

MTA doktori értekezés tézisei

Receptorműködés vizsgálata a sejtmembrántól a sejtmagig

Vámosi György



**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2025**

1. Bevezetés

1.1. Az interleukin-2 és -15 receptor szerkezete, kölcsönhatásai és működése

Az immunrendszer működését többek közt ingerek hatására termelődő citokinek szabályozzák, melyek jelentős részét immunsejtek termelik. Érdeklődésünk középpontjában az ún. közös γ_c receptorláncú citokincsalád áll, melynek tagjai az interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 és IL-21. Ezen citokineknek széleskörű pleiotróp hatásai vannak mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer szabályozásában. A humán γ_c mutációja okozza az X-kromoszómához kapcsolt súlyos kombinált immunhiányt (XSCID), mely a T és NK sejtszám drasztikus csökkenésével és a B sejtek működésképtelenségével jár. A 3-3 alegységből felépülő IL-2 és IL-15 receptoroknak nemcsak a γ_c (CD132), hanem a β alegységük (IL-2/15R β : CD122) is közös, csak α alegységeik (IL-2R α : CD25, IL-15R α : CD215) citokin-specifikusak. Kutatásaink során ezen két receptor működését, összeszerelődését, kölcsönhatásait, dinamikáját és ezeknek a külső-belső környezeti tényezőktől való függését vizsgáltuk T-sejteken főként biofizikai módszerekkel.

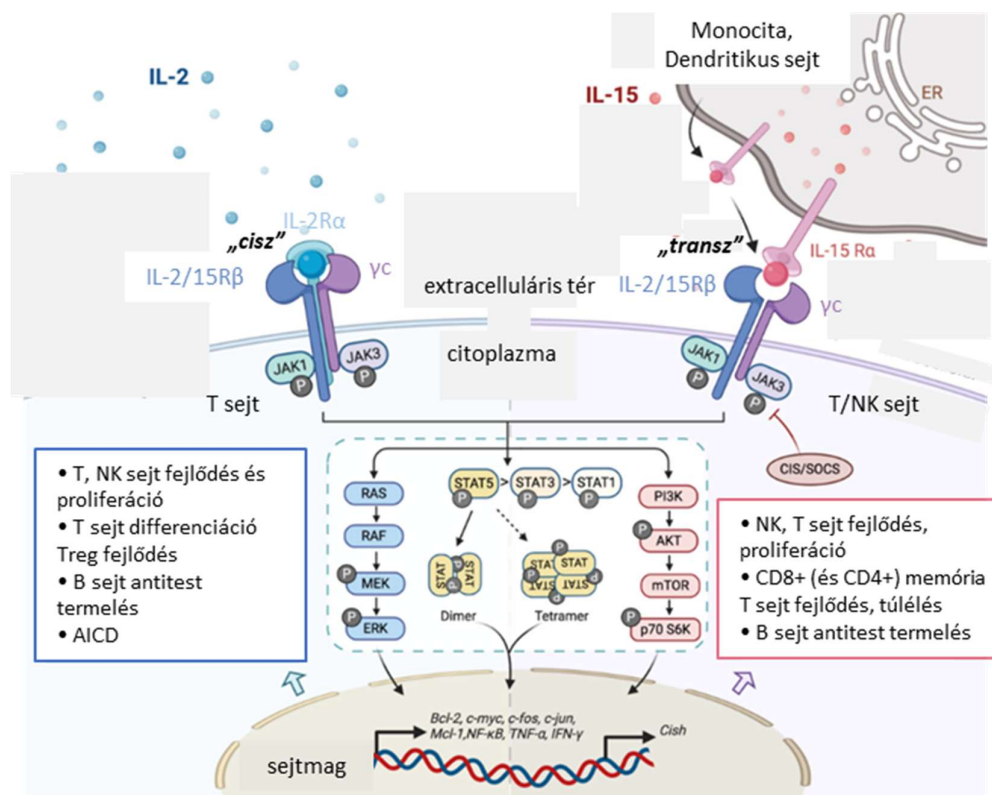
A naiv/nyugvó T-sejt antigén általi aktivációja több jelútvonalat indít, elvezetve a T-sejtek effektor funkcióinak kialakulásához, differenciálódásához, proliferációjához. A T-sejtek antigénfelismerő receptorának (TCR) variábilis láncai képesek specifikusan felismerni egy fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) által bemutatott peptid antigént. A TCR/CD3 komplex további részei a jelátvitelért felelős CD3 γ_c , CD3 δ CD3 ζ dimerek; emellett a komplex toborozza még a CD4 vagy CD8 koreceptort. A CD4⁺ (Th, „helper”) sejteknek az antigént professzionális antigénprezentáló sejtek (APC: dendritikus sejt, makrofág, B-sejt) által kifejezett MHC II glikoprotein mutatja be, míg a CD8⁺ (ölő/citotoxikus, Tc) sejteknek az MHC I, amit minden magvas sejt kifejez. A sejtek közti kontakt régió az immunszinapszis (IS), melya felsoroltakon kívül számos más molekulát, pl. egyéb receptorokat, adhéziós fehérjéket és ioncsatornákat is tartalmaz.

A TCR jelátvitel indukálja az IL-2R α kifejeződését, míg a kostimuláció, a CD80 vagy CD86 (APC) és a CD28 (T-sejt) kölcsönhatása serkenti a T-sejt IL-2 expresszióját. Az IL-2R α /IL-2 expresszió a T-sejtek expanziójához vezet.

Az IL-2-t elsősorban az aktivált CD4⁺ Th, kisebb mértékben a CD8⁺ Tc-sejtek termelik tranziensen, már 1-2 órával az aktivációt követően, de mindössze 20-24 órán át (saját nem közölt méréseink szerint 2-3 napig). Heterotrimerikus receptoraik a plazmamembránt egyszer átvelő glikoprotein alegységekből állnak, melyek különféle affinitású komplexeket alkothatnak a sejtfelszínen: az IL-2/15R β γ_c heterodimer közepes affinitással ($K_d=10^{-9}$ M), míg az IL-2R α β γ_c heterotrimer nagy affinitással ($K_d=10^{-11}$ M) köti a ligandot – ez a két komplex felelős a jelátvitelért. A közepes affinitású β γ_c dimert a nyugvó T-sejtek és az NK-sejtek is konstitutívan kifejezik, míg az IL-2R α a legtöbb T-sejttípuson csak az antigén-stimuláció után jelenik meg néhány óra elteltével és 1-2 hétig marad fenn, százszorosán érzékenyítve a T-sejteket az IL-2-re, mely autokrin/parakrin módon fejti ki hatását. Az IL-2 és IL-2R α kifejeződésének tranziens volta segít kontrollálni, leállítani az immunválaszt. Damjanovich és mtsai mérései alapján az IL-2R alegységei T limfóma sejteken előre összeszerelt állapotban találhatók meg, és a receptor heterotrimer konformációját különféle γ_c citokinek befolyásolják.

Míg az IL-2-re szinte kizárólag cisz-prezentáció jellemző, azaz a szolubilis ligandot megkötő receptor heterotrimer láncait egyazon sejt fejezi ki, addig az IL-15 fő működési módja a transz-prezentáció (IL-15 TP):

az IL-15R α /IL-15 komplexet kifejező monocita, makrofág, DC vagy epiteliális sejt bemutatja a ligandot az IL-2/15R $\beta\gamma_c$ receptor dimert kifejező T- vagy NK-sejtnak (1. ábra). Effektor Tc-sejtek, aktivált NK-sejtek is kifejezik az IL-15R α -t is, így ezen sejtek esetén az IL-15 cisz- és transz-prezentáció egyaránt előfordul.



1. ábra. Az IL-2 és IL-15 receptorok működése, jelátvittele, biológiai hatásai. Az IL-2R cisz-prezentációval, míg az IL-15R elsősorban transz-prezentációval működik.

Az IL-2 és IL-15 jelátvitelében egyaránt a JAK/STAT, a Ras/Raf/MAPK és a PI-3K/Akt/mTOR útvonal vesz részt. Az IL-2/15R β és a γ_c konstitutívan köti a JAK1, illetve a JAK3 Janus-arcú kinázt. Ligandkötéskor a receptorláncok konformációja megváltozik, a JAK1 és JAK3 foszforilálják egymást és a β , γ_c receptorláncokat, dokkolóhelyeket létrehozva a szintén általuk foszforilált STAT3, STAT5, STAT1 transzkripciós faktorok számára, melyek dimerként transzlokációdznak a sejtmagba.

Az IL-2 és IL-15 a közös receptorláncoknak köszönhetően több közös, de számos ellentétes funkcióval is rendelkezik. Mind az IL-2, mind az IL-15 serkenti az aktivált T-sejtek proliferációját, fokozza az NK-sejtek citotoxicitását és elősegíti a B-sejtek proliferációját és immunglobulin-termelését. Az IL-2 fontos az immuntoleranciában: az antigén általi aktiváció után a T-sejtekben a JAK/STAT útvonalon Fas-mediált apoptózist (AICD, aktiváció indukálta sejthalál) indít el, másrészt elősegíti a szabályozó T_{reg}-sejtek differenciálódását és túlélését. Az IL-2-vel, IL-2R α - vagy IL-2/15R β -val nem rendelkező egerekben az aktivált T-sejtek felhalmozódnak, míg a T_{reg}-sejtek száma csökken és autoimmun betegségek alakulhatnak ki.

Az IL-15 nélkülözhetetlen az NK sejtek fejlődéséhez, túléléséhez és aktiválásához, a természetes ölő T-sejtek (NKT) homeosztázisához, valamint a naiv és memória CD8⁺ T-sejtek fenntartásához. Gátolja az IL-2

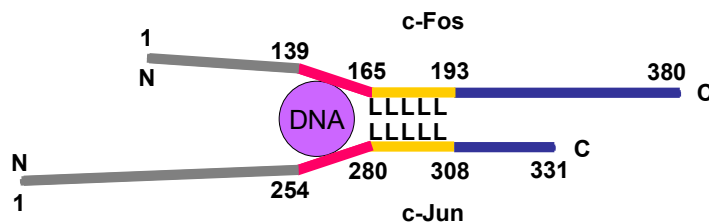
által kiváltott AICD-t, elsősorban a PI3K/Akt útvonalon keresztül. Az IL-15/IL-15R α -hiányos egerekből hiányoznak az NK-sejtek és súlyosan csökkent a memória CD8⁺ T-sejtek és a bél intraepiteliális limfociták száma. Az IL-15/IL-15R α overexpresszió autoimmun betegségekhez vezet.

Az IL-2R α értékes terápiás célpont, mivel nyugvó T-sejtek közül csak a T_{reg}-eken jelenik meg, viszont expressziója jelentősen megemelkedik különböző hematológiai malignitásokban. A daclizumab egy humanizált monoklonális antitest, amely az IL-2R α -hoz kötődve gátolja az IL-2R aktivációját, emellett ADCC-mediált citotoxicitást is indukálhat. Javította az allograft túlélést transzplantált betegekben és hatékonynak bizonyult a HTLV-1⁺ felnőttkori T-sejtes leukémia (ATL) krónikus vagy „parázsló” formája és az anaplasztikus nagysejtes limfóma kezelésében, de hatástalannak bizonyult az ATL akut fázisában. Radioaktív izotóppal jelzett (⁹⁰Y) daclizumab Hodgkin-limfómában hosszú távú remissziókat indukált.

Mivel az IL-2 és IL-15 számos közös funkció mellett ellentétes hatásokkal is rendelkezik, felvetődik a kérdés, hogy a két receptor azonos vagy eltérő doménekben, fehérje- és lipidkörnyezetben fejt-e ki hatását. Vizsgáltuk az IL-2R és IL-15R összeszerelődését, jelátvitelét és ezek függését a kölcsönható partnerektől és a membránponteciótól. Kíváncsiak voltunk, hogy a receptorok csak a plazmamembránban szignalizálnak, vagy már a szekréciós útvonal korábbi szakaszában, ami magyarázhatja a membránt célzó antitest terápiák részleges hatástalanságát. Végezetül megvizsgáltuk az IL-15 transzprezentáció és az antigénprezentáció kapcsolatát a fehérje-kölcsönhatások és a jelátvitel vonatkozásában.

1.2. Az AP-1 komplex

Az aktivátor fehérje 1 (AP-1) egy dimer transzkripció faktor, amely a sejtet érő ingerekre, pl. gyulladásos citokinekre, bakteriális és vírusfertőzésekre, növekedési faktorokra, stresszre adott válaszként szabályozza a génexpressziót. Szerepet játszik a sejt differenciálódás, proliferáció, apoptózis és az idegrendszer működésének szabályozásában. Az AP-1 elemei a Fos, Jun, ATF, JDP és Maf családokba tartozó fehérjék. A klasszikus AP-1 komplex a c-Fos – c-Jun heterodimer, de csak a Fos és Jun család tagjai 18 különböző homo/heterodimert alkothatnak különféle sejt típusokban. Génjeik a korai válasz gének közé tartoznak, melyek gyorsan aktiválódnak a sejtet érő ingerekre anélkül, hogy új fehérje termelődné. Az aktivált AP-1 késői válaszadó géneket indukál, amelyek az ingerre adott transzkripció válaszok második hullámát jelentik. A c-Fos-t és a c-Jun-t proto-onkogéneknek is nevezik, mivel regulációjuk megváltozása tumoros betegségekhez vezethet.



2. ábra. A Fos-Jun dimer doménszerkezete. Balról jobbra: N-terminális transzaktivációs domén (szürke), bázikus DNS-kötő domén (piros), dimerizációs domén leucin cipzárral (LLLLL, sárga), C-terminális domén (kék).

A c-Fos és c-Jun család fehérjéi leucin cipzárral összekapcsolódó dimerként működnek és számos gén promóter és enhanszer régióiban az AP-1 szabályozó elemeihez kötődnek. A c-Fos–c-Jun heterodimer felépítését a **2. ábra** mutatja. A krisztallográfiás vizsgálatok csak a DNS-kötő és a dimerizációs domént tárták

fel, nem adtak információt a C-terminális régiókról, melyek szintén transzaktivációs funkcióval rendelkezhetnek. Ezért célul tűztük ki a C-terminális domének konformációjának vizsgálatát.

A c-Jun nemcsak hetero-, hanem homodimert is képes alkotni, míg korábbi *in vitro* vizsgálatok szerint az izolált c-Fos nem képes homodimert létrehozni és kötődni a DNS-hez egy másik protein, pl. a c-Jun fehérje jelenlétében; valószínűleg a negatívan töltött aminosavak között fellépő taszító erők miatt instabil. Kísérleteink során ezért arra kerestünk választ, hogy a c-Fos képes-e élő sejtekben homodimert alkotni és kötődni a DNS-hez, ugyanis egyes tumorok a c-Fos-t önmagában túltermelik.

Az AP-1 alapvető szerepet játszik a T-sejtek aktivációjában, az IL-2 és IL-2R α expressziójában is és viszont, az IL-2R működése visszahat az AP-1-re. Az IL-2 jelátvitel elősegíti az AP-1 expresszióját és aktivitását fenntartó vagy fokozó downstream útvonalakat, ezáltal elősegítve a T-sejtek proliferációját és működését. Az AP-1 hatásai nem merülnek ki a T-sejt aktivációban. Számos folyamatot szabályoznak, például a differenciációt, proliferációt, a sejtek túlélését, a hipoxiára adott választ, az angiogenezist és az apoptózist. Hatásuk függ attól, hogy mely fehérjék alkotják a dimert, mely gének szabályozó régiójához kötődnek, milyen további transzkripciós faktorokkal hatnak kölcsön és ezáltal aktiválják vagy gátolják a transzkripciót.

1.3. Magreceptorok: a retinoid X receptor és dimerizációs partnerei

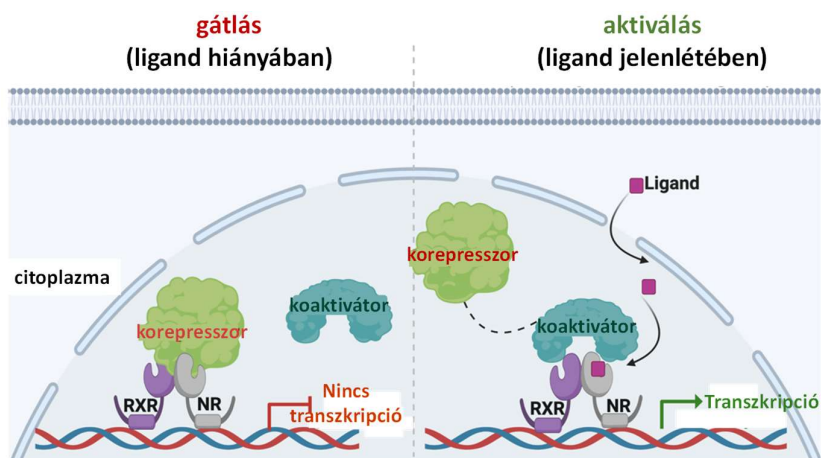
A magreceptorok (NR, nuclear receptor) olyan transzkripciós faktorok, melyek ligandfüggő módon szabályozzák célgénjeik kifejeződését. Lipidoldékony ligandjaik átjutnak a plazmamembránon. Számos szintetikus ligandot alkalmaznak a gyógyításban, pl. emlőrák kezelésében az ösztrogén receptor modulátor tamoxifent vagy II-es típusú cukorbetegségben a PPAR-ligand roziglitazont. A II-es típusú magreceptorok a retinoid X receptorokkal (RXR) alkotnak heterodimert; ennek a csoportnak 20 tagja ismert. Ligandjaik metabolitok, zsírdékony vitaminok (A, D), retinoidok, lipid- és zsírsavszármazékok. Válaszadó elemük két azonos orientációjú, egymástól 0-6 nukleotid által elválasztott AGGTCA konszenzus szekvenciájú félkötőhelyből áll. Az általunk vizsgált magreceptorokat (RAR α , PPAR γ , VDR) az 1. táblázat tartalmazza.

Magreceptor	Endogén ligandok	Fő biológiai funkciók
Retinsav/A vitamin receptorok RARα, RARβ, RARγ	csupa- <i>transz</i> -retinsav (ATRA), 9- <i>cisz</i> -retinsav, 9- <i>cisz</i> -dihidro-13,14-RA	Differenciálódás, proliferáció, immunválasz Lipidek, epesavak metabolizmusa hepatocitákban, koleszterintranszport szabályozása makrofágokban Szem fejlődése, egészsége
Peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor γ PPARγ	Linolsav, zsírsavak	Gyulladás, glükóz- és lipidanyagcsere, adipocita differenciáció szabályozása
D vitamin receptor VDR	1 α ,25-dihidroxi-D3-vitamin, litokolsav	Kalcium-, foszfor-, csont-homeosztázis, immunválasz, proliferáció és differenciálódás számos szövetben, szájüregi egészség, apoptózis szabályozása,
Retinoid X receptorok RXRα, RXRβ, RXRγ	9- <i>cis</i> retinsav dokozaheksánsav	20 magreceptor heterodimerizációs partnere Nem világos, hogy van-e „saját” útvonala

1. táblázat: Az általunk vizsgált magreceptorok, endogén ligandjaik, főbb funkcióik. Az általunk használt altípus vastag betűvel van szedve. A kötőhely vagy „válaszadó elem” típusa (direct repeat, DR) zárójelben látható.

A magreceptorok 50-100 kDa tömegű, 5 doménből álló, konzervált szerkezetű fehérjék. Az N- végén található az A/B domén, ebben az AF-1 régió a ligandtól független transzaktivációért felel. Az erősen konzervált, két cinkujj motívumot tartalmazó DNS-kötő domén (DBD) felelős a válaszadó elemhez (HRE) történő specifikus kötődésért. A DBD-ben vagy a következő D csuklós régióban található a bázikus aminosavakat tartalmazó magi lokalizációs szekvencia (NLS). A multifunkciós ligandkötő domén (LBD) szekvenciája nagyobb változatosságot mutat. Az első 11 α -hélix alakítja ki a ligandkötő zsebet, míg a C-terminális H12 – az AF-2 domén – ligandfüggő transzaktivációs funkcióval rendelkezik és nélkülözhetetlen a koregulátor-cseréhez. Az LBD felel elsősorban a receptor-dimerizációért és a ligandfüggő koregulátor-kötésért is. Az F-domén módosíthatja a magreceptorok transzkripciós aktivitását, kofaktor-kötését.

