



Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Az RXR α magreceptor ligand-indukált degradációja – egy ismert jelenség új szemszögből

Bírálatra való beküldéséhez hozzájárulok.

.....
Prof. Dr. Fésüs László

Intézetigazgató

.....
Dr. Tóké Szilvia

Intézeti TDK vezető

Pályamunka

Kiss Máté

ÁOK általános orvos

IV. évfolyam

Témavezetők: Brázda Péter, Prof. Dr. Nagy László

Debrecen

2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. ABSZTRAKT	3
2. BEVEZETÉS	4
2.1 A GÉNKIFEJEZŐDÉS SZABÁLYOZÁSA.....	4
2.2 A MAGRECEPTOROK ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI ÉS CSOPORTOSÍTÁSUK	6
2.3 RETINOID X RECEPTOR	10
2.4 AZ UBIKVITIN-PROTEASZÓMA RENDSZER	16
2.5 AZ UBIKVITIN-PROTEASZÓMA RENDSZER A TRANSZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN	20
2.6 A MAGRECEPTOROK ÉS AZ UBIKVITIN-PROTEASZÓMA RENDSZER KAPCSOLATA	20
2.7 AZ RXR LIGAND-INDUKÁLT DEGRADÁCIÓJA	23
3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA	25
4. FELHASZNÁLT ANYAGOK, ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	26
4.1 SEJTKULTÚRA ÉS KEZELÉS	26
4.2 ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÉRÉSEK	26
4.3 WESTERN BLOT TECHNIKÁVAL VÉGZETT FEHÉRJEKIMUTATÁS	27
4.4 RNS IZOLÁLÁS	28
4.5 REVERZ TRANSZKRIPCIÓ	28
4.6 KVANTITATÍV PCR (qPCR)	28
4.7 TRANSZFORMÁLÁS	29
4.8 PLAZMID IZOLÁLÁS	29
4.9 TRANZIENS TRANSZFEKCIÓ	30
4.10 STATISZTIKAI MÓDSZEREK	30
5. EREDMÉNYEK.....	31
5.1 AZ RXR ALFA LIGANDFÜGGŐ DEGRADÁCIÓJÁNAK KIMUTATÁSA WESTERN BLOTTAL ÉS ÁRAMLÁSI CITOMÉTERREL	31
5.2 A LIGANDFÜGGŐ DEGRADÁCIÓ IDŐBELI LEFOLYÁSA	35
5.3 A DEGRADÁCIÓ ÉS RECEPTOR EXPRESSZIÓ VISZONYA	37
5.4 A PROTEASZÓMA GÁTLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA	37
5.5 A LIGANDKÖTŐ DOMÉN DEGRADÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	43
6. MEGBESZÉLÉS.....	47
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	49
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	50

1. ABSZTRAKT

A magreceptorok családjába tartozó retinoid X receptor (RXR) meghatározó szereppel bír az egyedfejlődésben, differenciációban, és a szervezet homeosztázisában. A receptornak alfa, béta, és gamma izotípusa létezik, amelyek különböző szöveti expressziós mintázatot mutatnak. Endogén ligandja egy A-vitamin (retinol) származék, a 9-cisz retinsav. Az RXR egyedülálló abban a tekintetben, hogy számos magreceptorral heterodimert képez. Fontos annak megértése, hogy az RXR heterodimerek által továbbított hormonális szignál hogyan szűnik meg, azaz a ligand által aktivált receptor kikapcsolása hogyan történik. Az RXR ligandkötést követő degradációja a proteaszómákban valószínűleg része ennek a mechanizmusnak.

Mindeddig a degradáció tanulmányozásának leginkább használt módja a Western blot technikával végzett fehérjekimutatás volt, amely azonban viszonylag nehezen kvantifikálható, és a sejtek halmazainak átlagáról ad információt. Mi egy olyan módszer beállítását tűztük ki célul, amiben egyes sejtcsoportok vagy akár az egyes sejtek szintjén közelíthető meg ez a folyamat.

Áramlási citométeren vizsgáltuk a Western blot technikával nyert eredmények reprodukálhatóságát és a degradáció időbeli lefolyását. Ehhez RXR α zöld fluoreszcens fehérjével (GFP-vel) fuzionáltatott formáját expresszáló sejt vonalakat használtunk. A receptor mRNS szintjének mérésével azt is megvizsgáltuk, vajon a receptor degradációjának hatására változik-e szintézisének mértéke. Ezen kívül a beállított áramlási citometriás módszerrel megvizsgáltuk a proteaszóma gátlás hatását a receptorszintekre. Végül, AD293T sejtek tranziens transzfekciójával vizsgáltuk a ligandkötő domén degradációját.

Eredményeink azt mutatják, hogy a Western blot technikával végzett fehérjekimutatás eredményei áramlási citométerrel reprodukálhatók a degradáció tekintetében. A áramlási citometriás módszer segítségével megállapítottuk, hogy az agonista kezelést követő degradáció körülbelül az első 8 órában a legintenzívebb. A receptor aktiváció azonban 24 órán belül nem okozott lényeges változást az mRNS szintekben. A proteaszóma gátlásával – összhangban az irodalmi adatokkal – gátolható a degradációs folyamat. Szintén megfelelően a korábbi eredményeknek a receptor ligandkötő doménje önmagában is képes lebomlani.

A beállított módszer lehetőséget biztosít arra, hogy megvizsgáljuk a degradációs folyamat további részleteit, és az abban szerepet játszó tényezőket meghatározzuk.

2. BEVEZETÉS

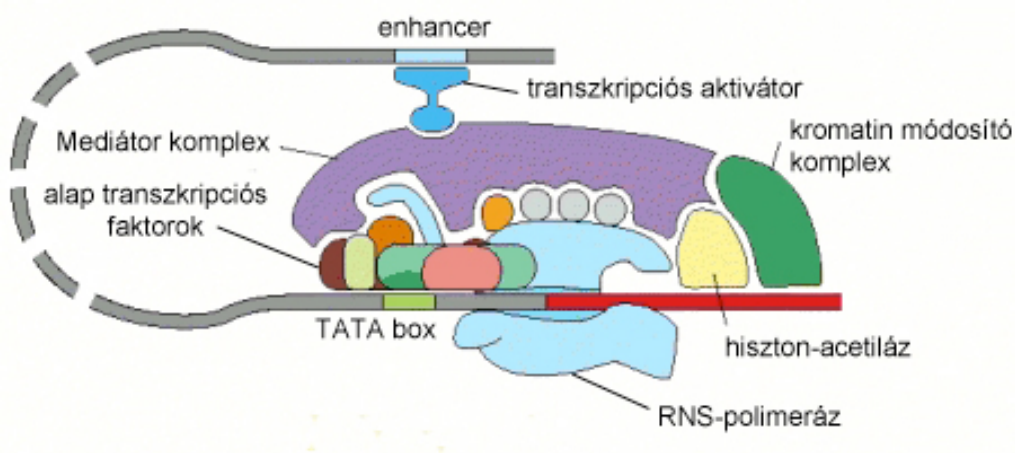
2.1 A génkifejeződés szabályozása

A legegyszerűbb egysejtű organizmusoknak is szüksége van arra, hogy környezeti hatásokhoz alkalmazkodva bizonyos génjeiket be- és kikapcsolják. A soksejtű szervezetekben ennek a képességnek olyan fejlett és nagymértékben specializált formája alakult ki, amely lehetővé teszi számtalanféle, változatos megjelenésű és funkciójú sejt létrejöttét. Ezen morfológiai és funkcionális sokféleség alapja az ugyanazon genetikai állománnyal rendelkező sejtek génjeinek különböző kifejeződése. Egy gén kifejeződése a DNS-től a funkcióképes fehérjéig vezető úton számos ponton regulálódhat. A sejt képes kontrollálni, hogy egy adott gén mikor és milyen gyakran kerül transzkripcióra, az így képződő RNS hogyan processzálódik, mely mRNS-ek kerülnek ki a magból a citoplazmába, a kikerült mRNS-ek egy részét képes szelektíven degradálni, kijelölni mely mRNS-ek kerülnek transzlációra a riboszómák által, végül képes az elkészült fehérjét szelektíven aktiválni vagy inaktiválni. A gének többsége esetében azonban a transzkripció szabályozása a legfőbb mechanizmus, amely a sejt külső és belső környezetének függvényében az adott gén kifejeződését regulálja (Alberts, 2009).

Az eukarióta gének transzkripcióját a génnel összefüggő DNS területen elhelyezkedő ún. cisz-elemek, és az ezekhez, ill. magához az érintett génszakaszhoz kötődő fehérjefaktorok, az ún. transz-faktorok szabályozzák. A cisz-elemek közül kiemelkedő jelentőségű a gén mRNS-t kódoló szakaszától 5' irányban elhelyezkedő promóter, amely az RNS-t szintetizáló RNS-polimeráz kötődését és elindulását teszi lehetővé. A legtöbb promóterben előfordul egy timin-adenin-timin-adenin (TATA) nukleotidsorrendű DNS-szakasz, az ún. TATA box. Ehhez kötődik a TATA-kötő fehérje, amelyhez további általános transzkripciós faktorok kapcsolódnak, lehetővé téve az RNS-polimeráz működését, ezáltal a transzkripció elindulását. Az RNS-polimerázt és az általános transzkripciós faktorokat együttesen alap transzkripciós apparátusnak nevezzük. További fontos cisz-elemek az ún. enhancer-ek (magyarul 'erősítő') illetve silencer-ek (magyarul 'csendesítő'), amelyek a gén kódoló szakaszától 5' és 3' irányban egyaránt elhelyezkedhetnek, akár több ezer bázispárnyira a befolyásolt géntől. Ezek a DNS-szakaszok transzkripciós faktorok kötőhelyeiből, az ún. válaszadó elemekből állnak. Attól függően, hogy a kapcsolódó transzkripciós faktor pozitív vagy negatív irányban befolyásolja a promóter működését, nevezzük a DNS szakaszt enhancer-nek vagy silencer-nek. A transzkripciós faktorok DNS-kötő doménjükön kívül aktiváló és/vagy gátló doménnel is rendelkeznek. Ezen domének révén közvetítő fehérjékhez, ún. koregulátorokhoz kötődnek.

Ezeket a fehérjéket koaktivátoroknak vagy korepresszoroknak nevezzük, attól függően, hogy a transzkripció aktivációját, vagy represszióját idézik elő.

A transzkripció szabályozásnak effektív működése érdekében egy barriert kell elbontania. Ez a barrier a kromatin. Az eukarióták magjában ugyanis a DNS hiszton fehérjékkel alkot komplexet. A kromatin szerkezeti egysége a nukleoszóma, amely megközelítőleg 146 bázispár DNS-t tartalmaz egy oktamer hiszton-komplex köré tekerve, amely a négy hisztonfehérje (H2A, H2B, H3, H4) két-két példányát tartalmazza. Az ötödik hiszton fehérje, a H1, vagy linker hiszton, amely a nukleoszóma közötti DNS-hez asszociálódva stabilizálja a szerkezetet. A koregulátorok általában egy nagyobb fehérjekomplex részei, amelyen keresztül a transzkripció faktor elősegítheti vagy gátolhatja az alap transzkripció apparátus összeszerelődését, valamint a fehérjekomplex enzimkomponensei hiszton-acetiláz, deacetiláz, metiláz, demetiláz, kináz, vagy ATP-függő kromatin-átrendező aktivitás révén elősegíthetik a kromatinszerkezet átalakulását, ezáltal fokozva vagy csökkentve a transzkripció mértékét. A transzkripció faktorok és az alap transzkripció apparátus között gyakran funkcionál hídként a Mediátor nevű fehérjekomplex (1. ábra). A génkifejeződés szabályozásában résztvevő fehérjéket kódolja az ismert humán gének körülbelül 5-10%-a, amely jól illusztrálja, milyen hatalmas és összetett rendszer képes létrehozni a különböző sejtípusokban megfigyelhető különböző génkifejeződési mintázatokat (Alberts, 2002; Szabó, 2009; Alberts, 2009).

