

A transzkripció szabályozás dinamikus arca

The dynamic face of transcriptional regulation

Brázda Péter¹, Szekeres Tibor²,
Vámosi György², Nagy László^{1,3}

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,

¹ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet,

² MTA – Debreceni Egyetem Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, ³ MTA – Debreceni Egyetem Apoptózis és Genomika Kutatócsoport, 4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

Összefoglalás

A magreceptorok szupercsaládjába olyan transzkripció faktorok tartoznak, melyek ligandumfüggő módon képesek szabályozni célgénjeik átíródását. Kulcsszerepet játszanak olyan alapvető biológiai folyamatokban, mint a növekedés, az egyedfejlődés vagy a homeosztázis fenntartása. A működésüket leíró általános modell alapján ligandum hiányában korepresszormolekulát és a represszorkomplex további tagjait kötik magukhoz, így a szabályozásuk alatt álló célgének kifejeződése nem történik meg. Agonista/aktiváló ligandum hatására konformációváltozáson mennek keresztül, ami a represszorkomplex leválását, a koaktivátor- és az aktivátor-komplex kötődését, majd a célgén átíródását váltja ki. Ezt a folyamatot írja le a molekuláris kapcsolómodell, ami egy kétállású, viszonylag statikus rendszer képét vetíti fel. A modern biofizikai módszereknek és a mikroszkóptechnika fejlődésének köszönhetően olyan alkalmazások kerültek a molekuláris biológia fegyvertárába, melyekkel egyre jobb időbeli felbontással vizsgálhatók a transzkripció szabályozásban részt vevő fehérjék kölcsönhatás-változásai, s a korábbi statikus modellt egyre inkább egy rendkívül dinamikus rendszer képe kezdi felváltani.

Brázda, P.¹, Szekeres, T.², Vámosi, Gy.²,
Nagy, L.^{1,3}

University of Debrecen, Medical and Health Centre, ¹ Institute of Biochemistry and Molecular Biology, ² Cell Biology and Signal Transduction Research Group, ³ Apoptosis and Genomics Research Group, Hungarian Academy of Sciences – University of Debrecen, H-4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98, Hungary

Summary

Nuclear receptors are transcription factors that regulate gene expression in a ligand-dependent manner. They play key roles in several basic biological processes such as growth, differentiation and maintenance of homeostasis. According to the current general model of nuclear receptor action, in the absence of ligand, co-repressor and other members of the repressor complex are bound to the receptor, keeping the target gene silent. However, in the presence of an agonist ligand, co-regulator exchange takes place, which means that the repressor complex is released and co-activator with members of the activator complex takes its place. This regulator exchange results in activation of target gene expression. This process is viewed as the molecular switch model, which represents two distinct states of a rather static system. Due to modern biophysics and the evolution of microscope technology, new applications became available in the field of molecular biology, which made it possible to investigate transcriptional regulation at increasingly higher time resolution. As the result of these experiments the earlier static model is being replaced by a rather dynamic one.

A sejtmagreceptor-biológia kezdetei

1896-ban Beatson jegyezte le, hogy azon előrehaladott mellrákban szenvedő betegek állapotában, akiknél eltávolították a petefészkeket, jelentős javulást tapasztaltak. Ezzel gyakorlatilag felfedte az ösztrogén mellrákra gyakorolt stimuláló hatását, jóval azelőtt, hogy magát a hormont leírták volna

[1]. Később, 1962-ben Jensen azt is leírta, hogy ezek a hormonok a sejtekben található fehérjékhez kötődnek, melyek azután a sejtmagba vándorolva fejtik ki hatásukat [2]. Az ösztrogénreceptor (ER) működésének modellje annyira újszerűnek bizonyult, hogy csak fokozatosan vált elfogadottá. A felfedezés azonban tudományos mérföldkönek számít.

Evans és Chambon nevéhez köthető az első magreceptor, a glükokortikoidreceptor (GR), majd az ER klónozása [3]. Ezek az eredmények indították el azt a folyamatot, mely során az 1980-as évek végéig számos további magreceptort azonosítottak homológia alapján. Majd az azonosított receptorokhoz egyre több endogén ligandumot is kötöttek, így adoptálódtak a kezdetben ismeretlen ligandummal rendelkező „árva” receptorok. A genomprojekteknek köszönhetően ma már tudjuk, hogy a *Caenorhabditis elegans* génállománya 270, a *Drosophila melanogaster* 21, az egéré 49, az emberé pedig 48 különféle magreceptort kódol. A szekenciavizsgálatokból kiderült, hogy ezek a fehérjék jelentős mértékben konzerváltak, ami azt jelenti, hogy a magreceptorok a többsejtűek törzsfejlődésének igen korai szakaszán jelenhettek meg, és valamennyi törzsben megtalálhatók [4].

