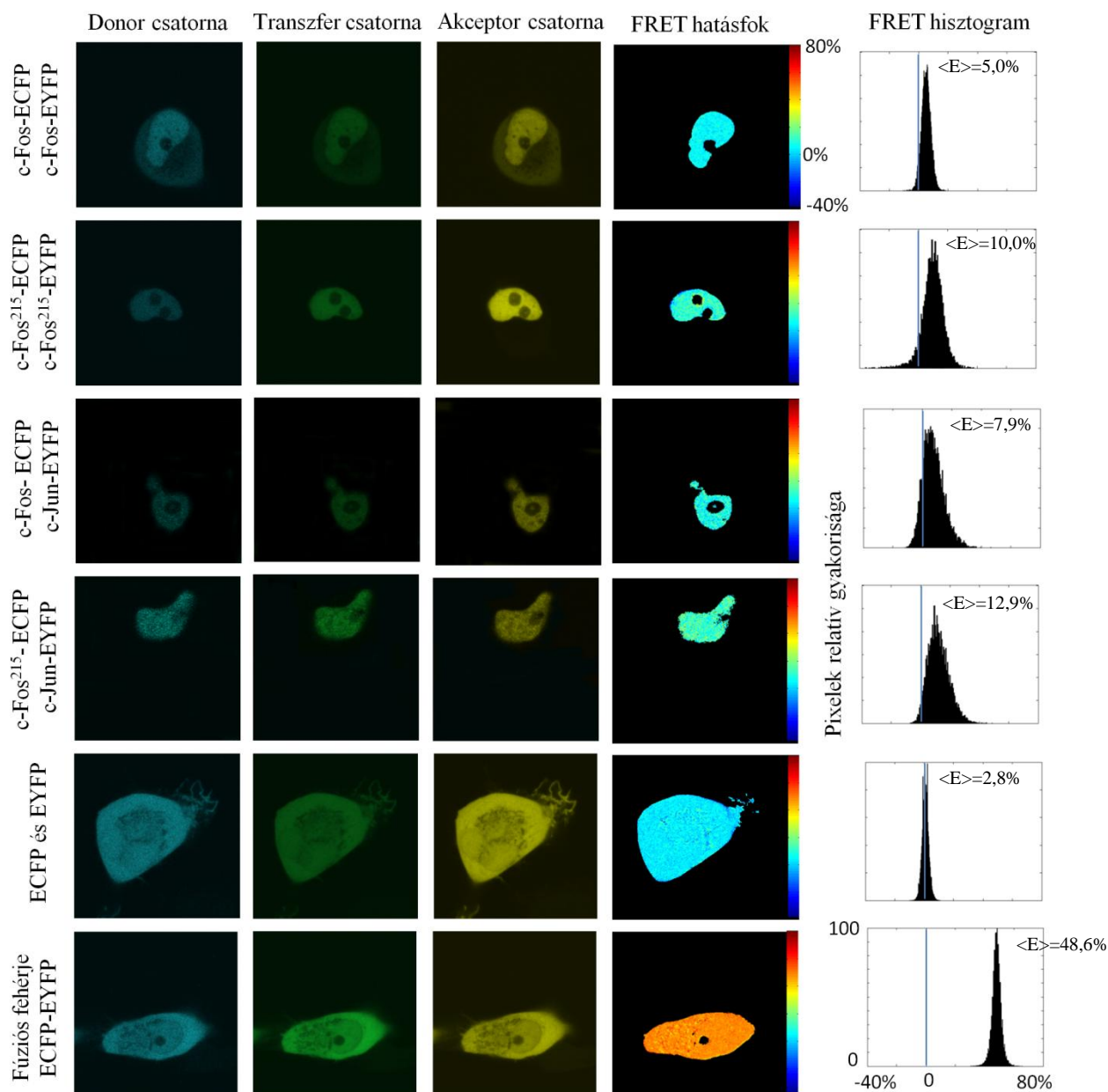
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. c-Fos-c-Fos és c-Fos-c-Jun dimerek FRET hatásfokának meghatározása konfokális mikroszkóppal

c-Fos homodimerek és c-Fos-c-Jun heterodimerek közötti konfokális mikroszkópiás FRET méréseinket kétféleképpen is elvégeztük. Az arányalapú FRET módszer során kiszámoljuk az  $\alpha$  faktort, ami a festékek spektrális tulajdonságait és a műszer beállításait jellemző paraméter. Ennek kiszámításához elengedhetetlen az extinkciós koefficiensek arányának ismerete, melynek pontatlansága nagyban befolyásolja a FRET hatásfok értékét. Az akceptor fotoelhalványítás technika egy önkontrollos módszer, ami alacsony FRET hatásfok megállapítására is alkalmas. Mivel a technika a donor molekula fluoreszcencia intenzitásának növekedését méri, nem szükséges a számoláshoz az extinkciós koefficiensek ismerete, így jóval egyszerűbb, mint az arányalapú meghatározás. Hátránya, hogy a mintát nagy intenzitású lézer megvilágításnak teszi ki, és a mérés során az akceptor kiég, így a mérés csak egyszer végezhető el.

#### 5.1.1. Eredmények arányalapú módszerrel

Arányalapú FRET technika lehetővé teszi molekuláris kölcsönhatások vizsgálatát élő sejtekben mindenféle ártalmas behatás nélkül. Konfokális mikroszkópiás méréseink során teljes hosszúságú c-Fos és c-Jun, illetve a C végen megrövidített c-Fos<sup>215</sup> mutáns fehérjéket használtunk, amikhez ECFP és EYFP fehérjéket kapcsoltunk. A donor, transzfer és akceptor jeleket három független csatornában rögzítettük és meghatároztuk a FRET hatásfok értékeket, illetve az akceptor-donor arányt sejtenként és pixelenként is. A pixelenkénti kiértékelésből kapott reprezentatív sejtekről készült intenzitás képeket, FRET hatásfok térképeket és a hisztogramokat a 13. ábrán tüntettem fel.



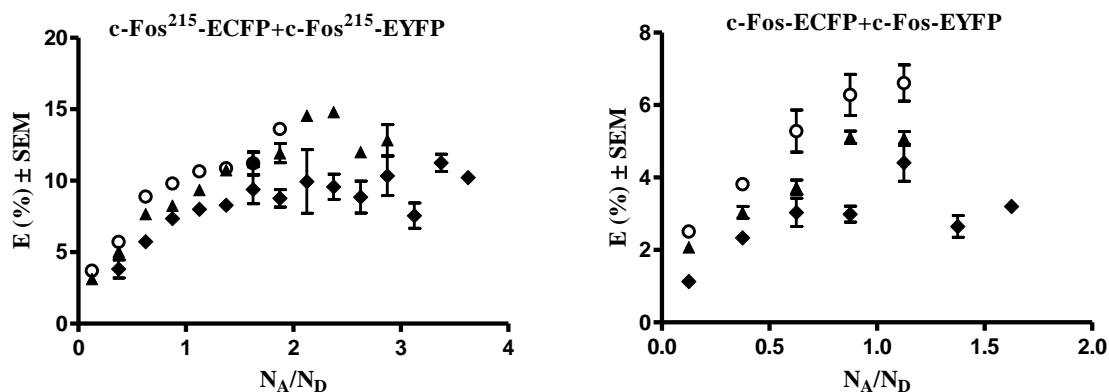
### 13. ábra: Homo- és heterodimerizáció pixelenkénti kimutatása konfokális mikroszkópiával

A homo- és heterodimeriek esetén a fehérjék túlnyomó többsége a sejtmagban helyezkedik el, míg a pozitív és negatív kontrollnál, ahol a fluoreszcens fehérjéket transzfektáltuk a sejtekbe, a teljes sejtben megtalálhatóak. A homodimer FRET hatásfoka kisebb, mint a heterodimeré, azonban jóval magasabb, mint a negatív kontrollnál mért érték.

Felülről az első sorban a teljes hosszúságú c-Fos fehérjékkal mért FRET látható, ahol az átlagos FRET hatásfok 30 sejtre  $5,0 \pm 0,5\%$  (átlag  $\pm$  SEM), míg a C terminálison lerövidített c-Fos<sup>215</sup>-nál (második sor) ez az érték  $10,0 \pm 0,5\%$  volt ( $n \sim 30$ ). A lerövidített fehérjével mért FRET értéke nagyobb, mint a vad típusú fehérje esetén azért, mert a festékekkel jelölt C terminális régiók közelebb helyezkednek el a dimerizációs doménhez, így feltehetően kisebb

távolságra vannak egymáshoz. Összehasonlításként lementük a FRET hatásfokot c-Fos-ECFP + c-Jun-EYFP és c-Fos<sup>215</sup>-ECFP + c-Jun-EYFP fehérjék között is, ahol a heterodimer képződést FCCS és FRET mérésekkel korábban már kimutatták [21, 104, 106]. Ezeknél a mintáknál (harmadik és negyedik sor) az átlagos FRET hatásfok  $7,9 \pm 0,4\%$  és  $15,0 \pm 1,1\%$  volt ( $n \sim 30$ ). Az első négy sor képein jól látható, hogy a c-Fos és c-Jun fehérjék túlnyomó többsége a sejtmagban található. A negatív kontroll (ECFP és EYFP külön transzfektálva) és a pozitív kontroll (ECFP-EYFP fúziós fehérje) az ötödik és hatodik sorban helyezkedik el, az átlagos FRET hatásfokuk pedig  $2,8 \pm 0,4\%$ , illetve  $48,6 \pm 0,8\%$  ( $n \sim 20$ ) volt. A pozitív és negatív kontroll esetén a fehérjék a sejt teljes térfogatában oszlanak el.

A fenti mérést kiértékeltek 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-Fos<sup>215</sup>-ECFP+c-Fos<sup>215</sup>-EYFP mintáknál a FRET hatásfok értékeket ábrázoltuk az  $N_A/N_D$  függvényében (14. ábra). Mind a két fehérjepárnál elmondható, hogy növekvő akceptor-donor aránnyal nő a FRET hatásfok is, mert több akceptor fehérjéhez kapcsolt c-Fos molekula lesz elérhető a donor fehérjéhez kapcsolt molekulák számára.



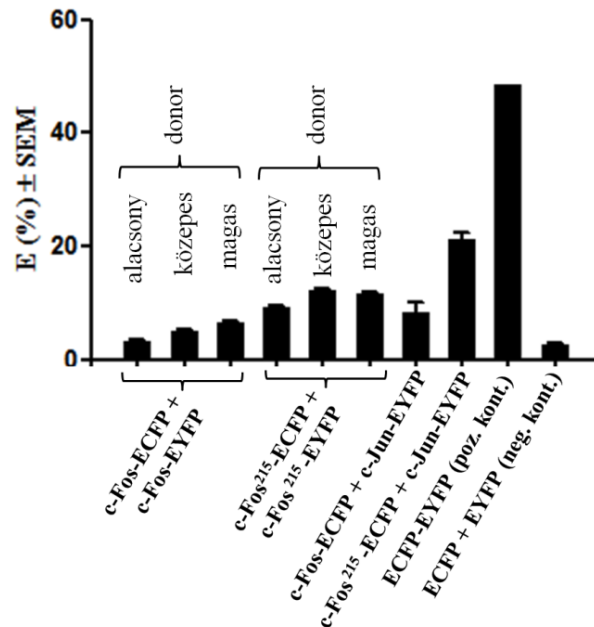
**14. ábra: Sejtenkénti FRET hatásfok adatok ábrázolása akceptor-donor arány függvényében**

Az adatokat donor intenzitás alapján három csoportba osztottuk, majd akceptor-donor arány szerint 0,25-ös intervallumokba csoportosítottuk. A FRET hatásfok adatok növekvő akceptor-donor aránnyal emelkednek. Mindkét esetben több mint ötszáz sejtet mértünk le.

A 15. ábrán a sejtenkénti telítési FRET hatásfok ( $E$ ) eredményeket tüntettük fel, ahol szintén jól látszik, hogy magasabb c-Fos fehérje koncentráció esetén a homodimerizáció mértéke is



növekszik. c-Fos homodimerek FRET hatásfoka alacsonyabb a c-Fos–c-Jun heterodimerekénél, de szignifikánsan magasabb, mint a negatív kontrollnál kapott érték ( $p < 0,0001$ ).



### 15. ábra: Sejtenkénti FRET hatásfok adatok

Magas akceptor-donor aránynál meghatározott telítési FRET hatásfok értékeket mutat az ábra, ahol homodimereknél ugyanaz a tendencia látható, mint a 14. ábrán. c-Fos–c-Jun heterodimer esetén a teljes hosszúságú fehérjével kapott FRET adatok alacsonyabbak a trunkált c-Fos fehérjével mért adatokhoz képest. Az ECFP-EYFP fúziós fehérje szolgált pozitív kontrollként, míg az egymástól függetlenül kifejeződő ECFP és EYFP volt a negatív kontroll.

### 5.1.2. Akceptor fotoelhalványításos módszerrel kapott eredmények

Mérés során meghatároztuk a pozitív és negatív kontroll, a c-Jun és az C végen lerövidített, illetve a teljes hosszúságú c-Fos közötti FRET hatékonyságot. Az EYFP fehérje kiégetése során kismértékben kiégett az ECFP is, amire a kiértékelés során korrigáltunk. Figyelembe vettük még a donor csatornában emittáló akceptor fototermék jelenlétét illetve az akceptor nem tökéletes kiégetését is.

	E (átlag ± SEM)
ECFP-EYFP (pozitív kontroll)	48,5±0,74%
ECFP + EYFP (negatív kontroll)	1,0±0,62%
c-Fos <sup>215</sup> -ECFP + c-Jun-EYFP	21,2±1,35%
c-Fos-ECFP + c-Jun-EYFP	8,0±1,45%

**2. táblázat: Akceptor fotoelhalványításból származó eredmények**

Konfokális mikroszkópiával meghatározott sejtenkénti FRET hatásfok eredmények a pozitív és a negatív kontroll, a lerövidített és a teljes hosszúságú c-Fos–c-Jun heterodimerek esetén. Mintánként több mint 40 sejtet mértünk meg. A táblázat hat mérési nap eredményét foglalja össze.