A II-es típusú magreceptorok működéséről alkotott képünket a molekuláris kapcsoló modell határozza meg. Eszerint a válaszadó elemükhöz kötődő magreceptor dimerek kofaktorokkal alkotott komplexben kötődnek a DNS-hez (3. ábra). Ligand hiányában korepresszort kötnek, melyek dokkolóhelyként is szolgálnak további komponensek, pl. hiszton-deacetilázok számára, melyek gátolt állapotban tartják a kromatint. Ligandkötéskor csökken a receptorok korepresszorok iránti affinitása, és kötőfelületet alakul ki koaktivátorok számára. Az első hullámban érkező, (pl. p160/SRC) koaktivátorok saját hiszton acetiltranszferáz aktivitásuk mellett dokkolófelületként is szolgálnak további komponensek: hiszton acetiltranszferázok (p300/CBP család), hiszton metiltranszferázok, a nukleosómákat átrendező/disszociációjukat elősegítő kromatin remodelláló faktorok (SWI/SNF család), végül a mediátor komplex számára, mely az RNS polimeráz II-vel és az alap transzkripciós gépezettel kölcsönhatva a transzkripciót szabályozza. A fenti modell azt sugallja, hogy a válaszelemükön statikusan ülő receptorokon mereven előre meghatározott eseménysorozat zajlik.



3. ábra. A molekuláris kapcsoló modell. Az RXR heterodimerek aktivációja ligand indukálta koregulátor csere révén játszódik le. (Dr. Lina Fadel PhD értekezése alapján, 2023)

A sejtmagban történő diffúzió és mobilitás szerepét a biokémiai vizsgálatokon és fehérjeszerkezeteken alapuló korai modellek nem vették figyelembe. A magreceptor működés dinamikájának leírásához egyedi élő sejteken végzett vizsgálatok szükségesek. Biofizikai, pl. FRAP (fotoelhalványítás utáni fluoreszcencia visszatérés) kísérletek szerint a glükokortikoid receptorok néhány másodperces tartózkodási időt mutattak a több kötőhelyet tartalmazó válaszelem tömbökön. Az ösztrogén receptorról fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával kimutatták, hogy több szubpopulációval rendelkezik, melyek rövidebb vagy hosszabb ideig tranziensen, illetve stabilan kötött molekuláknak felelhetnek meg. Kromatin immunprecipitációs kísérletekkel

sikerült kimutatni a kromatin remodelláló fehérjék és a transzkripciós faktorok mobilitásának ciklikus jellegzetességeit több tízperces időskálán. Mindezek alapján a DNS-hez kötött, stabilan kialakult komplexek statikus modelljét a „hit-and-run” modell váltotta fel, amely egy rendkívül dinamikus rendszert feltételez.

Kíváncsiak voltunk, hogy milyen viszony van a magreceptor aktiváció molekuláris eseményei: a ligandkötés, dimerizáció, DNS-kötés és kofaktorkötés között. Választ kerestünk arra is, hogy a promiszkuus RXR milyen szabályok szerint választja ki heterodimerizációs partnerét. Ezen kérdések megválaszolása segíthet a magreceptorokra irányuló terápiák tervezésében, a mellékhatások megértésében, kiküszöbölésében.

2. Célkitűzések

- I. Az interleukin-2 és -15 receptorral kapcsolatos kérdések:
 1. Hogyan szerelődnek össze az IL-15 receptor alegységei, milyen lipid doménekben találhatóak? Hogyan helyezkedik el az IL-2 és az IL-15 receptor egymáshoz képest a membránban?
 2. Hogyan befolyásolják egyéb tényezők: az MHC I molekulákkal való kölcsönhatás valamint a membránpotenciál az IL-2 és IL-15 receptorok klaszterizációját, mobilitását és működését?
 3. A receptor alegységek összeszerelődése és a jelátvitel csak a plazma membránban jön létre, vagy már az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-ban elkezdődik?
 4. Az IL-15 transz-prezentációja és az antigén prezentáció befolyásolják-e egymást?
- II. Az AP-1 komplexszel kapcsolatos kérdések:
 5. Milyen a c-Fos-c-Jun komplex C-terminális konformációja?
 6. Létrejöhethet-e stabil c-Fos homodimer, és az kötődhet-e a DNS-hez?
 7. Mekkora a c-Fos-c-Jun és a c-Fos-c-Fos komplex disszociációs állandója élő sejtekben?
 8. Hogyan függ össze a fenti komplexek esetében a DNS-kötés és a dimerizáció?
- III. A magreceptorokkal kapcsolatos kérdések:
 9. Hogyan változik a magreceptorok mobilitása a liganddal történő aktiválás során?
 10. Mi irányítja a magreceptorok dimerizációját?
 11. Hogyan választ heterodimerizációs partnert az RXR α ?
 12. Hogyan függ össze a ligandkötés, a DNS-kötés, a kofaktor-kötés és a dimerizáció?

3. Anyagok és módszerek

A módszerek leírásában a kevésbé elterjedt módszerek, pl. a különböző FRET és FCS mérési és kiértékelési eljárások leírására szorítkoztam, különös tekintettel az általunk bevezetett fejlesztésekre.

3.1. Sejtvonalak

Az IL-2/15R vizsgálatával kapcsolatos kísérleteket (1-3. közlemény) humán eredetű, IL-2 függő, CD4⁺ Kit225 K6 T leukémia/limfóma sejtvonalon, illetve ennek FLAG-IL-15R α alegységgel stabilan transzfektált,

FT7.10 nevű variánsán végeztük. Az IL-2/15 receptor összeszerelődését az ER-ben és a Golgi-ban (4. közlemény) HeLa humán méhnyakrák eredetű sejtvonalon vizsgáltuk, melyben fluoreszcens fehérjékkel jelzett receptor alegységeket expresszáltunk. Az IL-2 intrakrin jelátvitelének a proliferációra kifejtett hatását, illetve ennek gátlását két HTLV-1⁺ humán felnőttkori T-sejtes leukémia (ATL) sejtvonalon vizsgáltuk: az IL-2 függő, IL-2-t nem termelő ED40515(+), illetve az IL-2-t termelő ED40515(+)/IL-2 sejtvonalon. Az IL-15 transzprezentáció vizsgálatát (5. közlemény) humán Raji B-limfoblasztszerű, illetve Jurkat T-leukémia sejtvonalakkal végeztük. Az előbbi sejtvonalat stabilan transzdukáltuk mCherry-IL-15R α , míg az utóbbit az IL-2/15R β alegységgel. A magreceptorokkal kapcsolatos méréseket (6-10. közlemény) HeLa méhnyakrák sejteken vagy HEK 293 humán embrionális vese sejtvonalon végeztük, melyekbe tranziensen vagy stabilan transzfektáltuk a fluoreszcens fehérjékkel jelölt magreceptorokat és kofaktorokat. Ugyancsak HeLa sejtekben vizsgáltuk a fluoreszcens fehérjékkel jelzett c-Fos és c-Jun kölcsönhatásait (11., 12. közlemény).

3.2. Plazmidok, tranziens és stabil transzfekció, géncsendesítés

A sok esetben fluoreszcens fehérjével (TagBFP, ECFP, EGFP, EYFP, mRFP1, mCherry, mScarlet3) jelzett fehérjét kódoló plazmidokat a letapadó sejtek (HeLa, HEK) esetében FuGENE[®] HD transzfekciós reagens (Promega, MA, USA), a limfociták esetében elektroporációval (AMAXA Nucleofector II device, Lonza, Basel, Switzerland) transzfektáltuk tranziensen. A stabil transzdukcióhoz 3. generációs Lenti-vírusos rendszert alkalmaztunk. A pozitív sejteket G418 szelekciós reagenssel és sejtszeparálással (Becton Dickinson FACSARIA) dúsítottuk. Az MHC I könnyűlánc géncsendesítését siRNS (QIAGEN, Valencia, CA) elektroporációjával végeztük.

3.3. A Förster rezonancia energia transzfer (FRET)

A FRET két festékmolekula között létrejövő sugárzásmentes, dipól-dipól kölcsönhatáson alapuló energiaátadás, melyben a gerjesztett donor fluofoor átadja gerjesztési energiáját az akceptornak. Érzékeny tartománya kb. 2-10 nm, ami a biológiai makromolekulák tipikus mérettartományába esik, így molekuláris távolságok mérésére alkalmas, „molekuláris vonalzó”-nak is nevezik. A FRET-et molekuláris kölcsönhatások detektálására alkalmaztuk. A FRET E hatásfoka annak valószínűsége, hogy egy gerjesztett donor molekula átadja energiáját egy akceptornak, ami a távolság hatodik hatványával csökken. Kísérleteinkben három FRET módszert: az akceptor fotoelhalványításos, az intenzitásalapú ratiometrikus, illetve a donor fluoreszcencia élettartamának mérésén alapuló eljárásokat alkalmaztuk. A ratiometrikus eljárásnál az ún. α faktor segédparaméter meghatározására, amely a donor és az akceptor relatív emisszióképességét és detektálási érzékenységet veszi figyelembe, egy új módszert vezettünk be, melyhez a donor és az akceptor fúziós fehérjét használtuk fel.

3.4. Fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópia (FCS, FCCS)

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia egy fluktuációs módszer, mely egy kicsiny térfogatelemben, pl. a konfokális fókuszterefogatban ($\sim 0,1 \mu\text{m}^3$) mért fluoreszcencia intenzitás időbeli ingadozásának elemzésén alapul. Ennek révén információ nyerhető az intenzitást befolyásoló folyamatok dinamikájáról: a molekulák diffúziójáról, áramlásáról, együttmozgásáról, koncentrációjáról, aggregációs állapotáról, a fotofizikai folyamatokról. A fluktuációk kiértékelése a $G(\tau)$ autokorrelációs függvényen (acf) keresztül végezhető el. Az

FCS segítségével meghatározható a lokális molekulakonzentráció (N), a részecske által a detektálási térfogatban átlagosan eltöltött ún. diffúziós idő (τ_D), az ezzel fordítottan arányos diffúziós állandó (D), a diffúzió mechanizmusát jellemző anomalitási paraméter (α); több molekula szubpopuláció esetén pedig az egyes populációk hányadai (r_i), az egy molekulára jutó intenzitás vagy molekuláris fényesség (F/N). A magreceptorok és az AP-1 elemeinek mobilitását kétkomponensű szabad diffúziós modellel illesztettük, míg a membránreceptorok mobilitását egykomponensű modellel.

Az FCCS az FCS kétsatornás változata: két, spektrálisan különböző fluorofórral jelölt molekula fluoreszcens jeleit független detektorokkal detektáljuk. A kereszt- és autokorrelációs függvények amplitúdóinak arányából ($rCCF$) a komplexet alkotó molekulák arányára következtethetünk.

3.5. Molekuláris közelség és együttmozgás 2D térképezése SPIM-FRET-FCCS mikroszkópiával

A fénysík megvilágítású mikroszkópiában (SPIM, selected plane illumination microscopy) egy hengerlencse a lézernyalábot vonal mentén fókuszálja, ami egy rövid szakaszon egy néhány μm vastagságú „fénysíkkal” közelíthető. A kollaborációs partnereink (DKFZ Heidelberg) által épített SPIM mikroszkóppal két (zöld, vörös) detektálási csatornában lehet 530 μs -os képidővel képsorozatokot detektálni, és ezekből 2D-ben FCS és FCCS görbéket meghatározni, így térképezni lehet a detektált molekulafajták mobilitását és együttmozgását. A SPIM-FCCS mikroszkópot FRET mérésére is alkalmassá tettük alternáló lézergerjesztés segítségével, ezáltal a mobilitás mellett a molekuláris közelség is térképezhetővé vált.

3.6. FRET titrálás a c-Fos-c-Jun heterodimerizáció és c-Fos homodimerizáció disszociációs állandóinak meghatározására

Annak vizsgálatára, hogy a c-Fos létrehozhat-e stabil homodimert és mennyi a Fos homodimer és a Fos-Jun heterodimer disszociációs állandója (K_d), létrehoztunk egy FRET titrálási eljárást. A módszer dióhéjban:

1. FCS-sel meghatározzuk a GFP molekulák c koncentrációját élő sejtekben, majd konfokális mikroszkóppal megmérjük az F fluoreszcencia intenzitást. Így elkészítjük a $c(F)$ kalibrációs görbét.
2. A sejtek konfokális mikroszkóppal mért fluoreszcencia intenzitását (és koncentrációját) ki tudjuk fejezni egy sztenderd fluoreszcens gyöngy intenzitásához viszonyítva; ez összehasonlíthatóvá teszi a különböző napokon, különböző műszerekkel végzett méréseket.
3. Áramlási citométerrel mérjük a EGFP-vel jelölt fehérjét kifejező sejtek és a sztenderd gyöngy fluoreszcencia intenzitását. A gyöngy és a sejt térfogatarányát figyelembe véve megbecsülhetjük az EGFP-vel jelölt fehérje sejtbeli koncentrációját.
4. Az EGFP-mCherry fúziós fehérje zöld-vörös intenzitásarányát felhasználva meghatározzuk a donorral és akceptorral jelölt koexpresszált fehérjék N_d/N_D expressziós arányát.
5. Az endogén, nem fluoreszcens Fos és Jun mennyiségét immunfluoreszcens jelölés segítségével állapítjuk meg, és ezt is figyelembe vesszük a teljes Fos és Jun koncentráció megállapításakor.
6. A FRET méréseket a Fos-t és a Jun-t különböző koncentrációban expresszáló sejteken elvégezve – „FRET titrálás” – megkapjuk az E koncentrációfüggését, ebből pedig illesztéssel a K_d értékét.

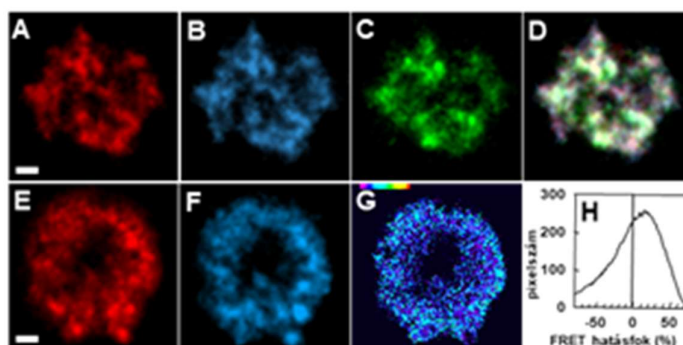
4. Eredmények és megbeszélés

4.1. Interleukin-2 és -15 receptorok kölcsönhatásainak és működésének vizsgálata

4.1.1. Az IL-2R és IL-15R közös klaszterekben fejeződik ki T-sejtek lipid tutajában

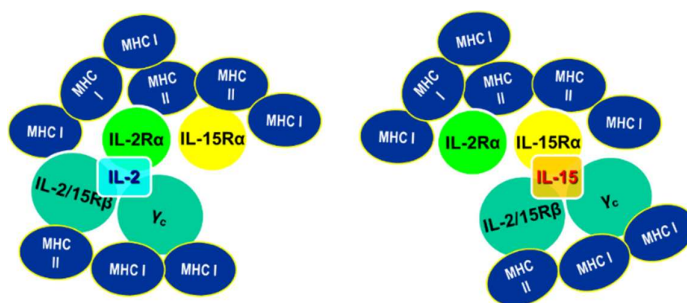
1. közlemény: Vámosi G., Bodnár A. és mtsai, PNAS, 2004, 101:11082-7.

A bevezetőben leírtak alapján azt a kérdést tettük fel, hogy az IL-15R alegységei már ligand nélkül is spontán összeszerelődnek-e, mint az IL-2R esetében, vagy csak ligandkötés után. Az is fontos kérdés, hogy az IL-2 és -15 bizonyos esetekben ellentétes működése (AICD vs. a memóriasejtek túlélése) magyarázható-e azzal, hogy a két citokinreceptor eltérő membrán mikrodoménekben/molekuláris környezetben helyezkedik el, és ezért dominálnak esetükben más jeltávíteli útvonalak. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy az IL-2R α és IL-15R α egymással és a GM1 lipid tutaj markerrel is átfedő membrán doménekben találhatóak a konfokális mikroszkóp felbontása (~200 nm) mellett, amit a magas Pearson-féle korrelációs együtthatók is jeleznek. Az IL-2R α és IL-15R α molekuláris szintű együttállását a pozitív FRET hatásfok értéke mutatja (4. ábra). Emellett az IL-15R α – hasonlóan az IL-2R α -hoz – közös klaszterekben helyezkedik el az MHC I és II glikoproteinekkal is. A fehérjék stabil együttmozgását fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával (FCCS) vizsgáltuk. Pozitív keresztkorrelációt kaptunk az IL-2R α /IL-15R α között (a mérések 20%-ában), és az IL-2R α /MHC I párnál (80%-ban), igazolva ezen molekulapárok stabil asszociációját, kodiffúzióját.



4. ábra. Az IL-15R α , az IL-2R α és a lipid tutajok hármass kolokalizációja, valamint pixelenkénti FRET mérés az IL-15R α és az IL-2R α között FT7.10 T limfóma sejtekben. Konfokális mikroszkópos képek az IL-15R α (A, E), az IL-2R α (B, F) és a lipid tutajok (C) eloszlásáról. Az IL-15R α és az IL-2R α közötti pixelenkénti FRET hatásfok térkép (fekete: 0%, vörös: 100%) és hisztogram (G, H).

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a két citokinspecifikus receptorlánc hogyan osztozik a közös β és γ_c alegységeken. FRET méréseink alapján az IL-15R α – hasonlóan az IL-2R α -hoz – ligand nélkül is kölcsönhat a β és γ_c láncokkal, azaz az IL-15R is előre összeszerelt állapotban található a sejtmembránban. A receptor alegységek közt IL-2 vagy IL-15 jelenlétében mért FRET hatásfokok és korábbi eredmények egybevetése alapján alkotott modellünk szerint az IL-2/15R négy alegysége feltehetően heterotetramer komplexet alkot, és mindig a jelenlévő citokinre specifikus receptor heterotrimer (IL-2R vagy IL-15R) válik szorosabbá, miközben a másik α lánc elfordul a közös β és γ_c alegységektől (5. ábra). Ez a mechanizmus a közös receptorláncok dinamikus és gazdaságos megosztását teszi lehetővé. Eredményeink szerint az IL-2 és -15 ellentétes hatásai nem magyarázhatók a receptorok különböző membrándoménekben való lokalizációjával.



5. ábra. Az IL-2/15R és az MHC glikoproteinek közös klaszterének egy lehetséges modellje. A FRET vizsgálatok összeegyeztethetők az IL-2/IL-15 receptor komplex tetramer szerkezetével. Az IL-2R α és az IL-15R α a citokinek jelenlétében és hiányában is egymás molekuláris szomszédságában vannak. Az IL-2 vagy IL-15 kötődése a β és az IL-2R α , illetve a β és IL-15R α alegységek közötti FRET hatások növekedéséhez vezet. Ezek a megfigyelések az IL-2R α és IL-15R α alegységek koordinált rotációs/transzlációs mozgásával magyarázhatók a γ_c heterodimerhez képest. Az IL-2/15R komplex MHC I és II glikoproteinekkal alkot közös klasztereket.

4.1.2. Az MHC I expressziója szabályozza az interleukin-2 és -15 receptorok mobilitását és a közös klaszterek képzését T-sejtekben

2. közlemény: Mocsár G és mtsai, Biophys J, 2016, 111:100-12.