A receptorok általános jellemzői

A magreceptorok szupercsaládjába olyan transzkripciósfaktorok tartoznak, melyek ligandumfüggő módon képesek szabályozni – aktiválni vagy gátolni – célgénjeik átíródását. Természetes ligandumaik közé kisméretű molekulák tartoznak, mint például a lipiddoldékony szteroid hormonok, a reti-

noidok és egyes metabolitok, amelyek szabadon képesek átdiffundálni a sejtmembránon. Az „árva” receptorok adoptálása során egy sor kis affinitású ligandum került azonosításra. Ezek között többszörösen telítetlen, illetve oxidált zsírsavak, sőt xenobiotikumok is vannak. Ezek a fehérjék képesek a hormonok vagy metabolitok által hordozott információt közvetlenül a genomhoz továbbítani. Kulcs szerepet játszanak olyan alapvető biológiai folyamatokban, mint a növekedés, az egyedfejlődés vagy a homeosztázis fenntartása [5]. Ezt a szerteágazó fehérjecsaldót két csoportra oszthatjuk élettani szerepük és működésük alapján. Az első csoportba azok a receptorok tartoznak, amelyek specifikus, nagy affinitású ligandumokat kötnek ($K_d \sim 10^{-9}$ M). Ezen „endokrin receptorok” közé tartoznak a szteroid hormonok receptorai, a már említett ER vagy az androgénreceptor (AR). A másik csoportba, a „metabolitreceptorok” csoportjába tartoznak azok a magreceptorok, melyek alacsony affinitású ligandumokat kötnek ($K_d \sim 10^{-6}$ M). Ilyenek például a peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR), melyeket különböző zsírsavak aktiválnak, az oxiszteolok által aktivált máj-x-receptorok (LXR), a retinsavreceptor (RAR) és a retinoid-x-receptor (RXR).



Brázda Péter PhD-hallgató a Debreceni Egyetem Természettudományi Karán végzett biológusként 2005-ben. 2002-ben tudományos diákkörösként csatlakozott a DE Orvos- és Egészségtudományi Centruma Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének Nagy László által alapított Magreceptor Kutatócsoportjához, ahol 2005 óta PhD-hallgatóként folytatja tanulmányait. Jelenleg magreceptorok és koregulátoraik kölcsönhatásának *in vivo* körülmények között történő vizsgálatával foglalkozik.

Szekeres Tibor biológushallgató jelenleg az MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoportjának tudományos diákkörös hallgatója. Tudományos érdeklődési területe: a magreceptorok működésének vizsgálata modern biofizikai módszerekkel.



Vámosi György tudományos főmunkatárs. Okleveles fizikusként végzett a Kossuth Lajos Tudományegyetemen 1991-ben, PhD-fokozatát a Debreceni Orvostudományi Egyetemen szerezte 1999-ben. 1991 és 1995 között a göttingeni Max Planck Intézetben DNS-struktúrák fluoreszcenciás vizsgálatával foglalkozott, 1995-től a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének, 2006-tól az MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoportjának tagja. Jelenlegi szakterülete fehérje–fehérje kölcsönhatások vizsgálata limfociták plazmamembrán-receptorai között (például IL-2/15R, illetve MHC-molekulák alkotta szuperklaszterekben), ezek szerepe a

transzmembrán jelátvitelben; továbbá kölcsönhatások dinamikájának vizsgálata magreceptorok, transzkripciósfaktorok között; fluoreszcenciamikroszkópiás és -spektroszkópiás módszerek: FRET, FCS fejlesztése és alkalmazása.

Nagy László egyetemi tanár, az MTA levelező tagja a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centruma Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében a Magreceptor Kutatócsoportot vezeti 1999 óta. Orvosként végzett 1991-ben a Debreceni Orvostudományi Egyetemen, majd hét éven át posztdoktori tanulmányokat folytatott az Egyesült Államokban, Houstonban és San Diegóban. 1999-ben tért haza és indította el itthoni kutatócsoportját. Érdeklődési területe a magreceptorok biokémiája, molekuláris és sejtbiológiája, valamint a transzkripció genomszintű vizsgálata.

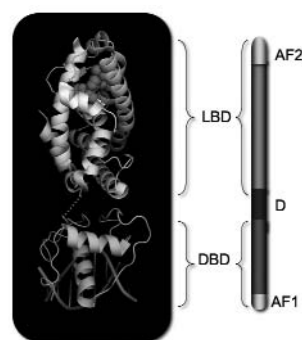


Szerteágazó és központi biológiai szerepüknek köszönhetően a magreceptorok a gyógyszerkutató elsődleges célpontjai között szerepelnek. Ezért lényeges, hogy megértsük azon folyamatokat, melyek során az inaktív, gátolt állapotban lévő receptor aktív állapotba kerül. A következőkben azon biokémiai, illetve biofizikai módszereket és az ezek felhasználásával született alapvető fontosságú eredményeket mutatjuk be, melyek hozzájárulnak, hogy egyre pontosabban átláthassuk ennek a komplex rendszernek a működését.