A pozitív kontroll (ECFP-EYFP fúziós fehérje) kiértékelése során meghatározott átlagos FRET hatásfok értéket ( $E=48,5\%$ ) sztenderdként használtuk az ECFP-EYFP festékpár esetén, így az arányalapú mérés kiértékelésekor a fúziós mintánál az  $\alpha$  értékét úgy állítottuk be, hogy megkapjuk ugyanezt az értéket. A többi minta kiértékeléséhez már ezt az  $\alpha$  értéket használtuk.

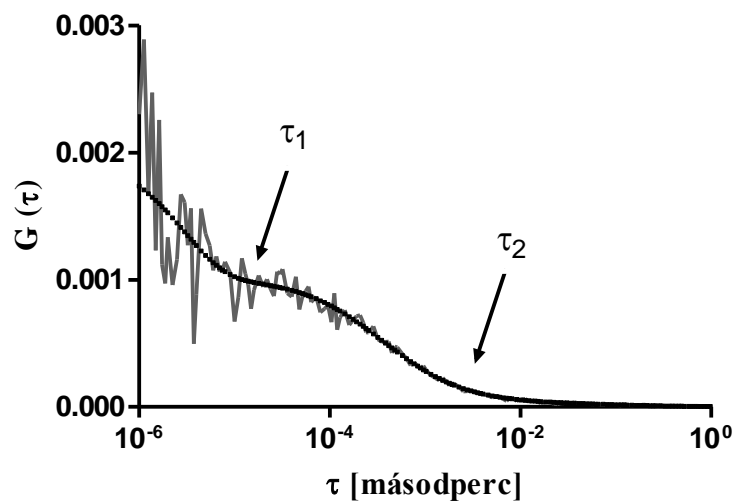
**5.2. Koncentráció meghatározása a fluoreszcencia intenzitásból FCS-sel végzett kalibráció segítségével**

A 14. ábrán látható FRET titrálási görbék demonstrálják, hogy a FRET hatásfok adatok alkalmasak molekula asszociációk kvantitatív vizsgálatára. A komplexek stabilitását a disszociációs állandóval lehet jellemezni ( $K_d$ ). Munkánk során kidolgoztunk egy módszert, ami lehetővé teszi élő sejtekben az egymással kölcsönható fehérjék  $K_d$  értékének meghatározását FRET titrálási görbék használatával, ahol a FRET hatásfok adatokat a dimereket alkotó fehérjék koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Ehhez szükséges volt a fluoreszcencia intenzitás, mint az abszolút koncentrációval arányos mennyiség kalibrációjára. A kalibrációt konfokális mikroszkópia és FCS kombinációjával végeztük.

Első lépésként FCS technika segítségével meghatároztuk az EGFP-hez kapcsolt fehérjék abszolút koncentrációját. Az FCS mérés során a molekulák átdiffundálnak egy femtoliternél ( $\mu\text{m}^3$ -nél) kisebb detektálási térfogaton, amit a fluoreszcencia fluktuációjaként detektálunk. A fluoreszcenciából a hardver korrelátor kiszámította a fluoreszcencia autokorrelációs függvényét (ACF). Ezt egy modell függvénnyel megillesztettük, így megkaptuk a diffúziós időt ( $\tau_d$ ), ami a molekula mozgékonyágát méri, illetve a detektálási térfogatban lévő átlag molekulaszámot ( $N$ ), ami a koncentrációval arányos. Először az Alexa 488 festékkoldat ACF-ét mértük meg, amit a detektálási térfogat ( $V_{eff}$ ) méretének

kalibrálásához használtunk. Ennek az értéknek az ismeretében már meg tudtuk határozni az abszolút koncentrációkat az  $N$  értékek ismeretében (26. egyenlet).

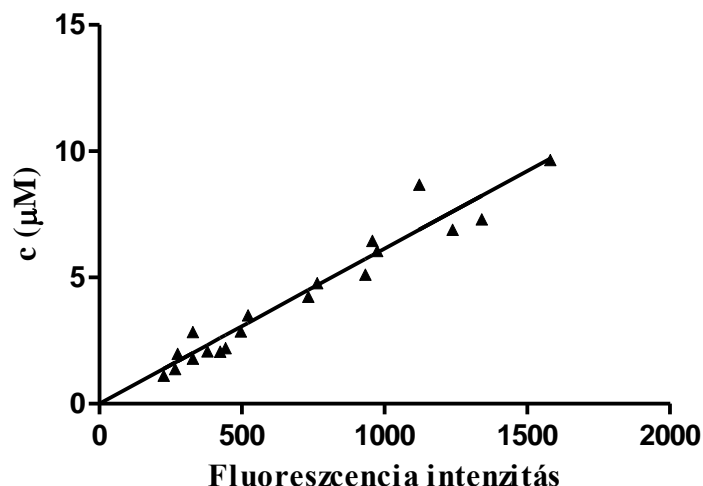
EGFP fehérjét kifejező HeLa sejtekről konfokális képeket vettünk fel, így meghatározva a fluoreszcencia intenzitásokat minden egyes pixelben. Sejtenként csak egy pontban mértünk. Ezután a sejtmag kiválasztott pontjaiban FCS méréseket végeztünk, és az autokorrelációs függvények illesztésével kapott  $N$  értékekből meghatároztuk a helyi EGFP koncentrációkat (lásd: módszerek 27. egyenlet).



**16. ábra: EGFP autokorrelációs függvénye**

A HeLa sejtekbe transfektált EGFP koncentrációját az autokorrelációs görbe amplitúdójából határoztuk meg. A görbét kétkomponensű diffúziós modellel illesztettük triplet állapot jelenlétét is figyelembe véve.

Az EGFP koncentrációját a fluoreszcencia intenzitás függvényében ábrázoltuk, majd a kapott pontokra kalibrációs egyenest illesztettünk, így a meredekségből megkaptuk a fluoreszcencia intenzitás egységét koncentrációban kifejezve.



**17. ábra: EGFP fluoreszcenciájához tartozó koncentráció meghatározása**

Az EGFP esetén az FCS mérésből meghatározott koncentrációt ábrázoltuk a konfokális mikroszkóppal kapott intenzitás függvényében. Az adatokat Deming regressziót használva illesztettük meg, ami az adatok x és az y irányú hibáját is figyelembe veszi.

Fluoreszcens gyöngyöt használtunk, hogy a koncentráció kalibrációt át tudjuk vinni más műszerekre, illetve össze tudjuk hasonlítani a különböző mérési napok adatait. Az FCS kalibráció napján, ugyanazon műszer beállítások mellett konfokális képeket vettünk fel a gyöngyről, majd meghatároztuk a gyöngy központi régiójának pixelenkénti átlag intenzitását. Az EGFP fluoreszcenciáját normalizáltuk a gyöngy fluoreszcenciájára, amivel megkaptuk az EGFP fluoreszcenciáját gyöngy intenzitás egységben kifejezve:

$$F_{bm(EGFP)} = \frac{F_{EGFP}}{F_{gyöngy}}, \quad (48)$$

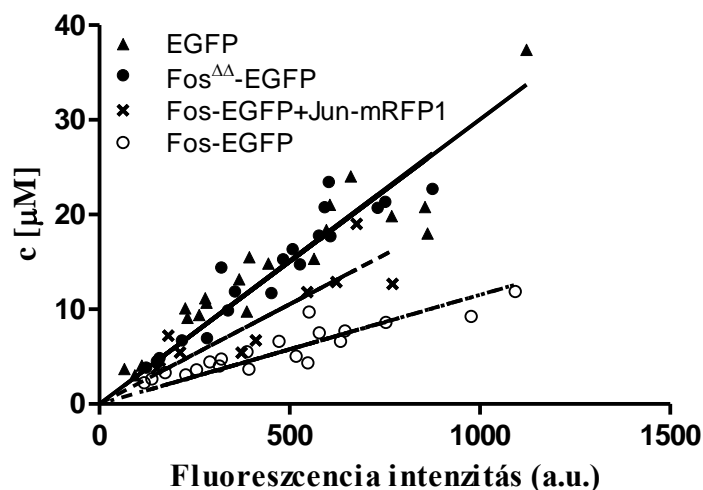
ahol  $F_{EGFP}$  az EGFP-t kifejező sejtek fluoreszcencia intenzitása egy adott pixelben,  $F_{gyöngy}$  a fluoreszcens gyöngy központi régiójának átlag pixel intenzitása és  $F_{bm(EGFP)}$  a gyöngyre normalizált EGFP fluoreszcencia intenzitás. Az egy gyöngy egységre vonatkoztatott EGFP koncentráció konfokális mikroszkópban  $\sim 15,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ -nak adódott. Ez a kalibráció lehetővé teszi egy minta fluoreszcencia intenzitásából történő koncentrációjának meghatározását azáltal, hogy egy gyöngy intenzitásához hasonlítjuk a minta intenzitását anélkül, hogy újra megismételnénk az FCS kalibrációt.

A fenti kalibrációt át tudjuk vinni más műszerekre, például áramlási citométerre is, ahol nagy mennyiségű sejtet tudunk lemérni rövid idő alatt. Mikroszkópos mérések kalibrációjakor a sejt és a fluoreszcens gyöngy pixelenkénti fluoreszcencia intenzitását hasonlítottuk össze, míg áramlási citometriás mérés esetén a teljes sejt illetve teljes gyöngy intenzitását mérjük meg. Számos korrekciót kell elvégeznünk, ha a kalibrációt át szeretnénk vinni mikroszkópról citométerre. Elsőként azt kell figyelembe venni, hogy a sejtmag térfogata (ahol a c-Fos és c-Jun fehérjék találhatók) 13,6-szorosa a gyöngy térfogatának, amit a konfokális mikroszkóp segítségével, Z irányú szeleléssel állapítottunk meg. Ezen kívül a különbség abból is adódik, hogy az EGFP és a fluoreszcens gyöngy spektrumának detektálási hatékonysága a konfokális mikroszkóp és az áramlási citométer esetén eltérő. A korrekció során figyelembe vettük még azt a jelenséget is, hogy a gyöngy közepén, illetve a teljes térfogatában mért fluoreszcencia intenzitás különbözik. A három korrekció eredményeként az áramlási citométeren egy gyöngy egységben kifejezett EGFP fluoreszcencia intenzitás 1/13-a a konfokális mikroszkópon mért normalizált gyöngy egységnek, így egy gyöngy egység az áramlási citométer esetén 1,2  $\mu\text{M}$  EGFP koncentrációnak felel meg.

A c-Fos fehérje kis hányada a citoplazmában is jelen van, amire szintén korrigáltunk. Mivel a citoplazmatikus c-Fos koncentráció a magbelinél egy nagyságrenddel kisebb, a citoplazmában monomerként van jelen. Ellenőriztük, hogy a  $K_d$  értékét ez a citoplazmatikus monomer frakció nem befolyásolja. Ezzel a korrekcióval egy gyöngy egységre  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ -t kaptunk és a továbbiakban ezt az adatot használtuk a Fos<sup>215</sup>-EGFP sejtmagbeli koncentrációjának meghatározásához áramlási citometriás kísérleteink során. Ezzel a kalibrációs módszerrel kalibrációs gyöngy használatával mérési naponként meghatározható az EGFP-vel jelölt fehérjék abszolút koncentrációja.

### **5.3. A c-Fos homoasszociációjának és DNS-hez kötődésének igazolása FCS-sel**

Az FCS méréseket a koncentráció kalibráció mellett a c-Fos fehérjék homodimerizációjának vizsgálatára is használtuk. Az EGFP, a c-Fos <sup>$\Delta\Delta$</sup> -EGFP (DNS-kötő és dimerizációs domén hiányos mutáns), a teljes hosszúságú c-Fos-EGFP és a c-Fos-EGFP + c-Jun-mRFP1 minták esetén a diffundáló részecskék koncentrációját ábrázoltuk a fluoreszcencia intenzitás függvényében. A koncentrációkat az autokorrelációs függvény illesztésével (az amplitúdó reciproka) kaptuk.

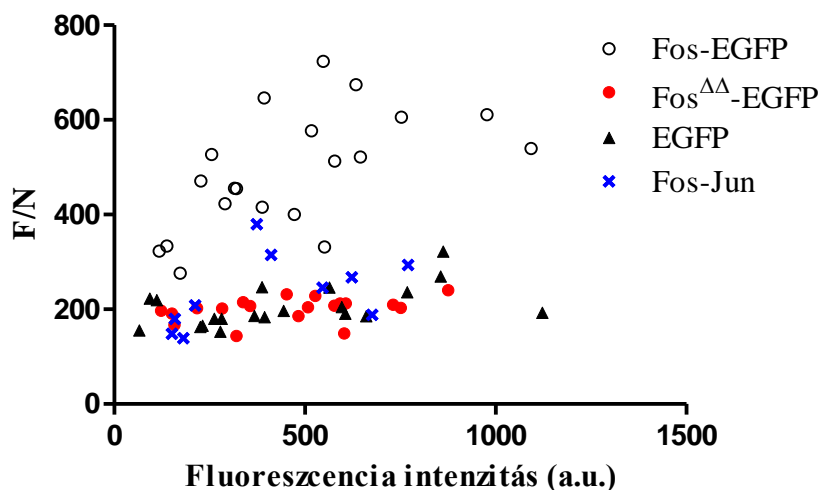


### 18. ábra: c-Fos homodimerizáció vizsgálata FCS-sel

EGFP, Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP, Fos-EGFP, és c-Fos-EGFP+c-Jun-mRFP1 mintáknál ábrázoltuk a diffundáló részecskék koncentrációját a pixelenkénti fluoreszcencia intenzitás függvényében, majd egyenest illesztve az adatpontokra megkaptuk az egyenesek meredekségét. A monomerek esetén a meredekség körülbelül kétszerese a c-Fos-EGFP mintáénak. A heterodimer meredeksége a monomerek és a homodimer közötti értéknek adódott.