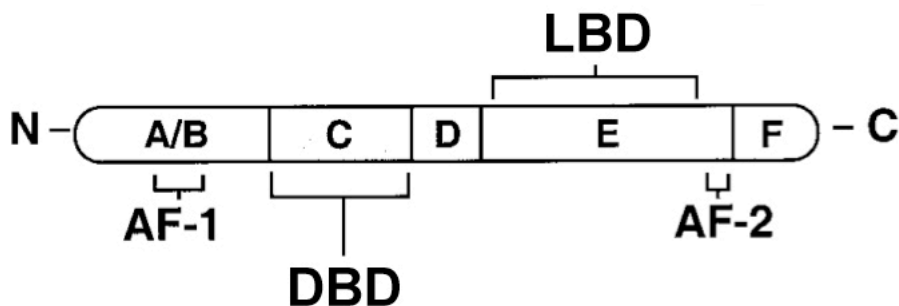


1. ábra. A génexpresszió szabályozása a transzkripció szintjén. (Alberts, 2002 nyomán)

2.2 A magreceptorok általános jellemzői és csoportosításuk

A sejt- és magmembránon átdiffundáló kisméretű hidrofób molekulák, mint az A és D vitamin, vagy a szteroid és thyroid hormonok fontos szerepet töltenek be a növekedésben és sejt differenciációban, a szaporodásban, a metabolizmusban, és a morfogenezisben egyaránt. Ezen molekulák hatásukat ligand-indukált transzkripciós faktorokon, magreceptorokon keresztül fejtik ki, amelyek a szignál molekulát megkötve aktiválódnak, és a DNS-hez kötődve meghatározott gének transzkripcióját szabályozzák. A membránkötött receptorokkal ellentétben tehát a magreceptorok intracelluláris elhelyezkedésűek, és a különböző, extracelluláris lipid-mediált szignálokat közvetlenül fordítják át transzkripciós válaszokra. A magreceptorok-mediálta transzkripciós reguláció koaktivátorok és korepresszorok kötésén keresztül valósul meg, amelyek kromatinmódosító komplexeken keresztül a célgén transzkripcióját elősegítik vagy gátolják. Az azonos működési mechanizmust követve a különböző magreceptorok hasonló, moduláris szerkezetet mutatnak: a legtöbb magreceptor 6 evolúciósan konzervált önálló funkcionális egységből, ún. doménből áll, amelyeket A-F-ig betűkkel jelölünk (2. ábra). Az N-terminális A/B régió mutatja mind méretében, mind szekvenciájában a legnagyobb változatosságot a magreceptorok között. Gyakran található itt egy ligandfüggetlen transzkripciós aktiválásért felelős domén (activation function 1 – AF-1). Az A/B régió más faktorokkal való kölcsönhatások révén promóter- és sejt típus specifikus aktivitást mutat. Ez a régió több foszforilációs helyet is tartalmaz, amelyeken keresztül kinázok (pl. MAPK, CDK) révén több szignálút vonal is képes a magreceptor transzkripciós aktivitását módosítani. Az erősen konzervált C régió alkotja a DNS-kötő domént (DNA-binding domain - DBD), amely lehetővé teszi specifikus DNS szekvenciák felismerését. A régióban található két cisztein-gazdag cink-ujj motívum, amely nélkülözhetetlen a DNS-sel történő szoros kölcsönhatáshoz. Az első cink-ujj erősen konzervált régiója az ún. P-box, amely a DNS-kötés szekvenciaspecifitását határozza meg. Egy másik konzervált régió a második cink-ujj területén található a D-box, amely a felismert szekvenciák közötti "spacer" méretét határozza meg (lásd alább). Az E régió a ligandkötő domént (ligand-binding domain - LBD) foglalja magában. Az LBD nem csupán a ligandkötésért felelős: itt találjuk a dimerizációs felszínt, a ligandfüggő transzkripciós aktivitásért felelős domént (activation function 2 – AF-2), ezen kívül felszínt biztosít koaktivátor és korepresszor molekulák kötődéséhez. Az LBD-t 12 konzervált alfa-helikális régió építi fel (H1-H12), amelyek egy háromrétegű "szendvics" struktúrába rendeződnek, alsó felén a hidrofób ligandkötő zsebbel. A ligandkötő zseb mérete meghatározza az adott receptor ligandkötő tulajdonságait és

szelektivitását. Egyes receptorokban (pl. PPAR-ok – peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorok) a ligandkötő zseb viszonylag nagy, ezáltal a ligand csak egy kis részét tölti ki. Ez egyrészt lehetővé teszi nagyszámú, különböző ligand kötését, másrészt a kialakuló kis affinitású kölcsönhatás a ligand és a receptor között a ligand-kötött és ligandot nem kötött állapot között gyors átmenetet biztosít. Ezzel szemben bizonyos receptorok (pl. RXR – retinoid X receptor, szteroid hormon receptorok) kisméretű ligandkötő zsebbel rendelkeznek, ami nagy specifitású és affinitású ligandkötést tesz lehetővé. A ligand bekötődését konformációs változás kíséri, egy kompaktabb proteinstruktúra kialakulását eredményezve. A D régió vagy "hinge" mozgékony kapocsként szolgál a DBD és LBD között, emellett a nukleáris lokalizációs szignál is itt találjuk. Egyes receptorok rendelkeznek egy F régióval is, amelynek valószínűleg az AF-1, és AF-2 domének aktivitását moduláló hatása lehet.



2. ábra. A magreceptorok doménszerkezete: az N-terminális A/B régióban találjuk az AF-1 (ligandfüggetlen transzkripció aktivitásért felelős) domént, a C régió a DNS-kötő domént (DBD), az E régió a ligandkötő domént (LBD) ill. az AF-2 (ligandfüggő transzkripció aktivitásért felelős) domén foglalja magában. A D régió az ún. hinge, vagy kapocs a DBD és LBD között. A C-terminális F régió pontos funkciója nem ismert. (Aranda et al., 2001 nyomán)

A magreceptorok által felismert DNS szekvenciát hormon válaszadó elemnek (hormon response element - HRE) nevezzük. A HRE leggyakrabban a célgéntől 5' irányban elhelyezkedő szabályozó szekvenciákban található, gyakran közel a promóterhez, azonban néhány esetben a transzkripció starthelytől több száz bázispárra lévő enhancer régióban található.

A monomer receptor specifikus DNS-kötéséhez egy 6 nukleotidból álló szekvencia felismerése szükséges (leggyakrabban: AGGTCA). Azonban a magreceptorok többsége homo- vagy heterodimert alkotva kötődik a DNS-hez, így ebben az esetben a HRE két hexamer motívumból áll, amelyek elhelyezkedése lehet direkt ismétlődés, palindrom, vagy fordított palindrom, egyes esetekben pedig a hexamer motívum nem ismétlődik. A szteroid hormonokat megkötő magreceptorok homodimereket alkotva 6 bázispárból álló palindrom szekvenciákhoz kötődnek, amelyeket 3 nukleotid választ el. Ezzel szemben a nem-szteroid molekulákat kötő magreceptorok különböző konfigurációjú válaszadó elemekhez kötődnek. Ebben az esetben a hexamer motívumok elhelyezkedése és a közöttük lévő nukleotidok száma határozza meg a HRE specificitását és szelektivitását (Mangelsdorf és Evans, 1995; Aranda és Pascual, 2001; Ádám, 2006).

A magreceptorok nagy hányada, számos egyéb transzkripciós faktorrall ellentétben képes kromatinba “ágyazott” válaszadó eleméhez kötődni. A specifikus szekvenciák felismerése a célgénben esszenciális a magreceptor működése szempontjából, azonban a receptor kapcsolata az RNS polimeráz II komplexszel és a gént körülvevő kromatin környezettel legalább ugyanekkora jelentőségű. A magreceptor működésének ezen aspektusát segíti elő a koregulátorokkal (koaktivátorokkal és korepresszorokkal) történő kölcsönhatás. Az első magreceptor koaktivátor, a szteroid receptor coactivator-1, azaz SRC-1 (Onate et al., 1995) és korepresszorok, a nuclear receptor co-repressor 1, azaz N-CoR és a silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors, azaz SMRT klónozása (Horlein et al., 1995; Chen és Evans, 1995) óta több mint 300 koregulátor leírására került sor, jóllehet ezeket nem kizárólag a magreceptorok “használják”. A szerkezeti konzerváltság ellenére a magreceptor család tagjai igen nagy különbözőséget mutatnak a transzkripció szabályozásának tekintetében. Egyes receptorok indirekt módon, más DNS-kötő faktorok révén fejtik ki szabályozó szerepüket. A magreceptorok egy csoportja (ide tartozik a TR és az RAR) ligand hiányában aktív módon represszálja a célgén transzkripcióját, ligand kötés hatására pedig, hasonlóan a legtöbb magreceptorhoz, potenciális transzkripciós aktivátorrá válik. Ugyanakkor több magreceptor képes ligand-dependens módon gátolni a transzkripciót silencer szekvenciákhoz kötődvé, vagy más transzkripciós faktorok hatását gátolva (transzrepresszió). Általánosságban azonban megállapítható, hogy ligand nélküli receptorok elsősorban korepresszorokkal, ligand-kötött receptorok pedig elsősorban koaktivátorokkal létesítenek kapcsolatot. A koregulátorok három nagy csoportba sorolhatók. Az első csoportba azok a faktorok tartoznak, amelyek kovalensen módosítják a hisztonfehérjéket [(de)acetiláció, (de)metiláció, (de)foszforiláció, (de)ubikvitináció]. Az így kialakított hiszton módosítások rendszere (az ún. hiszton kód) –

függően azok kombinációjától, az érintett hiszont fehérjétől és a módosított aminosav oldalláncoktól – transzkripciós aktivációt vagy repressziót tesz lehetővé. A leggyakoribb transzkripciós aktiválással összefüggő hiszton módosítások a hiszton acetiláció, a H3S10 foszforiláció, és a H3K4, H3K36 metiláció. Transzkripciós represszióval asszociált például a H3K9, H3K27 metiláció, és a H2A ubikvitináció (Kouzarides, 2007). A koregulátorok második csoportjába ATP-függő kromatin-átrendező faktorok tartoznak, amelyek szabályozzák a promóter hozzáférhetőségét az alap transzkripciós apparátus és transzkripciós faktorok számára a hiszton fehérjék kovalens módosítása nélkül. A harmadik csoportba azokat a koregulátorokat sorolhatjuk, amelyek nem módosítják a kromatinszerkezetet, ehelyett a koregulátor komplexek összeszerelődését, promóterhez vonzását, vagy arról való leválását szabályozzák. Ez az osztályozás azonban kétségtelenül túlegyszerűsített, hiszen az utóbbi évek eredményei rámutattak, hogy a koregulátorok többkomponensű komplex formájában működnek, amely nem tekinthető statikusnak, tagjai folyamatos dinamikus átrendeződést mutatnak az aktuális feladat függvényében. Így például az SRC-3 koaktivátor egy olyan komplex tagja, amely kinázokat, ubikvitin-ligázokat, ATP-ázokat, metiltranszferázokat, acetilázokat, és egy proteaszóma aktiváló fehérjét (a magreceptorok és proteaszóma kapcsolatát lásd később) tartalmaz. A koregulátorok nagy száma mellett változatos poszttranszlációs módosításukból eredő funkcionális diverzitásuk tovább növeli annak a szabályozási hálózatnak az összetettségét, amelynek a magreceptorok is szerves részei. A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor-1 béta, azaz PGC-1 β foszforilációja a transzkripciós aktivitás növekedéséhez, míg acetilációja és metilációja annak csökkenéséhez vezet, jelezve egyúttal, hogy sok esetben a koaktivátorok és korepresszorok közötti határ sem éles (McKenna és O'Malley, 2002; Perissi és Rosenfeld, 2005; Lonard és O'Malley, 2007).