Doménszerkezetük

Néhány kivételtől eltekintve valamennyi magreceptor hasonló doménszerkezettel bír (1. ábra). Az N-terminális végen helyezkedik el a nem ligandumfüggő aktivitásért felelős (*activation function 1*, AF1) A/B-domén. Ezt követi a magreceptorok között legmagasabb fokú konzerváltságot (kb. 90%) mutató DNS-kötő domén (DBD). A 75–90 aminosavból felépülő egység két darab, egyenként 4–4 konzervált ciszteint tartalmazó Zn-ujjal rendelkezik. Itt található az a hélix, amely a DNS nagyárákhoz képes kötődni, miután felismerte a magreceptor-specifikus válaszadó elemet (RE). A konszenzus válaszadó elem 5'-A/GGGTCA (fél szekvencia) sokszor több száz kilobázissal a transzkripció starthely előtt helyezkedik el direkt ismétlődéses, palindrom vagy inverz palindrom pozícióban, lehetővé téve ezáltal a specifikus receptor homovagy heterodimerek kötését. A D-régió flexibilis híd képez a DBD és a ligandumkötő domén (LBD) között. Az LBD valódi multifunkciós domén. Ide köthető a ligandumkötésen túl a ligandumfüggő transzkripció aktiválás (*activation function 2*, AF2), a dimerképzés, valamint a koregulátorkötés is. Ez az egység 12 hélixből épül fel, melyek három párhuzamos síkba rendeződnek [4]. Csak a DBD és az LBD kristályszerkezetét ismerjük, a teljes fehérje szerkezetét még egyik magreceptor esetében sem sikerült feltárni. Ezekből a kristályszerkezeti eredményekből tudjuk azt, hogy az LBD két félre osztható. Az alsó fél belsejében egy apoláros környezet biztosító üreg, a ligandumkötő zseb (LBP) található. Érdekes módon erre a konzervatív szerkezetet mutató régióra igen nagyfokú variancia is jellemző, ami a zseb méretének és kötőfelszínének változatosságából adódik. A nagyméretű zsebek – mint amilyen a PPAR γ is rendelkezik – azt ered-

ményezik, hogy ugyanaz a receptor többféle, kémiaiag eltérő ligandumot képes megkötni. Ezzel szemben a Nurr1 receptor kristályszerkezetét tanulmányozva kiderül, hogy nem rendelkezik ligandumkötő zsebbel, és valószínűleg nincs endogén ligandumuk. Ezek az „árva” receptorok nem az ismert mechanizmust követve működnek. A ligandumkötő zsebet a 12-es hélix (H12, az apo-RXR kristályszerkezte alapján) fedi le. A H12 kulcsszerepet játszik abban, hogy a magreceptorok molekuláris kapcsolóként működhessenek [6]. A magreceptor és válaszadó eleme közötti kötődést a D-vitamin-receptor esetében a 2. ábra mutatja be.



1. ábra A magreceptorok doménszerkezete. Az N-terminális vég felől: a válaszadó elemhez kapcsolódó DNS-kötő domén (DBD), híd régió (D), ligandumkötő domén (LBD) az aktívált pozícióban lévő H12 hélixszel (AF2) és a ligandumkötő zsebbel kötődött agonista ligandummal. (Szaggatott vonal ábrázolja a híd régiót; mivel technikai okok miatt a teljes hosszúságú receptor nem kristályosítható, ezért az LBD és a DBD kristályszerkezeti képei csak külön-külön ismertek.)

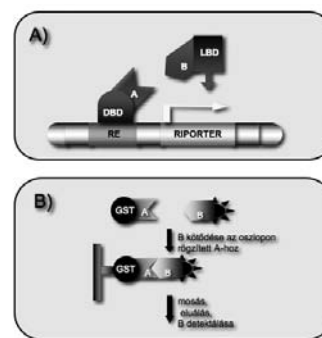
2. ábra (lásd a címlapon) A válaszadó eleméhez kapcsolódó magreceptor (D-vitamin-receptor). A ligandumkötő domén 12-es hélice (sárga színnel kiemelve), amint az agonista ligandum (pirossal jelölve) kötődését követően lezárja a ligandumkötő zsebet. A jelenleg kibontakozóban lévő elképzelések szerint a magreceptorok és a válaszadó elemek közötti dinamikus kölcsönhatások eredményeként a receptorok folyamatosan tesztelik (scanning) a potenciális válaszadó elemeket.

Dimerek, koregulátorok

A magreceptorok működésének megértéséhez szükséges további két jellegzetesség ismerete. Az egyik, hogy ligandumot kötő állapotban – kevés kivételtől eltekintve – dimereket képeznek. A dimerek a különböző hosszúságú szakaszokkal elválasztott dimerspecifikus fél kötőhelyekhez kötődnek. Alkothatnak így egyrészt homodimereket, mint például a GR, vagy az ER, illetve RXR-rel heterodimereket is, mint az RAR és a PPAR. Az RXR tehát központi szereppel bír a magreceptorok egy

csoportjában, mivel promiszkuus heterodimerizáló partnereként viselkedik. Az RXR-heterodimerek lehetnek permisszív heterodimerek, ha mindkét receptor oldaláról aktiválhatók (például RXR:PPAR), ellentétben a nem permisszív heterodimerekkel (például RXR:RAR), melyek kizárólagosan az RXR oldaláról nem, csak a partner oldaláról, illetve pánagonista ligandummal aktiválhatók. A másik lényeges jellemző a koregulátorok kötése. A magreceptorok a környező kromatinstruktúrára koregulátorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Jelenleg több száz ilyen koregulátort ismerünk, melyek hatalmas fehérjekomplexeket képezve egyrészt hidat jelentenek a magreceptorok és a transzkripció gépezet között, másrészt megvalósítják azt a fajta finoman hangolt kombinációs szabályozást, ami a receptorok sokrétű szerepének az alapja. Funkciójukat tekintve lehetnek korepresszorok és koaktivátorok. Korepresszor például a 270 kDa méretű SMRT, ami olyan molekulakomplexek tagja, amelyek például a hisztonok N-terminális lizinének deacetilálása révén gátolják a célgén átíródását. A koaktivátorok közé tartozik például a DRIP/TRAP komplex. Ebben az esetben is nagyméretű, 14-16 fehérjéből álló komplexről van szó. A komplex tagjai hiszton-acetiltranszferáz enzimatis aktivitással rendelkeznek, ami lehetővé teszi az aktív kromatin kialakítását, ezáltal a célgén átíródását [4].