Az illesztett egyenesek meredeksége EGFP és c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP esetén 30 és 30,3 (nM/intenzitás egység) volt. A két meredekség értéke nagyon hasonló, az EGFP illetve a c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP esetén ugyanakkora intenzitás ugyanannyi részecskeszámnak felel meg, ami azt mutatja, hogy a mutáns egy fluorofórt hordoz fehérjéként, tehát monomer. A teljes hosszúságú c-Fos-EGFP fehérje esetén a meredekség 11,5-nak adódott, ami kisebb, mint a monomer fehérjéknél. Így ugyanakkora intenzitású c-Fos-EGFP a monomer fehérjék részecske koncentrációjához képest körülbelül feleakkora, ami azt jelzi, hogy a c-Fos molekulák feltehetően homodimert alkotnak. A Fos-EGFP + Jun-mRFP1 minta esetén, ahol a zöld és piros intenzitásokból meghatározott átlagos c-Jun-c-Fos arány 0,7 volt, a meredekség a monomer és dimer meredeksége között helyezkedett el. Így a c-Fos-EGFP részlegesen komplexet alkot a Jun-mRFP1 molekulákkal, ahol az EGFP fényessége hasonló a monomeréhez, míg a többi c-Fos-EGFP homodimert alkothat.

A molekulák fényessége egy olyan paraméter, amivel a jelölt fehérjék kölcsönhatását jellemezhetjük. A fluoreszcencia intenzitás ( $F$ ) és a részecskeszám ( $N$ ) hányadosaként határozható meg, ami arányos az együtt diffundáló komplexben levő fluorofórok számával, így a jelölt fehérjék homoaggregációjának mértékét jellemzi. A négy fehérje  $F/N$  értékeit ábrázoltuk a koncentráció függvényében.

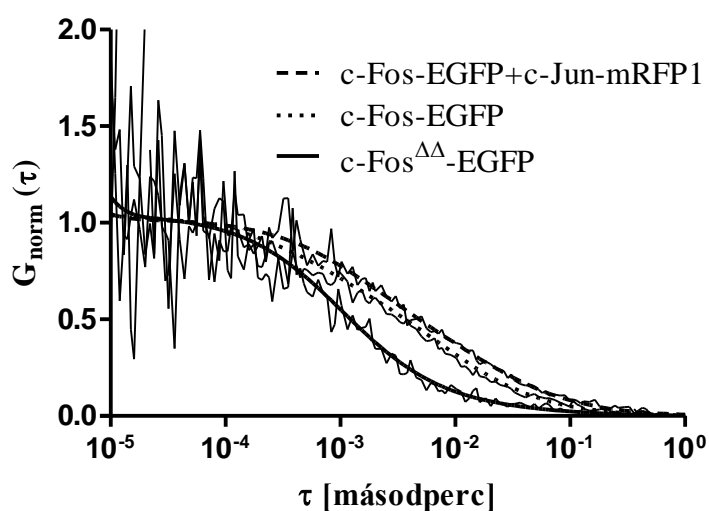


**19. ábra: Monomer, homodimer és heterodimer molekuláris fényessége**

Az EGFP fluoreszcenciájának függvényében ábrázoltuk a molekuláris fényesség adatokat mind a négy minta esetén, ahol az EGFP és a c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP monomerként, míg a c-Fos-EGFP homodimerként jelenik meg.

A 19. ábrán látható, hogy a c-Fos-EGFP fényessége nagyobb, mint az EGFP, a c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP illetve a c-Fos-EGFP + c-Jun-mRFP1 mintáké, ami megerősíti a c-Fos-EGFP homodimerizáció létét. Alacsony Fos-EGFP koncentrációnál viszont nem alakulnak még ki homodimerek, itt a molekuláris fényesség a monomeréhez hasonlít.

Az autokorrelációs görbékől a molekulák diffúziós tulajdonságait is meghatároztuk (20. ábra). A görbéket két diffundáló komponenst feltételezve illesztettük meg.



**20. ábra: Normalizált autokorrelációs görbék homodimer, heterodimer és a mutáns esetén**

A normalizált autokorrelációs görbéket kétkomponensű diffúziós modellel illesztettünk meg, ami egy gyors és egy lassan mozgó komponenst feltételez.

Az illesztésekből származó diffúziós állandókat és a lassú komponensek hányadát a 3. táblázatban tüntettem fel. A DNS-hez nem kötődő c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP lassú komponensének hányada jóval alacsonyabb, mint a heterodimeré (c-Fos-EGFP+c-Jun-mRFP1) vagy a c-Fos homodimeré, ami arra utal, hogy ezek a fehérje komplexek kötődnek a kromatinhoz, ami a lassulásukat okozza.

	D <sub>1</sub> ± SEM (μm <sup>2</sup> /s)	D <sub>2</sub> ± SEM (μm <sup>2</sup> /s)	Lassú komponens hányada ± SEM	n
EGFP	19.8 ± 1.5	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.02	11
c-Fos <sup>ΔΔ</sup> -EGFP	11.8 ± 1.9	0.38 ± 0.2	0.19 ± 0.03	16
c-Fos-EGFP+c-Jun-mRFP1	5.3 ± 0.4	0.19 ± 0.03	0.38 ± 0.02	19
c-Fos-EGFP	5 ± 0.6	0.26 ± 0.06	0.35 ± 0.03	17

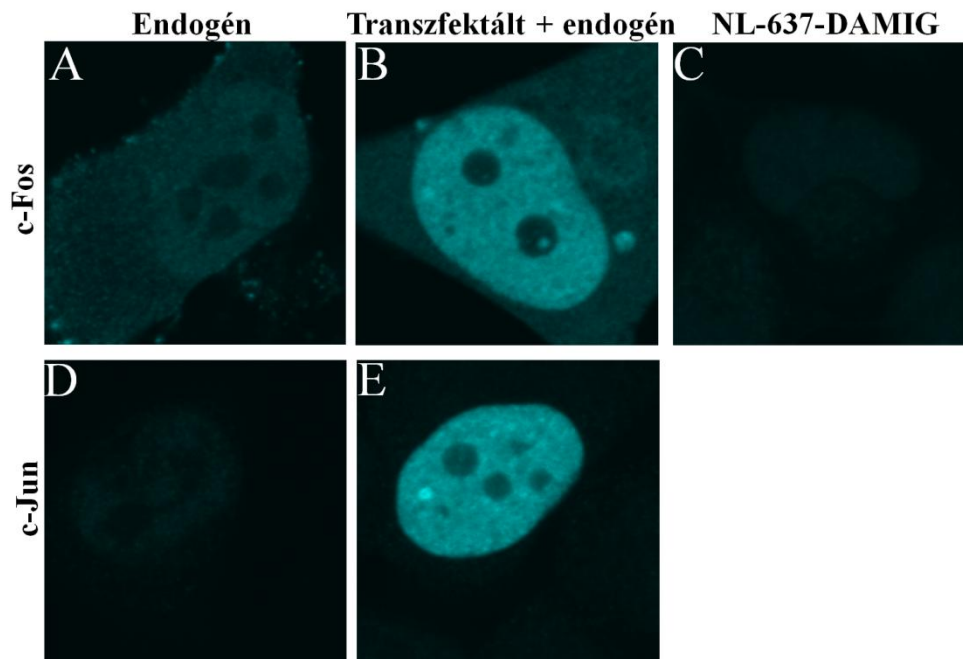
**3. táblázat: Diffúziós állandók és a lassú komponensek hányada**

A kétkomponensű illesztésekből származó diffúziós állandók és a második, lassú komponensek hányadát mutatja a táblázat. A homo- és heterodimeres esetén a lassú komponens aránya magasabb, mint a monomerek esetén, ami a kromatinhoz való kötődésüket valószínűsíti. Az n a sejtek számát jelöli.

**5.4. Endogén és transzfektált c-Fos és c-Jun fehérjék koncentrációjának meghatározása**

A c-Fos homodimeres disszociációs állandójának meghatározásához ismernünk kell az endogén c-Fos és c-Jun fehérjék mennyiségét is. Ha az endogén fehérjék koncentrációja jelentős, akkor a  $K_d$  számolásakor azokat is figyelembe kell venni. 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.





**21. ábra: c-Fos és c-Jun fehérjék mennyisége HeLa sejtekben**

c-Fos fehérje endogén szintje (A), illetve endogén és transzfekcióval bejuttatott fehérje együttes szintje (B). A másodlagos antitest (aspecifikus kötődés) jele a C ábrán látható. c-Jun transzkripció faktor endogén (D) illetve endogén és transzfekcióval bejuttatott fehérje együttes szintje (E).

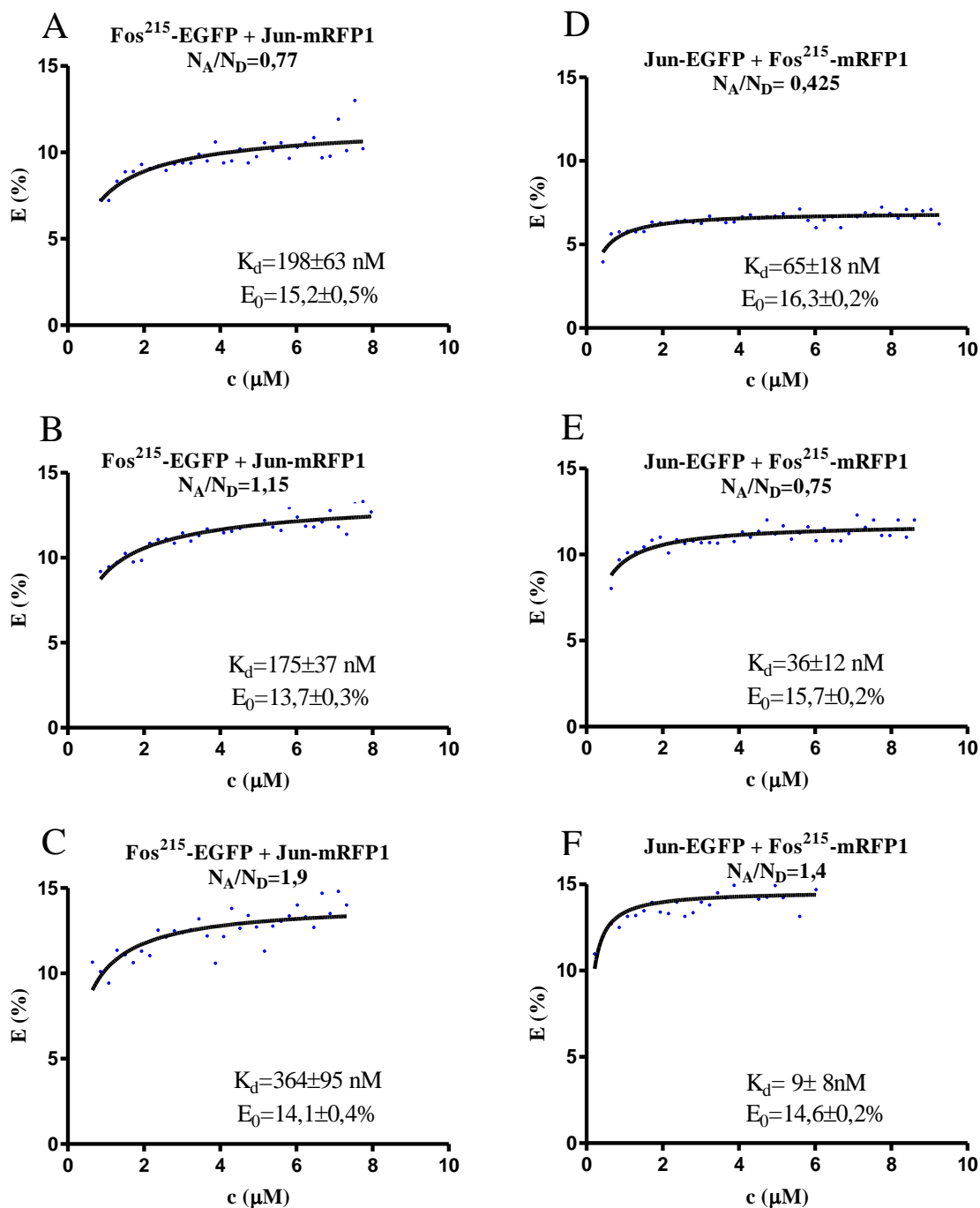
Áramlási citométerrel megmértük a c-Fos-EGFP, illetve a c-Jun-EGFP EGFP-től származó zöld jelét, amit a kalibrációs gyöngy fluoreszcenciájával összevetve meghatároztuk a transzfektált fehérje abszolút koncentrációját. A transzfektálatlan minta immunfluoreszcens vörös jele arányos az endogén koncentrációval, míg a transzfektált mintánál ez az endogén és transzfektált fehérjék együttes mennyiségével. A c-Fos-EGFP koncentrációjának ismeretében az endogén koncentrációt is meg tudtuk határozni (28-30. egyenlet). A c-Fos fehérje endogén koncentrációja így  $113 \pm 11 \text{ nM}$ -nak, míg a c-Jun fehérjéé  $94 \pm 10 \text{ nM}$ -nak adódott, a transzfektált fehérjék koncentrációja  $300 \text{ nM} - 9,6 \text{ }\mu\text{M}$  tartományban mozgott.

**5.5. c-Fos–c-Jun heterodimer és a c-Fos homodimer disszociációs állandójának meghatározása**

A disszociációs állandó ( $K_d$ ), ami a komplex stabilitását jellemzi, a fehérjék közötti kölcsönhatást jellemző legfontosabb paraméterek egyike. Mivel a komplex kialakulásának mértéke arányos a mért FRET hatásfokkal, 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.

c-Fos<sup>215</sup>-EGFP-vel és c-Jun-mRFP1-gyel, illetve c-Jun-EGFP-vel és c-Fos<sup>215</sup>-mRFP1-gyel kotranszfektált sejtek esetében meghatároztuk a sejtenkénti FRET hatásfokot ( $E$ ), a donor koncentrációt  $[F_D]_t$ , ami a FRET-re korrigált és a gyöngyre normalizált donor intenzitásból származik, és az akceptor-donor arányt ( $N_A/N_D$ ). A sejteket az akceptor-donor arány alapján csoportokba soroltuk, majd ábrázoltuk a FRET hatásfok értékeket a donor koncentráció függvényében. A FRET hatásfok növekvő  $N_A/N_D$  arány mellett emelkedett, mert nagyobb koncentráció esetén megnő annak a valószínűsége, hogy egy gerjesztett donoros molekula mellett akceptorral jelölt partner van jelen. Az adatokat a 40. egyenletben leírt modellfüggvény alapján illesztettük meg, ami figyelembe veszi a jelöletlen endogén c-Fos és c-Jun fehérjék jelenlétét is.