Az utóbbi évtized genomprojektjei lehetővé tették a magreceptorok számának meghatározását különböző fajokban. Így például a *Caenorhabditis elegans* genomja 270, a *Drosophila melanogaster* genomja 21, az egér genom 49, a humán genom pedig 48 magreceptor génjét tartalmazza. A magreceptorok a többsejtű állatok evolúciójának igen korai szakaszában megjelentek, nem találhatók meg a gombákban, a növényekben és az egysejtű eukariótákban sem. A különböző fajok nukleotidszekvenciáinak összehasonlítása és filogenetikai analízise alapján a magreceptorok többsége 6 alcsaládba sorolható:

1. Ebbe a nagy alcsaládba tartoznak a thyroid receptorok (TR), retinsav receptorok (RAR), peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorok (PPAR), a D-vitamin receptor (VDR), amelyek mindegyike retinoid X receptorral (RXR) képez heterodimert. Ezen kívül több árva, azaz

jelenleg ismert ligand nélküli magreceptort is ide sorolunk, így például az RAR-related orphan (ROR) receptorok, constitutive androstane receptor (CAR), Rev-erb receptorok.

2. A csoport legfontosabb tagja az RXR, amely az 1. és 4. csoportba tartozó receptorokkal képez heterodimert. Ide soroljuk még többek között a HNF4-et (hepatocyte nuclear factor 4), ill. a COUP- TF-et (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor).

3. Ebbe a csoportba tartoznak a legkorábban leírt, homodimert képző, szteroid hormonokat kötő magreceptorok: ösztrogén receptor (ER), glükokortikoid receptor (GR), progeszteron receptor (PR), androgén receptor (AR).

4. Egy kisebb csoport, amely fontosabb tagjai: Nurrl (nuclear receptor related 1 protein), Nur77, Nor1 (neuron-derived orphan receptor 1). Ezek egy része monomer formában aktív, míg egyesek (pl. Nur77) RXR-rel képezhetnek heterodimert.

5. Szintén egy kis csoport, ide tartoznak a Drosophila Fushi Tarazu Factor-1 (FTF-F1) analógjai, ill. az emlősökben található SF-1 (steroidogenic factor 1).

6. Az utolsó alcsaládba került a GCNF (germ cell nuclear factor), amely az előbbi csoportok egyikébe sem sorolható.

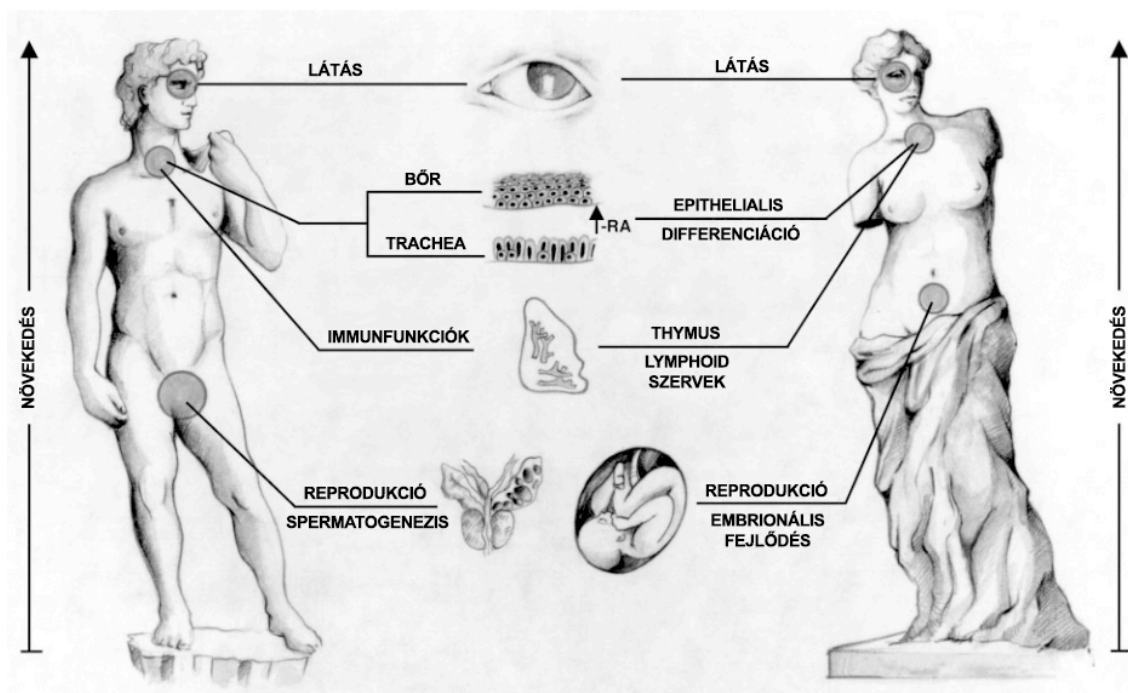
A 48 humán magreceptor között számos olyan van amelynek ligandját ismerjük, de több az ún. árva receptor, jelenleg ismert ligand nélkül. Ezen kívül léteznek olyan magreceptorok (pl. Nurrl) amelyek szerkezeti vizsgálata megmutatta, nem rendelkeznek ligandkötő zsebbel, funkciójuk tehát valószínűleg valamilyen más útvonalon szabályozott (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Szántó et al., 2004).

2.3 Retinoid X receptor

Az RXR általános jellemzői

Az A-vitamin és származékai, a retinoidok kiemelkedő szerepet játszanak a fejlődésben sejt differenciálásra, proliferációra, apoptózisra kifejtett hatásuk révén, emellett a homeosztázisban, és a metabolizmus szabályzásában is részt vesznek (2. ábra). Komplex hatásukat a magreceptorok családjába tartozó retinsav receptoron (RAR) és retinoid X receptoron (RXR) keresztül fejtik ki. Az alapvető strukturális és funkcionális különbségeken kívül az RAR és RXR különböző retinoidokat köt meg: az RAR-hez all-transz retinsav és 9-cisz retinsav egyaránt kötődik, míg az RXR csak a 9-cisz retinsav sztereoizomerrel aktiválható. Leírtak további feltételezett endogén RXR ligandokat is, ilyen a dokozahexaénsav ill. a fitánsav (de Urquiza et al., 2000; Lemotte et al., 1996). Emellett

léteznek – elsősorban szintetikus – ligandok, amelyek RXR-specifikusak, ezeket retinoidoknak nevezzük (pl. SR11237, LG100268, LGD1069).



3. ábra. Az A-vitamin biológiailag aktív származékai, a retinoidok kiemelkedő szerepet játszanak a fejlődésben sejt differenciálásra, proliferációra, apoptózisra kifejtett hatásuk révén, emellett a homeosztázisban, és a metabolizmus szabályzásában is részt vesznek. (Ross et al., 2000 nyomán)

A megfigyelés, miszerint a tisztított RAR nem kötődik hatékonyan válaszadó eleméhez, vezetett a hatékony kötődéshez szükséges “kiegészítő faktor”, az RXR leírásához. Később kiderült, hogy ez a fehérje – a magreceptorok között egyedülálló módon – nem csak az RAR-rel, hanem számos más magreceptorral heterodimert képez, ide tartozik a D-vitamin receptor (VDR), retinsav receptor (RAR), thyroid hormon receptor (TR), liver X receptor (LXR), peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (PPAR), farnezoid X receptor (FXR), konstitutív androsztán receptor (CAR), pregnán X receptor (PXR), valamint a 4. alcsalád két tagja a Nur-related protein 1 (Nurr1) és Nur77. Az összes heterodimer esetében kimutatták, hogy az RXR növeli a partner DNS-kötő képességét, és szükséges annak transzkripciót szabályozó funkciójához. A különböző RXR-t tartalmazó heterodimerek különböző válaszadó elemekhez kötődnek. Így például az RXR-PPAR heterodimer egy nukleotid (az ún. spacer) által elválasztott, az AGGTCA hexamer szekvenciát direkt ismétlődésben tartalmazó válaszadó

elemhez (direct repeat 1 - DR-1) kötődik. Ezzel analóg módon az RXR-RAR heterodimerek DR-2 és DR-5, az RXR-TR és RXR-LXR a DR-4, az RXR-VDR és RXR-PXR a DR-3 választó elemekhez (HRE) kötődnek. Bár a választó elem specificitását a két hexamer motívumot elválasztó nukleotidok száma (azaz a spacer mérete) határozza meg, a hexamer szekvenciája, a spacer szekvenciája, valamint a környező szekvenciák is befolyásolják a DNS-hez történő kötődést. (Germain et al., 2006). Az RXR heterodimerizációs partnerei ún. permisszív és nonpermisszív típusokba sorolhatók. A permisszív partnert tartalmazó RXR heterodimerek mind a partner, mind az RXR agonista ligandjával aktiválhatók, mindkét ligand jelenlétében szinergista hatás figyelhető meg. Permisszív típusúak a PPAR, LXR, FXR, és PXR receptorok. Ezzel szemben az RXR és nonpermisszív receptor (RAR, VDR, TR) alkotta heterodimer RXR agonistával nem aktiválható, kizárólag a partner agonistája révén. A nonpermisszív partner lehetővé teszi az RXR ligandkötését, viszont gátolja az aktivációját. Mindazonáltal ligandkötött, nonpermisszív partner jelenlétében az RXR agonistái képesek szinergista hatást kifejteni. Érdekes módon a permisszív partnerek a fent említett kis affinitású, nagyszámú különböző ligandot kötő, nagy ligandkötő zsebbel rendelkező receptorok közé tartoznak, míg a nonpermisszív receptorok mind nagy affinitásúak, kisméretű ligandkötő zsebbel.