A korepresszor- és koaktivátor-komplexek specifikusan képesek kötődni a magreceptorok LBD régiójához. A kölcsönhatás a koaktivátorok esetében az LxxLL, korepresszorok esetében az LxxxIxxxI/L motívumon keresztül történik (*receptor interaction domain*, RID). Az LBD mutációs feltérképezése azt a meglepő eredményt hozta, hogy a korepresszor és a koaktivátor interakciós felszínéhez kapcsolódó kötőhelyek nagymértékben átfednek egymással a magreceptoron. Ez azt jelentheti, hogy a koregulátorkötés kizárólagos, egyszerre csak egy molekula kapcsolódhat az LBD-hez. Így azzal, hogy az LBD-hez koaktivátor vagy korepresszor kötődik, lényegében eldől a „molekuláris kapcsoló” állása. Ezen a jelenségen alapul a magreceptorok működését leíró kapcsolómodell (3. ábra). A modell megalkotását elősegítette, hogy mind több kristályszerkezeti kép készült különböző receptorok LBD régiójáról ligandumkötő és apo-konformációban, valamint komplexben a koregulátorok interakciós doménjét képviselő peptidszakaszokkal [6]. Olyan kristályszer-



3. ábra A molekuláris kapcsoló-modell kidolgozásához vezető kísérleti rendszerek. (A) A kéthibrid rendszerben lehetséges fehérje–fehérje és fehérje–DNS kölcsönhatások vizsgálata. A rendszer működésének alapjelensége a riportter gén (például a luciferázgén, melynek terméke a luciferint detektálható fényjelenség mellett módosítja) aktiválása abban az esetben, ha a transzkripció faktor az aktivátorrégióhoz kötődik. Az elnevezés onnan ered, hogy a transzkripció faktort két részre bontva alkalmazzuk. A DNS-kötő félhez van kapcsolva a „csali” (A) fehérje, a transzaktívációs képességgel bíró félhez pedig a „zsákmány” (B). Ha a csali–zsákmány pár kölcsönhatásba lép egymással, az azt eredményezi, hogy az aktiváló domén a válaszadó elemhez kötődik a csalifehérjén keresztül, így a riportter gén kifejeződik. Ezt az alapelvet felhasználva a módszer alkalmas a magreceptorok ligandumfüggő transzaktívációs képességének vizsgálatára, a koregulátorcsere tanulmányozására, valamint promotértérképezésre is, attól függően, hogy milyen egységekből építjük fel. (B) A GST (glutathion-S transzferáz) pull-down módszerben a GST-fúziós csalifehérje glutationon keresztül kikötődik egy specifikus oszlopra. Az izotóp beépítésével, *in vitro* transzlált zsákmányfehérje is átáramlik az oszlopon. Azonban ha van affinitás a két fehérje között, akkor az izotóppal jelölt fehérje is kikötődik az oszlopra, ellentétben a többi fehérjével. A kötődött fehérje detektálásán keresztül vizsgálható, hogy különböző ligandumkezelések milyen hatással vannak a fehérjepartnernek kölcsönhatására, és mutagenézis segítségével a kölcsönható felszínek térképezhetők.

kezeti modell azonban, amely a teljes hosszúságú receptort tartalmazná, eddig nem készülhetett el technikai okok miatt. A működés hátterében álló fehérje–fehérje és fehérje–DNS kölcsönhatások változását élesztő-, majd fehérje-kéthibrid technikával, valamint GST-fúziós fehérjék kifejezésével tanulmányozták. Az így kirajzolódó egyszerű, kapcsolómodell lényegében az LBD felszínén lezajló koregulátorcsere írja le. Ennek alapján az apo-receptor korepresszort és ezen keresztül a represszorkomplex további tagjait köti. A célgén átíródása ekkor nem történhet meg, mivel a régió gátolt állapotban van. Agonista ligandum hatására azonban a represszor leválik a magreceptorról, és helyére koaktivátor, valamint az aktivátorkomplex további tagjai kötődnek. Ezek alakítják ki azt a kromatinkörnyezetet, ahol lehetővé válik a célgén aktiválása, átíródása.

A magreceptor-működést leíró modellek (mozgolódó magreceptor-kutatás)