A membránreceptorok mobilitását, térbeli eloszlását és működését más fehérjékkel való kölcsönhatásaik is befolyásolhatják. Mivel az általunk vizsgált FT7.10 T limfóma sejtekben az MHC I az IL-2/15R-rel és az MHC II-vel alkotott közös klaszterek legmagasabb szinten expresszált tagja, kíváncsiak voltunk arra, hogy az milyen szerepet játszik a klaszterméret és -mobilitás kialakításában. Az MHC I nehézlánc sejtmembránba történő transzportjához szükséges a β_2m könnyű lánc, így az MHC I sejt felszíni expresszióját β_2m -ellenes siRNS-sel csendesítettük, kb. 10%-ra. A fehérje klaszterizáció változását molekuláris, néhány nm-es szinten FRET és FCS segítségével, míg a nagyobb doménekbe, szuperklaszterekben történő szegregálódást néhány száz nm-es felbontással STED szuperfelbontású mikroszkópiával vizsgáltuk. A fehérjék mobilitását az FCS mérésekből nyert D diffúziós állandóval jellemeztük.

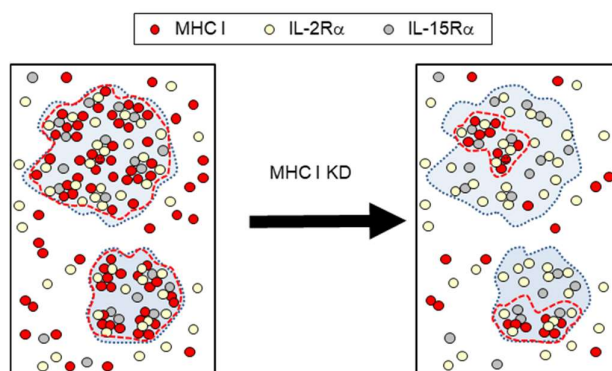
Az MHC I géncsökkentett (KD, knock-down) sejtekben az MHC I, az IL-2R α és az IL-15R α mobilitása megnőtt, egyedül az MHC II mobilitása nem változott szignifikánsan. A fluoreszcencia intenzitás és a detektálási térfogatban található részecskeszám hányadosa az F/N molekuláris fényesség. Ha F/N -t normalizáljuk a fehérje jelölésére használt Fab fragmentum molekuláris fényességével, akkor megkapjuk az egy ún. „szoros aggregátumhoz” tartozó nanoklaszterben együtt diffundáló fehérjék számát, melynek mediánja az IL-2/15R α és az MHC II esetén 1-2 közötti, míg az MHC I esetén >2 értéket adott. A géncsökkentés jelentősen csökkentette az MHC I-et tartalmazó aggregátumok számát és az egy aggregátumhoz tartozó MHC I molekulák számát, míg a többi fehérje hasonló paramétereit nem, vagy csak kismértékben befolyásolta. A mobilitás növekedése és az MHC I molekuláris fényességének csökkenése a szoros aggregátumok méretének, a bennük található molekulák számának csökkenésére utal. Fontos megjegyezni, hogy az FCS az immobilis, nagy aggregátumokban található vagy pl. a citoskeletonhoz rögzített fehérjéket nem érzékeli.

A fehérjeasszociációkat sejtenkénti felbontással áramlási citometriás vagy pixelenkénti felbontással konfokális mikroszkópiás FRET módszerrel mértük. Míg az IL-2R α és IL-15R α MHC I-gyel történő

heteroasszociációja, valamint az MHC I homoasszociációja MHC I KD hatására csökkent, addig az IL-2R α -nak a közös IL-2/15R β láncsal vagy az IL-15R α -val kialakított kölcsönhatása nem változott.

A fehérjék szuperklaszterbe szerveződését, doménszintű feldúsulását szuperfeloldású STED mikroszkópiával vizsgáltuk. A méret meghatározását többféle képanalízis módszerrel is elvégeztük: a klaszterek átlagos félértékszélességének meghatározásával, az intenzitáseloszlás radiális térbeli korrelációs függvényének illesztésével és egy adott intenzitásküszöb feletti, egymással szomszédos pixelek összterületének mérésével. Mindhárom eljárás szerint az MHC I klasztermérete szignifikánsan csökkent, míg az IL-2/15 receptoroké nem vagy alig változott. Végezetül meghatároztuk a vizsgált fehérjék doménszintű együttállását a néhányszor tíz nm felbontású STED képek alapján. Az IL-2R α MHC I-gyel közös pixelekben található hányada 75%-ról 5%-ra, az IL-15R α -é 91%-ról 20%-ra csökkent. Az MHC I – IL-2/15R kodisztribúciókat jellemző Pearson-féle korrelációs együtthatók szintén csökkentek, utalva arra, hogy géncsendesítés után a receptorok jelentősebb hányada helyezkedett el MHC I-mentes területen. A STED mikroszkópiával azonosított, néhány 100 nm-es klaszterek nem lehetnek stabilan és szorosan összekapcsolódó fehérjeaggregátumok, ugyanis ilyen méret mellett gyakorlatilag immobilisnak kellene lenniük. Feltehetően lazán/tranziensen összekapcsolódó fehérje-feldúsulások, melyeket pl. lipid domének vagy a citoskeleton tartanak egyben. Közlésre elfogadott publikációnk adatai szerint az aktin citoskeletontól mentes membrán hólyagokban („bleb”-ekben) a klaszterméret csökken, a mobilitás megnő, míg a szoros aggregátumokat stabilizáló fehérje-fehérje kölcsönhatások nem változnak.

Megfigyeléseinket a 6. ábrán látható modell szemlélteti. Az IL-2/15R alegységek és az MHC I szoros aggregátumai fajtánként néhány fehérjét tartalmaznak. Az MHC I géncsendesítése a szoros aggregátumokban található MHC I molekulák számát csökkenti, de az IL-2/15R alegységek számát, ezek összeszerelődését nem befolyásolja. A szoros aggregátumok méretcsökkenése a fehérjék mobilitásának növekedésével is együtt jár. A géncsendesítés csökkentette az MHC I-ben gazdag domének/szuperklaszterek méretét, de nem változtatta az IL-2/15R doménekét. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az expressziós szint változásai jelentősen megváltoztathatják a kölcsönhatásban lévő membránfehérjék szerveződését és mobilitását.



6. ábra. Az MHC I géncsendesítés hatása az IL-2R α /IL-15R α komplex és az MHC I klasztereződésére. A bekerikázott területek a STED-mikroszkópiával megkülönböztethető fehérje-szuperklasztereket jelölik (piros szaggatott vonal az MHC I és szürke szaggatott vonal az IL-2/15R szuperklaszterek esetében), amelyek több különböző együtt diffundáló fehérje szoros aggregátumait tartalmazzák. MHC I KD hatására az aggregátumok MHC I-tartalma csökken, ami méretük csökkenéséhez, mobilitásuk növekedéséhez vezet. Az MHC I szuperklaszterek mérete csökken (ezt jelzi a piros vonallal bekerített, MHC I-et tartalmazó régiók csökkent területe), míg az IL-2/15R szuperklaszterek átlagos geometriája nem változik jelentősen.

4.1.3. A membránpotenciál eltérően modulálja az IL-2 és -15 receptorok mobilitását és jelátvitelét a T-sejtekben

3. közlemény: Nagy É és mtsai: Biophys J. 2018, 114:2473-2482.

A membránreceptorok összeszerelődését, mobilitását és működését számos környezeti tényező, pl. a membrán lipid összetétele, koleszterintartalma, a citoskelettonnal kialakított kölcsönhatása is befolyásolhatja. Kevés figyelmet szenteltek a membránpotenciál (MP) hatásainak a receptorok biofizikai tulajdonságaira és működésére. A MP nyugalmi értéke T-sejtekben kb. -40 mV, a belőle származó elektromos térerősség nagyságrendileg 10^7 V/m. Az elektromos mező befolyásolhatja a transzmembrán fehérjék konformációját és viselkedését, ha a transzmembrán régiójukban vagy annak közelében egyenetlen töltéseloszlásuk.

A T-limfociták fejlődésük és működésük során gyakran vannak kitéve a MP változásainak. A tumoros mikrokörnyezetben a gyors sejtosztódás és a hipoxia nekrotikus vagy apoptotikus területeket hozhat létre, ahol az elpusztult sejtek ionjai az ec. térbe kerülnek. A magas ec. K^+ -koncentráció viszont depolarizálja a K^+ -csatornákat (pl. feszültségkapuzott Kv1.3 K^+ -csatornát) kifejező T-sejtek membránját. A gyulladt szövetekben hasonlóan bekövetkezhet nekrozis és $[K^+]_e$ növekedés. A transzmembrán fehérjék általában pozitív töltésű aminosavakat tartalmaznak a transzmembrán régiók (TMR) citoplazmatikus oldalán, míg a negatív töltésű aminosavak előnyben részesítik a TMR-k extracelluláris oldalát. Az IL-2/15R alegységek szintén tartalmaznak töltött aminosavakat a TMR-k közelében. Ezenkívül a β és γ_c láncokat ligandkötéskor a Jak1 és Jak3 kinázok foszforilálják, ami az ic. farkuknak negatív töltést ad. Így a plazmamembránban vagy annak közelében lévő elektromos mező befolyásolhatja ezen receptorok biofizikai tulajdonságait és aktivitását.

Kísérleteinkben vizsgáltuk a membrán de- és hiperpolarizáció hatását az IL-2/15R és a velük közös klasztereket alkotó MHC I és II glikoproteinek mobilitására, kölcsönhatásaira és jelátviteli hatékonyságára Kit 225 K6 vagy FT7.10 sejtekben. A membránt magas K^+ -tartalmú K-HBSS pufferral vagy margatoxinnal depolarizáltuk és a K^+ -ionofór valinomicinnel hiperpolarizáltuk (nyugalmi MP: -30 ± 9 mV, K-HBSS: kb. +5 mV, margatoxin: kb. 0 mV, valinomicin: -54 ± 16 mV patch clamp méréseink szerint).

A lipid tutajokban feldúsuló IL-2R α , az MHC I és az MHC II fehérjék diffúziós állandóját a depolarizáció szignifikáns mértékben csökkentette, egyetlen kivétellekt az IL-15R α mobilitása nőtt. A hiperpolarizáció ezzel szemben megnövelte az IL-2R α , az MHC I és az IL-15R α mobilitását. Nem tapasztaltunk szignifikáns változást sem a kontrollként használt, lipid tutajokban feldúsuló GPI-kapcsolt CD48 fehérje vagy a DiC₁₈ lipid analóg, sem pedig a bélelt csapdákból feldúsuló transzferrin receptor (TfR) esetében.

Feltételezhetjük, hogy a fehérjék mobilitásának MP-változások általi modulációja összefügghet a molekulák TMR-jei közelében lévő töltött aminosavak számával és eloszlásával. Az összes megvizsgált TM fehérje: az IL-2R α , IL-15R α , HLA A (MHC I), HLA DR (MHC II) és TfR a citoplazmatikus oldalukon pozitív töltéseket tartalmaznak. Az extracelluláris oldalon nettó negatív töltést (IL-2R α , HLA DR) vagy zérus nettó töltést (IL-15R α , HLA A) hordoznak, kivéve a TfR-t, mely pozitív töltésű. A legnagyobb mobilitásváltozás az IL-2R α és az MHC I esetében történt, melyek citoplazmatikus oldalán a legtöbb pozitív aminosav (6, illetve 5) található. Másrészt a TfR mobilitása nem változott de- vagy hiperpolarizáció hatására; ennek a fehérjének 2 pozitív aminosava van a citoplazmatikus és 3 pozitív az extracelluláris oldalon, ami szimmetrikusabb töltéseloszlást eredményez, mint a többi vizsgált fehérjénél, így kisebb vagy nincs dipólmomentuma.

A membránpotenciál befolyásolhatja a membrán biofizikai tulajdonságait. A membránfluiditást DPH és TMA-DPH fluoreszcens anizotrópiájával követtük nyomon, és azt találtuk, hogy azt nem befolyásolta a depolarizáció, így a tapasztalt mobilitásváltozásokat nem a membránfluiditás változása okozta.

Az IL-15R α , az MHC I vagy az MHC II homo/heteroasszociációit jellemző FRET hatásfokok nem, vagy csak kismértékben változtak de-/hiperpolarizációkor, így az asszociációkban bekövetkező változások sem magyarázzák a mobilitásváltozásokat.

A lipid membrán vastagsága elektrostrikió révén a MP függvényében változik. Ez befolyásolhatja a lipid kettősréteg és a membránfehérjék közötti kölcsönható felület nagyságát, ezáltal a sűrűlődséget és a fehérje mobilitást. A vizsgált MP tartományban a membrán vastagságának változása számításaink alapján azonban legfeljebb 1%-nyi, egy ilyen kis effektus pedig nem magyarázza a fehérjék mobilitásában mért változásokat.

Végezetül megvizsgáltuk a MP hatását az IL-2- és az IL-15 által kiváltott jelátvitel hatékonyságára a STAT5 foszforiláció mérésével. A depolarizáció mérsékelte, de statisztikailag szignifikáns növekedést okozott az IL-2 által kiváltott STAT5-foszforilációban, míg a hiperpolarizációnak nem volt szignifikáns hatása. Ezzel ellentétben az IL-15 által kiváltott foszforilációban a hiperpolarizáció szignifikáns csökkenést idézett elő. A de- és hiperpolarizáció tehát eltérő módon befolyásolja az IL-2 és az IL-15 jelátvitelét.

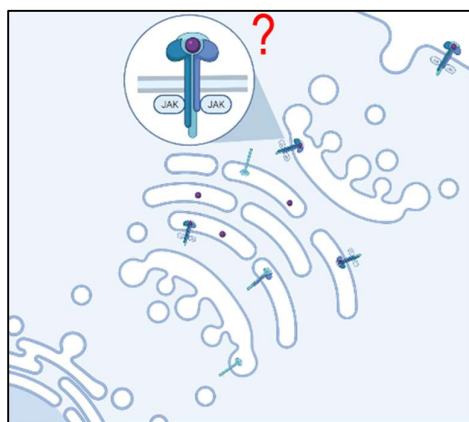
Adataink rávilágíthatnak egy új, MP által közvetített receptorműködést és mobilitást szabályozó mechanizmusra, és hozzájárulhatnak az IL-2 és IL-15 jelátvitel eltérő kimenetelének megértéséhez. Az IL-2 jelátvitel hatékonyságának fokozódása depolarizáció hatására hozzájárulhat az IL-2R-t nagy mennyiségben, kifejező T_{reg}-sejtekben az effektor T-sejtek daganatellenes immunfunkciójának elnyomásához a tumoros mikro környezetben. A tumor mikro környezet közvetlenebb módon is befolyásolja a T-sejtek effektor funkcióját. A fokozott [K⁺]_e az intracelluláris [K⁺]_i emelkedéséhez vezet az effektor T-sejtekben, ami a T-sejt-receptor által vezérelt Akt-mTOR foszforilációt és az effektor programokat gátolja, függetlenül a MP-tól. Az ionmilió és a MP változásainak fontossága a T-sejtek életében megkérdőjelezhetetlen. A következő lépés annak kiderítése, hogy a MP változás pontosan milyen módon befolyásolja a sejtmembrán különböző összetevőinek konformációját és működését.

4.1.4. Az IL-2 receptor előre összeszerelődik és jelátvitelre képes az ER-ben/Golgi-ban, ami rezisztenciát okozhat a sejtfelszínre célzó antiproliferatív antitest terápiákkal szemben

4. közlemény: Volkó J és mtsai, PNAS, 2019, 116:21120-30.

A receptorok működése a ligand termelésének és felhasználásának helye szerint lehet endokrin, parakrin vagy autokrin. Utóbbi esetben a ligandot és receptorát ugyanaz a sejt termeli. Autokrin működés esetén a sejt a ligandot az extracelluláris térbe szekretálja, amit a sejtfelszínen lévő receptor megköt, elindítva ezzel a jelátvitelt. A membránreceptorok életciklusa a durva ER-ben történő szintézissel kezdődik, ahonnan vezikuláris transzporttal jutnak a Golgi-készülékbe, majd a plazmamembránba (7. ábra). Az IL-2R láncok extracelluláris doménjei az ER-ben és a Golgi-ban azok lumenje felé néznek, és ugyanide kerülnek a szekretált ligandok, így az IL-2 is. Egy IL-2R-t és IL-2-t is termelő T-sejtben elvileg a receptor így már ezekben az ic. kompartmentumokban megkötheti ligandját, a citoplazma felé néző ic. doménjeihez pedig kapcsolódhatnak a JAK kinázok és STAT transzkripciós faktorok, lejátszódhat a jelátvitel.

Mivel az IL-2 fontos szerepet játszik a T-sejt proliferációban és aktivációban, IL-2R α antagonistá (daclizumab, az anti-IL-2R α mAb humanizált formája) terápiát alkalmaznak felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma (ATL) kezelésére, szervátültetés után a kilökődés megelőzésére és a szklerózis multiplex terápiájában. A daclizumab-terápiák hatékonysága azonban korlátozott; egy vizsgálatban az akut ATL-ben szenvedő betegek egyike sem reagált, 16 krónikus betegből pedig csak 6-nál észleltek részleges választ. Az antiproliferatív antitestterápiákkal szembeni rezisztencia molekuláris háttere nem világos. Az IL-2 hatásmechanizmusa parakrin vagy autokrin. Az aktivált T-sejtek tranziensen termelnek IL-2-t, míg a HTLV-1 Tax fehérje konstitutív expressziója miatt a „parázsló”/krónikus ATL-ben a sejtek konstitutívan expresszálják az IL-2-t és az IL-2R α -t, autokrin hurkot létrehozva. Feltételezésünk szerint az IL-2-t és receptorát is expresszáló sejtekben a jelátvitel még azelőtt megtörténhet, hogy a receptor alegységek elérnék a plazmamembránt, ami magyarázatot adhat a daclizumab terápiák korlátozott hatékonyságára.



7. ábra IL-2R feltételezett intrakrin (intracelluláris autokrin) működése. Az IL-2R alegységek extracelluláris doménje az ER, majd a Golgi lumenje felé néz. Ugyanebbe a kompartmentumba kerül az IL-2, mely már itt kötődhet a receptorához. Az IL-2R ic. doménjei a citoplazma felé néznek, ahol kölcsönhatásba léphet a JAK kinázokkal, így a jelátvitel már itt megtörténhet.

A fluoreszcens fehérjékkel (EGFP, mCherry) jelölt receptorláncok intracelluláris összeszerelődését FRET mikroszkópiával vizsgáltuk HeLa sejtekben. Az ER-t és a Golgi-t a TagBFP-vel jelölt, ER-rezidens Sac1, illetve Golgi-rezidens giantin fehérjékkel tettük láthatóvá. Az IL-2/15R β és a γ_c alegység közt mind az ER-ben, mind a Golgi-ban a negatív kontrolloknál szignifikánsan magasabb FRET hatásfokot mértünk. Az IL-2/15R β és az IL-2R α (vagy az IL-15R α) közt az ic. kompartmentumokban mért értékek (5-10%) jelentősen alacsonyabbak voltak, mint a plazmamembránban (~20%), ami arra utal, hogy az ER-ben és a Golgi-ban az IL-2R és az IL-15R alegységeinek összeszerelődése csak részleges. Ennek oka az is lehet, hogy a receptor alegységek az ER különböző területein szintetizálódnak, így teljes elkeveredésükre csak a plazmamembránban kerül sor. A közlemény megjelenése óta FLIM-FRET mérésekkel azt is igazoltuk, hogy az EGFP-IL-2 a Golgi-ban kötődik az mCherry-IL-2R α -hoz.