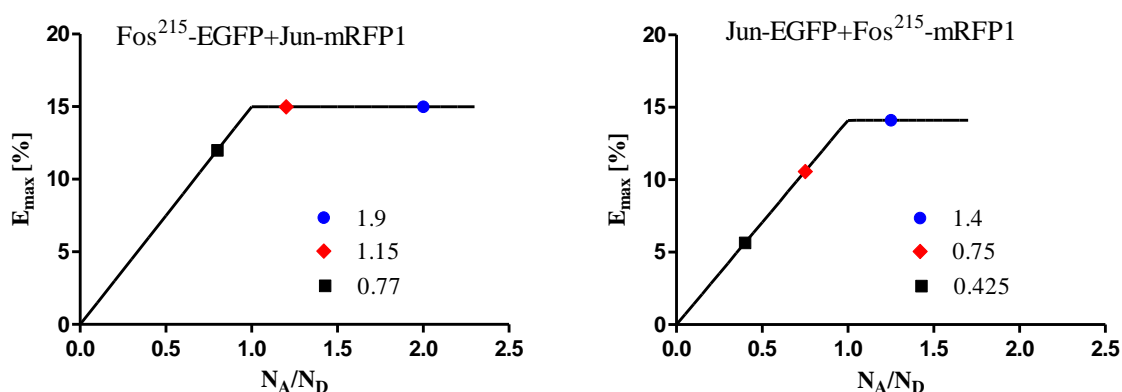
A modellfüggvényeket Dr. Vámosi György vezette le, az illesztéseket a GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) szoftver segítségével én végeztem el.



**22. ábra: Heterodimerek disszociációs állandója és E<sub>0</sub> értékei különböző akceptor-donor arányú csoportok esetén**

A sejteket kotranszfektáltuk c-Fos<sup>215</sup>-EGFP+c-Jun-mRFP1 illetve c-Jun-EGFP+c-Fos<sup>215</sup>-mRFP1 plazmidokkal. A sejtenkénti adatokat akceptor/donor molekula arány szerint csoportokba soroltuk, majd donor intenzitás alapján 0,25 μM-onként intervallumokba csoportosítottuk. A mért FRET hatásfokot ábrázoltuk a donorral jelölt c-Fos<sup>215</sup> illetve c-Jun koncentráció függvényében. Az illesztett függvényből megkaptuk a disszociációs állandó és az E<sub>0</sub> értékeit. Növekvő akceptor-donor aránnyal nő a FRET hatásfok mindkét heterodimer esetén.

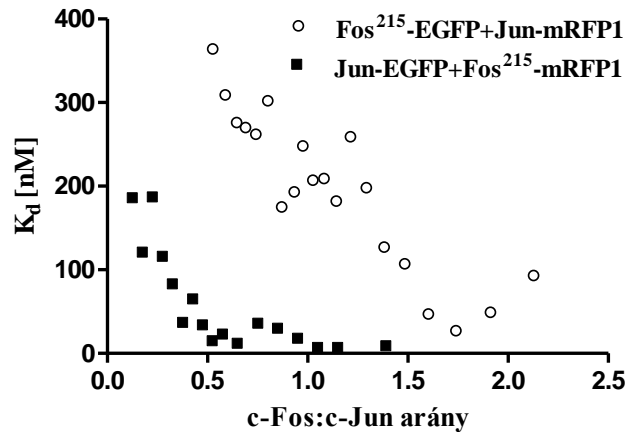
Az illesztésből származó látszólagos  $K_d$  értéke 10-370 nM között változik különböző akceptor-donor arányoknál mindkét pár esetén.  $E_0$  az egy donor-akceptor párra jellemző FRET hatásfok. A 23. ábrán a folyamatos vonal az elméletileg elérhető legmagasabb FRET hatásfokot mutatja az akceptor-donor arány függvényében. Ezeket az értékeket akkor kapnánk, ha az összes lehetséges donor-akceptor komplex létrejönne (adott akceptor/donor arány mellett végtelenhez tartó koncentrációk esetén). Heterodimerek esetén a maximális FRET hatásfok értéke folyamatosan növekszik, majd  $N_A/N_D=1$  esetén eléri az  $E_0$  értéket és magasabb akceptor-donor arány esetén nem emelkedik tovább.



### 23. ábra: Elméletileg elérhető legmagasabb FRET hatásfok heterodimerek esetén

A folytonos vonal a különböző akceptor-donor arányoknál elérhető maximális FRET hatásfok értékeit mutatja, mikor az összes c-Jun molekula heterodimert alkot a c-Fos fehérjével ( $E_0=15\%$  és  $14,1\%$  az illesztésekből). A színes pontok mért értékeket jelölnek.

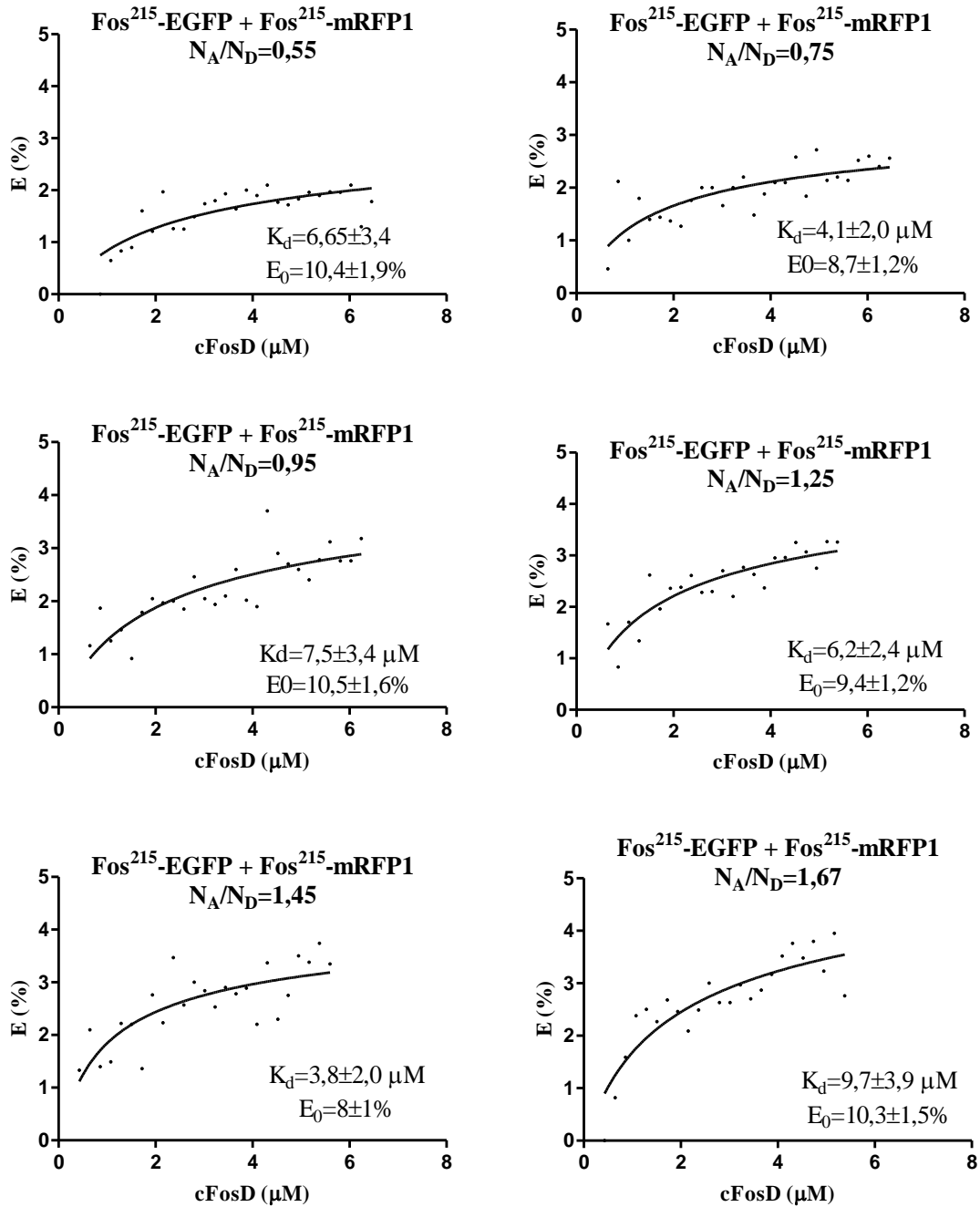
Az akceptor-donor arány szerint csoportosított adatokat donor intenzitás alapján 0,25-ös intervallumokba soroltuk, így csökkentve a sejtes adatok szórását. A 24. ábrán az adatsorok illesztéséből kapott disszociációs állandókat ábrázoltuk c-Fos:c-Jun arány függvényében mindkét irányú donor-akceptor jelölés esetében. A disszociációs állandó a c-Fos:c-Jun arány növekedésével csökken, nagyobb c-Fos:c-Jun aránynál, ahol több c-Fos volt jelen, alacsonyabb disszociációs állandót kaptunk mindkét heterodimer esetén. A különbséget okozhatja a c-Jun homodimerek kialakulása, ahol ezen homodimerek kialakulása kompetálhat a heterodimerek kialakulásával. 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.



**24. ábra: Disszociációs állandó függése a c-Fos–c-Jun aránytól**

Donor intenzitás alapján csoportokba sorolt adatok illesztéséből származó disszociációs állandót ábrázoltuk a c-Fos–c-Jun arány függvényében. Nagyobb c-Fos–c-Jun aránynál, ahol több c-Fos volt jelen, alacsonyabb disszociációs állandót kaptunk mindkét heterodimer esetén.

A Fos<sup>215</sup>-EGFP-vel és Fos<sup>215</sup>-mRFP1-gyel kotranszfektált sejteknél a heterodimer esetén kapott értéknél nagyobb disszociációs állandót vártunk. 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 pozitív FRET-et. Az illesztés az endogén c-Fos fehérjék jelenlétével is számol, hiszen ezek szintén összekapcsolódhatnak a jelölt c-Fos illetve c-Jun fehérjékkel. Az  $E$  versus  $cFos_D$  görbéket a 45. és 46. egyenletek szerint nemlineáris regresszióval illesztettük meg.

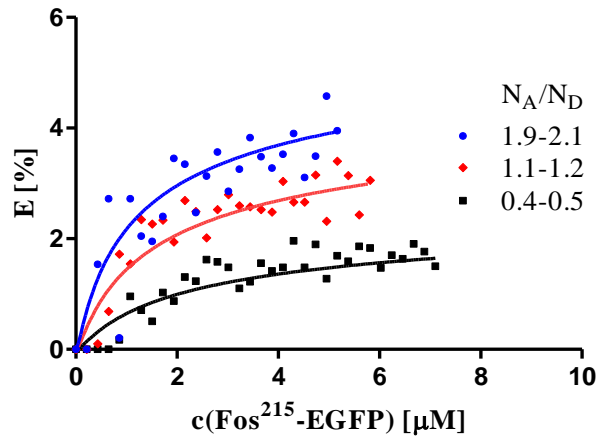


**25. ábra: c-Fos homodimerek disszociációs állandója és  $E_0$  értékei különböző akceptor-donor arányú csoportok esetén**

A közel azonos akceptor-donor arányú sejteket donor intenzitás szerinti csoportosítottuk, majd a mért FRET hatásfokot ábrázoltuk a donorral jelölt c-Fos<sup>215</sup> koncentráció függvényében. A független illesztésekből megkaptuk a disszociációs állandó és az  $E_0$  értékeit.

A különböző akceptor-donor arányú adatszoportokat úgy is megillesztettük, hogy az adatszoportokra azonos  $K_d$  és  $E_0$  értékeket illesztettünk. Az összekapcsolt illesztéssel  $K_d=6,7\pm 1,7$  μM és  $E_0=9,5\pm 0,8\%$  értékeket kaptunk. Amikor a különböző akceptor-donor

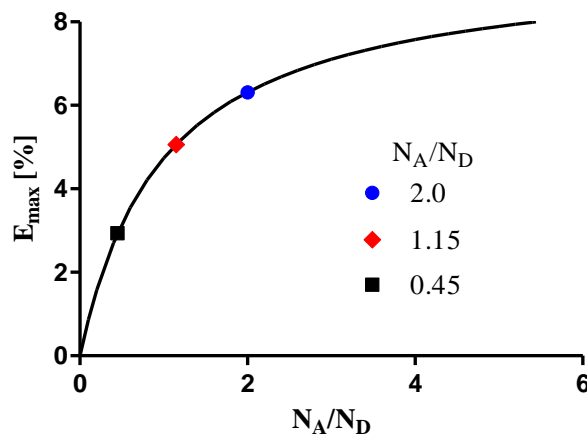
arányú csoportokat függetlenül illesztettük meg, a  $K_d$  és az  $E_0$  értéke 5,4 és 9,7  $\mu\text{M}$  illetve 9,1% és 11,9% között változott.



**26. ábra: Különböző akceptor-donor arányú csoportok kapcsolt illesztése**

$c\text{-Fos}^{215}\text{-EGFP}+c\text{-Fos}^{215}\text{-mRFP1}$  homodimerek FRET értékeit ábrázoltuk a donorral jelölt  $c\text{-Fos}^{215}$  koncentrációjának függvényében különböző akceptor-donor arányú csoportok esetén, ahol az eltérő adatsorokra azonos disszociációs állandót és  $E_0$  értékeket illesztettünk.

A homodimer esetén a maximálisan elérhető FRET hatásfok közelíti az  $E_0$  értékét, ahogy az akceptor-donor arány tart a végtelenhez.