Egy statikus modell: a molekuláris kapcsoló

De miként dönt az LBD arról, hogy melyik típusú koregulátort kösse? Milyen molekuláris folyamatok állnak a kapcsoló működése mögött? A rendelkezésre álló kristályszerkezeti képek alapján a koaktivátor interakciós domén (ID) a receptor 3-as, 4-es és 12-es hélixekhez kötődik (H3, H4, H12), mégpedig olyan módon, hogy a H12 pozíciója egy töltéscsapdán keresztül elősegíti ezt a kölcsönhatást. Ez a H12 aktív pozíciója a holo-receptor esetében, azaz, amikor az agonista ligandum a ligandumkötő zsebben ül. A H12 mint egy egérfogó karja, lényegében lezárja ezt a zsebet, stabilizálva a koaktivátor kötődését (2. ábra). Ezzel szemben – bár a korepresszor is ugyanahhoz a régióhoz kötődik az LBD-n – a hosszabb ID-régióknak köszönhetően a H12 nem tudja felvenni az aktív pozíciót. Ez a ligandum által vezérelt koregulátorcsere a kapcsoló működésének alapja. Proteolízis-szenzitivitás és NMR-vizsgálatok világossá tették, hogy a ligandumkötés stabilizálja az LBD-t, egy kompaktabb konformációt hozva létre. Apo-PPAR magreceptoron végzett fluoreszcencia-anizotrópiás vizsgálatok alapján a H12 rendkívül mobilis, és mobilitása független a domén többi részétől. Ligandumkötés után azonban ez a dinamika jelentősen mérséklődik, alátámasztva azt az elképzelést, hogy ekkor a 12-es hélix felkötődik az LBD felszínére, felvéve aktív pozícióját. A ligandum tehát két úton is stabilizálja a receptor aktív konformációját. Egyrészt közvetlenül is kapcsolódik a H12 hélixhez, másrészt az egész LBD konformációjára hatással van, mivel kompaktabbá teszi azt, ezzel is elősegítve a kialakult aktív konformáció stabilizálását. Ligandum hiányában viszont a bekötődő korepresszor nagyobb méretű ID-jének köszönhetően a H12 nem foglalja el aktív pozícióját, és az apo-konformáció stabilizálódik. Megjegyzendő azonban az is, hogy a jelen lévő koregulátorok egymáshoz viszonyított aránya is befolyásolja a koregulátorcserét.

Lendületben: új alkalmazások, új modellek

ChIP. A molekuláris kapcsoló modellje alapján egy viszonylag statikus rendszer rajzolódik ki előttünk, melyben a transzkripció szabályozásának kulcsát a különböző hatással bíró fehérjekomplexek és a kro-

matin kölcsönhatásai jelentik. Ez a modell azonban nem tér ki a folyamatok kinetikájára, ugyanis a modellhez vezető módszerek alkalmatlanok a transzkripció szabályozás időbeli lefolyásának vizsgálatára. Ilyen irányú vizsgálatokat tesz lehetővé a kromatin-immunprecipitáció (ChIP) és módosított formáinak alkalmazása. Az eljárás alaplépései a következők: 1) a szövet vagy sejtek, a DNS-fehérje és fehérje-fehérje komplexek formaldehiddel történő keresztkötése, 2) a kromatin fragmentálása, 3) a kromatinfragmentumok immunkicsapása magreceptor-, illetve koregulátorspecifikus antitestekkel, 4) a keresztkötések feloldása, 5) a promóter DNS detektálása. Az antitestek specifitásának javítása és PCR technikák alkalmazása nagyban növelték a módszer hatékonyságát, még pontosabbá téve a promóter régió feltérképezését. Az időfüggés vizsgálatát a Shang által alkalmazott „kinetikus ChIP” módszer [7] tette lehetővé. Ezzel ugyanis kimutathatóvá vált a pS2 és a cathepsin D promóterén felépülő ER-kötött transzkripció komplex össze rendeződése szinkronizált sejtpopulációban [8]. Két érdekes eredményt is hoztak ezek a kísérletek. Az egyik, hogy az egyes komplexek promóterkötése átfed. Az aktiváció bekövetkezéséhez szükség van a korepresszorok jelenlétére is.

Nem áll ez ellentétben azzal a koncepcióval, amit a kéthibrid-kísérletekből születő kapcsolómodell leír? A legérdekesebb észlelés pedig csak ezután következett. Ösztrogén, azaz az agonista ligandum hiányában az ER promóterkötése jellegzetes ciklikusságot mutatott. A be-ki ciklus periódusa 20 perc körül mozgott, azonban az RNS-polimeráz II promóterkötése nem volt detektálható ekkor. Ösztrogén jelenlétében ezzel szemben az ER, a polimeráz és a koregulátorok is követték ezt a be-ki ciklust, noha egy jelentősen lelassult, körülbelül 40 perces ciklusosságot követve [9]. Ezen eredmények alapján egy sokkal dinamikusabb rendszer kezdett kirajzolódni. Nem szabad azonban meglepedezni arról, hogy a ChIP alkalmazása során a kölcsönható partnereket biokémiai módszerekkel keresztkötjük, így lényegében pillanatképet készítünk a komplexekről. Ezeket a pillanatképeket megfelelően egymás után helyezve érzékelhető ugyan, hogy egy dinamikus változó rendszerről van szó, viszont a perces nagyságrendű időbeli felbontás és az *in vitro* környezet alapvetően korlátozza, hogy a valóságos dinamikai változásokat feltárhassuk.

*A biofizika és a molekuláris biológia határterületén:
in vivo fluoreszcencia mikroszkópia*

Igény jelentkezett tehát olyan molekuláris biofizikai módszerekre, melyekkel nem csupán egy nagyobb sejtpopuláció halmazátlagaként, hanem akár egyedi sejtenként, szubszekundumos felbontással és „valódi” környezetében, azaz *in vivo* körülmények között vizsgálhatók az említett fehérjedinamikai változások. Az igények és a technikai fejlődés szerencsés egybeesése egy sor olyan fluoreszcenciamikroszkópiás eljárás kifejlesztését eredményezte, amelyek megfeleltek ezeknek a kritériumoknak, forradalmasítva a magreceptorok működéséről kialakult elképzeléseket.