Az RXR képes homodimer képzésére is (lásd alább), azonban az a kérdés, hogy rendelkezik-e saját jelátviteli útvonallal, vagy csak heterodimerizációs partnereinek aktivitását szabályozza, ma sem tisztázott teljesen. Leírták, hogy RXR homodimerek képesek *in vivo* PPAR választó elemhez (DR-1) kötődve transzkripciót aktiválni (Ijpenberg et al., 2004).

Az RXR szerkezete és ligand-indukált szerkezeti változások

Az RXR követi a magreceptorok fent leírt moduláris szerkezetét, amely magában foglalja a kapocsrégió által összekötött, konzervált DNS- és ligandkötő domént, ill. a ligandfüggetlen (AF-1) és ligandfüggő (AF-2) transzkripciós aktivációs doméneket. A ligandkötő domén funkcionális komplexitása következtében a ligand bekötődése után végbemenő konformációs változások a receptor működésének több aspektusát érintik. Ez minden ligand-aktivált magreceptorra igaz, azonban az RXR esetében, amely számos magreceptorral heterodimert képezve a transzkripciós reguláció több útvonalában is érintett, különösen nagy jelentőségű. Ezek a konformációs változások az RXR szerkezetének három fő területét érintik, ezáltal három fontos változást eredményezve a molekula viselkedésében.

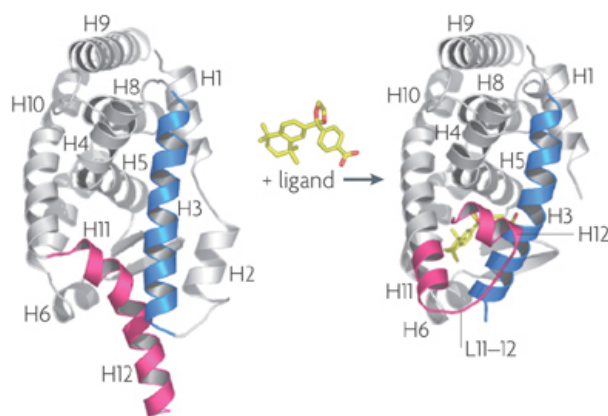
1. Az első ezek közül a receptormolekula-multimerek képződésének csökkenése. Az RXR abból a szempontból is unikális a magreceptorok között, hogy az LBD-n található

dimerizációs felszíne lehetővé teszi energetikailag kedvező szimmetrikus és asszimmetrikus interakciók létrejöttét egyaránt, azaz mind RXR/RXR homodimerek, mind RXR és 1. csoportba tartozó magreceptorok közötti heterodimerek létrejöttét. Ennek szerkezeti alapja a megfelelő nagyságú területen létrejövő intermolekuláris kapcsolat, amely képes a dimert stabilizálni. Tehát a homodimert képző szteroidreceptorok nem képesek heterodimert létrehozni, ill. az RXR-rel heterodimert képező 1. csoportú receptorok nem képesek homodimerizálódni, mivel ezekben az esetekben a dimerizációs felszínnek asszociációja nem teszi energetikailag kedvezővé a dimert. Az RXR homodimerek képződése egy új – elsősorban 11. és 12. hélixek által alkotott – felszínt hoz létre, amely a dimerek asszociációját, ezáltal RXR tetramerek létrejöttét idézi elő. Agonista ligand bekötődése (pl. 9-cisz retinsav) a 12. hélix egérfogószerű felhajlását eredményezi a ligandkötő zsebhez, így a homodimerek közötti kapcsolat megszűnik, a tetramerek disszociálnak, RXR homodimerek, vagy megfelelő partner jelenlétében RXR-t tartalmazó heterodimerek jönnek létre. Az RXR tetramerekben a 12. hélixen található AF-2 domén el van zárva a koaktivátoroktól és korepresszoroktól, ezért – bár DNS-hez képes kötődni – a tetramer transzkripciós szabályozó aktivitással nem rendelkezik. A tetramerek tehát ligand hiányában RXR molekulák funkcióképes, azonban inaktív készletét képezhetik a sejtben. Ezt a jelenséget szem előtt kell tartani RXR-t nagy mennyiségben expresszáló kísérleti rendszerekben végzett vizsgálatok során.

2. Az agonista ligandok által indukált konformációváltozás érinti az LBD dimerizációs felszínét is, így a ligand az RXR homo- és heterodimerizációs képességének megváltozását eredményezi. Míg a ligandot nem kötött (ún. apo-) RXR forma tetramer formában stabil, addig a ligand-kötött (ún. holo-) forma hetero- vagy homodimert képez. A partnerek között így kialakuló érintkezési felszín pl. az RXR/PPAR ill. RXR/RAR heterodimerekben nagyobb mint az RXR/RXR homodimerben, tehát megfelelő partnerek jelenlétében ligandkötést követően a heterodimer forma energetikailag kedvezőbb. A homodimer alacsonyabb stabilitását jól illusztrálja, hogy - ellentétben a heterodimerrel - egyetlen mutáció képzése a dimerizációs felszínen elegendő a homodimerizációs képesség elvesztéséhez (Vivat-Hannah et al., 2003). A különböző RXR heterodimerek kristályszerkezetének megismerése szerkezeti alapot nyújtott a permisszív és nonpermisszív heterodimerek működésének megértéséhez is. Permisszív heterodimerekben (pl. RXR/PPAR, RXR/FXR, RXR/LXR) egy ligand-indukált változás az RXR 7. hélixének szerkezetében lehetővé teszi az RXR dimerizációs felszíne és a partner C-terminális 12. hélixén található AF-2 domén közötti sókötés létrejöttét. Ez a sókötés egyrészt növeli a heterodimer stabilitását, másrészt elősegíti a partner 12. hélixének elmozdulását koaktivátorkötő konformációba, ezáltal nő a heterodimer transzkripciós

aktivitása. Tehát permisszív heterodimerekben a partner AF-2 doménjének pozíciója lehetővé teszi a sókötés létrejöttét, ezáltal az RXR ligandkötése a partner aktivációját idézi elő (Gampe et al., 2000; Bourguet et al., 2000). Nonpermisszív heterodimerekben (pl. RXR/RAR, RXR/VDR, RXR/TR) a partner C-terminális AF-2 doménje nincs megfelelő közelségben az RXR "ligandérzékeny" csoportjaihoz a sókötés létrejöttéhez, tehát az RXR ligandkötése nem vezet koaktivátorkötő felszín kialakulásához, és transzkripció aktiválásához.

3. A ligandkötés idézi elő a koaktivátor- ill. korepresszor-kötő konformációs állapotok közötti váltást is. A DNS-hez kötődő magreceptor egy fehérjekompleksszel asszociálódik, amely kromatinmodifikáló enzimeket, ill. a magreceptor állapotától függően koaktivátorokat vagy korepresszorokat tartalmaz. Ezek a molekulák az LBD meghatározott hélicei által alkotott felszínhez kötődnek, amely érdekes módon nagyrészt átfedést mutat a koaktivátor és korepresszor esetében. (Nagy et al., 1999) Agonista ligand hatására a 11. és 12. hélixek egérfogószerűen behajlanak, lezárva a ligandkötő zseb nyílását, egyidejűleg egy töltött felszínt létrehozva, amely nagy affinitással köti az LxxLL motívumot tartalmazó koaktivátor fehérjét. Ligand hiányában a 12. hélix pozíciója a korepresszor kötést preferálja, amely a korepresszor LxxxIxxxI/L (L=leucin, I=izoleucin, x=bármely aminosav) motívumán keresztül valósul meg. Antagonista ill. részleges agonista (azaz a ligandkötő zsebet nem teljesen kitöltő, pl. olajsav) ligand kötődése után a 12. hélix eltérő módon záródik, amely szintén korepresszor kötését eredményezi. A fent említett strukturális alapok ismeretében egyértelmű, hogy a permisszív heterodimerekben az egyik partner ligandkötése elegendő a koaktivátorkötéshez, mindkét partner ligandkötött állapota pedig szinergisztikus hatású a koaktivátor megkötésére. A nonpermisszív heterodimerek ligand hiányában korepresszor komplexet kötnek. Ebben az esetben egyedül az RXR ligandkötése nem elegendő a korepresszor komplex koaktivátorra történő cseréjéhez, ez a folyamat csak a nonpermisszív partner (pl. RAR) ligandkötésének hatására megy végbe (Mangelsdorf és Evans, 1995; Szántó et al., 2004; Ahuja et al. 2003; Bastien et al., 2004; Germain et al. 2006).



4. ábra. Az RXR magreceptor ligandkötés következtében létrejövő konformációs változása. Látható a 12. hélix egérfogószerű felhajlása, bezárva a ligandkötő zsebet.
(de Lera et al., 2007 nyomán)

Az RXR izotípusai és funkciójuk

Az RXR megnevezés tulajdonképpen egy receptoreszoportot foglal magában, amelyet három izotípus - RXR α , β , γ - alkot. A különböző gének által kódolt izotípusok két-két izoformában fordulnak elő, amelyek az RXR génekről átírt RNS-ek alternatív splicing variánsai. Az egyes RXR izotípusok különböző szöveti eloszlással jellemezhetők. Az RXR β szinte minden szövetben megtalálható, míg az RXR α elsősorban a vesében, májban, bőrben, lépben, és placentában expresszálódik. Az RXR γ expressziója az izomzatra és az agy bizonyos részeire korlátozódik (Mangelsdorf et al., 1992). Az RXR morfogenezisben ill. a felnőtt szervezet fizioiógias működésében játszott szerepére a különböző RXR izotípusok génjeinek szelektív kiütésével létrehozott knock-out állatmodellek derítették fényt. Az RXR α hiánya embrionálisan letális következményű, ennek oka myocardialis hypoplasia miatt fellépő szívelégtelenség az embrióban. Az embriókban a szív mellett a szem fejlődése is zavart szenved (Kastner et al., 1994). Ezen izotípus postnatalis funkciójának vizsgálatához az embrionális letalitás miatt kondicionális knock-out állatmodellek előállítása vált szükségessé, amelyek lehetővé tették a gén szövetspecifikus kivágását. Az RXR α hiánya a májban számos metabolikus folyamatot érint, melynek oka az RXR-rel heterodimert képző, májban expresszálódó magreceptorok (PPAR α , CAR β , PXR, LXR, FXR) funkciózavara, bizonyítva az RXR, mint heterodimerizációs partner központi szerepét a magreceptorok-mediálta transzkripciós regulációban (Wan et al., 2000). Az RXR α zsírszövet-specifikus kiütésekor zavart szenved a pre-adipocyták differenciációja, a knock-out állat rezisztens az elhízásra, ezen kívül a normálisan éhezéskor meginduló lipolízis is károsodik. A májjal analóg módon itt a PPAR γ /RXR heterodimer működése válik elégtelenné (Imai et al., 2001). Azokon az állatokon, amelyekben a keratinocyták nem expresszálják RXR α -t szőrtüsző degeneráció, következményes szőrhány és különböző bőrelváltozások figyelhetők meg, elsősorban a VDR/RXR heterodimer funkciójának kiesése következtében (Li et al., 2000). Érdekes módon az RXR α prostata-specifikus kiütése a mirigyszövetben multifokális hyperplasiához és

preneoplasticus léziókhöz vezet (Huang et al., 2002). Az RXR β hiányos állatok körülbelül 50%-a a méhen belül elpusztul, azonban a megszületett állatokon nem figyelhető meg abnormalitás, a hím állatok sterilitását kivéve, amelynek legvalószínűbb oka a Sertoli-sejtek felborult lipid metabolizmusa (Kastner et al., 1996). Az RXR γ hiányos állatok fejlődése normális, azonban a vad típusú állatokénál magasabb szérumban tiroxin és TSH szinttel rendelkeznek, az így kialakuló hyperthyreózis magasabb metabolikus rátát eredményez. Ez egybevághat a receptornak az agyalapi mirigy thyreotrop sejtekben kimutatott expressziójával (Krezel et al. 1996; Brown et al., 2000).