**27. ábra: Maximális FRET hatásfok elméleti értéke homodimer esetén**

Maximálisan elérhető FRET hatásfok értéke különböző akceptor-donor arányú csoportok esetén, mikor az összes  $c\text{-Fos}$  molekula homodimert alkot ( $E_0=9,5\%$  az illesztésekből). A színes pontok a 26. ábrán bemutatott titrálási görbékhez tartozó  $N_A/N_D$  értékeket jelölik.

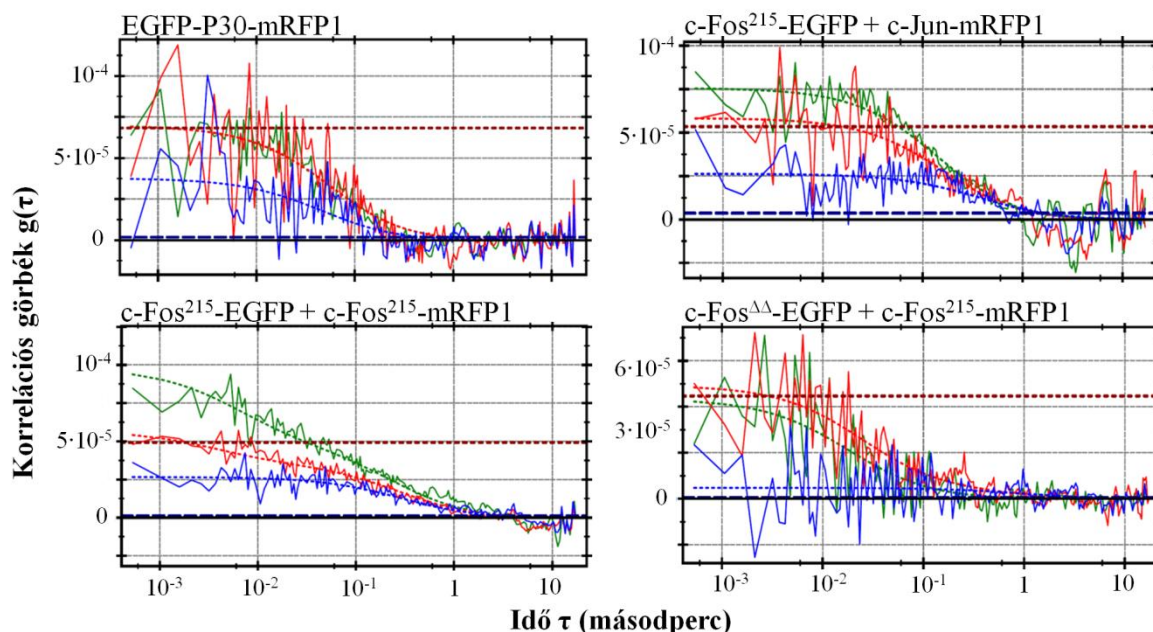
A heterodimer disszociációs állandója kisebb, mint a c-Fos homodimeré, ami azt jelenti, hogy ugyanakkora c-Fos és c-Jun koncentráció esetén a c-Fos–c-Jun heterodimer kialakulásának nagyobb a valószínűsége.

### **5.6. c-Fos fehérjék homoasszociációja és DNS-hez való kötődése**

Fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) méréssel egyszerre két, különböző spektrumú festékkel jelölt molekula mozgását detektálhatjuk és meghatározhatjuk a fluoreszcencia autokorrelációs (ACF) és keresztkorrelációs (CCF) függvényeit. A duplán jelölt sejtek esetén a pozitív CCF amplitúdó a molekulák legalább egy részének együttmozgását jelzi, míg a CCF és ACF amplitúdók aránya a komplexet alkotó molekulák hányadával arányos. A SPIM-FCCS méréseket EM-CCD kamerával ellátott mikroszkópon végeztük, ahol egyszerre egy sejt több pixelében tudunk mérni. A mérés során kétdimenziós térképek formájában kapunk információt a molekulák és az együttmozgó komplexek mobilitásáról és kölcsönhatásáról [110].

Méréseinkhez a sejteket az alábbi kombinációkban kotranszfectáltuk: c-Fos<sup>215</sup>-EGFP+c-Fos<sup>215</sup>-mRFP1, c-Fos<sup>215</sup>-EGFP+Jun-mRFP1, c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP+c-Fos<sup>215</sup>-mRFP1 (negatív kontroll) és EGFP-P30-mRFP1 (pozitív kontroll, ahol az EGFP és mRFP1 fehérjéket 30 prolinból álló polipeptidlánc köti össze). A méréshez azokat a sejteket választottuk ki, amelyek kb. azonos mennyiségű zöld és vörös molekulát fejeztek ki és a fehérjék koncentrációja a FRET méréseknél használt tartományba esett (300 nM – 9,6 μM). A 28. ábrán a négy minta egy-egy reprezentatív sejtje egy pixelének a korrelációs görbéi láthatók.

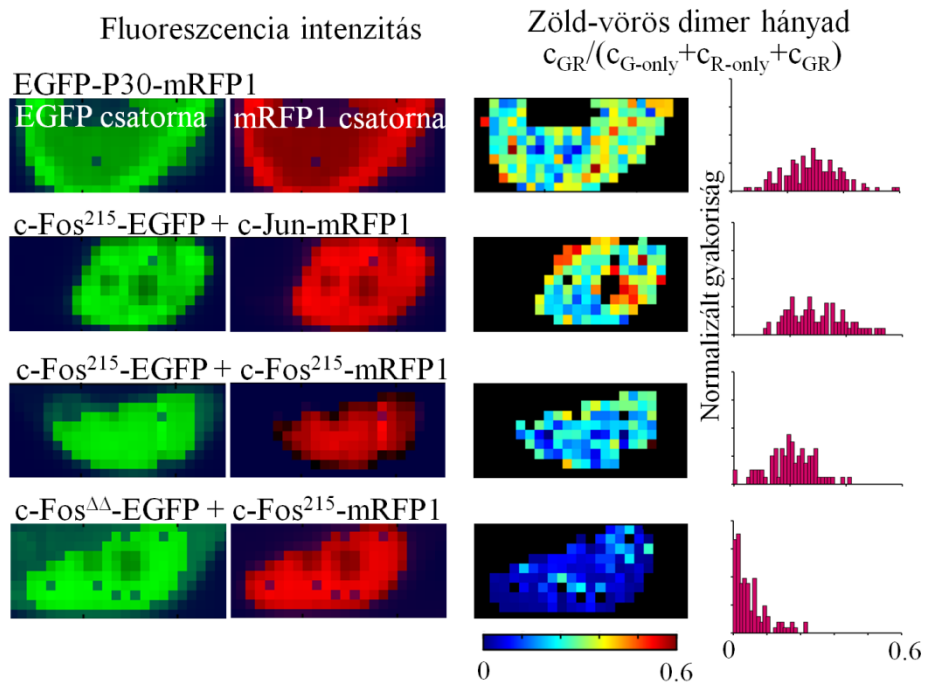




**28. ábra: SPIM-FCCS mérésekből származó auto- és keresztkorrelációs görbék**

Zöld (EGFP ACF), vörös (mRFP1 ACF) és kék (CCF) folytonos vonallal a mérési adatokat, míg szaggatott vonallal az illesztett modellfüggvényeket jelöltük. Az autokorrelációs görbék illesztésénél két, míg a keresztkorreláció esetén egy diffúziós komponens tételünk fel. A vízszintes piros vonal jelöli az EGFP átvilágítására korrigált vörös ACF amplitúdót, míg a kék vízszintes vonal az EGFP átvilágításból származó keresztkorreláció mértékét mutatja.

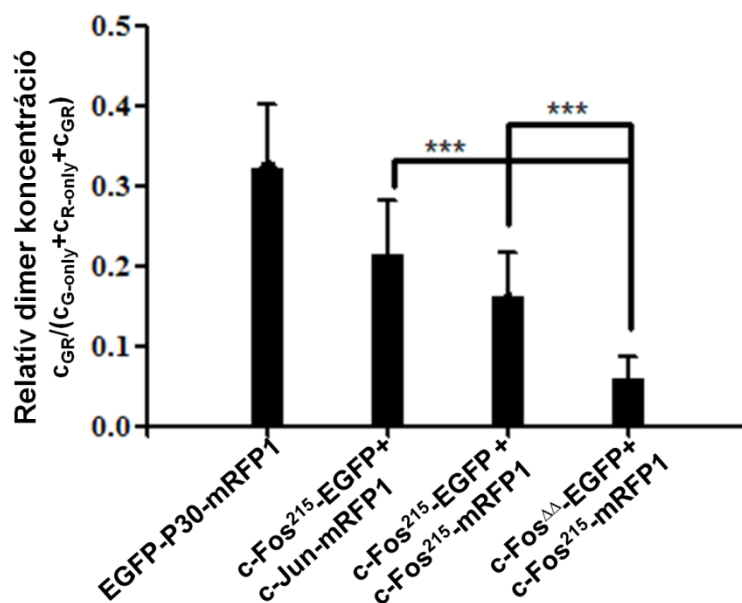
Zöld (EGFP), vörös (mRFP1) és kék (keresztkorreláció) folytonos vonallal jelöltük a mérési adatokat, míg szaggatott vonallal az illesztett egyeneseket tüntettük fel. A vízszintes piros vonal jelöli az EGFP átvilágítására korrigált vörös ACF amplitúdót, míg a kék vízszintes vonal az EGFP átvilágításból származó keresztkorreláció mértékét mutatja. Az ezen érték feletti keresztkorreláció a zöld és vörös molekulák együttes diffúziójára utal. c-Fos homodimerizáció csak magas fehérje koncentráció esetén mutatható ki, ezért magas koncentrációknál mértünk. Így a mért autokorrelációs amplitúdók alacsonyok voltak, azonban ilyen magas koncentrációk mellett is értékelhető adatokat kaptunk. Minden egyes pixelben elvégeztük az illesztést, így pixelenként volt zöld és vörös ACF illetve CCF adatunk. Az illesztés során a három görbénél kapcsolatosan illesztettük a zöld (G-only), a vörös (R-only) és a zöld-vörös dimer koncentrációt (GR). Az autokorrelációs görbéket két komponensű, míg a keresztkorrelációs görbéket egy komponensű diffúziós modellel illesztettük. A diffúziós állandókat nem kapcsoltuk össze, mert így jobb illesztést kaptunk. A 29. ábrán reprezentatív sejtekről készült kétdimenziós térképeket és hisztogramokat láthatunk.



**29. ábra: Fluoreszcencia intenzitás térképek és relatív dimer koncentrációk**

A két első oszlop egy kiválasztott sejt EGFP illetve mRFP1 fluoreszcencia intenzitás térképét mutatja. A harmadik oszlopban az illesztésekből meghatározott zöld-vörös dimerek hányadának térképe, míg a negyedik oszlopban a kiválasztott sejt dimer hányadának eloszlása látható.

Az első két oszlop egy kiválasztott sejt EGFP (zöld) és mRFP1 (vörös) fluoreszcencia intenzitás térképét mutatja. A harmadik oszlop mutatja a relatív dimer koncentráció  $c_{GR}/(c_{G-only}+c_{R-only}+c_{GR})$  térképeket, ami az összes detektált molekula közül a dimerben levő fehérjék hányadát mutatja. A negyedik oszlopban levő hisztogram ezen paraméter pixelenkénti eloszlását mutatja.

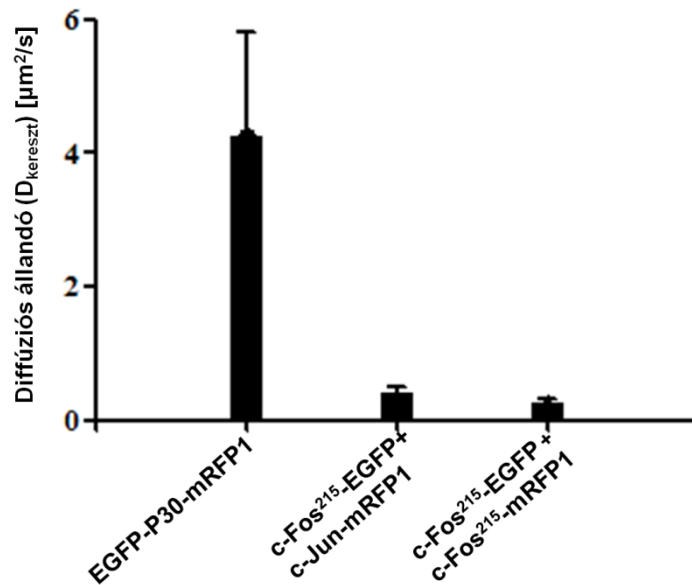


### 30. ábra: Zöld-vörös dimerek hányada

A pixelenkénti kiértékelés során a keresztkorrelációból meghatározott paraméter medián értékeit átlagoltuk ki. A sejtszám mintánként minden esetben több volt, mint tíz. A t teszt mind a c-Fos–c-Jun heterodimer, mind a c-Fos heterodimer esetén szignifikáns eltérést mutatott a negatív kontrolltól, \*\*\* $p < 0.0001$ .

A negatív kontroll (c-Fos<sup>ΔΔ</sup>-EGFP+c-Fos<sup>215</sup>-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-Fos<sup>215</sup> homodimer kicsit alacsonyabbat (0,16), mint a heterodimer, de még mindig szignifikánsan magasabb értéket, mint a negatív kontroll. Az ábrán több mint tíz sejtre pixelenként kiszámolt adatok medián értékeinek átlagát tüntettünk fel, szórással. A felső határ kisebb, mint egy, amiért több tényező felelős. A zöld és a vörös detektálási térfogatok átfedése, a festékek részleges fotoelhalványítása és a fluoreszcens fehérjék nem megfelelő érése, ami a duplán jelölt molekulák mellett csak zöld és csak vörös fehérjéket is eredményezett, mind szerepet játszott ebben.

Vizsgáltuk a fehérje dimerek sejtmagbeli mobilitását is, amit a CCF-ek illesztéséből kaptunk meg. Egykomponensű illesztést használva meghatároztuk azon komplexek átlagos mozgékonyágát, amelyek zöld és vörös fluorofórokat tartalmaztak. Egy második komponens illesztésére nem volt szükség, egy komponens jól leírta a komplexek diffúzióját.