A fluoreszcenciamikroszkópiás vizsgálatok alapja, hogy a tanulmányozni kívánt fehérjéhez megfelelő tartományban gerjeszthető és detektálható fluoreszcens fehérjét – zöld fluorescens proteint (GFP) vagy annak különböző színű változatait – csatolnak. Az így keletkező kiméra szerencsés esetben megőrzi a magreceptor eredeti tulajdonságait, azaz ligandumfüggő transzaktivációs, dimerizációs és koregulátorkötési képességét.

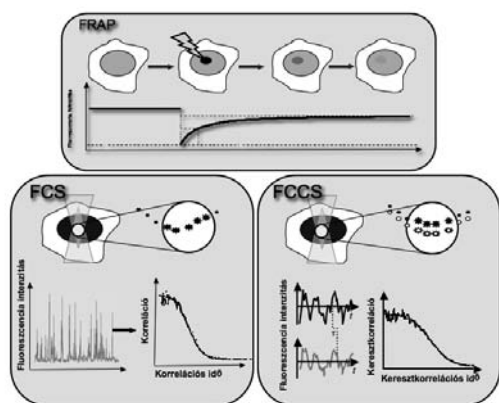
A fúziós fehérjék transzfektálásával élő sejtekben, *in situ* lehet vizsgálni a magreceptorok dinamikájának térbeli és időbeli változásait. A legkézenfekvőbb lehetőség a lokalizáció vizsgálata. Lokalizáció alapján három csoportba oszthatók a magreceptorok. Az első csoportba tartoznak azok, amelyek többnyire elsősorban a magban találhatók. Ilyen az ER, az RXR vagy a RAR. A GR és az AR elsősorban a citoplazmában helyezkedik el, a progeszteronreceptor (PR) pedig hasonló arányban található meg a citoplazmában és a sejtmagban. Ligandumkezelés hatására jellegzetes, az egyes receptorokra jellemző változásokat tapasztalhatunk. Ez jelenti egyrészt a transzlokációt, azaz a ligandummentes állapotban a citoplazmában található receptorok ligandum hatására a magba történő vándorlását, valamint az eloszlás megváltozását is. Az ER diffúz magi eloszlása agonista hatására pontozottá válik, a receptorok intenzívebb és halványabb, de jól kivehető foltokba rendeződnek. A foltképződés mechanizmusa és szerepe még nem minden esetben tisztázott, azonban mivel érdekes módon a foltok nem kolokalizálódnak a transzkripciósan aktív RNS-polimeráz II enzimmel, valószínűnek tűnik, hogy a túlexpresszált magreceptorok raktárai lehetnek. Ugyanakkor ez a fajta

ligandumfüggő eloszlásváltozás PPAR esetében nem figyelhető meg [10].

FRAP. Összefüggésbe lehet-e hozni ezt a változást a transzkripció faktorok szempontjából alapvető DNS-kötéssel? A válasz megadásához olyan módszer szükséges, amivel élő sejtekben, *in situ* követhető a jelölt fehérjék mozgása, dinamikája. A kromatinhoz kötött, immobilizált transzkripció faktorok tanulmányozására alkalmasak például a fotokioltáson alapuló fluoreszcenciamikroszkópiás eljárások. A fotokioltás utáni fluoreszcencia-visszatérés (FRAP) mérése során először rövid ideig tartó, intenzív lézerbesugárzással kitégetjük a fluoreszcens molekulák egy részét a mérési térfogatban, majd detektáljuk a fluoreszcenciajel visszatérését, amit a kitégetett és a térfogatelemen kívülről érkező ép molekulák diffúzióval történő kicserélődése okoz. A mérés információt ad a jelölt molekula mobilitásáról és a molekulák mobilis hányadáról. Ezzel az eljárással sok esetben sikerült kapcsolatot találni a magreceptorok immobilizációja és a kialakuló, pontozott mintázat között (4. ábra, FRAP). A FRAP-eredmények alapján a magreceptorok egyik csoportja – amelybe a PPAR, RAR is tartozik – rendkívüli mobilitással rendelkezik, ami a ligandumkezelés hatására sem változik jelentősen. Ezzel szemben a GR, ER csoportjában ligandumkezelés után a receptorok egy szubpopulációja immobilizálódik, a fennmaradó rész pedig csökkent diffúziót mutat.

Egy átfogó, kromatinkötő fehérjékre irányuló FRAP-vizsgálat szerint a legtöbb fehérje (20 proteinből 18) magas DNS-kötési rátát mutatott, másodperces–perces nagyságrendű tartózkodási idővel. Phair elképzelése szerint ez a gyors dinamika teszi lehetővé, hogy a fehérjekomplexek nagy hatékonysággal válaszoljanak a kötőpartnereken történt legkisebb változásokra is. Így tehát a magfehérjék viselkedésére sokkal inkább a gyors alkalmazkodóképesség, mintsem a hosszú élettartamú, stabil fehérjekomplexek kialakulása jellemző [11].

Itt érdemes visszautalni arra, hogy a CHIP-vizsgálatok azt mutatják meg egy sejtpopulációra vonatkoztatva, hogy adott időpontban mekkora valószínűséggel kapcsolódik egy adott komplex a promóterhez, ellentétben a most említésre kerülő módszerekkel, amelyekkel azt mérhetjük, mennyi időt töltenek az egyes komplexek a promóteren.