2.4 Az ubikvitin-proteaszóma rendszer

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer felelős legnagyobb részben az eukarióta sejtek rövid életű, regulációs fehérjéinek szelektív, energiaigényes lebontásáért. A folyamat első lépése egy erősen konzervált, 8,6 kDa molekulatömegű fehérje, az ubikvitin kovalens kötése a lebontásra ítélt fehérjéhez. Az ubikvitinált fehérjét ezt követően egy több alegységből álló proteáz komplex, a 26S proteaszóma ismeri fel, és bontja le. Az ubikvitin specifikus konjugációját a sejtben lévő több ezer célfehérje lizin oldalláncához az ubikvitin-aktiváló enzimek (E1), ubikvitin-konjugáló enzimek (E2), és ubikvitin-ligáz enzimek (E3) összehangolt működése teszi lehetővé. A humán genom 2 E1, 38 E2, és megközelítőleg 600-1000 E3 enzimet kódol, ezek különböző kombinálásával alkalmazkodik a sejt a rendkívül széles szubsztrátspektrumhoz.

Az ubikvitin-aktiváló enzim (E1) ATP hidrolízisét követően adenyl csoportot kapcsol az ubikvitinhez, majd az ilyen módon aktivált molekula az E1 enzim katalitikus cisztein oldalláncához kapcsolódik nagy energiájú tioészter kötéssel AMP felszabadulása mellett. Ezt követően az ubikvitin az ubikvitin-konjugáló enzim (E2) cisztein oldalláncára kerül át újabb tioészter kötés révén. A folyamat utolsó lépésében az ubikvitin egy ubikvitin-ligáz enzimre (E3) kerül, amely felismeri a lebontásra ítélt fehérjét, és katalizálja az ubikvitin átvitelét a fehérjére, kialakítva egy izopeptid kötést az ubikvitin C-terminális karboxil-csoportja és a szubsztrát fehérje egy lizinjének ϵ aminocsoportja között (5/A ábra). Az E3 enzimeknek két osztályát különíthetjük el. A HECT családba tartozó E3 enzimek esetében az ubikvitin az E2 enzimről az E3 HECT doménjének egy ciszteinjére helyeződik át, mielőtt a célfehérjére kerülne, kialakítva egy újabb nagy energiájú tioészter kötést. Az E3 enzimek többsége viszont egy ún. RING domént tartalmaz, amely csupán katalizálja az ubikvitin transzferét az E2-ről a

szubsztrátfehérjére, kovalens kötést az ubikvitinnel nem létesít. Egy fehérjének több különböző lizin oldallánca is ubikvitinálódhat, ezt a jelenséget multiubikvitinációnak nevezzük. Egyes E2/E3 enzimkombinációk képesek a szubsztrát-konjugált ubikvitin egy lizinjéhez újabb ubikvitineket kapcsolni, poliubikvitin láncot létrehozva. A mono-, multi-, ill. polyubikvitináció különböző útvonalakra tereli a fehérjét. A mono- és multiubikvitináció regulatorikus szerepű, nem követi degradáció a proteaszóma által. Érdekes módon bizonyos esetekben, ha a fehérjéhez kapcsolt poliubikvitin láncban adott lizin oldalláncokon (pl. K63) keresztül kapcsolódnak a monomerek, foszforilációhoz hasonló fehérjefunkció-változás tapasztalható degradáció nélkül. Tehát csak meghatározott módon kapcsolódó ubikvitin-monomerek alkotta lánc irányíthatja a fehérjét a proteaszómához. (Sadowski, 2010).

Kritikus fontosságú a sejt számára, hogy csak a megfelelő fehérjék ubikvitinációja és proteolízise történjen meg. Ez abban az esetben valósulhat meg, ha a lebontásra ítélt fehérjén az E3 enzim által felismerhető degradációs szignál keletkezik, vagy van jelen folyamatosan. A fehérjének ezt a jellemzőjét degronnak is nevezik. Ez a szignál, illetve felismerésének módja igen változatos lehet a különböző fehérjék és E3 enzimek esetében. Az egyik legkorábban megismert degron az ún. N-vég szabály, amely szerint egy fehérje N-terminális aminosav oldalláncai meghatározzák féléletidejét, azaz degradációjának valószínűségét. A jelenség alapja az E3 α 1 (UBR1) enzim kötődése bizonyos ún. destabilizáló N-terminális oldalláncokhoz (Varshavsky, 1997). Számos proteint meghatározott oldalláncainak foszforilációja ítélt lebontásra, a kinázok által kialakított különböző foszforilációs mintázatokat pedig különböző ubikvitin-ligázok ismerik fel. Több, rövid féléletidejű fehérje (pl. I κ B α , Fos) ún. PEST elemeket tartalmaz, azaz prolin, glutaminsav, szerin és treonin aminosavakban gazdag szekvenciákat (Rechsteiner és Rogers, 1996). Mivel a PEST szekvenciák Cdk és egyéb protein kinázok foszforilációs helyeit tartalmazzák számos fehérje esetében a PEST elemben bekövetkező foszforiláció a degradáció feltétele. Más, degradációhoz vezető foszforilációs helyek is ismertek, némely fehérjék bizonyos oldalláncainak foszforilációja ugyanakkor ellentétes, degradációt gátló hatású. Bizonyos esetekben magának az E3 enzimnek kell foszforilálnia ahhoz, hogy szubsztrátját megkösse (pl. az EGF receptort felismerő c-Cbl). Egyes fehérjéket nem ismer fel közvetlenül a ligáz, csak egy köztes fehérjén keresztül. Ilyen összekötőként funkcionálhatnak például egyes vírusfehérjék (pl. HPV E6 fehérje) és chaperonok. A sejtciklus szabályozásában központi szerepet betöltő ciklinek ubikvitinációját egy N-terminális rövid aminosavszekvencia, az ún. destruktív box mediálja. Érdekes módon ez a konzervált szekvencia csak az E3 által történő felismerést szolgálja, az ubikvitináció nem a szekvencián belül történik.

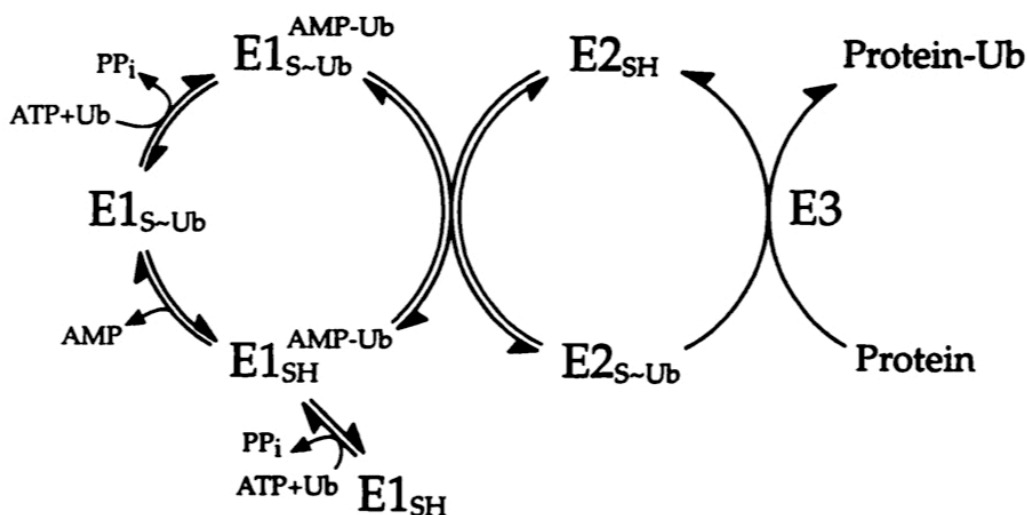
Az ubikvitin-konjugációs kaszkád egy “címkét” helyez el a fehérjén, amelyet a 26S proteaszóma ismer fel. Ez a nagyméretű proteolitikus komplex a “felcímkézett” fehérjét ATP-dependens módon lebontja, míg az ubikvitin egységek felszabadulnak, lehetővé téve újrafelhasználásukat. A 26 S proteaszóma egy, a proteolitikus aktivitást hordozó 20S komplexből (core particle) és a két végéhez csatlakozó, regulatorikus szerepű 19S komplexekből (regulatory particle) áll (5/B ábra). A 20S komplex négy darab héttagú gyűrűből felépülő hengeres struktúra. A henger alapját és tetejét az α alegységek gyűrűi képezik, amelyek a két köztes, β alegységekből felépülő gyűrűt szegélyezik. Az egyes gyűrűk hét-hét különböző α ill. β alegységből állnak. A β alegységekből álló gyűrűk belső felszínén, a 20S komplex centrumában találhatóak a proteolitikus aktív helyek, gyűrűnként 3-3 különböző, azaz minden proteaszómában 6. A központi üreg a 20S komplex hengerének két végén keresztül érhető el, azonban a bejáratot leszűkíti az α alegységek N-terminális szegmense (~ 13 Å átmérőre), amely kizárja, hogy egy összehajtogatott fehérje áthaladjon azon. Ez védőfunkcióként is szolgál a sejtfehérjék szabályozatlan proteolízise ellen. A 19S komplex 19 alegységből áll, és két nagy szerkezeti egységre, egy alap és egy fedél részre tagolható. A fedél elem felelős a poliubikvitinált fehérje felismeréséért és az ubikvitin lánc eltávolításáért (deubikvitináció). Az alap rész két, ATP-áz aktivitás nélküli, és hat AAA+ ATP-áz családba (ATPases Associated with diverse cellular Activities) tartozó alegységből (Rpt1-6) áll. Ezen alegységek változatos funkcióval bírnak, többek között chaperon aktivitást kölcsönöznek az alapnak, ill. lehetővé teszik a 20S komplex α gyűrűjéhez történő kötődést, egyidejűleg megnyitva a 20S komplex szűk bejáratát, és szabad utat engedve a proteolitikus helyekhez. A 20S komplex belsejébe kerülő, harmadlagos szerkezetüket részben vagy teljesen elvesztő fehérjék 3-23 aminosav hosszúságú peptidekre darabolódnak. A 20S komplex – ellentétben számos egyéb proteázzal a szervezetben – képes bármely két aminosav közötti peptidkötést hasítani.

Az ATP-ázok elhelyezkedése tükrözi a folyamat energiaigényes lépéseinek helyét: a 19S komplexben található ATP-ázok szabadítják fel a fehérje letekeredéséhez (unfolding), ill. a 20S komplex kapujának nyitásához szükséges kémiai energiát, maga a proteolízis tehát nem energiaigényes.