A Golgi-ban összeszerelődött IL-2R jelátviteli kompetenciájának felmérésére ATL sejtvonalakból ultracentrifugálással Golgit izoláltunk, és Western blot segítségével vizsgáltuk az IL-2 jelút vonal elemeinek foszforilációját. Foszforilált pJAK1, pJAK3 sávokat, illetve a γ_c lánc várható molekulatömege (65-70 kDa) körüli foszfortirozin sávokat detektáltunk az IL-2-termelő ED/IL-2 sejtek Golgi-frakciójából; mindhárom foszforilált komponens jelei gyengébbek voltak az IL-2-t nem expresszáló ED40515(+) wt. sejtek esetében.

Végezetül az IL-2/IL-2R α antagonistá antitestek proliferációt gátló hatását is vizsgáltuk ED40515(+) és ED/IL-2 sejteken radioaktív timidin beépülés alapján. Az anti-IL-2R α daclizumab-kezelés ~30-50%-kal

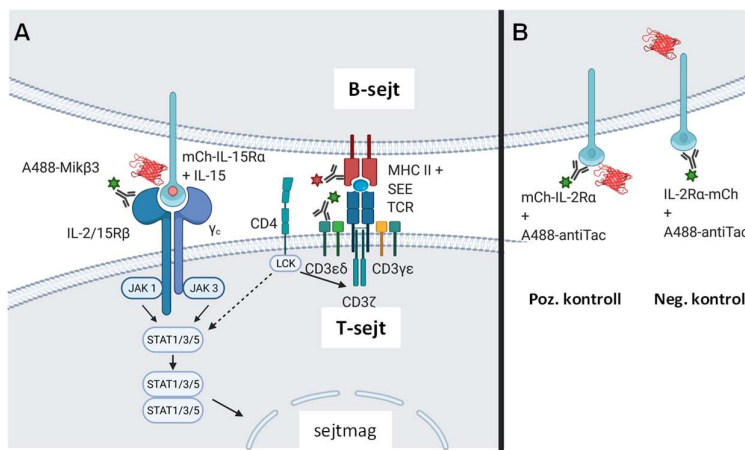
csökkentette mindkét sejttípus proliferációs rátáját. Az anti-IL-2 kezelés 40-50%-os csökkenést okozott a vad típusú sejteknél, de alig volt hatása az IL-2-t termelő változatra. A két antitest együttes alkalmazása 97%-kal csökkentette az IL-2 függő, de csak ~50%-kal az IL-2-termelő sejtek proliferációját, utóbbiak sikeresen kikerülték a blokkot. Ez arra utal, hogy az IL-2 intracellulárisan kötődik receptorához és az hatékony jelátvitelre képes. Azóta egy intracelluláris JAK gátlószerezrel is végeztünk hasonló kísérleteket, mely mindkét sejtvonal esetében hatékony gátlást eredményezett (nem közölt adatok).

Eredményeink az IL-2 receptor működésben egy új paradigmát definiálnak, az intracelluláris autokrin vagy intrakrin jelátvitelt. Vizsgálataink klinikai jelentőségét az adja, hogy amennyiben a tumor a ligandot is termeli, fennállhat az intrakrin jelátvitel lehetősége, hatástalanná téve a sejtfelszíni receptorokat célzó antitest terápiát. Ilyenkor ic. célpontokra irányuló terápiák szükségesek. Az IL-2 intrakrin működése fiziológias körülmények között is fontos lehet. Mivel a T-sejt az antigén-aktiváció után tranziensen koexpresszálja az IL-2-t és az IL-2R α -t, elképzelhető, hogy a T-sejtek robbanásszerű osztódása a parakrin mechanizmusnál rövidebb úton létrejövő intrakrin mechanizmusnak is köszönhető. További kísérleteink ennek felderítésére is irányulnak.

4.1.5. Az IL-15 transz-prezentáció az antigénprezentációtól független, autonóm folyamat

5. közlemény: Kenesei Á és mtsai, J Immunol. 2021 Nov 15;207(10):2489-2500.

Mivel mind az IL-15 TP, mind az antigénprezentáció (AP) hozzájárul a T-sejtek aktiválásához és hasonló sejt-sejt kapcsolaton alapulnak, felmerül a kérdés, hogy a két folyamat összefügg-e egymással. Célunk volt az is, hogy közvetlen bizonyítékot adjunk a két sejt által expresszált IL-15R alegységek IL-15 TP során történő összeszerelődésére. Arra is választ kerestünk, hogy az IL-15R és a TCR által közvetített jelátvitel befolyásolja-e egymást. Egy B-sejt – T-sejt modellrendszert használtunk, amely expresszálja az AP és az IL-15 TP komponenseit (8. ábra). A ligandok – IL-15 vagy a Staphylococcus enterotoxin E (SEE) szuperantigén – prezentálása során létrejövő szinaptikus régióban biofizikai módszerekkel vizsgáltuk a "transz" (sejtek közötti) és "cisz" (egyazon sejtben előforduló) fehérje kölcsönhatásokat.



8. ábra. Modellrendszer az IL-15 TP és az AP vizsgálatára. (A) Raji B-sejteket mint prezentáló sejteket mCherry-IL-15Ra-val, a Jurkat T-sejteket pedig (amelyek endogén módon expresszálják a γ_c alegységet) IL-2/15R β -vel stabilan transzdukáltuk. A B-sejteket SEE szuperantigénnel és/vagy IL-15-tel kezeltük, mielőtt összekevertük és összecentrifugáltuk őket a T-sejtekkel. A biofizikai mérések során az IL-2/15R β -t Mik β 3, a CD3 koreceptort OKT3, az MHC II-t L243 fluoreszcens mAb-val jelöltük. (B) A FRET pozitív kontrolljaként az IL-2Ra-t Alexa 488-anti-Tac mAb-val (donor) és N-terminális mCherry-vel (akceptor) jelöltük. A negatív kontrollban az mCherry-t a C-terminálison helyeztük el.

Az IL-15R α és IL-2/15R β alegységek összeszerelődését a kontakt régióban FRET mikroszkópiával mértük. Az IL-15 kezelés $E=8,7\%\pm2,4\%$ FRET hatásfokot eredményezett, ami az IL-15 receptor-ligand komplex összeszerelődését jelzi az IS-ban. Az IL-15 + SEE kettős kezelés ezt tovább növelte $10\%\pm0,2\%$ -ra, míg a csak SEE kezeléssel kapott érték alacsony, $1,3\%\pm2,7\%$ volt. Az AP kimutatására FLIM-FRET segítségével megmértük a CD3 és az MHC II közelségét az IS-ban. IL-15 kezelés esetén a két fehérje között nem volt jelentős asszociáció, SEE kezelés után a FRET hatásfok jelentősen megnőtt ($E=5,3\%\pm2,4\%$), míg a kettős kezelésnek nem volt további hatása, tehát az AP hatékonyságát az IL-15 TP nem befolyásolta.

A T-sejten kialakuló az IL-2/15R β és a CD3 között nem volt szignifikáns kölcsönhatás sem magányos sejteken, sem az AP vagy IL-15 TP során kialakuló IS-ban. Ezzel szemben az IL-15R α és az MHC II között magas FRET hatásfokot mértünk mind magányos B-sejteken, mind az IS-ban, ami SEE kezelés hatására tovább nőtt. Míg az MHC II és az IL-15R α bármelyik ligand jelenlétében feldúsult, azaz a két fehérje együtt vándorolt az IS-ba, addig a CD3 és az IL-2/15R β csak saját ligandja jelenlétében, megerősítve, hogy ezek között a molekulák között nincs közvetlen kölcsönhatás a T-sejten.

Áramlási citometriával mértük a STAT5 foszforilációs szintjét nyugalmi állapotban lévő Jurkat sejtekben és Raji sejtekkel való kölcsönhatás után. Eredményeink azt mutatták, hogy az IL-15 TP képes a JAK/STAT jelátvitelt elindítani, és az AP-nak nincs erre jelentős hatása, az IL-15 TP tehát egy AP-tól független, autonóm folyamat. Az SEE által kiváltott CD3 foszforilációt az IL-15 áramlási citometriás méréseink szerint nem növelte, sőt, a Western-blot szerint csökkentette. Az IL-15R α és a $\beta\gamma_c$ heterodimer összekapcsolódása zavarhatja az IL-15R α -hoz asszociált MHC II és a TCR közötti kölcsönhatást, vagy korlátozhatja a CD3 ζ foszforilációs hely hozzáférhetőségét.

Eredményeink arra utalnak, hogy az IL-15 TP az APC-k és a T-sejtek között nemcsak az AP kísérőjeként, hanem attól függetlenül is lejátszódhat. Az IL-15 TP olyan autonóm folyamatnak tekinthető, amely patogén hiányában is túlélési szignált adhat a memória T-sejteknek, amikor azok találkoznak az IL-15-öt prezentáló sejtekkel. Ezáltal az IL-15 képes fenntartani az immunológiai memóriát patogénmentes időszakban is.

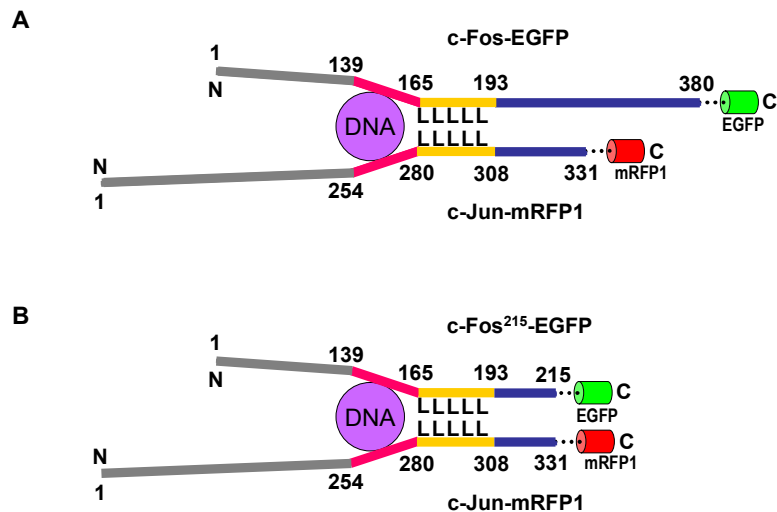
4.2. A c-Fos és c-Jun hetero- és homodimerizációja, C-terminális konformációja és DNS-kötése

11. közlemény: Vámosi G és mtsai, Biophys J. 2008; 94(7):2859-68.

12. közlemény: Szalóki N és mtsai, Mol Cell Biol. 2015 Nov;35(21):3785-98.

A c-Fos és a c-Jun (a továbbiakban Fos és Jun) heterodimert alkot in vitro és in vivo. A dimer ismert röntgenkrisztallográfiás szerkezete a DNS-kötő és dimerizációs (bZip) doménekre korlátozódik. Sem az N-terminális transzaktivációs doménokről, sem a C-terminális szegmensekről nem állnak rendelkezésre szerkezeti adatok. Kollaborációs partnereink fluoreszcens keresztkorrelációs spektroszkópiával élő HeLa sejtekben kimutatták a Fos-EGFP és a Jun-mRFP1 kölcsönhatását a sejtmagban. A keresztkorrelációs görbét egy lassú komponens uralta, jelezve, hogy a dimerek többsége a DNS-hez kötődik. Az FCCS azonban nem ad kvantitatív információt a két kölcsönhatásban lévő partner távolságáról, konformációjáról, erre a FRET alkalmas. Mivel a Fos C-terminális doménja a dimerizációs doméntól számítva 164 AA-val hosszabb, mint a

Jun-é, egy rövidített Fos konstruktot (Fos²¹⁵-EGFP) is létrehoztunk, hogy a C-terminális domének egy másik pontpárja közötti távolságról információt nyerjünk (9. ábra). A FRET-et sejtenként, illetve pixelenként áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával mértük. Új módszert dolgoztunk ki a FRET-hatásfokok és a relatív akceptor-donor expressziós arányok értékének meghatározására. Az akceptor-donor arány (N_A/N_D) kalibrálásához donor és akceptor fluoroforból álló fúziós fehérjét használtunk.



9. ábra: A Fos-Jun dimerek doménszerkezetének sematikus rajza. A) A teljes hosszúságú c-Fos-EGFP C-terminális doménje 164 AA-val hosszabb, mint a Jun-mRFP1-é. B) A c-Fos²¹⁵-EGFP csonka C-terminális doménjének hossza megegyezik a c-Jun-mRFP1-ével.

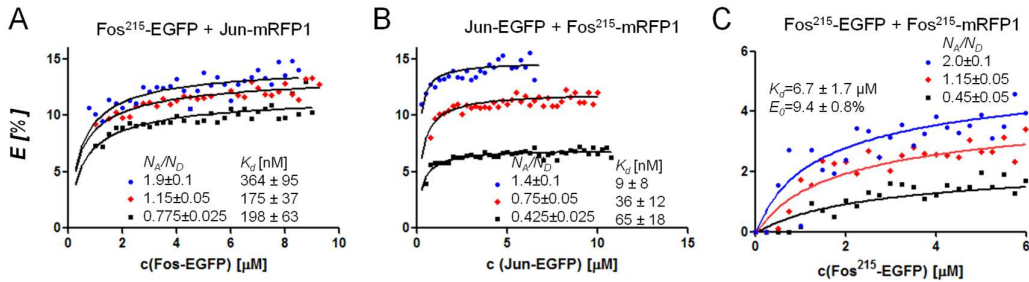
Az áramlási citometriás mérések a teljes hosszúságú Fos-Jun dimer esetében $E \sim 4\%$, míg a Fos²¹⁵-Jun dimernél $\sim 17\%$ átlagos FRET hatásfokot adtak. A a DNS-kötő, a leucin cipzár (dimerizációs) és C-terminális doméneket nem tartalmazó Jun Δ deléciós mutánszal zérus körüli eloszlást kaptunk. A lehetséges konformációk sokaságát jellemző FRET hatásfok a teljes hosszúságú Fos-Jun esetében 8 ± 1 nm, a csonka Fos²¹⁵-Jun esetében $6,1 \pm 1$ nm, az EGFP-mRFP1 fúziós minta esetében pedig $5,4 \pm 0,5$ nm átlagos donor-akceptor távolságnak felel meg. Konfokális mikroszkóppal kapott FRET hatásfok értékek eloszlása homogén a sejtmagban a Fos-Jun és a Fos²¹⁵-Jun heterodimer esetében is, azaz a Jun és a Fos asszociációja és a dimer konformációja nem függ jelentősen a sejtmagban lévő helyi környezettől vagy specifikusan elhelyezkedő DNS-szekvenciák jelenlététől.

Annak megállapítására, hogy a Fos C-terminálison történő csonkítása befolyásolja-e a dimerizációt, a mobilitást vagy a DNS-kötést, Fos²¹⁵-tel és Jun-nal transzfektált sejteken is végeztünk FCCS méréseket. A keresztkorrelációs hányados értéke közel állt a teljes hosszúságú Fos és Jun esetében talált értékhez, tehát a dimerizációt nem befolyásolta jelentősen a Fos C-végi szakasza. Az auto- és keresztkorrelációs függvényekben két komponens van jelen; a gyors komponens a szabad, a lassú a DNS-hez kötött fehérjéknek tulajdonítható. A keresztkorrelációs görbékben a lassú komponens aránya a Fos²¹⁵-Jun komplex esetében $56 \pm 4\%$, míg a teljes hosszúságú Fos-Jun konstrukció esetében $\sim 77 \pm 13\%$ volt, ami arra utalhat, hogy a Fos C-terminális doménje részt vehet a dimer más nukleáris komponensekhez való rögzítésében. Ez egybevág a C-terminális doménnek a fibroblasztok transzformációjában megfigyelt transzaktiváló szerepével.

A FRET hatásfokok alapján becsült donor-akceptor távolságokat összevetettük a kollaborációs partnerünk, Dr. C-W. von der Lieth által készített molekuláris dinamikai szimulációk eredményével. A C-terminális kromofórok közötti távolságok ezekben a modellekben 6 és 20 nm között változnak, míg a FRET általunk meghatározott átlagértéke 8 nm-es távolságnak feleltethető meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a komplexek többsége olyan állapotokban van, amelyeket rövidebb kromofór-kromofór távolságok (<10 nm) jellemeznek. Ez arra utalhat, hogy a C-terminális domének szomszédos nukleáris komponensekhez kötődnek.

Korábban a Fos-ról feltételezték, hogy kedvezőtlen töltéseloszlása miatt nem alkothat homodimereket, majd in vitro kimutatták az izolált leucin cipzár domének homodimerizációját 5,6 μM -os disszociációs állandóval. Felvetődik a kérdés, hogy olyan tumorokban, ahol csak a Fos termelődik túl, a Jun nem, előfordulhat-e Fos homodimerizáció és DNS-kötés. Kísérleteink ennek eldöntésére irányultak. A Fos²¹⁵-Jun heterodimer és a Fos²¹⁵-Fos²¹⁵ homodimer disszociációs állandóinak meghatározására kidolgoztunk egy FCS és áramlási citometria kombinációján alapuló FRET titrálási eljárást (ld. a 3.6 alfejezetet). A módszer a fluoreszcens fehérjével jelölt Fos és Jun mellett az endogén, nem fluoreszcens molekulák koncentrációját is meghatározza és figyelembe veszi az analízis során. A FRET titrálás eredményeit a 10. ábra mutatja.

A görbék illesztésekor figyelembe vettük mind a Fos homoasszociációját (a donor-jelölésű, akceptor-jelölésű és endogén molekulák minden kombinációjában), mind heteroasszociációját az endogén Jun-nal. Ha a K_d disszociációs állandót és az egyedi donor-akceptor párra jellemző E_0 értékeket kapcsoltan illesztettük a különböző N_A/N_D arányú adatsorok esetében, a homodimerizációs folyamatra $K_d = 6,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$ és $E_0 = 9,5\% \pm 0,8\%$ értékeket kaptunk, az N_A/N_D csoportokat egymástól függetlenül illesztve pedig a K_d 5,4-9,7 μM , az E_0 9,1-11,9% között változott. A Fos²¹⁵-EGFP+Jun-mRFP1 és Jun-EGFP+Fos²¹⁵-mRFP1 heterodimerek esetén a látszólagos K_d értékek 9-364 nM között változtak különböző N_A/N_D arányok esetén. A várakozásnak megfelelően a Fos²¹⁵ homodimer K_d értéke sokkal magasabb, mint a Fos²¹⁵-Jun heterodimeré, tehát a Fos homodimerizáció csak szelektív Fos overexpresszió esetén lesz jelentős; azonos Fos és Jun koncentráció esetén a heterodimerek kialakulása dominál.



10. ábra: A Fos-Jun heterodimerek és Fos-Fos homodimerek disszociációs állandóinak meghatározása áramlási citometriás FRET-titrálással. A) Fos²¹⁵-EGFP+Jun-mRFP1 és B) Jun-EGFP+Fos²¹⁵-mRFP1 ko-transzfektált sejtekben mért FRET-hatásfok a donor-jelölt Fos²¹⁵ vagy Jun koncentráció függvényében ábrázolva. Az adatokat magas (kék), közepes (piros) és alacsony (fekete) akceptor-donor arányú (N_A/N_D) csoportokba osztottuk és illesztettük, így kaptuk meg a heterodimerek K_d -értékét és az egyedi donor-akceptor párok E_0 FRET hatásfokát. C) A Fos²¹⁵-EGFP+Fos²¹⁵-mRFP1 homodimerek FRET hatásfoka a donor-jelölt Fos²¹⁵ koncentrációjának függvényében és az illesztésből kapott K_d és E_0 értékek.