4. ábra A dinamikus modell kidolgozásánál alkalmazott fontosabb biofizikai módszerek. A fotokióltás utáni fluoreszcencia-visszatérés (FRAP) mérése során először rövid ideig tartó, intenzív lézerbesugárzással kiegészítjük a fluoreszcencia molekula egy részét a mérési térfogatban, majd detektáljuk a fluoreszcenciájel visszatérését, amit a kiegészített és a térfogatelemen kívülről érkező ép molekulák diffúzióval történő kicserélődése okoz. A fluoreszcenciakorrelációs spektroszkópia (FCS) alkalmazásakor a vizsgált és gerjesztett térfogat konfokális elrendezésű, femtolitres méretű. A fluoreszkáló molekulák – esetünkben a különböző fluorofórokkal jelölt magreceptorok – diffúziójuk során beúsznak a gerjesztési–detektálási térfogatba, és ott fluoreszcencia jelet bocsátanak ki, melyet fotodiódával detektálhatunk. Amikor a molekula kiúszik a detektálási térfogattól, a fluoreszcencia jel csökken. Megfelelően alacsony molekulakonzentráció mellett csak néhány molekula tartózkodik egy időben a konfokális térfogatban, így a molekulák száma nagy statisztikus ingadozást mutat ($\Delta N \sim N^{1/2}$). Ennek megfelelően az idő függvényében mért fluoreszcenciafüggvény is jelentős relatív ingadozást fog mutatni. Az ingadozást a detektált molekulák diffúziójának sebességén túl fotofizikai folyamatok és kémiai reakciók is befolyásolhatják. A fluoreszcencia ingadozásából kiszámítható az autokorrelációs függvény, amelynek alapján meghatározható a detektálási térfogatban lévő átlagos molekulaszám és a molekulák diffúziós ideje (a detektálási térfogatban töltött átlagos időtartam), ami fordítottan arányos a diffúziós állandóval. Fluoreszcencia-keresztkorrelációs spektroszkópiás (FCCS) méréshez két molekulafajtát különböző színű festékekkel jelölünk, és ezek fluoreszcenciáját két csatornában egyidejűleg detektáljuk. Amennyiben a molekulák stabilan együtt mozognak, a fluoreszcenciaingadozások párhuzamosak lesznek, és az ún. keresztkorrelációs függvény amplitúdója nullától különböző lesz. Az amplitúdóból megbecsülhető a komplex koncentrációja, a diffúziós időből pedig diffúziós állandója.

A magreceptorok transzkripciószabályozásáról kialakuló képet nagyban alakították az ún. tandem array rendszereken végzett kísérletek, ahol a több, mesterségesen egymás mellé rendezett válaszadó elem jól látható lókuszként figyelhető meg, miután kapcsolódott hozzájuk a fluorofórral jelölt fehér-

jék. A legismertebb ilyen típusú kísérletet egérsajt-vonalon végezték, ahol 800–1200 GR kötőhelyet tartalmazó egységet építettek be az egér 4-es kromoszómájába, majd a GFP–GR eloszlását és dinamikáját vizsgálták. A fluoreszcencia-visszatérési idő a 10 másodperces tartományba esett. A receptorok ebből származtatott látszólagos kötési idejét növeli a kötőhelyek nagy koncentrációja, tehát az egy önálló válaszadó elemre jellemző receptortartózkodási idő ennél is kisebb lehet. FRAP-vizsgálattal sikerült kimutatni a magreceptorok, valamint a velük kölcsönható koregulátorok gyors cserélődését ezeken a válaszadóelem-sorozatokon. A transzkripció faktorok és a kromatinkötő fehérjék nagyfokú mobilitása, azaz a válaszkepes promóterek ilyenfajta szondázása arra utal, hogy a transzkripció szabályozás alapját sztochasztikus folyamatok jelentik. Ezen az elképzelésen alapul a McNally-féle „hit-and-run” modell [12].

Úgy tűnik tehát, hogy a FRAP módszer alkalmas ennek az egyre dinamikusabb képet mutató rendszernek a tanulmányozására, azonban a módszer hátránya, hogy nehezen kvantifikálható. Emellett az időbeli felbontása a néhány száz milliszekundumos tartományig terjed.

FCS. A fluoreszcenciakorrelációs spektroszkópia (FCS) jelentette a megoldást erre a nehézségre. Ezzel a módszerrel akár a mikroszekundumos időskálán lejátszódó diffúziós folyamatokat is tanulmányozhatjuk. Magát a módszert már 1974-ben leírták, azonban csak a közelmúltban, az eljárás konfokális mikroszkópiával való összekapcsolásának köszönhetően vált lehetővé, hogy FCS-méréseket *in vivo* körülmények között lehessen folytatni. Ezzel a ligandumhatás és egyéb dinamikai változások olyan pontosságú detektálása vált lehetővé, amelyek a transzkripció szabályozáshoz kapcsolódó elképzeléseket véglegesen új megvilágításba helyezték. Az FCS alkalmazása során egy rendkívül kicsi, szubfemtolitres (köbmikrométernél kisebb) méretű térfogatot gerjesztünk fókuszált lézersugárral. Ez gerjeszti a gerjesztési térfogaton áthaladó, esetünkben a vizsgálandó fehérjéhez kapcsolt fluorofórt, majd az általa kibocsátott sugárzást detektáljuk (4. ábra, FCS). Mivel a detektált jel ingadozása a detektálási térfogatba be- és onnan kidiffundáló molekulák mennyiségétől és azok sebességétől függ, annak vizsgálatából a molekulapopulációk