### 31. ábra: Keresztkorrelációból meghatározott diffúziós állandók

A CCF-ek egykomponensű illesztéséből pixelenkénti kiértékeléssel kapott diffúziós állandók medián értékeinek átlagát mutatja az ábra. A hetero- és homodimer esetén a diffúziós állandó értéke alacsonyabba pozitív kontrollhoz viszonyítva, ami azt mutatja, hogy mind a két dimer bekötődik a lassan mozgó kromatinhoz.

A negatív kontroll esetén a keresztkorrelációt nem tudtuk megfelelően megilleszteni a nagyon alacsony amplitúdók miatt. Az illesztés az együttmozgó zöld-vörös komplexek átlagos mobilitását mutatja. EGFP-P30-mRFP1 fúziós fehérje átlagos diffúziós állandója  $\sim 4,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , míg c-Fos<sup>215</sup>-c-Fos<sup>215</sup> 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 komponenst tudunk illeszteni az adatokra, ami arra utalhat, hogy a komplexek egy lassan mozgó sejtmag komponenshez, nagy valószínűséggel a kromatinhoz kötődhetnek.

A diffúziós állandók viszonylag nagy hibát adnak, ami a kamera behatárolt időbeni feloldásából és abból adódik, hogy a homodimerizációhoz szükséges nagy koncentrációnál a fluktuáció rosszul mérhető, azonban az eredményeink még így is hasonlóak a konfokális FCS-sel a c-Fos-c-Jun komplexre és a pozitív kontroll mintára kapott adatokhoz [104]. Az egyedi pixelekből mért adatok minősége javítható a pixelek összevonásával, és az eredmények megbízhatóságát garantálja a sejtek nagyszámú pixeléből kapott jó statisztika.

## 5.7. FRET kiértékelés szuboptimális mérési körülmények között

FRET egy spektroszkópos technika, amelyet gyakran használnak molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára. Több műszer is alkalmas a mérésére, például a konfokális mikroszkóp, a lézer pásztázó citométer illetve az áramlási citométer is. Konfokális mikroszkópiás méréseinket kétféleképpen, arányalapú és akceptor fotoelhalványítás technikával is elvégeztük. Arányalapú FRET számolásnál az analízis egyik kulcsfontosságú része az  $\alpha$  faktor meghatározása, ahol a donor és az akceptor fluoreszcencia intenzitását a molekulaszámra és a gerjesztési hatékonyságra normalizáljuk. Méréseinkhez donor-akceptor fúziós fehérjét használtunk, ahol a festékek 1:1 arányban fejeződnek ki, a gerjesztési hatékonyság normálásához pedig a donor és akceptor festékeket ugyanazzal a lézervonallal gerjesztettük és a detektált jeleket osztottuk a gerjesztési hullámhosszra jellemző abszorpciós együtthatókkal.

ECFP és EYFP gerjesztésére a konfokális mikroszkóp 458 és 514 nm-es lézervonalait használtuk, ami kitűnő jel-zaj arányt biztosít. A 4. táblázatban két arányalapú FRET hatásfok értéket tüntettünk fel minden minta esetén, a különböző  $\epsilon_2$  értékekkel számolva. Az  $\epsilon_2 = \epsilon_{458nm}^{ECFP} / \epsilon_{458nm}^{EYFP}$  érték bizonytalansága abból adódik, hogy az ECFP maximális extinkciós együtthatójának irodalomban fellelhető értéke nem egységes (26,000 [112]; 28,750 [113] és 32,500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [114]). Mivel 458 nm-nél az abszorpciós együtthatót a maximális érték 84,2 százalékaként számítottuk ki, így az  $\epsilon_2$  értéke sem adható meg egyértelműen. Mindemellett a táblázatban jól látható, hogy az arányalapú módszerrel meghatározott FRET adatok jól egyeznek az akceptor fotoelhalványítással kapott eredményekkel.

	Arányalapú E (átlag ± SD) $\varepsilon_2=3.18$	Arányalapú E (átlag ± SD) $\varepsilon_2=3.97$	Akceptor fotoelhalványítás E (átlag ± SD)
ECFP-EYFP (poz. kontroll)	47,3±3%	37,9±2,5%	48,5±1,8%
ECFP + EYFP (neg. kontroll)	0,9±1,2%	0,6±0,8%	1,0±1,5%
c-Fos <sup>215</sup> -ECFP + c-Jun-EYFP	22,0±1,9%	16,0±1,1%	21,2±3,3%
c-Fos-ECFP + c-Jun-EYFP	7,9±2,5%	5,5±1,7%	8,0±3,6%

#### 4. táblázat: Konfokális mikroszkópiás FRET adatok

Arányalapú kiértékelés során az extinkciós együttható legalacsonyabb ( $\varepsilon_{434}^{CFP}=26,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , bal oszlop) és legmagasabb ( $32,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , középső oszlop) értékével számoltunk. A legalacsonyabb epszilon kettő értékkel kapott FRET hatásfok adatok közelítik leginkább az akceptor fotoelhalványítással kapott eredményeket.

Lézer pásztázó citométer és FACS Aria áramlási citométer esetén a 458 és 514 nm-es lézerek nem voltak elérhetőek, az ECFP-t 405 nm-es, míg az EYFP festéket 488 nm-es lézerrel gerjesztettük. A 405 nm-es lézerrel az ECFP jól gerjeszthető, de az EYFP gerjesztődése alacsony (az extinkciós együttható csúcs értékének kevesebb, mint 2%-a, a pontos érték nem ismert, 0,5% és 2% közötti értéknek tekintettük). Ezért az  $\alpha$  faktor pontos meghatározása nem volt lehetséges, mert az  $\varepsilon_2$  érték (és az  $S_2$  átvilágítási faktor) meghatározása ebből adódóan bizonytalan volt. Az említett okok következtében a FRET hatásfok értékek is nagy bizonytalanságot hordoztak. További hibaforrás volt még az  $\varepsilon_4$  értékének (ld. a 3.6.2 fejezetet) bizonytalansága is, ami szintén függött az EYFP 405 nm-en való alacsony gerjeszthetőségétől. Ha behelyettesítjük az extrém  $\varepsilon$  értékeket az extinkciós együtthatók arányát meghatározó képletekbe, akkor a pozitív kontroll FRET hatásfok értéke széles tartományt fed le (5. táblázat).

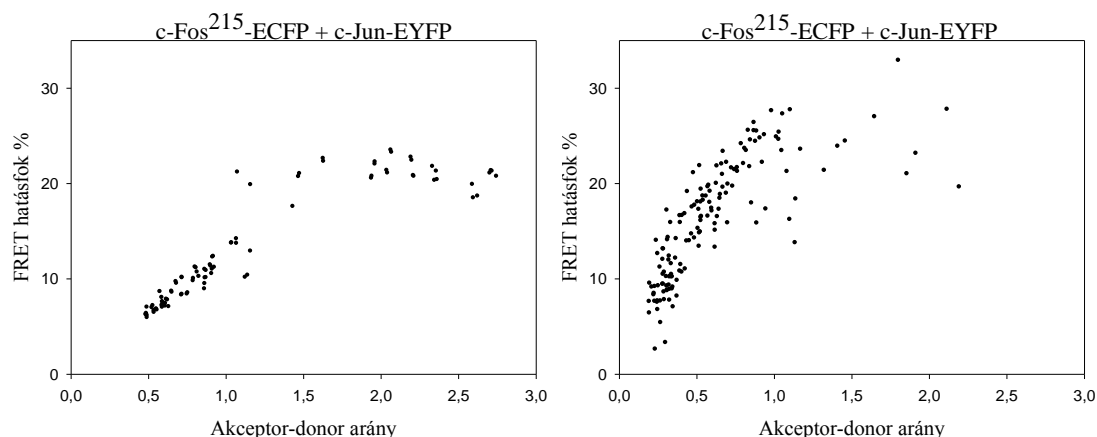
	$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{405}^{CFP}}{\varepsilon_{405}^{YFP}}$	$\varepsilon_4 = \frac{\varepsilon_{488}^{CFP} \varepsilon_{405}^{YFP}}{\varepsilon_{405}^{CFP} \varepsilon_{488}^{YFP}}$	Pozitív kontroll átlagos FRET hatások tartománya (ECFP-EYFP)
Lézer pásztázó citométer	42,6–9,5	0,0029–0,0066	44%–224%
Áramlási citométer			31%–135%

**5. táblázat: LSC és áramlási citometriás kiértékelés**

Lehetséges extinkciós együttható hányadok és FRET hatások adatok tartományai pozitív kontroll esetében LSC-n és áramlási citométeren. Az epsilon tényezők meghatározásának pontatlansága miatt a pozitív kontroll esetén meghatározott FRET hatások értékek nagy bizonytalanságot mutatnak.

Azért, hogy ezt a problémát kikerüljük, referenciaként ECFP-EYFP fúziós fehérjét használtunk, aminek FRET hatásfokát (48,5%) konfokális mikroszkópon mért akceptor fotoelhalványítás technikával határoztuk meg, ahol nincs szükség az  $\alpha$  faktor ismeretére. Ezt az  $E$  értéket használtuk a többi műszer esetén sztenderdként, ami lehetővé tette az arányalapú technikával történő számolás során az  $\alpha$  faktor meghatározását úgy, hogy a pozitív kontrollra megkapjuk a 48,5%-os értéket. Az így kapott  $\alpha$  faktort felhasználva a további mintákon megbízható FRET kiértékelést végezhetünk annak ellenére, hogy nem ideális hullámhosszon gerjesztettük az ECFP és EYFP fehérjéket.

Méréseinket c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok között végeztük. A konfokális mikroszkóppal és lézer pásztázó citométerrel mért adatokat a 33. ábrán hasonlítottuk össze, ahol a FRET hatékonyságot ábrázoltuk az akceptor-donor arány függvényében. A c-Fos–c-Jun heterodimerek kialakulása függ az abszolút koncentrációtól és a fehérjék relatív mennyiségétől; ha növeljük az akceptor-donor arányt, a FRET hatások növekedni fog. Csak azokat a sejteket választottuk ki a kiértékeléshez, ahol az akceptor-donor arány nagyobb volt, mint egy és ahol az  $E$  vs. akceptor-donor arány görbében telítődés volt látható.



### 33. ábra: FRET hatásfok akceptor-donor aránytól való függése

Konfokális mikroszkóppal (bal oldali ábra) és lézer pásztázó citométerrel (jobb oldali ábra) mért FRET hatásfok adatok függése az akceptor-donor aránytól. A FRET adatok szórásának csökkentése érdekében hasonló donor intenzitású sejteket választottunk ki, míg az akceptor expresszió széles tartományban változott. A FRET hatásfok értéke telítődést mutat, ha az akceptor-donor arány nagyobb, mint egy, mert ekkor minden donornak lehet egy akceptoros párja.

A lézer pásztázó és áramlási citometriás adatok kiértékelése során a pozitív kontroll esetén az  $\alpha$  értékét úgy állítottuk be, hogy a FRET hatásfok átlaga 48,5% legyen. Ezt az  $\alpha$  értéket használtuk a továbbiakban a többi minta kiértékeléséhez. A különböző műszereken mért FRET hatásfok adatok ezt a módszert alkalmazva jó egyezést mutatnak (6. táblázat).

	Konfokális mikroszkóp	Lézer pásztázó citométer	Áramlási citométer
Minta	E (átlag $\pm$ SD)	E (átlag $\pm$ SD)	E (átlag $\pm$ SD)
ECFP-EYFP (poz. kontroll)	48,5%	48,5%	48,5%
ECFP + EYFP (neg. kontroll)	0,84 $\pm$ 0,9%	0,65 $\pm$ 1,6%	1,8 $\pm$ 1%
c-Fos <sup>215</sup> -ECFP + c-Jun-EYFP	21,1 $\pm$ 1,3%	23,6 $\pm$ 2,8%	22,1 $\pm$ 3,7%
c-Fos-ECFP + c-Jun-EYFP	8,3 $\pm$ 1,9%	8,6 $\pm$ 2,9%	10,2 $\pm$ 3,6%

### 6. táblázat: Sejtenként meghatározott FRET hatásfok adatok

Számolás során az  $\alpha$  faktort úgy állítottuk be, hogy a pozitív kontroll esetén a FRET hatásfok 48,5% legyen, amely értéket akceptor fotoelhalványítással határoztunk meg. Csak azokat a sejteket vettük figyelembe, ahol az akceptor-donor arány egynél nagyobb volt.



## 6. MEGBESZÉLÉS

Az AP-1 kétféle aktivitással rendelkezik: lehet anti-proliferatív hatású (anti-onkogenikus), amikor apoptózist indukál, illetve serkentheti is a proliferációt (onkogenikus), a sejt túlélését indukálva [115-117]. Az AP-1 olyan dimerek keveréke, amelyek a Fos, Jun és ATF családok fehérjéiből állnak. Ezen fehérjék mindegyike eltérően fejeződik ki és szabályozásuk is különböző, ezért minden egyes sejt AP-1 dimer keveréket tartalmaz, melyek funkciója is eltérő. Kimutatták, hogy a Jun fehérjéknek egyedi és kritikus szerepük van a sejtciklus szabályozásában [17], illetve hogy a c-Fos növeli a c-Jun transzformáló képességét [118]. Általánosan elmondható, hogy a c-Jun onkogénként, míg a JunB anti-onkogénként viselkedik.