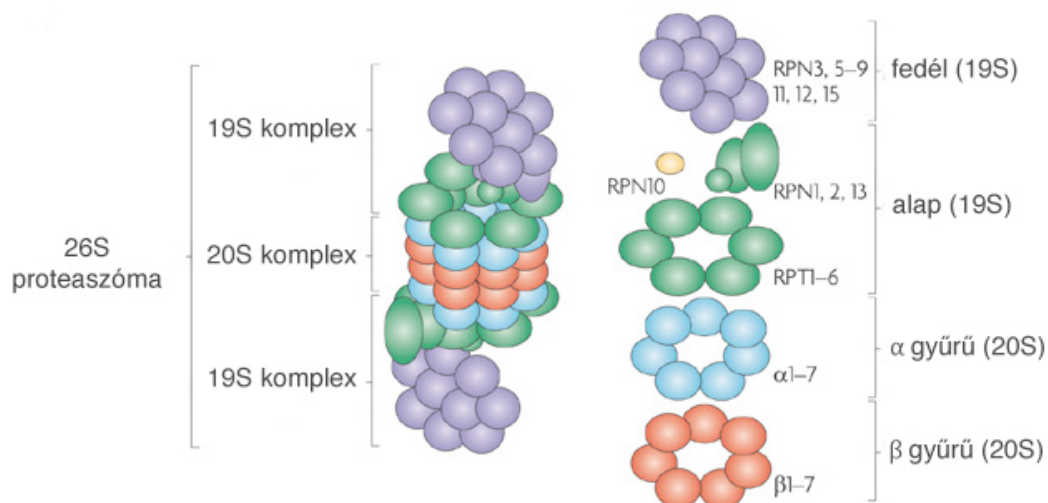
Az ubikvitin-proteaszóma rendszer által mediált fehérje lebontás kulcsfontosságú szerepet játszik számos alapvető celluláris folyamatban. Ide tartozik többek között a sejtciklus szabályozása, a sejtosztódás, differenciáció, stresszválasz, transzkripció reguláció, DNS-javítás, cirkadián ritmus és antigén prezentáció. Mutáns, denaturált és rosszul hajtogatott fehérjék lebontásával nélkülözhetetlen szerepet játszik a sejthomeosztázisban. (Haas és

Siepmann, 1997; Pickart, 1997; Hershko és Ciechanover, 1998; Glickman és Ciechanover, 2002; Pickart és Eddins, 2004; Schrader, 2009)

A



B



5. ábra. Az ubikvitináció mechanizmusa (A). A 26S proteaszóma vázlatos szerkezete és alegységösszetétele (B). (Haas et al., 1997 és Murata et al., 2009 nyomán)

2.5 Az ubikvitin-proteaszóma rendszer a transzkripció szabályozásában

Elsősorban az utóbbi évtizedben nyert teret az az elképzelés, hogy a proteaszóma proteolitikus ill. nem proteolitikus funkciója révén részt vesz a transzkripció szabályozásában. Elsősorban *S. cerevisiae* modellben nyert adatok támasztják ezt alá, noha egyre több emlős modellrendszerből származó eredmény megerősíti a proteaszóma ezen új funkcionális aspektusát.

A proteaszóma proteolitikus funkciója elsősorban transzkripciós regulátorok lebontása révén avatkozik a transzkripció térbeli és időbeli szabályozásába. Részt vesz egyes faktorok kialakításában is: az NF κ B transzkripciós faktor esetében kimutatták, hogy p50 alegységének prekursorát ubikvitin-konjugációt követően C-terminális részének részleges proteolízisével alakítja ki a proteaszóma (Palombella, 1994). Ezen kívül a 26S proteaszóma kapcsolódik az elongációs komplexekhez, majd lebontja a komplexeket a terminációs helyeken, gátlása pedig a termináció zavarát idézi elő (Gillette, 2004).

Ezen túlmenően a proteaszóma más, nem proteolitikus aktivitással összefüggő mechanizmusok útján is szerepet játszik a transzkripciós szabályzásban, jelen ismereteink szerint elsősorban a 19S komplexe révén. Így a 19S komplex elősegíti az SRC-3 koaktivátor promóterhez történő odavonzását, amit degradációja követ (Ferry, 2009). A 19S komplex az MHC II gén szabályozásában is részt vesz: a CIITA transzaktivátorhoz kötődve elősegíti a gén transzkripcióját, majd a 20S komplex késleltetett asszociációja terminálja a transzkripciót (Bhat et al., 2010). A 19S komplex több hiszton módosításban is reguláló szerepet játszik. Így pozitívan regulálja a hiszton H3-K4 és H3-R17 metilációt ill. a H3-K18 acetilációt a CBP (CREB-binding protein) által az MHC II promóterén (Koues et al. 2009). Érdekes módon egyes 19S alegységek részt vesznek az mRNS-transzportban is. Ilyen alegység a Sem1 fehérje, amely a TREX-2 (TRanscription EXport-2) komplex részeként fontos szerepet játszik mRNS-ek nukleáris exportjában (Strasser et al., 2002).

Úgy tűnik tehát, hogy a proteaszóma a transzkripciós regulátorok gyors lebontásával, a transzkripciós apparátussal kialakított kapcsolata révén, és különböző, elsősorban a 19S komplex-mediálta intermolekuláris kölcsönhatások útján szerves része a transzkripciós gépezetnek.

2.6 A magreceptorok és az ubikvitin-proteaszóma rendszer kapcsolata

A fentiek alapján érthető, hogy a magreceptorok, mint ligand-indukált transzkripciós faktorok több fronton kapcsolatba kerülnek a proteaszóma rendszerrel. A receptorszám csökkentése része egy adaptációs válasznak, amelynek célja a sejt érzékenységének csökkentése a külső stimulusokkal szemben. Egyes sejtfelszíni receptorok ligand hatására végbemenő endocytosisa lehetővé teszi, hogy a ligandok kevesebb receptort érjenek el és aktiváljanak, azonban a membránon könnyedén átdiffundáló ligandokat kötő magreceptorok ilyen módon nem inaktiválhatók. Elsőként az ösztrogén receptor esetében írták le, hogy a sejtek ösztrogénstimulusa a citoplazmatikus receptor ösztrogénköti képességének csökkenéséhez vezet (Sarff és Gorski, 1971). Csaknem két évtizeddel később derült fény arra, hogy ennek oka a receptor lebontása az ubikvitin-proteaszóma rendszer által (Nawaz et al., 1999). A 2000-es évek elejére számos magreceptor, így a PR, VDR, TR, RAR, RXR, PPAR esetében is leírták a ligand-indukált degradáció jelenségét (Lange et al., 2000; Masuyama et al. 1998; Dace et al., 2000; Zhu et al., 1999; Nomura et al., 1999; Hauser et al., 2000). A receptorok lebontása energiaigényes folyamat, így minden bizonnyal fontos szerepe lehet a transzkripció fiziológias működésében. Ezt bizonyítja több receptor esetében a megfigyelés, miszerint a proteaszóma gátlása egyúttal gátolja a receptorok által mediált transzkripciót is (Lonard et al., 2000; Dace et al., 2000; Hauser et al., 2000; Kopf et al., 2000; Shen et al. 2001; Osburn et al. 2001). Kivételt képez ez alól a glükokortikoid receptor, a mineralokortikoid receptor, és a PPAR α , amelyek transzkripciós aktivitása a proteaszóma gátlás hatására nő (Wallace et al., 2001; Yokota et al., 2004; Blanquart et al., 2002). Fontos azonban megjegyezni, hogy a proteaszómák gátlását generalizált stresszhatásnak tekinthetjük, amely számos ponton beavatkozik a sejt homeosztázisába. Az ilyen körülmények között megfigyelhető folyamatok nem feltétlen tükrözik a fiziológias állapotot. A különböző magreceptorok szekvenciájában mutációk képzésével kezdték el a degradációjához elengedhetetlen elemek, az ún. degronok keresését. A család számos tagjának vizsgálata két domén szükségességét mutatta ki. Ezek az N-terminális AF-1 és a ligandköti doménen belül található AF-2 domén, azaz a ligandfüggetlen, ill. ligandfüggő transzaktivációért felelős szerkezeti egységek. A degron és a transzaktivációs domén átfedése más transzkripciós faktorokban (pl. Myc, E2F-1) is megfigyelhető. A magreceptorok abból a szempontból különböznek, hogy mindkét domén megléte esszenciális az ubikvitinációjukhoz és következményes lebontásukhoz. A ligandköti tehát valószínűleg új felszínt hoz létre az AF-1 és AF-2 résztvételével az ubikvitin-ligázok számára. A részleges agonisták és az antagonisták azonban általában nem indukálnak degradációt, jelezve, hogy a ligandköti domén agonista-indukált, transzkripciósan aktív konformációja szükséges az ubikvitin-ligázok által történő felismeréshez (Alarid, 2006). A

degradáció szabályozásának újabb szintjét hozza létre a receptorok foszforilációja különböző aminosavoldalláncon, ill. különböző szignálútvonalakon keresztül aktiválódó kinázok által. Mind a PR, mind az RAR γ 2 AF-1 doménje foszforilálódik ligandkötést követően a MAPK kináz kaszkád útvonalán keresztül, amely feltétele a receptor proteaszómális lebontásának (Lange et al., 2000; Gianni et al., 2002). Az ER α és GR AF-1 doménjeinek foszforilációs helyei szintén szerepet játszanak a receptor stabilitásában (Calligé et al., 2005; Webster et al., 1997). A foszforiláció azonban nem feltétlenül szolgál degradációs szignálként. Valószínűleg inkább különböző kinázok relatív aktivitása határozza meg a fehérje stabilitását, ahogy azt az ER α esetében kimutatták: míg az ERK7 és a protein kináz C fokozta a proteolízist, a PI3K és a protein kináz A stabilizálta a fehérjét (Marsaud et al., 2003; Henrich et al., 2003; Tsai et al., 2004). Mutációs vizsgálatokkal célozták meg a DNS-kötő domén degradációban betöltött szerepét is, viszont az ER α és PPAR γ cink-ujj doménjében képzett pont-mutációk nem gátolták a degradációt (Lonard et al., 2000; Hauser et al., 2000). Kirajzolódni látszik tehát egy általános mechanizmus a magreceptorok ligand-indukált degradációjára, amelyet alapvetően két szignál határoz meg: a ligandkötő domén agonista ligand-indukált konformációváltozása, és a receptor foszforilációja megfelelő aminosav oldalláncain. A folyamat pontos részletei a receptorok többségénél azonban nem ismertek.