diffúziós együtthatója meghatározhatóvá válik [13]. Ezzel a módszerrel sikerült kimutatni, hogy ligandumkezelés hatására a PPAR dinamikája jelentősen csökken. Továbbmenve azt is sikerült kimutatni, hogy mind a ligandumkötött, mind pedig a nem ligandumkötött receptor is kisebb diffúziós együtthatóval rendelkezik, mint amekkorára egy, a magban monomerként vagy dimerként szabadon diffundáló molekula esetében számítani lehetne. Erre logikus magyarázat az, hogy *in vivo* körülmények között lényegében nincs szó szabad diffúzióról, mivel a receptorok ligandum hiányában a represszor-komplexhez, ligandumkötés után pedig a még nagyobb méretű aktivátorkomplexhez kötődnek. A komplexek együtthatójából vonatkoztatott molekulatömegek azonban olyan nagynak adódtak, hogy felvetődött ismét annak a gondolata, hogy a receptorok egy populációja tranziensen kötődik a kromatinhoz, és innen adódik a mobilitás jelentős csökkenése. Újra megérkeztünk tehát a „hit-and-run” modellhez, azonban nyilvánvalónak tűnik, hogy a molekulapopuláció dinamikájának változásához a kromatinkötés és a koregulátorkötés egyaránt hozzájárul. A fluoreszcenciarezonancia-energiatranszfer (FRET) módszerével lehetséges élő sejt környezetben fehérje–fehérje együttállások kimutatása, sőt a komplex konformációjának vizsgálata is (mivel a FRET sebességi állandója a donor-akceptor távolság hatodik hatványával fordítottan arányos). Előfordulhat azonban, hogy a fluorofórok az egymással kölcsönható molekulák átellenes oldalán helyezkednek el, vagy relatív orientációjuk a FRET létrejötté szempontjából kedvezőtlen, így a FRET hatásfoka nagyon kicsi vagy nem is mérhető. Különösen hasznos lehet nagyméretű fehérje-komplexek kölcsönhatásainak vizsgálatakor egy olyan módszer, amivel indirekt kötődéseket is ki lehet mutatni [8].

FCCS. A fluoreszcencia-keresztkorrelációs spektroszkópiával (FCCS) két különböző színű festékkel megjelölt molekula fluoreszcenciafluktuációin keresztül a molekulák együttmozgását vizsgálhatjuk (4. ábra, FCCS). Azáltal, hogy ez a módszer is bekerült az *in vivo* körülmények között alkalmazható eljárások fegyvertárába, sejthető, hogy az eddig született modellek pontosításával, átfogalmazásával közelebb kerülhetünk a transzkripciós szabályozás működésének megértéséhez [10].

A molekuláris biológiával párhuzamosan a magreceptor-kutatás is megdöbbentő változásokon ment át az elmúlt bő két évtizedben. Még mindig egy viszonylag fiatal tudományterületről van szó, ahol különösen igaz az, hogy az ugrásszerű előrelépéseket, dogmaváltásokat olyan módszerek elterjedése teszi lehetővé, melyek a határtudományok felől érkeznek, és alkalmazásukkal természetesen korábban nem ismert nézőpontból vizsgálhatjuk a rendszer alapjelenségeit. Ahogy különböző „omikák” megszületéséhez nélkülözhetetlen volt, hogy az informatika eszköztára megfelelő szintre bővüljön, úgy a különböző biológiai rendszerekben felvetődő kérdések újabb és újabb kihívásokat adnak a mikroszkópia, a biofizika és az informatika fejlődésén munkálkodóknak is. Kirajzolódni látszik már a terület következő mérföldköve, amennyiben egyre több *in vivo* fluoreszcencia technológia válik elérhetővé nagy feldolgozóképeségű rendszerekben is.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA T48745 program támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- [1] Griekspoor, A., Zwart, W., Michalides, R. (2007) Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nucl. Receptor Signal.*, 5: 1–9.
- [2] Jensen, E. V. (1962) On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol. Med.*, 6: 47–59.
- [3] Evans, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240: 889–895.
- [4] Gronemeyer, H., Miturski, R. (2001) Molecular mechanisms of retinoid action. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 6: 3–52.
- [5] Kersten, S., Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405: 421–424.
- [6] Nagy, L., Schwabe, W. R. (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.*, 171: 1–8.
- [7] Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazam, M. A., Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 103: 843–852.
- [8] Hinojos, C. A. D., Mancini, M. A. (2005) Molecular dynamics and nuclear receptor function. *Trends Endocrin. Metab.*, 16: 12–18.
- [9] Metivier, R., Gannon, F. (2006) Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep.*, 7: 161–167.
- [10] Gelman, L., Wahli, W., Desvergne, B. (2006) Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. *Nuclear Receptor Signaling*, 4: 1–4.
- [11] Phair, R. D. (2004) Global nature of dynamic protein-chromatin interactions *in vivo* three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol. Cell Biol.*, 24: 6393–6402.
- [12] McNally, J. G., Hager, G. L. (2000) The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*, 287: 1262–1265.
- [13] Wachsmuth, M., Waldemar, W., Langowski, J. (2000) Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 298: 677–689.