A Fos homodimerizációját az FCS mérésekből származtatható F/N részecskefényesség segítségével is megerősítettük. A koncentráció függvényében ábrázoltuk a fluoreszcencia intenzitást az EGFP, a Fos^{ΔΔ}-EGFP,

a teljes hosszúságú Fos-EGFP és a Fos-EGFP+Jun-mRFP1 mintákra. Az EGFP és a Fos^{ΔΔ}-EGFP esetében az illesztett egyenesek meredeksége megegyezett, az EGFP és a Fos^{ΔΔ}-EGFP részecskénként egy fluorofort tartalmaz, monomer. Ezzel szemben a teljes hosszúságú Fos-EGFP fehérje esetén a meredekség kevesebb mint fele az előző értékeknek, ami Fos homodimerek kialakulására utal. Az autokorrelációs függvényeket egy gyors, szabadon diffundáló és egy lassú, DNS-kötött komponenst feltételező modellre illesztettük. A lassú hányad $0,35 \pm 0,14$ volt az önmagában kifejezett Fos-EGFP, és $0,38 \pm 0,10$ a Jun-mRFP1-gyel együtt kifejezett Fos-EGFP esetében, míg a nem kötődő Fos^{ΔΔ}-EGFP mutánsnál csak $0,19 \pm 0,12$, az EGFP-nél pedig $0,07 \pm 0,05$. A magában vagy a Jun-mRFP1-gyel együtt expresszált Fos-EGFP hasonló lassú hányadai arra utalnak, hogy a Fos nemcsak heterodimerként, hanem homodimerként is képes kötődni a kromatinhoz.

SPIM-FCCS méréseket használtunk a dimereket alkotó Fos molekulák együttmozgásának és mobilitásának jellemzésére. A keresztkorreláció a Fos-Jun heterodimer nagy látszólagos asszociált (dimer) hányadot mutatott ($0,22 \pm 0,07$), míg a Fos²¹⁵ homodimeré valamivel kisebb volt ($0,16 \pm 0,05$), de szignifikánsan nagyobb, mint a Fos^{ΔΔ}-Fos²¹⁵ negatív kontrollé ($\sim 0,05$). A homodimerekre jellemző érték azért is alacsonyabb, mert az azonos színű monomerekből (zöld-zöld, vörös-vörös) álló homodimerek nem járulnak hozzá a keresztkorreláció amplitúdójához. A Fos-Jun és Fos²¹⁵-Fos²¹⁵ minták keresztkorrelációs függvényeinek illesztésére elegendő volt egyetlen, lassú diffúziós komponens, azaz a homodimer is képes a DNS-hez kötődni.

A FRET-mérésekből származó adatok alapján kollaborációs partnerünk, Dr. Komáromi István MD-modellezéssel tesztelte a Fos homodimerek kialakulását. Az 500 ns szimulációs intervallum alatt nemcsak a Fos-Jun heterodimer, hanem a Fos-Fos homodimer is DNS-hez kötött maradt, és a dimer szerkezetek (coiled-coil motívumok) leucin cipzár régióik révén stabilan asszociáltak egymással.

A stabil, kromatinkötésre képes Fos homodimerek létezése felveti annak lehetőségét, hogy a Fos önálló transzkripciós regulátorként működhet, és magyarázatot adhat a Fos túltermelés jelentőségére az onkogenezisben. Még nem világos, hogy a Fos homodimer autonóm transzkripciós faktorként működik-e, vagy pedig elfoglalja az AP-1 heterodimerek kötőhelyeit, megakadályozva azok normális működését és beavatkozva azok proliferatív vagy antiproliferatív hatásába.

4.3. Magreceptorok kölcsönhatásai és működése

4.3.1. Az RAR és az RXR aktiváció molekuláris lépéseinek vizsgálata: DNS-, ligand- és kofaktorkötés

6. közlemény: Brázda P és mtsai, J Cell Sci. 2011, 124:3631-42.

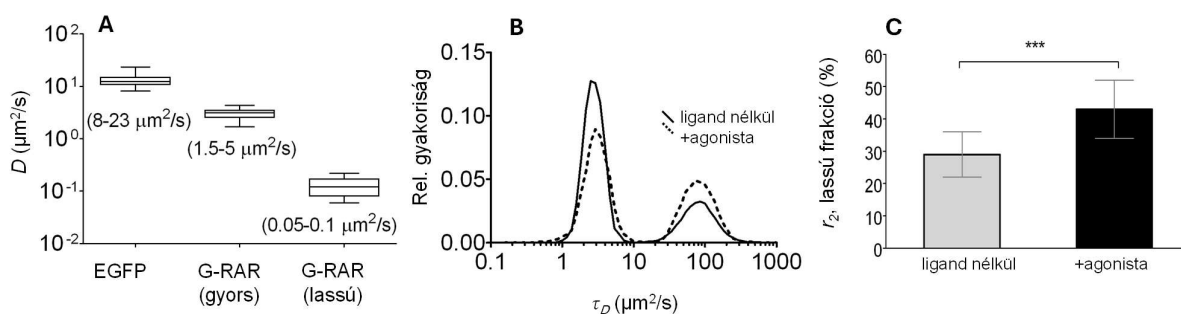
7. közlemény: Brázda P és mtsai, Mol Cell Biol. 2014, 34:1234-45.

A magreceptorok viselkedése dinamikusabb, mint amit a stabil DNS-kötést feltételező, statikus molekuláris kapcsoló modell sugall. A HeLa sejtekben expresszált RAR α és RXR α (a továbbiakban RAR és RXR) mobilitását FCS és FRAP segítségével vizsgáltuk. Megváltozott DNS- vagy kofaktor-kötő képességű mutánsokat is használtunk, hogy betekintést nyerjünk a magreceptorok a ligandkötése, DNS-kötése, dimerizációja és kofaktor-kötése közötti összefüggésekbe.

Az N-végen EGFP-vel jelölt RAR (G-RAR) NLS-e révén döntően a sejtmagban helyezkedett el, míg a DBD-vel nem rendelkező ligandkötő domén (G-RAR-LBD) homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlású volt. Az FCS méréseket a konfokális mikroszkóppal felvett optikai szelet egy vagy több kijelölt pontján, a sejtmagban végeztük. Az autokorrelációs függvényt kétkomponensű szabad diffúziós modellel illesztettük.

A diffúziós állandók és diffúziós idők eloszlása a **11. ábrán** látható. A sztenderdként használt EGFP molekula mért diffúziós idejének és ismert molekulatömegének ($M_{EGFP}=27$ kDa) alapján a gyors komponens látszólagos tömegére a G-RAR tényleges molekulatömegének (51 kDa) kb. 5-10-szeresét, míg a lassú komponensre 10^6 -szorosát kaptuk. A gyors komponens feltehetően szabadon vagy kisméretű komplexben diffundáló receptoroknak, pl. dimereknek, receptor-kofaktor komplexeknek vagy pedig a DNS-hez rövid ideig, néhány ms-ig tranziensen kötődő molekuláknak felel meg. A lassú, 100 ms-os diffúziós idő a receptor kromatinnal történő együttmozgásának vagy a rövid komponensénél stabilabb, de szintén tranziens kötődés időtartamának is megfelelhet. Egyéb DNS-kötő fehérjékkel, hisztonokkal vagy Fos/Jun fehérjékkel hasonló diffúziós állandókat mértünk vagy mértek kollaborációs partnereink.

Egy szelektív RAR-agonistával (100 nM AM580) történő kezelés csak kismértékű változást okozott a diffúziós időkben (**11. B ábra**). A receptor aktiválódását inkább a gyors populációból a lassúba való átmenet, mintsem a diffúziós idők változása jellemzi. Az agonista kezelés hatására a lassú populáció hányadában a kiindulási ~30%-hoz képest ~10-15%-os növekedést észleltünk (**11. B, C ábra**). A továbbiakban azokat a kulcsfontosságú tényezőket kerestük, melyektől ez a jelenség függhet. Mivel a receptor aktiválódását a korepresszor disszociációja, majd a koaktivátor kötődése kíséri, megvizsgáltuk a jelenség koregulátorkötő képességtől való függését. Ligand nélkül a koaktivátort konstitutívan kötő mutáns hasonló lassú hányaddal rendelkezett, mint a vad típus. Ezzel szemben a koaktivátorkötésre képtelen, a korepresszort konstitutívan kötő, a kofaktorokat nem kötő, illetve a C-terminális 12-es hélixet nélkülöző mutánsoknál az r_2 lassú hányad csökkent a vad típushoz képest. Az agonista kezelés a vad típus mellett csak a koaktivátorkötő mutánsnál növelte számottevően a lassú frakciót. Tehát a lassú hányad ligand-indukált növekedéséhez szükséges a koaktivátorkötő képesség is.



11. ábra. A G-RAR mobilitási paramétereit. (A) Az EGFP molekula diffúziós állandója, illetve a G-RAR gyors és lassú komponensének diffúziós állandója; (B) A G-RAR diffúziós idejének eloszlása 100 nM AM580 hozzáadása előtt (folytonos vonal) és 10 perccel azután (szaggatott vonal). (C) A lassú populáció hányada AM580 hozzáadása előtt és után (átlag $\pm$ s.d.; *** $p < 0,001$).

Ezután olyan mutánsokat vizsgáltunk, melyekben a receptor DNS-kötési affinitását közvetlenül megváltoztattuk. Az egyik cinkujj ciszteineit alaninra cseréltük, ami drámaian csökkentette a DNS-kötő képességet – ennél a mutánsnál a ligandkezelés jóval kevésbé növelte a lassú hányadot, mint a vad típusnál. A

saját DNS-kötő képességgel nem rendelkező, de ligandkötésre képes RAR-LBD esetében a kezeletlen mintában a lassú populáció aránya 17%-ra csökkent, és ligandfüggő növekedése ugyan kimutatható volt, de lényegesen alacsonyabb szintet (27%) ért el, mint a vad típusé – ez a növekedés valószínűleg az RXR-rel való dimerképződésnek és a dimerizációs partnerén keresztüli DNS-kötődésnek köszönhető. Összefoglalva, a kromatinhoz való közvetlen kötődés fontos, de nem az egyedüli tényező a receptorok gyors és lassú populációk közötti eloszlásának meghatározásában.

Annak érdekében, hogy közvetlenebb bizonyítékot nyerjünk a kofaktor-kötés szerepére az RAR gyors és lassú állapotai közötti eloszlásban, kompetíciós kísérleteket végeztünk. A G-RAR mellé kotranszfektáltuk az ACTR koaktivátor vagy a SMRT korepresszor peptid fragmentumait, melyek a magreceptorokhoz kötődő két interakciós domént (ID1+2) tartalmazták, de hiányoztak belőlük az aktivációs komplex további fehérjéinek dokkolásáért felelős domének. Mindkét koregulátor-peptid kotranszfekeciója ~5%-kal csökkentette a lassú frakciót ligand hiányában. Ligandkezeléskor a korepresszor peptid feltehetően disszociált, teret engedve az endogén koaktivátor agonista-indukált kötődésének, míg koaktivátor peptid transzfekeciójakor az agonista-indukált növekedés nem volt megfigyelhető, az kompetitíven gátolhatta az endogén koaktivátor kötődését. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a feltételezésünkkel, hogy a ligand által indukált átrendeződés a gyors és lassú populációk között a teljes hosszúságú koaktivátor kötődésétől függ.

A következő kísérletsorozatban a II-es típusú magreceptorok egyik közös dimerizációs partnere, az RXR α (a továbbiakban RXR) mobilitását vizsgáltuk. A stabilan transzfektált HeLa sejtekben a teljes hosszúságú G-RXR is a sejtmagban dúsult fel, míg a DNS-kötő doménnel nem rendelkező G-RXR-LBD ligandkötő domén homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlást mutatott. A G-RXR FCS mérésekkel meghatározott lassú populáció aránya kezeletlen állapotban ~16%, az LG268 RXR-specifikus agonista vagy az RAR/RXR-specifikus 9-cis-reténsav kezelés után ~43%-ra nőtt. Mind a gyors, mind a lassú komponens diffúziós idejének átlaga kissé megnőtt, a tranziens kötődés időtartamának növekedésére utalva. Az RXR-LBD gyors komponensének diffúziós ideje rövidebb volt, mint a teljes hosszúságú G-RXR-é, ami összefüggésbe hozható a csonka receptor kisebb molekulatömegével vagy a rövid időtartamú tranziens kötődés hiányával. A lassú komponens diffúziós ideje nem különbözött jelentősen a G-RXR-étől, de hányada (<10%) jóval kisebb volt, mint a teljes hosszúságú receptoré. Agonista hozzáadásakor a G-RXR-LBD lassú hányada a teljes hosszúságú receptoréhoz hasonlóan változott, ~40%-ra nőtt, ami feltehetően az endogén interakciós partnerekkel (magreceptorok és koregulátorok) kialakított kölcsönhatásnak és közvetett DNS-kötésnek tudható be. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a kofaktor-kötés hogyan befolyásolja az RXR mobilitását. Ezért az mCherry-NLS-SMRT-ID korepresszor, illetve az mCherry-NLS-ACTR-ID koaktivátor peptideket koexpresszáltuk a G-RXR-rel. Itt is az RAR esetéhez hasonló következtetést vonhattunk le: a lassú komponens ligand-indukálta növekedéséhez a teljes hosszúságú koaktivátor kötése szükséges.

Az RXR intracelluláris mobilitását a másodperces idő- és több száz nm-es/mikrométeres távolságtartományban FRAP segítségével vizsgáltuk. A kísérlet során egy 820 nm széles sávot fakítottunk ki a sejtmagban, és a fluoreszcencia visszatérést is ugyanott mértük. A FRAP visszatérési görbét kétkomponensű exponenciális függvényvel illesztettük, két diffundáló komponenst feltételezve. Az FCS mérésekből a ms-os idő- és 200 nm-es távolságtartományban kapott eredmények és a FRAP-pal a több szekundumos idő- és ~1 μ m-es távolságtartományban kapott, hosszabb távú diffúziós tulajdonságok

kvalitatíve megegyező eredményt adtak, egybehangzóan bizonyítotva a ligandkötés és DNS-kötés szerepét az RXR mobilitásában. A FRAP mérések rávilágítottak arra is, hogy még a lassabb komponens is döntően tranziens DNS-kötésnek felel meg, legfeljebb az igen kis immobilis hányad kötődik a perces időtartományban stabilan a DNS-hez: ligand nélkül $3\% \pm 3\%$, ligand jelenlétében $7\% \pm 3\%$.

Szelektív sík megvilágítású mikroszkóp, SPIM-FCS segítségével 2D-ben térképeztük a mobilitás paramétereit. A ligand-indukált átrendeződést a SPIM-FCS is megerősítette. A populációk eloszlása térben meglehetősen homogén volt, nem volt felismerhető a nukleáris architektúrával kapcsolatos mintázat.

Végül kollaborációs partnereinkkel (Prof. Nagy László munkacsoportjával) az RXR genomi kötődését vizsgáltuk ChIP-seq módszerrel. A kontroll (oldószerrel kezelt) mintákban összesen 6636 kötőhelyet találtunk, ami LG268-aktivált mintákban 8302-re nőtt, melyek közül 5138 ($>50\%$) csúcs volt azonos a kezelés előtt és után. 1498 hely tűnt el és 3164 új hely jelent meg aktiváláskor. A csúcsok a válaszadó elemek konszenzusos AGGTCA félkötőhely szekvenciáját tartalmazták az esetek $>50\%$ -ában. A fennmaradó $<50\%$ -ban történhet direkt kötődés a konszenzus szekvenciához hasonló motívumokhoz, vagy hurokképződés, illetve más faktorok révén történő indirekt kötődés a DNS-hez. Az agonista kezelés előtt és után közös RXR-kötőhelyek kumulatív betöltöttségét jelző „tag-count” átlagértéke 9,3-ról 12-re nőtt; a teljes DNS-kötődés – a kötőhelyek számának megnövekedése miatt – ennél nagyobb mértékben, összhangban az FCS és FRAP eredményekkel.

A FRAP és FCS mérések kimutatták, hogy a magreceptorok dinamikusan változó mobilitással rendelkeznek: egy gyorsan diffundáló és egy lassabban mozgó molekulapopulációval. A ligandkötés növeli az RAR és az RXR DNS és koaktivátorok iránti affinitását, és ezzel egy „elkötelezettebb” állapot felé tolja anélkül, hogy teljesen immobilizálná azokat. Ez a viselkedés alátámasztja a „hit-and-run” vagy esetleg „scan-and-stop” modellt, ahol az RXR és az RAR dinamikusan pásztázza a genomot, mielőtt meghatározott régiókhoz kötődne. Kísérleteink azt is kimutatták, hogy az RXR és RAR mobilitás-változásai kisebb mértékben akkor is bekövetkeznek, ha a DNS-kötő doméneket eltávolítjuk, ami rávilágít a fehérje-fehérje kölcsönhatások fontosságára. Összességében az RXR nagyobb ligand-indukált mobilitás-változást mutatott az RAR-nél, de a ligand hatása kimozdítható volt. Az RXR rugalmas és dinamikus volta lehetővé teszi az ingerekre adott gyors válaszokat, biztosítva, hogy folyamatosan rendelkezésre álljon a különféle partnerekkel végbemenő szabályozási feladatokhoz, összhangban a promiskuitásából következő központi szabályozó szerepével.

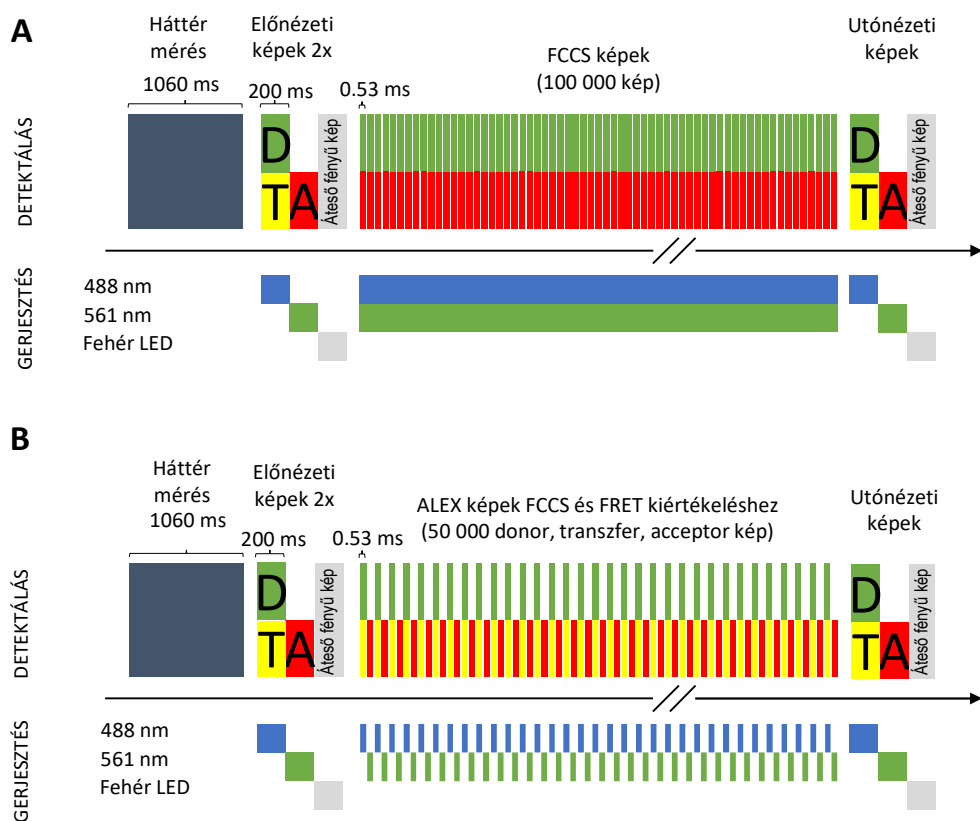
4.3.2. Az RAR és RXR agonista-indukált dimerizációjának és DNS-kötésének kimutatása a molekuláris közelség és együttmozgás egyidejű térképezésével

8. közlemény: Rehó B és mtsai, Anal Chem. 2020 Jan 21;92(2):2207-2215.