Ligand stimuláció hatására a proteaszóma komponensei kolokalizációt mutatnak a GR receptorral és koaktivátoraival (Baumann et al., 2001). Ezek az eredmények is jelzik, hogy a proteaszóma a magreceptorok mediálta transzkripciók eseményeknek is szerves része. ChIP (chromatin immunoprecipitation) és FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) kísérletek eredményei alapján úgy tűnik, hogy a magreceptorok, koregulátoraikkal együtt ciklikusan hozzákapcsolódnak, majd leválnak a promóterről, csak rövid ideig létesítve kapcsolatot a válaszadó elemmel (Metivier et al., 2003; Reid et al., 2003; Kang et al., 2002; Nagaich et al., 2004). Ebben a folyamatban szerepe lehet az ubikvitin-proteaszóma rendszernek. Ligandkötés hatására a magreceptorok, a koregulátorok, ill. az alap transzkripciók faktorok is ubikvitinálódnak és degradálódnak (Nawaz és O'Malley, 2004; Rochette-Egly, 2005). Ilyen módon a proteaszómális degradáció egy hatékony módja lehet a válaszadó elemmel történő ciklikus interakció kialakításának, amely egyúttal lehetővé teszi más koregulátorok kötődését a környezeti szignálok függvényében (Dennis és O'Malley, 2005). Ezzel egybevágó módon egyes ubikvitin konjugáló enzimek (E2) és ubikvitin-ligáz enzimek (E3) egyaránt részt vesznek a magreceptor-mediált transzkripcióban, interakcióba lépve a receptorokkal és koaktivátoraikkal, ezen kívül szintén részt vesznek a transzkripciók apparátus lebontásában. Bizonyos E3 enzimek szerves részei a koregulátor ill. polimeráz

komplexeknek, ezáltal elősegítve a transzkripciót, a proteolitikus útvonalon kívül (Conaway et al., 2002). A proteaszóma maga is betölt hasonló szerepet: az SUG-1, a 19S komplex egyik ATP-áza jelen van a transzkripciósan aktív gének közelében, kapcsolódva magreceptorokhoz, a TFIIF alap transzkripció faktorhoz és az RNS polimeráz II-höz (Sun et al., 2002; Gianni et al., 2002). Az ubikvitin-proteaszóma rendszer tehát alapvető eleme a magreceptor-mediált dinamikus transzkripció folyamatnak mind proteolitikus aktivitása, mind egyes komponenseinek szabályozó funkciója révén.

2.7 Az RXR ligand-indukált degradációja

Az RXR magreceptor ligandfüggő degradációja alapvonásaiban megegyezik a fent leírt, magreceptorok többségére jellemző mechanizmussal, azonban heterodimerizációs partnereinek változatossága mindenképp érdekessé teszi a degradáció szabályozásának tanulmányozását. Ennek ellenére viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a folyamat molekuláris részleteiről, és csaknem kizárólag az RXR α izotípusról.

Az RXR α ligand-indukált ubikvitinációját és lebomlását több sejtvonalban is kimutatták. Specifikus agonistái indukálják, antagonistái viszont gátolják a lebomlást. A 12. hélix, azaz az AF-2 domén eltávolítása gátolja a degradációt, tehát a degradációnak valószínűleg feltétele az agonista ligand bekötődését követő konformációs változás a ligandkötő doménben (Osburn et al., 2001). Ennek egyik eleme, a 12. hélix már említett egérfogószerű felhajlása (4. ábra). Adipocitákban nem történik meg az RXR β ubikvitinációja és degradációja ligandkezelés hatására, ami felveti a folyamat izotípus- vagy szövetspecifikus voltát (Lefebvre et al., 2010). Az RXR, mint heterodimerizációs partner stabilitásának jelentőségét hangsúlyozzák azok az eredmények, amelyek szerint az RXR α specifikus degradációja fokozza az adipociták válaszkészségét a PPAR γ agonista ligandjával, a Rosiglitazone-nal szemben. Ezekben a sejtekben egy hypoxia-indukált ubikvitin-hidroláz-ligáz (UCH-L1) képes izotípus-specifikus módon csökkenteni az RXR α szintjét (Lefebvre et al., 2010). A reguláció valószínűleg nem csak a zsírszövetre korlátozódik, ugyanis cardiomyocitákban is kimutatták az RXR szint csökkenését hypoxia hatására (Huss et al., 2001). Az RXR/RAR heterodimerben az RXR degradációjának feltétele saját agonista ligandjának megkötése, és heterodimerizációja partnerével. Bár az RXR/RAR heterodimer nonpermisszív, azaz a transzkripció aktivitáshoz az RAR agonistájának kötése szükséges, koexpresszált rendszerben mind RXR-, mind RAR-specifikus ligand a heterodimer mindkét tagjának lebomlását indukálta (Zhu et al., 1999). Ez a

jelenség RXR/TR és RXR/PPAR γ heterodimerekben is megfigyelhető (Osburn et al., 2001). Valószínű tehát, hogy a degradáció tekintet nélkül a heterodimer permisszív/nonpermisszív voltára, mindkét partner ligandkötése révén megtörténhet.

A foszforiláció degradációt szabályozó szerepére vonatkozóan az RXR esetében is vannak adatok. Az RXR α AF-1 doménjében három oldallánc található, amelyet MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) kinázok foszforilálnak (Adam-Stitah et al., 1999). Ezen foszforilációs helyek hiánya gátolja az RXR önálló degradációját, szükségessé téve ligandkötött partner jelenlétét (Gianni et al., 2003). Ezzel ellentétben a 260. szerinjének foszforilációja a MAPK útvonalon keresztül stabilizálja a fehérjét, ezzel egybevágóan a MAPK kináz (MKK) inhibitor fokozott RXR degradációt vált ki. Az MKK gátlása az AF-2 mutáns RXR szintjét is csökkenti, tehát ez a mechanizmus nem igényli a 12. hélix integritását. (Adachi et al., 2002; Osburn et al., 2001). Érdekes módon az RAR γ A/B régióban lévő foszforilációs helyeinek mutációja csökkenti az RXR degradációjának hatékonyságát, tehát a heterodimer stabilitását valószínűleg fokozza az RXR partnerének foszforilációja. (Kopf et al., 2000).

Az RXR α két PEST motívumot is tartalmaz (az egyik az A/B domén területén, a másik a kapocs-régióban), amely számos rövid féleletidejű fehérjében az ubikvitin-ligázok felismerési szignáljaként funkcionál. Ugyanakkor egyik PEST motívum sem bizonyult szükségesnek az ubikvitinációhoz és következményes lebontáshoz (Boudjelal et al., 2000).

A Gal4-RXR LBD fúziós fehérje a teljes fehérjéhez hasonlóan agonista-függően degradálódik, tehát az LBD önmagában elegendő a hatékony lebomláshoz. Az RXR molekula DNS-kötése így valószínűleg nem feltétele az RXR degradációjának. Ezt alátámasztja az is, hogy transzkripció aktivitásuktól megfosztott, koaktivátor-kötésre képtelen mutáns RXR fehérjék degradációja is végbemegy (Osburn et al., 2001). A korepresszor-kötés azonban, úgy tűnik, befolyásolja a folyamatot: a SMRT korepresszor asszociációja a receptorokhoz csökkenti degradációjukat (Boudjelal et al., 2002).

Egyes daganatsejtekben előfordulhat az RXR rendellenes (fokozott vagy csökkent) degradációja, rendellenes retinoid jelátvitelt eredményezve (Prüfer et al., 2002; Lattuada et al., 2007).

Összességében, a fentiek alapján láthatjuk, hogy az RXR magreceptor szerkezete, transzkripció szabályozásának mechanizmusa, hiányának fenotípusos következménye meglehetősen jól karakterizált. Azonban ismereteink proteaszómális degradációjának pontos mechanizmusáról, szabályozásáról, illetve a folyamat funkcionális jelentőségéről a transzkripció szabályozás vonatkozásában számos ponton hiányosak.

3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA

Munkánk során az RXR magreceptor (és későbbiekben egyéb magreceptorok) degradációjának tanulmányozásához kívántunk egy új módszert beállítani. A jelenség vizsgálatához a szakirodalomban szinte kizárólag a Western blottal történő fehérjekimutatást használták, a membránon megjelenő specifikus sáv intenzitásának ligandkezelést követő csökkenését megmutatva. Ennek előnye, hogy a fehérje mesterséges kifejeztetése nélkül az endogén fehérjeszintek is vizsgálhatóak, ugyanakkor alkalmazásával lizált sejtek halmazáról kapunk információt, relatíve kis érzékenységgű, nehezen kvantifikálható módon. A fehérjekimutatás számos problémájára megoldást nyújt a zöld fluoreszcens fehérjével (GFP-vel) fuzionáltatott receptor degradációjának vizsgálata áramlási citométer segítségével. A módszer előnyeként említhető, hogy gyorsan és nagy érzékenységgel vizsgálhatók tetszőlegesen választott sejtpopulációk, vagy akár egyetlen sejt. Fontos ezen kívül kiemelni, hogy élő sejtekben, valós időben zajló folyamatok tanulmányozhatóak, ellentétben a fehérjekimutatással. A módszernek kétségtől hátránya a receptorfehérje stabil vagy tranziens transzfekcióval történő túlexpresszáltatásának szükségessége, azonban fontos megjegyezni, hogy számos fehérjekimutatáson alapuló szakirodalmi adat szintén transzfektált, receptorfehérjét nagy mennyiségben kifejező sejtvonalakból származik.

Elsődleges célunk volt tehát az áramlási citométer bevezetése a jelenség vizsgálatának módszertárába. Ezen túlmenően a beállított rendszer segítségével a ligandfüggő degradáció több, részben a korábbi módszerrel már vizsgált aspektusát tanulmányoztuk.

4. FELHASZNÁLT ANYAGOK, ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

4.1 Sejtkultúra és kezelés

Kísérleteinkhez EGFP-hRXR α (Enhanced Green Fluorescent Protein – human Retinoid X Receptor α , a továbbiakban: GFP-RXR α) fúziós fehérjét stabilan expresszáló HeLa sejtvonalakat (cervicalis carcinoma eredetű), ill. tranziens transzfekció céljából AD293T (human embrionalis vese eredetű) sejtvonalat használtunk. A HeLa sejtek tenyésztése 6 lyukú sejtkultúrás pléteken történt, egy lyukba 250 000 sejt került. Tápoldatként 2ml 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 0,9% glutamin, 0,9% penicillin-streptomycin tartalmú RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médiumot használtunk lyukanként. Az AD293T sejtek tenyésztése 12 lyukú sejtkultúrás pléteken történt, egy lyukba 150 000 sejt került. Tápoldatként 1 ml 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 0,9% glutamin, 0,9% penicillin-streptomycin tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiumot használtunk lyukanként.

A sejtek kezelésekor használt ligandok/inhibitorok dimetil-szulfoxid és etanol 1:1 arányú elegyében kerültek beoldásra, majd ebben az oldószerben történt a hígítási sorok készítése is. A sejtek ligandkezelése során a ligandok/inhibitorok friss tápoldatban kerültek kihígításra, majd erre cseréltük le a korábban hozzáadott tápoldatot. A kontrollként használt sejtek a kezelt sejtekkel megegyező mennyiségű oldószert kaptak a tápoldatban, különböző ligandkezelési idők esetén a leghosszabb ligandkezelés időtartamáig.

4.2 Áramlási citometriás mérések

Az áramlási citometriás mérések során 20 000 sejt adata került összegyűjtésre FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométer használatával. A fluoreszcencia intenzitást az FL1 csatornán, 515-545 nm hullámhossztartományban detektáltuk. A sejtmérettel arányos előre irányuló fényszórás (forward scatter) detektálásakor 52-es küszöbértéket használtunk a sejttörmelék kiszűrése céljából. Az adatok analízise FCS Express 4 szoftver segítségével történt. Ennek során olyan kaput határoztunk meg, amely körülhatárolja az oldószerral kezelt kontroll sejtpopulációt, azonban a GFP-t nem tartalmazó HeLa sejtek nem esnek bele. Az ezen kapuba eső sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg a szoftver segítségével. Az időfüggés vizsgálata kivételével minden eredmény több mérés eredménye közül bemutatott reprezentatív adat.