Számos cikkben leírták az izolált c-Fos transzkripciós faktor homodimerizációját, ahol a fehérje főként a leucin cipzárat tartalmazta. Ezekben a tanulmányokban azt állították, hogy a homodimerek stabilitása alacsony és feltételezhetően az élő sejtekben nem fordulnak elő. FRET mikroszkópia, áramlási citometria, FCS és képkalkoló FCCS kombinálásával élő sejtekben kimutattuk, hogy a c-Fos transzkripciós faktor homodimert alkot. A c-Fos homodimer esetén a disszociációs állandó látszólagos értéke HeLa sejtekben  $6,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$  volt, míg a c-Fos–c-Jun heterodimernél ez tartomány 10-370 nM-nak adódott. Más munkacsoport is használta a FRET technikát a c-Fos–c-Jun heterodimer disszociációs állandójának meghatározására *in vitro*, izolált fehérjékkel végzett kísérletekben, ahol a c-Fos bZIP domén régióját fluoreszcenciával, míg a c-Junét rodaminnal jelölték meg [119]. A számolások során feltételezték, hogy c-Fos–c-Jun heterodimer kialakulására nincs hatással a c-Jun homodimerek jelenléte, és a disszociációs állandó értékét 23 nM-ban állapították meg. Mások szcintillációs közelségi vizsgálatokat végeztek, ahol a c-Jun biotinált leucin cipzárt streptavidinnel fedett mikrogyöngyökre kötötték ki, és a c-Fos leucin cipzár doménjét szabad ligandként adták a rendszerhez [120], a disszociációs állandó értékét 110 nM-ban határozták meg. Heuer és munkatársai peptid alapú ELIZA-t fejlesztett ki, ahol a glutation S-transzferázhoz kapcsolt rekombináns c-Fos leucin cipzár doménjét a plate aljára kötötték ki, amihez a változó koncentrációban adott, biotinnal jelölt c-Jun cipzárak kikötődtek. A kihorgonyozott fehérjék koncentrációját és a disszociációs állandóját streptavidin alapú enzim komplex amplifikációs rendszerrel határozták meg [121], ahol a disszociációs állandó 1 nM volt. Szerintük Patel és munkatársai által használt bZIP motívum DNS hiányában kinyúlik a leucin cipzárból és így jelentős tasztító erőként hat, ami csökkenti a dimerizációs affinitást, ami magyarázhatja a két disszociációs állandó különbségét. Mindhárom munkacsoport

szintetizált leucin cipzárt használt a mérései során, viszont a leucin cipzár régiókon kívül eső aminosavaknak is lehet szerepük a heterodimerizáció folyamatában [122], ami bizonytalanná teszi az általuk meghatározott disszociációs állandók relevanciáját.

A  $K_d$  általunk meghatározott látszólagos értéke, ami széles tartományt fed át (10-370 nM), nagyban függ 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 sok c-Jun van jelen, a c-Jun homodimerek létrejöttével kevesebb szabad c-Jun monomer lesz elérhető a heterodimerek kialakulásához. Ez a jelenség okozhatja a heterodimerizáció folyamatának eltolódását magasabb koncentráció tartományok, illetve magasabb látszólagos  $K_d$  felé. Magasabb c-Fos:c-Jun aránynál, ahol a c-Jun homodimer kialakulásának kicsi a valószínűsége, a heterodimer  $K_d$  értéke <100 nM, ami megegyezik a korábbi *in vitro* adatokkal. A zöld csatornában mérhető autofluoreszcencia ~50 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.

A koncentráció számolás során a sejt és a fluoreszcens gyöngy térfogatát konfokális mikroszkópos z irányú szeleteléssel határoztuk meg, ahol az átlagértékeket vettük figyelembe a további számoláshoz, ami a gyöngy és a sejt térfogatarányának meghatározásában pontatlanságot okozhatott, mivel a sejtek térfogata nagy szórást mutatott.

Izolált fehérjék disszociációs állandójának meghatározásához *in vitro* számos tanulmányban FRET-et használtak [119, 123]. Az abszolút fehérje koncentráció megállapítása nélkülözhetetlen a  $K_d$  ismeretéhez. Ehhez vagy a fehérje sejtenkénti kópiaszámát becsülték meg [124], vagy a koncentráció kalibrációhoz tisztított fehérjéket használtak [125]. Az első esetben élesztő sejteket használtak, ahol az YFP-t az Arf1 fehérjéhez kapcsolták, aminek sejtenkénti mennyiségét 20 ezerre becsülték. Feltételezték, hogy a sejt gömb alakú, melynek átmérője 5  $\mu\text{m}$  és ebből kiszámolták, hogy a mikroszkópos kép egy pixelére mennyi molekula jut. Meghatározták az adott térfogatra jutó átlag intenzitást, amiből egy képlet segítségével kiszámolták az ahhoz tartozó koncentrációt. Második esetben a kalmodulint ECFP-vel, míg az L típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna alegységét EYFP-vel jelölték meg, a fluoreszcens fehérjékhez kapcsolt relatív donor és akceptor molekulaszámot FRET technikán alapuló optikai izolációval becsülték meg [125] és a disszociációs állandót ezen adatok felhasználásával állapították meg. Az általunk bemutatott  $K_d$  számolási módszer FCS-sel végzett koncentráció kalibráció utáni FRET titráción alapszik, ami élő sejtekben történt. A számolás során először mi vettük

figyelembe a transzfektált, fluoreszcens fehérjék mellett az endogén, nem fluoreszcens fehérjék koncentrációját is. Az általunk használt koncentráció kalibráció 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 FRET mérésekben gyakran használt festékpár, mert jelentős a spektrális átfedésük és így nagy a Förster távolságuk [71]. 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. A mérés kiértékeléséhez kidolgoztunk egy új számolási módszert, ahol az  $\alpha$  faktor és a FRET hatásfok meghatározását egyidejűleg meg tudtuk határozni ugyanazt az egyenletrendszerrel használva.

FRET használatával a fehérjék egy bizonyos hányadának kölcsönhatásairól kapunk információt, de a kapcsolat stabilitásáról nem. A molekulák együttes mozgását fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával igazoltuk, mely technika a molekulák közötti stabil kapcsolatok kimutatására alkalmas. Az FCS adatok elemzése azt mutatta, hogy a c-Fos-EGFP molekuláris fénysége kétszer akkora, mint a DNS-kötő és a dimerizációs domén hiányos mutánsé, vagy, mint a szabad EGFP molekuláé. Két komponensre illesztve az adatokra a lassú komponens hányada ugyanakkora volt a c-Fos homodimer és a c-Fos-c-Jun heterodimer esetén, míg a Fos<sup>ΔΔ</sup> mutánsé szignifikánsan alacsonyabb volt. Ez az adat azt mutatja, hogy a c-Fos fehérje homo- és heterodimerként is bekötődik a DNS-hez. EGFP és Fos<sup>ΔΔ</sup> esetén is tudunk kis hányadban lassú komponensre illeszteni, mert a sejtekben lévő makromolekulák magas koncentrációja „molecular crowding” jelenségéhez, ezáltal anomális diffúzióhoz vezet [126], ami az autokorrelációs görbe elnyúlásához és egy látszólagos második komponens megjelenéséhez vezet, hosszabb diffúziós idővel.

A SPIM-FCCS technika lehetővé tett számunkra, hogy megerősítsük a c-Fos homodimer jelenlétét, láthassuk sejtmagbeli eloszlását és mobilitását. Méréseinkből kiderült, hogy a homodimer legalább néhány tizedmásodpercig stabilak voltak. Az illesztett keresztkorrelációs görbékből 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 [127-130]. A hetero- és homodimerre kapott diffúziós állandó értékek kisebbek az EGFP-P30-mRFP1 fúziós

fehérjével kapott diffúziós állandó értékénél ( $\sim 4,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), 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 önálló transzkripciós szabályozóként szerepelhetnek. Emellett a c-Fos homodimer akadályozhatja a c-Fos–c-Jun heterodimer DNS-hez való kötődését és így a működését is. Ezáltal c-Fos homodimereknek fontos szerepe lehet a sejtosztódásban és az onkogenezisben a c-Fos túlermelő tumorokban. A c-Fos homodimer kötőhelyeinek megismerése pontosabb rálátást nyújthat a tumorok kialakulásában betöltött szerepéről.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok az aktivátor fehérje 1 (AP-1) családba tartoznak. Heterodimert alkotnak, és bázikus leucin cipzár régiójukkal a DNS-hez kötődve 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 transzfektáltunk, 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. Képalkotó fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (SPIM-FCCS) 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 működhet a c-Fos-t túltermelő tumorokban és szerepet játszhat a tumorok kialakulásában.

## 8. SUMMARY

The c-Fos and c-Jun transcription factors, members of the activator protein-1 (AP-1) complex form heterodimers, bind to DNA via a basic leucine zipper, and regulate the cell cycle, differentiation, apoptosis, etc. Purified c-Jun leucine zipper fragments could also form stable homodimers, whereas c-Fos leucine zipper homodimers were found to be much less stable in earlier *in vitro* studies. The importance of c-Fos overexpression in tumors and the controversy in the literature concerning c-Fos homodimerization prompted us to investigate c-Fos homodimerization in live cells by fluorescence techniques. We used Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence (cross)correlation spectroscopy (FCS, FCCS) applied to HeLa cells transfected with fluorescent protein-tagged c-Fos and c-Jun to investigate their homo- and heterodimerization. FRET and molecular brightness analysis by FCS indicated that c-Fos formed homodimers. We developed a method to determine the absolute concentrations of transfected and endogenous c-Fos and c-Jun by combining FCS and immunofluorescence, which allowed us to analyze protein association quantitatively. From FRET data of cells expressing various concentrations of donor- and acceptor-tagged proteins, we determined the apparent dissociation constant of c-Fos homodimers ( $6.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ) and c-Fos–c-Jun heterodimers ( $K_d < 100 \text{ nM}$ ) in live cells. Single plane illumination microscopic FCCS confirmed that c-Fos homodimers were stably associated and could bind to the chromatin. Molecular modeling simulation also supported that stable homodimers could form. Our results establish c-Fos homodimers as a novel form of the AP-1 complex, which may be an autonomous transcription factor in c-Fos overexpressing tissues, and could contribute to tumor development.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

### 9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Hivin, P., et al., *A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(9): p. 2761-2772.
2. Curran, T. and B.R. Franza Jr, *Fos and jun: the AP-1 connection*. Cell, 1988. **55**(3): p. 395-397.
3. Chinenov, Y. and T.K. Kerppola, *Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity*. Oncogene, 2001. **20**(19 REV. ISS. 2): p. 2438-2452.
4. Porte, D., et al., *DNA binding and transactivation properties of Fos variants with homodimerization capacity*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(15): p. 3026-3033.
5. Johnston, S.R.D., et al., *Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance*. Clinical Cancer Research, 1999. **5**(2): p. 251-256.
6. Kress, E., et al., *Cooperation Between the Thyroid Hormone Receptor TRα1 and the WNT Pathway in the Induction of Intestinal Tumorigenesis*. Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1863-1874.e1.
7. Szabó, G., *Sejtbiológia*2009.
8. Chen, G., A.T. De Jong, and J.A. Shin, *Forced homodimerization of the c-Fos leucine zipper in designed bHLHZ-like hybrid proteins MaxbHLH-Fos and ArntbHLH-Fos*. Molecular BioSystems, 2012. **8**(4): p. 1286-1296.
9. Milde-Langosch, K., *The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis*. European Journal of Cancer, 2005. **41**(16): p. 2449-2461.
10. Halazonetis, T.D., et al., *C-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities*. Cell, 1988. **55**(5): p. 917-924.
11. Nakabeppu, Y., K. Ryder, and D. Nathans, *DNA binding activities of three murine Jun proteins: Stimulation by Fos*. Cell, 1988. **55**(5): p. 907-915.
12. Smeal, T., et al., *Different requirements for formation of Jun : Jun and Jun : Fos complexes*. Genes and Development, 1989. **3**(12 B): p. 2091-2100.
13. Curran, T., *Fos and Jun: oncogenic transcription factors*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 1992. **168**(2): p. 169-174.
14. Mason, J.M., et al., *Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: Universal implications for leucine zipper prediction and design*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(24): p. 8989-8994.
15. O'Shea, E.K., et al., *Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from Fos and Jun*. Science, 1989. **245**(4918): p. 646-648.
16. Nicklin, M.J.H. and G. Casari, *A single site mutation in a truncated Fos protein allows it to interact with the TRE in vitro*. Oncogene, 1991. **6**(1): p. 173-179.
17. Kovary, K. and R. Bravo, *The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts*. Molecular and Cellular Biology, 1991. **11**(9): p. 4466-4472.
18. Lallemand, D., et al., *Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts*. Oncogene, 1997. **14**(7): p. 819-830.
19. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer, 1991. **1072**(2-3): p. 129-157.
20. Leonard, D.A., N. Rajaram, and T.K. Kerppola, *Structural basis of DNA bending and oriented heterodimer binding by the basic leucine zipper domains of Fos and Jun*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(10): p. 4913-4918.
21. Vámosi, G., et al., *Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study*. Biophysical Journal, 2008. **94**(7): p. 2859-2868.
  22. Newman, J.R.S. and A.E. Keating, *Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2097-2101.
  23. Arndt, K.M., et al., *A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected in vivo from a designed library-versus-library ensemble*. Journal of Molecular Biology, 2000. **295**(3): p. 627-639.
  24. Harbury, P.B., P.S. Kim, and T. Alber, *Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer*. Nature, 1994. **371**(6492): p. 80-83.
  25. O'Shea, E.K., R. Rutkowski, and P.S. Kim, *Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer*. Cell, 1992. **68**(4): p. 699-708.
  26. Glover, J.N.M. and S.C. Harrison, *Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c Jun bound to DNA*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 257-261.
  27. Wisdom, R. and I.M. Verma, *Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain*. Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**(12): p. 7429-7438.
  28. Rauscher 3rd, F.J., et al., *Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro*. Genes & development, 1988. **2**(12 B): p. 1687-1699.
  29. Mechta-Grigoriou, F., D. Gerald, and M. Yaniv, *The mammalian Jun proteins: Redundancy and specificity*. Oncogene, 2001. **20**(19 REV. ISS. 2): p. 2378-2389.
  30. Turpaev, K.T., *Role of transcription factor AP-1 in integration of cell signaling systems*. Molecular Biology, 2006. **40**(6): p. 851-866.
  31. Vanhoutte, P., et al., *Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(1): p. 136-146.
  32. Hazzalin, C.A. and L.C. Mahadevan, *MAPK-Regulated transcription: A continuously variable gene switch?* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(1): p. 30-40.
  33. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. Oncogene, 2001. **20**(19 REV. ISS. 2): p. 2390-2400.
  34. Turjanski, A.G., J.P. Vaqué, and J.S. Gutkind, *MAP kinases and the control of nuclear events*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3240-3253.
  35. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. Journal of Molecular Medicine, 1996. **74**(10): p. 589-607.
  36. Franklin, C.C., et al., *Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(15): p. 7247-7251.
  37. Bannister, A.J., et al., *Phosphorylation of the c-Fos and c-Jun HOB1 motif stimulates its activation capacity*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**(24): p. 5173-5176.
  38. Hipskind, R.A. and G. Bilbe, *MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library., 1998. **3**: p. d804-816.
  39. Sheng, M., M.A. Thompson, and M.E. Greenberg, *CREB: A Ca<sup>2+</sup>-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases*. Science, 1991. **252**(5011): p. 1427-1430.