A sejtek jelátviteli folyamatai molekuláris kölcsönhatások dinamikus hálózatából állnak, amelyek sejtenkénti és szubcelluláris heterogenitást mutatnak. Ezért szükség van olyan mikroszkópos módszerre, amely képes 2D-ben vagy 3D-ben feltérképezni a kölcsönhatások különböző aspektusait: a molekulák közelségét (FRET) és (ko)mobilitását (FCCS) élő biológiai rendszerekben. Kollaborációs partnereink kifejlesztették a szelektív sík megvilágítás alapú fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópiát (SPIM-F(C)CS). A minta kiválasztott szeletét egy $2\ \mu\text{m}$ vastagságú fénysík gerjeszti. Erre merőleges irányból a mintából származó

fluoreszcenciát EMCCD kamera detektálja két (zöld, vörös) csatornában. Ebből pixelenként megkapjuk a jelek autokorrelációs (ACF0, ACF1) és keresztkorrelációs (CCF) függvényeit.

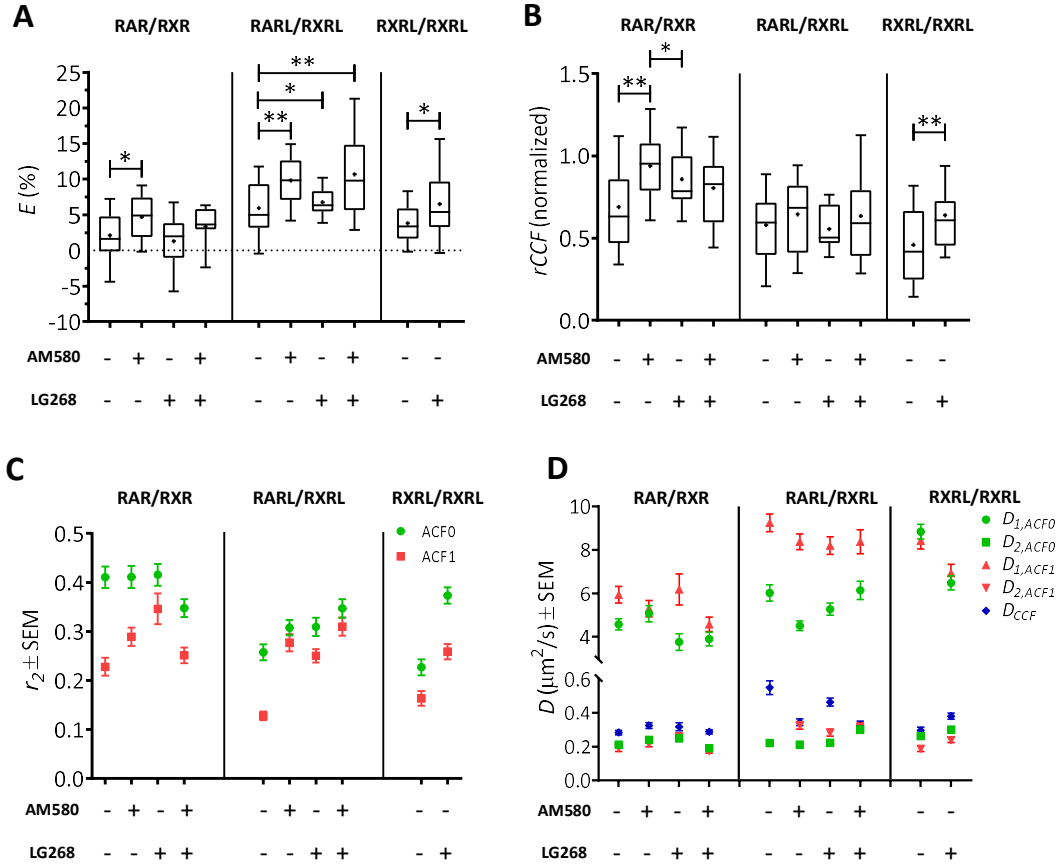
A SPIM-FCCS eredeti megvalósításában a donort és az akceptort gerjesztő lézerek folytonos üzemmódban működtek, így csak két jelet lehetett detektálni: egyet a donor és egyet az akceptor csatornában. A FRET méréshez három: donor, transzfer és akceptor jelre van szükség. Annak érdekében, hogy a FRET- és FCCS-elemzést lehetővé tegyünk ugyanazon képekből, váltakozó lézeres gerjesztést (ALEX) alkalmaztunk. A 488 nm-es gerjesztés egy zöld donor és egy vörös transzfer jelet, míg az 561 nm-es gerjesztés egy vörös akceptor jelet hoz létre a FRET kiértékeléshez. Az FCCS mérés szempontjából további előrelépést jelent, hogy az akceptor jel nem tartalmazza a donor átvilágítását és az akceptor FRET-ből származó szenzitizált emisszióját az akceptor csatornában, így nő a módszer érzékenysége. A mérés sémáját az **12. ábra** mutatja.



12. ábra. SPIM-FRET-FCCS mérés folyamatábrája folytonos gerjesztéssel (A) és ALEX-szel (B). Először gerjesztés nélkül készültek képek a háttérkorrekcióhoz, majd hosszabb expozícióval előnézeti képeket készítettünk. Folytonos gerjesztéssel (488 nm, 561 nm) két képsorozatot kaptunk; ez nem teszi lehetővé a FRET-számításokat. ALEX gerjesztéssel a donor (zöld), transzfer (sárga) és akceptor (vörös) jeleket külön-külön lehetett detektálni, lehetővé téve a FRET kiértékelést. Végül utónézeti képek segítségével ellenőriztük, hogy történt-e elmozdulás.

A módszert kontroll mintákkal validáltuk. A GC⁺ minta az EGFP (G) és az mCherry-hez (C) fúziós fehérjéje egy 6 AA hosszúságú peptiddel összekapcsolva – ez pozitív kontroll a FRET (közelség) és az FCCS (együttmozgás) számára is. A GC⁻ esetében, amely a FRET negatív és az FCCS pozitív kontrolljaként szolgál, a festékeket egy hosszú, merev poliprolin-30 szakasz (P30) köti össze. A G/C mintában, amely mindkét mérésnek negatív kontrollja, az EGFP-t és az mCherry-t különálló fehérjeként koexpresszáltuk. A GC⁺ dimer magas FRET hatásfokot és keresztkorrelációt, míg a GC⁻ minta hasonló keresztkorrelációt, de alacsony FRET-et adott. Mivel a G/C mintában a molekulák külön diffundálnak, nullához közeli FRET-et kaptunk. Folytonos

gerjesztésnél ez a minta $rCCF \sim 0.25$ körüli relatív keresztkorrelációs amplitúdót adott, ami ALEX gerjesztésnél 0,08 körüli értékre csökkent, mivel a donor jele nem keveredett az akceptor jelébe. Ez megnöveli az FCCS érzékenységét, kisebb együttmozgó hányadok megbízható kimutatását lehetővé téve. A FRET és az FCCS egyidejű meghatározásának előnyét mutatja, hogy a három kontroll minta jól elkülönülő populációként jelenik meg. Önmagában sem a FRET, sem az FCCS nem lett volna képes elkülöníteni ezeket.



13. ábra. A SPIM-ALEX-FRET-FCCS-mérések az RAR és az RXR és ligandkötő doménjeik ligandfüggő hetero- és homodimerizációját és DNS-kötődését mutatják. **A)** FRET hatásfokok a teljes hosszúságú G-RAR/C-RXR heterodimerre (balra), a G-RARL/RXRL ligandkötő domén heterodimerre (középen) és a G-RXRL/C-RXRL ligandkötő domén homodimerre (jobbra). A diagramok a pixelenkénti E értékek sejtmédiánjainak eloszlásait ábrázolják. A sejteket 10^{-7} M AM580 és/vagy LG268 RAR, ill. RXR specifikus agonistákkal kezeltük. **B)** Az ALEX-szel mért CCF, illetve a magasabb ACF0 vagy ACF1 (zöld és vörös csatorna) amplitúdóból számolt, GC^+ kontrollra normált, az együttmozgó hányadokat jellemző $rCCF$ -arányok. **C)** A lassú komponens átlagos r_2 hányada, kétkomponensű szabad diffúziós modellhez való illesztésből, amely egy gyors, szabadon diffundáló és egy lassú, kromatinhoz kötött komponenst feltételez. Az RARL és az RXRL nem képes közvetlenül a kromatinhoz kötődni. **D)** Az ACF-ekből és a CCF-ből illesztéssel nyert sejtmédiánokból számolt átlagos diffúziós együtthatók. A D_1 és a D_2 az ACF-ek gyors, ill. lassú komponenseit, D_{CCF} pedig az egy komponenssel illesztett CCF-et jellemzik.

A módszerrel ezután a ligandkötésnek az RAR és RXR dimerizációjára és DNS-kötésére (13. ábra) kifejtett hatását kívántuk tanulmányozni. A receptorokat EGFP-vel vagy mCherry-vel jelöltük, (G-RAR, C-RXR), kontrollként ligandkötő doménjeiket használtuk (G-RARL, C-RXRL). A számításokhoz a jobb jel/zaj viszonytal rendelkező előnézeti képeket használtuk az alacsony FRET-hatásfokok miatt. A medián E érték 1,6-ról 4,9%-ra nőtt AM580 kezelés hatására, nem változott LG268-ra, míg a kettős kezelés hatása (3,6%) közel azonos volt az AM580-éval (13. A ábra). Az 13. B ábrán az ALEX-FCCS mérésekből származó $rCCF$

értékeket a GC^+ konstrukcióval mért értékre normáltuk. Az E értékekkel ellentétben a komobilitás magas volt, és mindegyik ligandkezelés hatására nőtt; az önmagában alkalmazott AM580-nak volt a legnagyobb hatása. Az LG268 indukálhatja az RXR homodimerizációját vagy heterodimerizációját az RAR-tól különböző endogén magreceptorokkal is, ebből adódhat az LG268 vagy a kettős kezelés gyengébb hatása az AM580-nal történő kezeléshez képest. A dinamikáról a korrelációs görbék elemzésével tájékozódunk. Az ACF-eket kétkomponensű szabad diffúziós modellel illesztettük. A heterodimereket jellemző CCF görbék egykomponensű diffúziós modellel lehetett megilleszteni, ami hasonló értékeket eredményezett, mint az autokorrelációs görbék lassú komponense, ami azt jelzi, hogy a heterodimerek valószínűleg teljes egészében a kromatinhoz kötődnek. A G-RARL és a C-RXRL közötti E értékek magasabbak (5% ligand nélkül, **13. A ábra**), mint a teljes hosszúságú receptorok esetében. Az $rCCF$ értéke 0,6 (**13. B ábra**), alacsonyabb, mint a teljes hosszúságú receptoroknál, ami arra utal, hogy a kromatinkötés is elősegíti a dimerizációt. Ez azt is jelenti, hogy az LBD-k magasabb E értéke nem a nagyobb mértékű dimerizációnak köszönhető, inkább az N-terminális DBD-k deléciója hozza közelebb egymáshoz az N-végen elhelyezkedő festékeket. Végül megvizsgáltuk az RXRL homodimerizációs viselkedését (**13. ábra A-C**). A kezeletlen sejtekben ~3,4%-os medián E érték LG268 kezelés hatására 5,4%-ra nőtt, míg az $rCCF$ 0,42-ről 0,61-re, ami megerősíti a homodimerizációt és annak ligand által kiváltott növekedését.

A mobilitás és a közelség mérésének kombinálásával a ligandok hatását leíró molekuláris kapcsoló modellt a következőképpen egészíthetjük ki. A legtöbb RAR-RXR heterodimer kromatinhoz kötött. Az RAR agonista fokozza a heterodimerizációt és a kromatin-kötést. Így az agonista hatására kialakuló aktivációs komplexben lévő receptoroknak magasabb lehet a DNS-kötött hányaduk, mint az agonista hiányában kialakuló represszor komplexben. A teljes hosszúságú receptorok és az LBD-k viselkedésének összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy a kromatinkötő képesség és a dimerizáció pozitívan korrelál: a DNS-kötés a dimerizációt is fokozza. Az RXR agonistával való kezelés nemcsak az RAR-RXR heterodimerizációt növeli, hanem az RXRL homodimerizációját is, ami az RXR mint autonóm transzkripció faktor lehetséges szerepére utalhat.

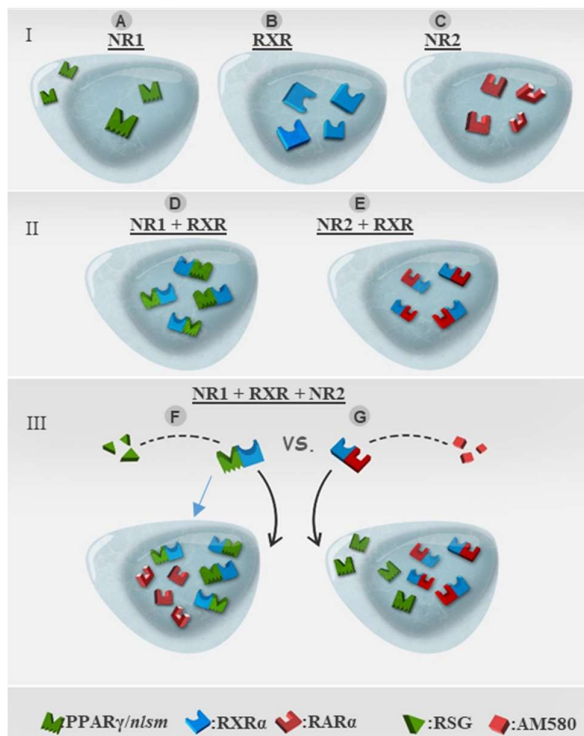
4.3.3. Magreceptorok ligandfüggő kompetíciója az RXR-rel történő heterodimerizációért és a DNS-kötésért

9. közlemény: Fadel L és mtsai, J Biol Chem. 2020; 295:10045-10061.

10. közlemény: Rehó B és mtsai, J Biol Chem. 2023; 299:102896.

Kérdéses, hogy a promiszkuus RXR hogyan választ heterodimerizációs partnert, ha korlátozott mennyiségben van jelen vagy szekvesztrálódik. Hipotézisünk az volt, hogy a partnerek versengenek az RXR-hez való kötődésért, és egy specifikus agonista kötődése növeli az adott receptor RXR iránti affinitását, elősegítve heterodimerizációját. Ez a hipotézis összhangban áll a várakozással, hogy a ligandok specifikus sejtválaszokat váltsanak ki. A hipotézist az RXR α és három partnere: az RAR α , a PPAR γ és a VDR segítségével teszteltük. A kompetíciót először a fehérje-fehérje kölcsönhatások szintjén vizsgáltuk, majd tanulmányoztuk ennek hatását a magreceptorok DNS-kötésére is. Vizsgálatainkat az is inspirálta, hogy a magreceptorokat célzó szisztémás ligandterápiák különféle mellékhatásokkal rendelkeznek, melyek egy másik magreceptor alulműködésére utalnak – kísérleteink ezekre adhatnak magyarázatot.

A heterodimerizáció kimutatására létrehoztunk egy modellrendszert, melyben az RXR α és két partnere (NR1, NR2) három különböző színű fluoreszcens fehérjével volt megjelölve (B: TagBFP, G: EGFP, C: mCherry). Az egyik – a továbbiakban NR1-nek nevezett – receptornak egy olyan formáját fejeztük ki, melynek



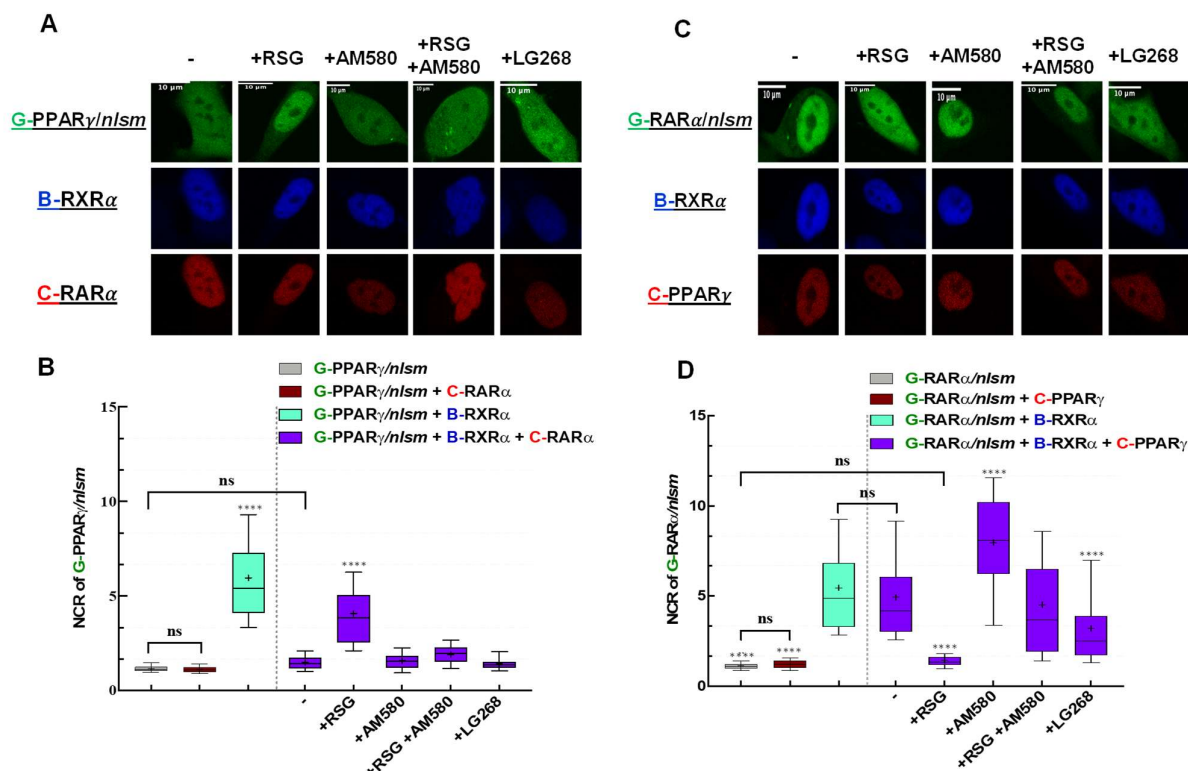
eloszlása önmagában homogén (nukleo-citoplazmatikus), míg a sejtmagban dúsul fel, ha a jellemzően sejtmagi lokalizációjú RXR α -hoz kötődik. Így az NR1 RXR α -val történő dimerizációját annak sejtmagba történő transzlokációjával tudtuk kimutatni. Az RAR α és a PPAR γ homogén eloszlású változatát a magi lokalizációs szekvencia (NLS) mutációjával hoztuk létre (RAR α /nlsm és PPAR γ /nlsm), míg a vad típusú VDR maga is majdnem homogén eloszlású volt. A kompetíciós kísérletekben használt NR2 egy adott magreceptor vad típusú formáját jelentette. A vizsgált három magreceptor szubcelluláris eloszlását önállóan vagy kettesével kifejezve, RXR hiányában vagy jelenlétében vizsgáltuk különböző agonista ligandkezelések mellett. A modellrendszert az **14. ábra** mutatja.

14. ábra. Három szint alkalmazó magi transzlokációs modellrendszer a magreceptorok RXR α -val történő heterodimerizációjának kimutatására. I. felső sor: önmagukban kifejezett magreceptorok; (A) az NR1 (pl. PPAR γ /nlsm) homogén eloszlású; az RXR α (B) és az NR2 (pl. RAR α) (C) a magban dúsul fel HEK293 sejtekben. II. középső sor: NR1 vagy NR2 expressziója a B-RXR α -val stabilan transzfektált HEK293^{B-RXR α} sejtekben; az NR1 feldúsul a sejtmagban (D), az NR2 a sejtmagban marad (E). III. Alsó sor: NR1, RXR α és NR2 hármas koexpressziója az NR1 vagy NR2 RXR α -val történő heterodimerizációjának kimutatására. Az NR1 magi transzlokációja várható, ha az RXR α preferált partnere az NR1 (nem pedig az NR2) (F). Az NR1 homogén eloszlása várható, ha az RXR α preferált partnere az NR2 (nem pedig az NR1) (G). Az NR1 és NR2 ligandjai befolyásolhatják az RXR α partnerválasztását; RSG, roziglitazon: PPAR γ agonista; AM580: RAR agonista.