40. Darnell Jr, J.E., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-1421.
41. Greger, K., J. Swoger, and E.H.K. Stelzer, *Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(2).
42. Piechaczyk, M. and J.M. Blanchard, *c-fos proto-oncogene regulation and function*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 1994. **17**(2): p. 93-131.
43. Fisch, T.M., R. Prywes, and R.G. Roeder, *An AP1-binding site in the c-fos gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate*. Molecular and Cellular Biology, 1989. **9**(3): p. 1327-1331.
44. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: Quarrel and harmony among siblings*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(25): p. 5965-5973.
45. Van Dam, H. and M. Castellazzi, *Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis*. Oncogene, 2001. **20**(19 REV. ISS. 2): p. 2453-2464.
46. Andersen, H., et al., *The ability of Fos family members to produce phenotypic changes in epithelioid cells is not directly linked to their transactivation potentials*. Oncogene, 2002. **21**(31): p. 4843-4848.
47. Bamberger, A.M., et al., *Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: Correlations with cell cycle regulators*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2001. **127**(9): p. 545-550.
48. Soto, U., et al., *Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition*. International Journal of Cancer, 2000. **86**(6): p. 811-817.
49. Mishra, A., et al., *Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 superfamily proteins in human oral cancer*. International Journal of Cancer, 2010. **126**(4): p. 819-829.
50. Alt, J.R., et al., *Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation*. Genes and Development, 2000. **14**(24): p. 3102-3114.
51. Wagner, E.F. and R. Eferl, *Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system*. Immunological Reviews, 2005. **208**: p. 126-140.
52. Schreiber, M., et al., *Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent*. Genes and Development, 1999. **13**(5): p. 607-619.
53. Bakiri, L., et al., *Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: A role in the control of cyclin D1 expression*. EMBO Journal, 2000. **19**(9): p. 2056-2068.
54. Wisdom, R., R.S. Johnson, and C. Moore, *c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms*. EMBO Journal, 1999. **18**(1): p. 188-197.
55. Deng, T. and M. Karin, *JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers*. Genes and Development, 1993. **7**(3): p. 479-490.
56. Pfarr, C.M., et al., *Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras*. Cell, 1994. **76**(4): p. 747-760.
57. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
58. Matz, M.V., et al., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nature Biotechnology, 1999. **17**(10): p. 969-973.

59. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(12): p. 7877-7882.
60. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(12): p. 1567-1572.
61. Evrogen. <http://www.evrogen.com/protein-descriptions/TagBFP-description.pdf>.
62. Shaner, N.C., G.H. Patterson, and M.W. Davidson, *Advances in fluorescent protein technology*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(24): p. 4247-4260.
63. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nature Methods, 2005. **2**(12): p. 905-909.
64. Biovision. <http://www.biovision.com/blog.php/2012/05/07/fluorescent-proteins-the-colorful-dynamics-within-a-cell/>.
65. Nikon. *Fundamental Principles of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy with Fluorescent Proteins*. Available from: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fret/fretintro.html>.
66. Cotlet, M., et al., *Collective effects in individual oligomers of the red fluorescent coral protein DsRed*. Chemical Physics Letters, 2001. **336**(5-6): p. 415-423.
67. Haupts, U., et al., *Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(23): p. 13573-13578.
68. McAnaney, T.B., et al., *Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (YFP 10C): A unifying mechanism*. Biochemistry, 2005. **44**(14): p. 5510-5524.
69. Hendrix, J., et al., *Dark states in monomeric red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation and single molecule spectroscopy*. Biophysical Journal, 2008. **94**(10): p. 4103-4113.
70. Merzlyak, E.M., et al., *Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime*. Nature Methods, 2007. **4**(7): p. 555-557.
71. Patterson, G.H., D.W. Piston, and B.G. Barisas, *Forster distances between green fluorescent protein pairs*. Analytical Biochemistry, 2000. **284**(2): p. 438-440.
72. Peter, M., et al., *Multiphoton-FLIM quantification of the EGFP-mRFP1 FRET pair for localization of membrane receptor-kinase interactions*. Biophysical Journal, 2005. **88**(2): p. 1224-1237.
73. Förster, T., *Energiewanderung und Fluoreszenz*. Die Naturwissenschaften, 1946. **33**(6): p. 166-175.
74. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer*. Current Opinion in Biotechnology, 1995. **6**(1): p. 103-110.
75. Szöllösi, J., et al., *Principles of resonance energy transfer*. Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.], 2006. **Chapter 1**.
76. Dale, R.E., J. Eisinger, and W.E. Blumberg, *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer*. Biophysical Journal, 1979. **26**(2): p. 161-193.
77. Van Der Meer, B.W., *Kappa-squared: From nuisance to new sense*. Reviews in Molecular Biotechnology, 2002. **82**(3): p. 181-196.
78. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. Annual Review of Biochemistry, 1978. **47**: p. 819-846.
79. Jares-Erijman, E.A. and T.M. Jovin, *FRET imaging*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(11): p. 1387-1395.

80. Szöllosi, J., S. Damjanovich, and L. Mátyus, *Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: Routine and research*. Communications in Clinical Cytometry, 1998. **34**(4): p. 159-179.
81. Jovin, T.M. and D.J. Arndt-Jovin, *Luminescence digital imaging microscopy*. Annual review of biophysics and biophysical chemistry, 1989. **18**: p. 271-308.
82. Karpova, T.S., et al., *Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser*. Journal of Microscopy, 2003. **209**(1): p. 56-70.
83. Mekler, V.M., et al., *Fluorescence energy transfer-sensitized photobleaching of a fluorescent label as a tool to study donor-acceptor distance distributions and dynamics in protein assemblies: Studies of a complex of biotinylated IgM with streptavidin and aggregates of concanavalin A*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1997. **40**(3): p. 278-287.
84. Szentesi, G., et al., *Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series*. Cytometry Part A, 2005. **67**(2): p. 119-128.
85. Wouters, F.S., et al., *FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes*. EMBO Journal, 1998. **17**(24): p. 7179-7189.
86. Bastiaens, P.I.H. and T.M. Jovin, *Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: Fluorescent-labeled protein kinase C  $\beta$ I*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(16): p. 8407-8412.
87. Roszik, J., J. Szöllosi, and G. Vereb, *AccPbFRET: An ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**.
88. Day, R.N. and A. Periasamy. *FRET microscopy to visualize transcription factor dimerization in the nucleus of the living cell*. in *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences*. 2001. San Jose, CA.
89. Berney, C. and G. Danuser, *FRET or no FRET: A quantitative comparison*. Biophysical Journal, 2003. **84**(6): p. 3992-4010.
90. Takanishi, C.L., et al., *GFP-based FRET analysis in live cells*. Brain Research, 2006. **1091**(1): p. 132-139.
91. Tron, L., J. Szollosi, and S. Damjanovich, *Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis*. Biophysical Journal, 1984. **45**(5): p. 939-946.
92. Nagy, P., et al., *Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy*. European Biophysics Journal, 1998. **27**(4): p. 377-389.
93. Sebestyén, Z., et al., *Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer*. Cytometry, 2002. **48**(3): p. 124-135.
94. Vámosi, G., et al., *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*, in *Cellular Diagnostics: Basic principles, methods and clinical applications of flow cytometry* 2008, S. Karger AG. p. 141-158.
95. Vereb, G., J. Matkó, and J. Szöllösi, *Cytometry of Fluorescence Resonance Energy Transfer*, in *Methods in Cell Biology* 2004. p. 105-152.
96. Magde, D., E. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Physical Review Letters, 1972. **29**(11): p. 705-708.

97. Haustein, E. and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy: Novel variations of an established technique*, in *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2007. p. 151-169.
98. Hinterdorfer, P., *Handbook of single-molecule biophysics*, 2009, Springer.
99. Thompson, N.L., A.M. Lieto, and N.W. Allen, *Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002. **12**(5): p. 634-641.
100. Lakowicz, *PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY* 2006, Springer.
101. Bacia, K., S.A. Kim, and P. Schwille, *Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells*. *Nature Methods*, 2006. **3**(2): p. 83-89.
102. Wohland, T., et al., *Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments*. *Optics Express*, 2010. **18**(10): p. 10627-10641.
103. Singh, A.P., et al., *The performance of 2D array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy*. *Optics Express*, 2013. **21**(7): p. 8652-8668.
104. Baudendistel, M., et al., *Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo*. *ChemPhysChem*, 2005. **6**(5): p. 984-990.
105. Roszik, J., et al., *Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry - Approaches and a software solution*. *Cytometry Part A*, 2009. **75**(9): p. 761-767.
106. Szalóki, N., et al., *High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry*. *Cytometry Part A*, 2013. **83**(9): p. 818-829.
107. Krieger, J.W. and J. Langowski. *QuickFit 3.0 (compiled:2015/01/08, SVN: 3697): A data evaluation application for biophysics*. 2015; Available from: <http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/>.
108. Weidemann, T., et al., *Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging*. *Journal of Molecular Biology*, 2003. **334**(2): p. 229-240.
109. Petrášek, Z. and P. Schwille, *Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy*. *Biophysical Journal*, 2008. **94**(4): p. 1437-1448.
110. Krieger, J.W., et al., *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS)*. *Optics Express*, 2014. **22**(3): p. 2358-2375.
111. Ries, J., S. Chiantia, and P. Schwille, *Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS*. *Biophysical Journal*, 2009. **96**(5): p. 1999-2008.
112. Patterson, G., R.N. Day, and D. Piston, *Fluorescent protein spectra*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 5): p. 837-8.
113. Karasawa, S., et al., *Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 1): p. 307-12.
114. *Olympus FluoView Resource Center*. Available from: <http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>.
115. Ameyar, M., M. Wisniewska, and J.B. Weitzman, *A role for AP-1 in apoptosis: The case for and against*. *Biochimie*, 2003. **85**(8): p. 747-752.
116. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis*. *Nature Reviews Cancer*, 2003. **3**(11): p. 859-868.
117. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. *Nature Cell Biology*, 2002. **4**(5): p. E131-E136.

118. Schütte, J., et al., *jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun*. Cell, 1989. **59**(6): p. 987-997.
119. Patel, L.R., T. Curran, and T.K. Kerppola, *Energy transfer analysis of fos-jun dimerization and DNA binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(15): p. 7360-7364.
120. Pernelle, C., *An efficient screening assay for the rapid and precise determination of affinities between leucine zipper domains*. Biochemistry®, 1993. **32**(43): p. 11682-11687.
121. Heuer, K.H., et al., *Development of a sensitive peptide-based immunoassay: Application to detection of the Jun and Fos oncoproteins*. Biochemistry, 1996. **35**(28): p. 9069-9075.
122. Cohen, D.R. and T. Curran, *Analysis of dimerization and DNA binding functions in Fos and Jun by domain-swapping: Involvement of residues outside the leucine zipper/basic region*. Oncogene, 1990. **5**(6): p. 929-939.
123. Song, Y., V. Madahar, and J. Liao, *Development of FRET assay into quantitative and high-throughput screening technology platforms for protein-protein interactions*. Annals of Biomedical Engineering, 2011. **39**(4): p. 1224-1234.
124. Mehta, K., et al., *A computational approach to inferring cellular protein-binding affinities from quantitative fluorescence resonance energy transfer imaging*. Proteomics, 2009. **9**(23): p. 5371-5383.
125. Erickson, M.G., et al., *Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels revealed by FRET in single living cells*. Neuron, 2001. **31**(6): p. 973-985.
126. Wachsmuth, M., W. Waldeck, and J. Langowski, *Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy*. J Mol Biol, 2000. **298**(4): p. 677-89.
127. Brazda, P., 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*. Molecular and Cellular Biology, 2014. **34**(7): p. 1234-1245.
128. Brazda, P., 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. **124**(21): p. 3631-3642.
129. Elf, J., G.W. Li, and X.S. Xie, *Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1191-4.
130. Vercammen, J., et al., *DNA-induced polymerization of HIV-1 integrase analyzed with fluorescence fluctuation spectroscopy*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38045-52.

## 9.2. Értekezés alapjául szolgáló saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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., 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.* 83 (9), 818-829, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22315>  
IF:3.066



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☐ Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) ☐ Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



### 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 értekezés alapjául 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.





## **10. TÁRGYSZAVAK**

Fos homodimerizáció, transzkripciós faktor, disszociációs állandó, fluoreszcencia rezonancia energia transzfer, konfokális mikroszkópia, áramlási citometria, fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia, lézer pásztázó citométer

## **11. KEYWORDS**

Fos homodimerisation, transcription factor, dissociation constant, fluorescence resonance energy transfer, confocal microscopy, flow cytometry, fluorescence correlation spectroscopy, laser scanning cytometer



## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Szöllősi János intézetigazgatónak, hogy intézetében lehetővé tette a doktori értekezésem elkészítését.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Vámosi Györgynek témavezetéséért, hasznos tanácsért, amivel hozzájárult az elméleti és gyakorlati ismereteim bővítéséhez.

Köszönet illeti Prof. Dr. Damjanovich Sándort, aki az intézetben eltöltött első éveimben tanácsaival segítette munkámat.

Külön köszönöm Dr. Tóth Katalinnak a kedvességét és a munkámban nyújtott segítségét.

Köszönöm Nagy Edina és Utasi-Szabó Rita asszisztenseknek a nélkülözhetetlen technikai segítségét.

Végezetül hálával tartozom családomnak és barátaimnak a szeretetükért, bátorításukért és fáradhatatlan támogatásukért. Nélkületek sehol sem lennék.