A vad típusú G-RAR α , G-PPAR γ , B-RXR α és cinkujj-mutánsa (znm, ez a mutáns nem képes a DNS-hez kötődni) önmagában kifejezve is magi lokalizációval rendelkezett HEK293 sejtekben. Ezzel szemben az NR1-ként használt vad típusú G-VDR közel homogén, az NLS-mutáns G-PPAR γ /nlsm, G-RAR α /nlsm és B-RXR α /nlsm pedig teljesen homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlást mutatott önmagában kifejezve, és feldúsult a sejtmagban, ha B-RXR α -val stabilan transzfektált HEK293^{T^{B-RXR α}} sejtekben fejeztük ki. A sejtmagi feldúsulást az NCR értékkel (nuclear-to-cytoplasmic ratio) jellemeztük, mely a citoplazmatikus és magi régiók pixeleiben mérhető átlagos fluoreszcencia intenzitások hányadosa; az 1-es érték jelenti homogén eloszlást.

Az RAR α , a PPAR γ és a VDR RXR α iránti affinitását kompetíciós kísérletekkel hasonlítottuk össze. Az alábbiakban csak a PPAR γ és az RAR α közötti versengést mutatom be az RXR α -hoz való kötődésért; ezzel analóg kísérleteket végeztünk a másik két NR pár relatív RXR-affinitásának összehasonlítására is. Olyan sejteket választottunk a mérésekhez, melyekben a három magreceptor kb. 1:1:1 arányban fejeződött ki. A G-PPAR γ /nlsm homogén eloszlásúvá vált a HEK293^{B-RXR α} sejtekben, mikor a sejteket C-RAR α -val

kotranszfektáltuk. Az RSG-vel (PPAR agonista) történő kezelés ismét magi feldúsulást okozott, míg AM580 (RAR agonista) vagy LG268 (RXR agonista) hozzáadásakor homogén eloszlású volt (15. A,B ábra).

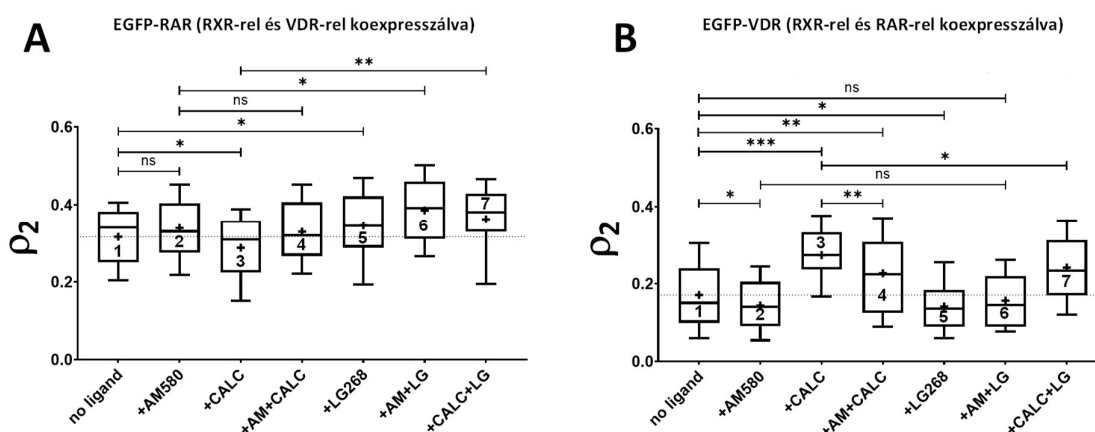


15. ábra. Kompetíció a PPAR γ és az RAR α között: az RXR α hajlamosabb az RAR α -val heterodimerizálódni, mint a PPAR γ -val, kivéve, ha csak a PPAR γ köt agonistát. A) és C) panel: A konfokális felvételeken zölddel az NR1, kékkel az RXR α és pirossal az NR2 látható. Méretvonal: 10 μ m. A) A G-PPAR γ /nlsm eloszlásának változásait C-RAR α -val kotranszfektált HEK293^{B-RXR α} sejtekben ligand nélkül vagy agonisták (10⁻⁶ M RSG, 10⁻⁷ M AM580 vagy 10⁻⁷ M LG268 (RXR agonista)) jelenlétében vizsgáltuk. C) Analóg módon a G-RAR α /nlsm eloszlásában bekövetkező változásokat C-PPAR γ -val kotranszfektált HEK293^{B-RXR α} sejtekben értékeltük. B) és D) Az NR1 magban és citoplazmában mért átlagos pixelenkénti fluoreszcencia intenzitásának aránya (NCR). **: $p < 0,0001$ a 4. oszlophoz (NR1-gyel és NR2-vel kotranszfektált HEK293^{B-RXR α} kezetlen sejthez) képest.**

A kísérletet fordított felállásban is elvégeztük: itt a G-RAR α /nlsm (NR1) eloszlását követtük nyomon HEK293^{B-RXR α} sejtekben C-PPAR γ (NR2) jelenlétében. A korábbiakkal összhangban a C-PPAR γ ligand nélkül nem gátolta a G-RAR α /nlsm kötődését a B-RXR α -hoz, a G-RAR α /nlsm a sejtmagban helyezkedett el, és ezt az AM580 kezelés tovább fokozta. Az RSG-kezelés elősegítette a C-PPAR γ B-RXR α -hoz való kötődését, így a G-RAR α /nlsm homogén eloszlásúvá vált (15. C, D ábra). Abban az esetben, ha az RXR mindkét partner számára megfelelő mennyiségben volt jelen ($[RXR] > [RAR] + [PPAR\gamma]$), a kompetíció megszűnt, és a PPAR γ RAR jelenlétében is magi lokalizációt mutatott.

A fentiekhez hasonló kísérleteket végeztünk az RAR és a VDR valamint az RAR α és a PPAR γ RXR α iránti affinitásának összehasonlítására is. Ezek alapján megállapítottuk, hogy hozzáadott ligandok nélkül a három NR affinitási „erőssorrendje” a következő: RAR α > PPAR γ > VDR, azonban specifikus agonista hozzáadása esetén mindig a ligandot kötő NR dominál. Ha mindkét kompetáló partner ligandja telítő koncentrációban van jelen, akkor közöttük a ligand nélküli, eredeti erőssorrend érvényesül.

FCS mérések segítségével azt is megvizsgáltuk, hogyan hat a kompetíció két kiválasztott magreceptor, az RAR és a VDR DNS-kötésére. Kísérleteinkben FCS mérésekkel követtük nyomon az RAR α és a VDR mobilitását RXR α jelenlétében és hiányában különböző ligandkezelések mellett. Az RXR α -t TagBFP-vel, az RAR α -t és a VDR-t pedig felváltva EGFP-vel, illetve mCherry-vel jelöltük. A magában expresszált RAR ρ_2 lassú frakciójának átlagértéke $\sim 0,22$ volt, amit az AM580 agonistával történő kezelés $\sim 0,34$ -re növelt és csökkentette a D_2 diffúziós állandóját, tükrözve a DNS-hez kötött állapotban töltött idő növekedését. Az RXR hozzáadása megnövelte a lassú frakciót és még nagyobb mértékben csökkentette a D_2 -t. Az RXR koexpresszió és ligandkezelés hatása additív volt az RAR DNS-kötésére. Ezután a G-VDR mobilitását vizsgáltuk. A magában kifejezett VDR kisebb mértékben kötődött a DNS-hez, mint az RAR, amire a kisebb ρ_2 lassú frakció (0,15) és a D_2 diffúziós együttható magasabb értéke utal. A VDR-agonista kezelés vagy az RXR koexpresszió önmagukban csekély hatást váltottak ki, de együttesen fokozták a VDR DNS-kötődését, ρ_2 a kétszeresére nőtt, D_2 pedig csökkent.



16. ábra. A RAR és a VDR kompetíciója az RXR-ért és a DNS-kötőhelyekért háromszorosan transzfektált HEK293 sejtekben a lassú komponens tükrében. A) Az EGFP-RAR lassú komponensének hányada mCherry-VDR-rel kotranszfektált HEK293^{B-RXR} sejtekben. A sejteket 100 nM AM580-nal, 100 nM kalcitriollal, 100 nM LG268-cal vagy ezek kombinációjával kezeltük. B) az EGFP-VDR lassú hányada mCherry-RAR-rel kotranszfektált HEK293^{B-RXR} sejtekben. Az oszlopok számozása a kezelések könnyebb hivatkozását szolgálja. Az átlagok („+”) összehasonlítására t-próbákat végeztünk; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns, nem szignifikáns.

Az RXR-ért folyó kompetíció DNS-kötésre kifejtett hatásának vizsgálatára a három NR-t különböző fluoreszcens fehérjékkel jelölve koexpresszáltuk. Ligand hozzáadása nélkül az RAR lassú hányadának átlaga kisebb volt a háromszorosan transzfektált sejtekben ($\rho_2 \sim 0,32$, **16. A ábra** 1. oszlop), mint a csak RAR-ral és RXR-rel transzfektált sejtekben ($\rho_2 \sim 0,38$), ami arra utal, hogy az RXR populáció egy részét a VDR elvonta. A VDR esetében, amely csak csekély DNS-kötődés növekedést mutatott, amikor RXR-rel együtt, de ligand nélkül expresszáltuk ($\rho_2 \sim 0,15 \rightarrow 0,18$), az RXR-rel és RAR-ral való hármas transzfekció sem okozott jelentős változást ($\rho_2 \sim 0,18 \rightarrow 0,17$; **16. B ábra** 1. oszlop). Ezután a különböző ligandok hatását vizsgáltuk a háromszorosan transzfektált sejtekben. Saját agonista (AM580) alkalmazásakor kicsiny, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést mértünk az RAR lassú frakciójában (**16. A ábra** 1. és 2. oszlop). A VDR agonista (kalcitriol) jelenlétében ρ_2 kissé csökkent, míg mindkét agonista jelenlétében megtartotta az RAR agonista esetén észlelt magas értéket (**16. A ábra** 3. és 4. oszlop). A VDR lassú frakciója a saját agonistával való kezelés hatására jelentősen megnőtt (**16. B ábra** 1. és 3. oszlop), míg az RAR agonistával való kezelés hatására csökkent (**16. B ábra** 2. oszlop). Mindkét agonistával történő együttes kezelés a VDR lassú frakcióját a két

független kezelésből származó értékek közötti értékre csökkentette (**16. B ábra** 4. oszlop). Ez arra utal, hogy mindkét ligand jelenlétében az RAR dominál a VDR-rel szemben az RXR-rel történő dimerizációban. Az RXR agonista jelenléte befolyásolhatja az NR partnerekkel való heterodimerizációját és a komplex DNS-hez való kötődését is. Korábban ko-mobilitás mérések alapján megállapítottuk, hogy az RXR szintetikus agonistája, az LG268 fokozta a RAR-RXR heterodimerizációt (133). Háromszorosan transzfektált sejtekben azt találtuk, hogy az LG268 minden vizsgált ligandkombinációban növelte az RAR DNS-hez kötött lassú frakcióját és csökkentette a VDR-ét (**16. A,B ábra** 5-7. oszlop).

Összességében adataink megerősítik, hogy az RAR és a VDR között a DNS-kötés szintjén is ligandvezérelt kompetíció van jelen, és az RAR dominál a VDR-rel szemben ligandok nélkül, vagy ha mind az RAR, mind a VDR agonistája jelen van. Ez a dominancia tovább erősödik az RXR ligandjának jelenlétében.

A molekuláris kapcsoló modell szerint a magreceptor dimer ligand hiányában korepresszort, jelenlétében koaktivátorral komplexet alkotva kötődik a DNS-en elhelyezkedő HRE válaszadó elemekhez. Kísérleteink bizonyították, hogy a magreceptorok viselkedése dinamikusabb: élő sejtekben az RAR, RXR, PPAR γ és VDR mobilitása alapján legalább két alpopulációra osztható. A gyorsabb diffúziójú komponens monomereket vagy kisméretű komplexeket tartalmazhat, amely a DNS-hez legfeljebb rövid ideig, tranziensen (ms) kötődik. A lassabb diffúziójú komponens a DNS-hez stabilan vagy hosszabb ideig tranziensen (>100 ms) kötődik. Összegezve a magreceptorok működéséről alkotott képünket, a ligandkötés, a dimerizáció, a DNS-kötés és a koaktivátor-kötés egymást erősítő folyamatok, és az aktivációs komplex minden említett eleme hozzájárul a komplex stabilitásának növekedéséhez. A DNS-kötés ligand által indukált növekedésének feltétele, hogy az RAR képes legyen koaktivátort kötni, azaz transzkripcionálisan aktív komplexet létrehozni, ami megerősíti a feltevést, hogy a lassú komplex legalább részben a transzkripcionálisan aktív, HRE-hez kötött komplexnek felel meg. Emellett a magreceptorok (RAR, PPAR γ , VDR) versengenek az RXR-rel történő heterodimerizációért, az affinitás sorrendje ligand nélkül (vagy mindkét NR agonistájának jelenlétében) RAR>PPAR γ >VDR, valamelyik partner agonistája jelenlétében pedig a ligandot kötő partner dominál, ami a DNS-kötésben is megnyilvánul.

Ezen eredmények gyakorlati jelentőséggel bírnak. A magreceptorok számos betegségben gyakori gyógyszer-célpontok. A retinoidterápiát hatékonyan alkalmazzák például akné és pikkelysömör kezelésére. Rák kezelésére is engedélyezték; főként akut promielocitás leukémiában. A PPAR-agonista roziglitazon 2-es típusú diabéteszben alkalmazzák. A D-vitamin szerepet játszik a kalcium-homeosztázisban, és immunmodulátorként is működik; jótékony hatásait a COVID-19 fertőzés kiegészítő kezelésében bizonyították. A specifikus magreceptor-agonisták hosszú távú szisztémás alkalmazása azonban számos mellékhatással járhat, ami korlátozhatja alkalmazásukat. A bőrbetegségek kezelésére alkalmazott retinoidok a D-vitaminhiány tüneteit okozhatják; a cukorbetegségben alkalmazott roziglitazon fokozza a csonttörések és a csontritkulás kockázatát, ami a csökkent VDR-funkciónak tudható be. A roziglitazon-kezelés makulaödémával járhat, ami a retinsav-szignalizáció megzavarására utalhat. Az ilyen mellékhatások, melyek egy másik magreceptor alulműködéséből eredhetnek, legalábbis részben az RXR-rel való heterodimerizációért és a DNS-kötésért folyó versengésnek tudhatók be. Alternatív magyarázat lehet az aktivátor komplex valamely másik komponenséért (pl. egy koaktivátorért) folytatott kompetíció. Az ilyen terápiák szakaszos alkalmazása és más magreceptor ligandokkal történő kombinálása lehetséges kezelési irány a mellékhatások kiküszöbölése

érdekében. Egy másik klinikai alkalmazási terület a kompetíció kedvező hatásainak kihasználása lehet. Krónikus vesebetegeknél megnő a szérumban a foszfátion szintje, de csökken a Ca^{2+} visszatartása, így a szérumban a Ca^{2+} szintje is, csonttritkulást okozva. Ezt D-vitamin szedéssel igyekeznek ellensúlyozni, ami azonban mellékhatásként a lágy szövetekben, pl. az erekben vagy a szívben is növelheti a kalcifikációt. Ennek visszaszorítását a különféle szövetekben differenciáltan expresszált RXR partner magreceptorok agonistáival történő célzott kezelés ellensúlyozhatja, mely csak a megcélzott, a receptort kifejező szövetben okoz kompetíciót, a csontszövetben (amely nem fejezi ki a receptort) nem. Jelenleg ebben az irányban is folytatunk ígéretes eredményeket mutató kísérleteket.

5. Összefoglalás

Az interleukin-2/15 receptorokkal kapcsolatban tett főbb megállapításaink a következők:

Az IL-2R/IL-15R alegységek közös klaszterekben fejeződnek ki T-sejtek lipid tutajában, feltehetően IL-2R α /IL-15R α /IL-2/15R β/γ_c heterotetramert alkotva, melyben az IL-2R vagy IL-15R heterotrimer elemei közötti kapcsolat szorosabbá válik a megfelelő specifikus ligand – IL-2 vagy IL-15 – jelenlétében. A receptorok MHC I és MHC II glikoproteinekkal is kölcsönhatnak, az MHC I csendesítése csökkenti a klaszterek méretét és növeli azok mobilitását. A klaszterezettség két szinten is megfigyelhető: a néhány fehérjéből álló, együtt diffundáló szoros aggregátumok lazább, néhány száz nm-es szuperklasztereket alkotnak.

Az IL-2R és IL-15R alegységek már az ER-ben és a Golgi-ban részlegesen összeszerelődnek, ami IL-2-t is termelő felnőttkori T-sejtes leukémia sejtekben intrakrin jelátvitelt tesz lehetővé, azaz a receptor az ER/Golgi lumenében képes megkötni a ligandot és jelet generálni. Ebben az esetben a jelátvitel nem gátolható hatékonyan a sejtmembránt célzó, receptorelles antitestekkel, intracelluláris célpontok elleni, pl. kinázgátló terápiák szükségesek. Az intrakrin jelátvitelnek jelentősége lehet az antigénnel frissen aktivált, az összes IL-2R alegységet és a ligandot is termelő T-sejtekben is.

A membránpotenciál befolyásolja – a depolarizáció többnyire csökkenti, a hiperpolarizáció növeli – az IL-2R α , IL-15R α , MHC I és MHC II mobilitását T-sejtekben. A depolarizáció növeli az IL-2 által, míg a hiperpolarizáció csökkenti az IL-15 kiváltott STAT foszforiláció hatékonyságát. A tumoros és gyulladásos szövetekre jellemző depolarizáló mikrokörnyezet ezáltal modulálhatja a T-sejtes immunválaszt.

FRET mérésekkel közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltatunk a prezentáló B sejt által kifejezett IL-15R α és a T-sejt által kifejezett IL-2/15R β alegységek összeszerelődésére IL-15 transz-prezentáció során. Kimutattuk, hogy a memória T-sejtek fennmaradásában kulcszerepet játszó IL-15 transz-prezentáció autonóm folyamat, amely az antigénprezentációval együtt, de attól függetlenül is végbemehet, és a két folyamat által kiváltott membránközeli fehérje (STAT5, CD3 ζ) foszforilációs események nem erősítik egymást. A prezentáló sejtben az IL-15R α és az MHC II kölcsönhat egymással és közösen vándorol a T-sejttel kialakított immunszinapszisba, míg a T-sejtben az IL-2/15R β és a CD3 között nincs kölcsönhatás.

A magreceptorokkal kapcsolatban tett megállapításaink:

Az általunk vizsgált magreceptorok (retinsav receptor, retinoid X receptor, D-vitamin receptor és peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma) mobilitása élő sejtekben két populációra osztható: egy

szabadon diffundáló vagy a DNS-hez rövid, ms-os időtartományban tranziensen kötődő gyors, és egy DNS-hez stabilabban kötődő lassú komponensre. Agonista ligand fokozza az RAR, PPAR γ és VDR heterodimerizációját az RXR-rel és növeli DNS-kötését. Az RAR agonista által indukált DNS-kötés növekedés függ a koaktivátorkötő képességtől. Eredményeinket összegezve megállapítottuk, hogy a receptor dimerből, DNS válaszadó elemből, koaktivátorból és agonista ligandokból álló aktivációs komplex minden eleme hozzájárul a komplex stabilitásának növeléséhez és a komplex kialakulásának részfolyamatai kölcsönösen elősegítik egymást.

Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált magreceptorok ligandfüggő módon kompetálnak az RXR-rel való heterodimerizációért. Ligand hiányában affinitásuk az RAR>PPAR γ >VDR sorrenddel jellemezhető, egy agonista jelenlétében a ligandot kötő receptor dominál, míg mindkét partner agonistájának jelenlétében az eredeti sorrend érvényesül. A kompetíció a magreceptorok DNS-kötésében is tetten érhető.

A fehérjék (ko)mobilitásának 2D térképezésére kifejlesztett fénysík megvilágítású fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópiát (SPIM-FCCS) alkalmassá tettük molekuláris proximitás mérésére is (SPIM-FRET-FCCS), amivel magreceptorok és AP-1 dimerizációját és DNS-kötését vizsgáltuk. Segítségével többek közt megállapítottuk, hogy mindkét transzkripciós faktor dimerjei szinte teljes egészében DNS-kötött állapotban találhatók HeLa sejtekben.

Az AP-1 transzkripciós faktorról kapcsolatos megállapításaink:

Kísérleteinkben a c-Fos és c-Jun hetero- és homodimerizációját és DNS-kötését vizsgáltuk. Kidolgoztunk egy fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia és immunfluoreszcens jelölés kombinációján alapuló módszert a fehérjék endogén és transzfektált abszolút koncentrációjának becslésére, amit FRET titrálások során disszociációs állandók meghatározására használtunk élő sejtekben. Igazoltuk, hogy a c-Fos – a korábbi feltételezéssel ellentétben – képes homodimereket létrehozni élő sejtekben, és a homodimer kötődik a DNS-hez. Meghatároztuk a Fos homodimer és a Fos-Jun heterodimer disszociációs állandóját, és megállapítottuk, hogy a homodimer stabilitása ($K_d \sim 6,7 \mu\text{M}$) két nagyságrenddel alacsonyabb a heterodimerénél (10-100 nM). Eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy a c-Fos-t túlexpresszálo tumorokban a c-Fos homodimer önálló onkogén transzkripciós faktorként is működhet.

Módszerfejlesztés

Az FCS és immunfluoreszcens jelölés kombinálásán alapuló módszerünkkel tetszőleges endogén fehérje abszolút mennyisége meghatározható sejtenként.

FRET titrálási módszerünkkel fehérjék disszociációs állandója határozható meg élő sejtekben.

Kidolgoztunk egy új számítási módszert a ratiometrikus FRET mérésben kritikus α faktor kiszámítására fluoreszcens fehérjékkel jelölt mintákban.

A SPIM-FCCS technikát alkalmassá tettük molekuláris távolságok és (ko)mobilitás egyidejű térképezésére (SPIM-FRET-FCCS).

6. Köszönetnyilvánítás

Hálával gondolok mentoraimra: Prof. Robert M. Clegg-re, akitől a göttingeni Max Planck Biofizikai Kémiai Intézetben a fluoreszcencia spektroszkópiát és a kísérletezést megtanultam, és Prof. Damjanovich Sándorra, akinek segítségével kijuthattam Göttingenbe, debreceni munkacsoportjában dolgozva pedig megismerkedhettem a sejtbiofizikával.

Hálával tartozom Dr. Tóth Katalinnak, Prof. Jörg Langowski-nak (DKFZ, Heidelberg) és munkatársaiknak (Gabriele Müller, Dr. Nina Baudendistel, Dr. Alexander Gansen, Dr. Malte Renz, Dr. Jan Krieger, Dr. Lukas Lau, Dr. Norbert Mücke), akik kitüntettek barátságukkal és akikkel 2000 óta számos közös témán és fejlesztésen dolgozhattam együtt;

Prof. Nagy Lászlónak (Johns Hopkins Medicine, St. Petersburg, FL), akinek barátként, a magreceptorok témájában kollaborációs partnerként és Fulbright-ösztöndíjas időszakom laborvezetőjeként egyaránt sokat köszönhetek, valamint munkatársainak: Dr. Brázda Péternek, Dr. Bojcsuk Dórának, Dr. Nagy Gergelynek;

Prof. Szöllösi Jánosnak, aki mentorként és intézetvezetőként támogatta kutatócsoportom kialakítását és Prof. Panyi Györgynek, aki intézetvezetőként lehetővé tette munkacsoportom fejlődését;

Dr. Thomas A. Waldmann-nak (NIH, Bethesda), akivel több mint két évtizeden keresztül együttműködtünk az interleukin receptorok működését vizsgálva;

Munkacsoportom jelenlegi és korábbi tagjainak, akik a munka dandárját végezték, a teljesség igénye nélkül: Dr. Volkó Julianna, Dr. Mocsár Gábor, Dr. Szalóki Nikoletta, Dr. Lina Fadel, Dr. Kenesei Ádám, Dr. Hajdú István, Nagy Éva, Dr. Rehó Bálint, Dr. Hegedüs Éva, Anass Benziane, Bilakovics Noémi, Hagymási-Szabó Zsófia, Varga-Tóth Katica, Dr. Arpan Chowdhury, Pialy Sen, Anshu Kumar Sharma, Ibtissem Benhamza, Dr. Sebestyén Veronika, Szekeres Tibor, Szolyka Levente, Utasi-Szabó Rita, Nagy Edina;

Dr. Dóczy-Bodnár Andreának, akivel hosszú évekig dolgoztunk együtt, Prof. Vereb Györgynek, aki révén Göttingenben az FCS módszert megtanulhattam, köszönet nekik és Prof. Szabó Gábornak, Dr. Bacsó Zsoltnak, Prof. Nagy Péternek, Dr. Hajdu Péternek, Dr. Papp Ferencnek, Prof. Varga Zoltánnak, Dr. Kovács Tamásnak, Dr. Zákány Florinának, Dr. Imre Lászlónak, Dr. Rebenku Istvánnak, Dr. Csomós Istvánnak, Prof. Mátyus Lászlónak, Dr. Nizsalóczki Enikőnek, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet összes, itt fel nem sorolt munkatársának a barátságért és együttműködésért;

Dr. Kelemen Lórántnak és Dr. Galajda Péternek (HUN-REN SZBK), Dr. Németh Krisztinának és Dr. Kele Péternek (HUN-REN TTK), Prof. Yutaka Tagayá-nak (Univ. S. Florida), Prof. Gerhard Schütz-nek (TU Wien), Dr. Veronika Huntosová-nak (Univ. Kassa), Prof. Jerker Widengren-nek (KTH Stockholm), Prof. Várnai Péternek (SE), Dr. Balajthy Zoltánnak, Dr. Jambrovics Károlynak, Dr. Balkay Lászlónak, Dr. Széles Lajosnak és Dr. Jeney Viktóriának (DE) a kollaborációért.

Végezetül a legnagyobb köszönet és hála családomat illeti: drága szüleimet, akik személyes példájukkal belém oltották a kutatómunka szeretetét és bátyámmal együtt mindvégig biztattak, drága feleségemet, Tündét, akitől szeretetet és támogatást kaptam és aki helyt állt gyermekeink nevelésében és sok egyébben, és drága gyermekeinket: Marcit, Ábelt, Boldit, Boglárt és Bendit, akik feltöltöttek energiával és elnézték nekem, hogy a munka sokat elvett abból az időből, amit velük tölthettem volna.

7. A disszertációt megalapozó közlemények

1. **Vámosi G***, Bodnár A*, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Dubois S, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllősi J, Waldmann TA, Damjanovich S: Interleukin-2 and -15 receptor alpha subunits are co-expressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(30):11082-7, 2004. (**egyenrangú első szerzők**)
2. Mocsár G, Volkó J, Rönnlund D, Widengren J, Nagy P, Szöllősi J, Tóth K, Goldman CK, Damjanovich S, Waldmann TA, Bodnár A, **Vámosi G**: MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells. *Biophys J*. 2016 Jul 12;111(1):100-12.
3. Nagy É, Mocsár G, Sebestyén V, Volkó J, Papp F, Tóth K, Damjanovich S, Panyi G, Waldmann TA, Bodnár A, **Vámosi G**: Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells. *Biophys J*. 2018 May 22;114(10):2473-2482.
4. Volkó J, Kenesei Á, Zhang M, Várnai P, Mocsár G, Petrus MN, Jambrovics K, Balajthy Z, Müller G, Bodnár A, Tóth K, Waldmann TA, **Vámosi G**: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2R α therapies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019 Oct 15;116(42):21120-21130.
5. Kenesei Á, Volkó J, Szalóki N, Mocsár G, Jambrovics K, Balajthy Z, Bodnár B, Tóth K, Waldmann TA, **Vámosi G**: IL-15 trans-presentation is an autonomous, antigen-independent process. *J Immunol*. 2021 Nov 15;207(10):2489-2500.
6. Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Tóth K, **Vámosi G***, Nagy L*: Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. *J Cell Sci*. 2011 124:3631-42 (***szenior, levelező szerzők**)
7. Brazda P, Krieger J, Daniel B, Jonas D, Szekeres T, Langowski J, Tóth K, Nagy L*, **Vámosi G***: Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. *Mol Cell Biol*. 2014 Apr;34(7):1234-45.
8. Rehó B, Lau L, Mocsár G, Müller G, Fadel L, Brázda P, Nagy L, Tóth K, **Vámosi G**: Simultaneous Mapping of Molecular Proximity and Comobility Reveals Agonist-Enhanced Dimerization and DNA Binding of Nuclear Receptors. *Anal Chem*. 2020 Jan 21;92(2):2207-2215.
9. Fadel L, Rehó B, Volkó J, Bojcsuk D, Kolostyák Z, Nagy G, Müller G, Simándi Z, Hegedüs É, Szabó G, Tóth K, Nagy L, **Vámosi G**: Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. *J Biol Chem*. 2020 Jul 17;295(29):10045-10061.
10. Rehó B, Fadel L, Brazda P, Benziane A, Hegedüs É, Sen P, Gadella TWJ, Tóth K, Nagy L, **Vámosi G**: Agonist-controlled competition of RAR and VDR nuclear receptors for heterodimerization with RXR is manifested in their DNA-binding. *J Biol Chem*. 2023 Jan 11;299(2):102896.
11. **Vámosi G**, Baudendistel N, von der Lieth CW, 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):2859-68, 2008.
12. Szalóki N, Krieger JW, Komáromi I, Tóth K, **Vámosi G**: Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. *Mol Cell Biol*. 2015 Nov;35(21):3785-98.
13. Szalóki N, Xuan QMD, Szöllősi J, Tóth K, **Vámosi G***, Bacsó Z*: High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A*. 2013 Sep;83(9):818-29. (***szenior, levelező szerzők**)

A disszertáció témájához kapcsolódó további közlemények:

1. Bosire R, Fadel L, Mocsár G, Nánási P Jr, Sen P, Sharma AK, Naseem MU, Kovács A, Kugel J, Kroemer G, **Vámosi G***, Szabó G*: Doxorubicin impacts chromatin binding of HMGB1, Histone H1 and retinoic acid receptor. *Sci Rep*. 2022 May 16;12(1):8087. *senior corresponding authors
2. Sebestyén V, Nagy É, Mocsár G, Volkó J, Szilágyi O, Kenesei Á, Panyi G, Tóth K, Hajdu P, **Vámosi G**: Role of C-Terminal Domain and Membrane Potential in the Mobility of Kv1.3 Channels in Immune Synapse Forming T Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2022 Mar 18; 23(6), 3313
3. **Vámosi G**, Miller S, Sinha M, Mocsár G, Renz M: Assessing Protein Interactions in Live-Cells with FRET-Sensitized Emission. *J Vis Exp*. 2021 Apr 22;(170). doi: 10.3791/62241.
4. **Vámosi G**, Friedländer-Brock E, Ibrahim SM, Brock R, Szöllösi J, Vereb G: EGF Receptor Stalls upon Activation as Evidenced by Complementary Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching Measurements. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 9;20(13). pii: E3370.
5. Nizsalóczki E, Nagy P, Mocsár G, Szabó Á, Csomós I, Waldmann TA, **Vámosi G**, Mátyus L, Bodnár A: Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: A quantitative CLSM and FRET analysis. *Cytometry A*. 2018 Nov;93(11):1106-1117.
6. **Vámosi G**, Rueda D: DNA Bends the Knee to Transcription Factors. *Biophys J*. 2018 May 22;114(10):2253-2254.
7. **Vámosi G**, Damjanovich L, Bene L: Turning noise into order on the cell surface: Resonant activation of molecular highlighters. *Cytometry A*. 2018 Apr;93(4):397-401.
8. **Vámosi G**, Mücke N, Müller G, Krieger JW, Curth U, Langowski J, Tóth K: EGFP oligomers as natural fluorescence and hydrodynamic standards. *Sci Rep*. 2016 Sep 13;6:33022.
9. Nizsalóczki E, Csomós I, Nagy P, Fazekas Z, Goldman CK, Waldmann TA, Damjanovich S, **Vámosi G**, Mátyus L, Bodnár A: Distinct Spatial Relationship of the Interleukin-9 Receptor with Interleukin-2 Receptor and Major Histocompatibility Complex Glycoproteins in Human T Lymphoma Cells. *Chemphyschem*. 2014 Dec 15;15(18):3969-78.
10. Doan-Xuan QM, Szalóki N, Tóth K, Szöllösi J, Bacso Z*, **Vámosi G***: FRET Imaging by Laser Scanning Cytometry on Large Populations of Adherent Cells. *Curr Protoc Cytom*. 2014 Oct 1;70:2.23.1-2.23.29.
11. Fábíán A, Horváth G, **Vámosi G**, Vereb G, Szöllösi J.: TripleFRET measurements in flow cytometry. *Cytometry A*. 2013 Apr;83(4):375-85
12. Renz M, Daniels B, **Vámosi G**, Arias IM, Lippincott-Schwartz J: Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM. *P Natl Acad Sci USA*, 2012 Oct 30;109(44):E2989-97
13. Buchholz JW, Pernus A, Mocsár G, Kreith B, Charbon E, **Vámosi G**, Kebschull U, Langowski J: FPGA implementation of a 32x32 autocorrelator array for analysis of fast image series. *Optics Express*, 20(16): 17767-17782, 2012
14. Mocsár G, Kreith B, Buchholz J, Krieger JW, Langowski J, **Vámosi G**: Multiplexed multiple- τ auto- and cross- correlators on a single FPGA. *Rev Sci Instrum*. 2012 Apr;83(4):046101
15. **Vámosi G**, Damjanovich S, Szöllösi J, Vereb Gy: Measurement of Molecular Mobility with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Current Protocols in Cytometry*. Wiley Interscience. 2009 Oct;Chapter 2:Unit2.15.
16. **Vámosi G**, Vereb G, Bodnár A, Tóth K, Baudendistel N, Damjanovich S, Szöllösi J: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (ed.) Cellular Diagnostics. Basics, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Karger, Basel, pp. 141-158, 2009
17. **Vámosi G**, Damjanovich S, Szöllösi J: Dissecting interacting molecular populations by FRET. *Cytometry A*. 73(8):681-4, 2008.

18. de Bakker BI, Bodnár A, van Dijk EMHP, **Vámosi G**, Damjanovich S, Waldmann TA, van Hulst NF, Jenei A, Garcia-Parajo MF: Nanometer scale organization of the alpha subunits of interleukin-2 and -15 receptors (IL2Ra-IL15Ra) on Kit 225 FT7.10 human T lymphoma cells. *J. Cell Sci.*;121(Pt 5):627-33, 2008.
19. Bodnár A, Nizsalóczki E, Mocsár G, Szalóki N, Waldmann TA, Damjanovich S, **Vámosi G**: A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol. Lett.* 116(2):117-25, 2008.
20. Gombos I, Steinbach G, Pomozi I, Balogh A, **Vámosi G**, Gansen A, László G, Garab G, Matkó J: Some new faces of membrane microdomains: A complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells. *Cytometry A.* 73(3):220-9, 2008.
21. Bene L, Kanyári Z, Bodnár A, Kappelmayer J, Waldmann TA, **Vámosi G***, Damjanovich L*: Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD4(+) T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(1):202-7, 2007. ***equal senior authors**
22. Vereb G, Ujlaky-Nagy L, Friedländer E, **Vámosi G**, Szöllösi J: Fluorescence Correlation Spectroscopy of Living Cells. In: Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Mendez-Vilas A, Labajos-Broncano A, (eds), Formatex, Badajoz, Spain, vol. 2, pp. 848-854, 2007.
23. **Vámosi G**, Vereb G, Bodnár A, Tóth K, Baudendistel N, Damjanovich S, Szöllösi J: Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (ed.) Zelluläre diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Karger, Basel, pp. 120-138, 2007.
24. **Vámosi G***, Bodnár A*, Vereb G, Szöllösi J, Damjanovich S: Role of Lipid Microdomains in the Formation of Supramolecular Protein Complexes and Transmembrane Signaling, in: Lipid Rafts and Caveolae: From Membrane Biophysics to Cell Biology (ed. C. J. Fielding), John Wiley & Sons, New York, pp. 141-174, 2006
25. Nagy P, **Vámosi G**, Damjanovich S, Damjanovich L: ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(3):758-63, 2006.
26. Szatmári I, **Vámosi G**, Brázda P, Bálint BL, Benkő S, Széles L, Jeney V, Özvegy-Laczka C, Szántó A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem.* 281(33):23812-23, 2006.
27. **Vámosi G**, Bodnár A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, Damjanovich L: The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes. *Immunol Lett.* 104(1-2):53-8, 2006.
28. Bodnár A*, **Vámosi G***, Tóth K, Jenei A, Mátyus L, Damjanovich S: Non-random patterns of membrane proteins and their roles in transmembrane signaling. in: Biophysical Aspects of Transmembrane Signalling. Springer Series in Biophysics. Vol. 8. (ed. Damjanovich S.) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 71-95, 2005 ***equal first authors**
29. Gombos I, Detre C, **Vámosi G**, Matkó J: Rafting MHC-II domains in the APC (presynaptic) plasma membrane and the thresholds for T-cell activation and immunological synapse formation. *Immunology Letters* 92: 117-124, 2004.
30. Panyi G*, **Vámosi G***, Bacsó Z*, Bagdány M, Bodnár A, Varga Z, Gáspár R, Mátyus L, Damjanovich S: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1285-90, 2004. ***equal first authors**
31. Szentesi G, Horváth G, Bori I, **Vámosi G**, Szöllösi J, Gáspár R, Damjanovich S, Jenei A, Mátyus L: Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comp. Meth. Prog. Biomed.* 75(3):201-11, 2004.
32. Bene L, Bodnár A, Damjanovich S, **Vámosi G**, Bacsó Z, Aradi J, Berta A, Damjanovich J.: Membrane topography of HLA I, HLA II, and ICAM-1 is affected by IFN-gamma in lipid rafts of uveal melanomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 322(2):678-83, 2004.

33. Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, **Vámosi G**, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S: Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2592-7, 2003.
34. Sebestyén Z, P Nagy P, Horváth G, **Vámosi G**, Debets R, Gratama JW, Alexander DR, Szöllősi J: 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* 48(3): 124-35, 2002.
35. Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, **Vámosi G**, Szentesi G, Szöllősi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, Damjanovich S: GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur J Biochem* 269(4): 1199-208, 2002.
36. Damjanovich S, **Vámosi G**, Bodnár A, Bene L: New trends in studying structure and function of biological membranes. *Acta Physiol Hung* 89(4): 415-25, 2002
37. Vereb G, Matkó J, **Vámosi G**, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szöllősi J, Jenei A, Gáspár R Jr, Waldmann TA, Damjanovich S: Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6013-8, 2000.
38. Brock R, **Vámosi G**, Vereb G, Jovin TM: Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10123-8, 1999.