4.3 Western blot technikával végzett fehérjekimutatás

A sejtek lízise lízis pufferrel [összetétele: 1% Triton X-100, 10 mM Tris, 5mM EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav), 50mM nátrium-klorid, 30mM nátrium-pirofoszfát, 50mM nátrium-fluorid, 1mM nátrium-ortovanadát, használat előtt kiegészítve: 5µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Pepstatin, 2µg/ml Leupeptin, és 1mM végkoncentrációjú Fenil-metil-szulfonil-fluorid] történt (150ul/250 000 sejt) billegőn 4 °C-on 30 percig. A sejteket ezt követően felkapartuk, majd az így nyert sejtízátumot 20 percig 4 °C-on, 13 200 RCF-en (relative centrifugal force) centrifugáltuk. A kapott fehérjetartalmú felülúszóval dolgoztunk tovább, amelynek fehérjekoncentrációját BCA (bicinchoninic acid) módszer segítségével határoztuk meg, 570 nm-en mért abszorbanciából számítva. A 10%-os nátrium dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid gélen gélelektroforézissel elválasztott fehérjemintákat Western blot technikával nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 mA, 1 óra). A nitrocellulóz membránra transzferált fehérjeminták ezután a nem specifikus antitest kötőhelyek lefedése céljából szobahőn 1 órára 1% BSA (Bovine Serum Albumin), 0,01% nátrium-azid tartalmú TBST [0,1% Tween 20 TBS-ben (Tris Buffered Saline)] oldatba kerültek. Az anti-RXRalfa (D20 Santa Cruz) típusú elsődleges antitesteket 1:200 hígításban 0,5% tejport tartalmazó TBST-ben hígítottuk, majd ebben az oldatban a membránokat egy éjszakán át 4 C-on billegőn inkubáltuk. 3x5 perc TBST-s mosást követően a TBST-ben 1:5000 arányban hígított HRP (Horseradish Peroxidase - torna-peroxidáz)-konjugált nyúl IgG ellenes másodlagos antitesttel 1 órán keresztül szobahőn billegőn inkubáltuk a membránokat. Újabb 3x10 perc TBST-s mosás után a HRP szubsztrát Luminolt tartalmazó oldatban (összetétele: 10% 1M Tris-HCl, 5% Luminol, 0,22% kumársav, 30% hidrogén-peroxid) 5 percig inkubáltuk a membránokat, majd röntgenfilmre rögzítettük a kemilumineszcens jelet. A normalizáló GAPDH (gliceril-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz) detektálásához ún. strippelést végeztünk a membránokon, azaz eltávolítottuk az addig megkötött elsődleges és másodlagos antitesteket (30 perc 55 °C-on “stripping” pufferben, amelynek összetétele: 100mM 2-merkapto-etanol, 2% nátrium-dodecil-szulfát, 62,5 mM Tris). Ezt követően a GAPDH fehérje detektálása a membránon 1:1000 arányban hígított anti-GAPDH (6C5 Santa Cruz) típusú elsődleges antitesttel, 1:5000 arányban hígított eger IgG ellenes másodlagos antitesttel a fent leírt protokoll szerint történt.

4.4 RNS izolálás

Az RNS izolálás során a mintákat 5 percig TRIzol reagenssel inkubáltuk, majd a mintákhoz 200µl kloformot adtunk. A hozzáadott kloformmal a mintákat alaposan összeráztuk, majd 3 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk és 15 percig 13200 RCF-en 4°C-on centrifugáltuk. A centrifugálás után a felső RNS-t tartalmazó vizes fázissal dolgoztunk tovább. Ezután a mintákhoz 1:1 arányban 2-izopropanolt adtunk majd 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, ezután 10 percig 13200 RCF-en 4°C-on centrifugáltuk. A centrifugálás után a felülúszót leöntöttük a mintákról, majd a pelletet 1ml 70%-os etanollal mostuk, ezt követően 5 percig 13200 RCF-en 4°C-on centrifugáltuk. A képződő pelletet vákuumos szárító segítségével beszáritottuk és 50µl nukleáz mentes vízben oldottuk fel. Utolsó lépésként 65°C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat, majd összerázás után jégre kerültek.

A DNS és RNS minták tisztaságának és koncentrációjának meghatározásához a NanoDrop ND-1000 spektrofotométert használtuk. Az OD260 érték alapján határoztuk meg az RNS és DNS mintáink koncentrációját, valamint a mintáink tisztaságára vonatkozó további információkat nyertünk az OD260/OD280 és az OD260/OD230 abszorbanciák aránya alapján.

4.5 Reverz transzkripció

A reakció végtérfogata 20µl, mely a következőképpen oszlott meg: 8µl 5x SSII puffer, 4µl 100mM DTT, 8µl 2,5mM dNTP, 0,3µl 3µg/µl rnd hexamer primer 0,2µl SSII Mnlv (200U/µl). Ehhez 20µl beoldott RNS-t adtunk. A reverz transzkripció után a cDNS mintákat azonos koncentrációra, 100ng/µl-re hígítottuk.

A protokoll a következő volt: 1. lépés: 10 perc 25°C, 2. lépés: 2 óra 42°C, 3. lépés 5 perc 72°C, 4. lépés 4°C ∞.

4.6 Kvantitatív PCR (qPCR)

A cDNS kvantitatív meghatározása a labor munkatársai által tervezett PCR assay segítségével történt.

A reakció térfogata a következőképpen oszlott meg 10µl végtérfogatban: 2,1µl nukleáz mentes víz, 1,2µl MgCl₂ (25mM), 1µl 10x puffer, 0,5µl 2,5mM dNTP, 0,0375µl primer- (100µM), 0,0375µl primer+ (100µM), 0,0625µl próba (20µM), 0,0625µl Taq polimeráz (5U). A mixhez 5-5µl cDNS-t adtunk.

A kísérletekhez használt primer szekvenciák:

humán RXR α

(1278+) GGCCTACTGCAAGCACAAGTA

(1341-) CAGGCGGAGCAAGAGCTTA

humán RAR α

(1206+) CCAGCACCAAGCTTCCAGTTA

(1302-) GGGAGGGCTGGGCAC

humán ciklofilin

(52+) ACGGCGAGCCCTTGG

(117-) TTTCTGCTGTCTTTGGGACCT

A qPCR eredmények három párhuzamos mérés átlagából adódnak.

4.7 Transzformálás

A tranziens transzfekció során felhasznált plazmidokat DH5 α , ultrakompetens E. coli baktériumokban sokszoroztuk fel az alábbi protokoll szerint.

Hőshock-kezelés: 20 µl sejthez adtunk 1 µg plazmidot. A sejtek és plazmidok elegyét 30 percig jégen hűtöttük. A hűtés után 90 másodperces, 42°C-os hőkezelést alkalmaztunk. Ismét jégen hűtöttük az elegyet 5 percig. A sejteket ampicillin-tartalmú táptalajra szélesztettük és éjszakán át 37°C-on inkubáltuk.

Kis-kultúra elindítása: Az éjszakán át növesztett kultúrákból különálló telepeket választottunk ki, melyeket átoltottunk LB (Luria-Bertani medium) és ampicillin tartalmú tápoldatba. Ezeket éjszakán át 25°C-on ráztuk.

4.8 Plazmid izolálás

A plazmid izoláláshoz a *WIZARD, DNA Purification System MiniPrep (PROMEGA)* kit felhasználásával végeztük, az előírt protokoll alapján:

Az éjszakán át növesztett baktérium-kultúrákat lecentrifugáltuk (5 perc, 10.000g). A felülúszó eltávolítása után a sejteket 250 µl reszuspendáló oldattal a homogén állag eléréséig

szuszpendáltuk. 250 µl lizáló oldattal lizáltuk a sejteket. 350 µl neutralizáló oldattal kezeltük a sejteket, majd a lizázumot centrifugáltuk (10 perc, 14.000g). A felülúszót újra centrifugáltuk (10 perc, 14.000g). A felülúszót gyűjtőoszlopra öntöttük át. Centrifugálás után (1 perc, 14.000g) a csapadékot eltávolítottuk. Az oszlopra 750 µl mosó oldatot öntöttünk, amit centrifugálás után (1 perc, 14.000g) megismételtünk 250 µl mosó oldattal (2 perc, 14.000g). 50 µl nukleáz-mentes víz hozzáadása után centrifugálással (1 perc, 14.000g) eluáltuk az oszlopról a termeltetett plazmidokat.

4.9 Tranziens transzfekció

A transzfekciós kísérletekhez a hatékonyabban transzfektálható AD293T sejtvonalat használtuk. Lyukanként 160 µl, 0,8 µg 10x PEI (Polyethylenimin) oldatot tartalmazó NaCl oldatot adtunk 160 µl, 3,2 µg plazmidot tartalmazó NaCl oldathoz. Ezt az elegyet 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a sejtek tápoldatát 320 µl FBS mentes DMEM-re cseréltük, majd ehhez 320 µl előzőleg elkészített elegyet adtunk. 5 óra 37 °C-on történő inkubációt követően a tápoldatot 640 µl, a sejtenyésztés részben ismertetett tápoldattal egészítettük ki.

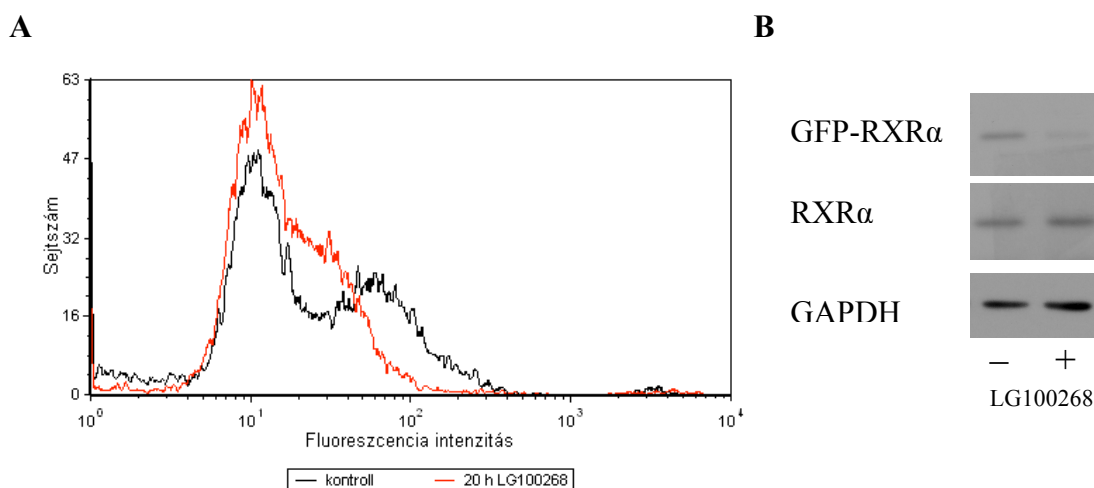
4.10 Statisztikai módszerek

A statisztikai számítások Microsoft Excel és Graphpad Prism szoftverrel történtek. A szignifikancia szint számítása során kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

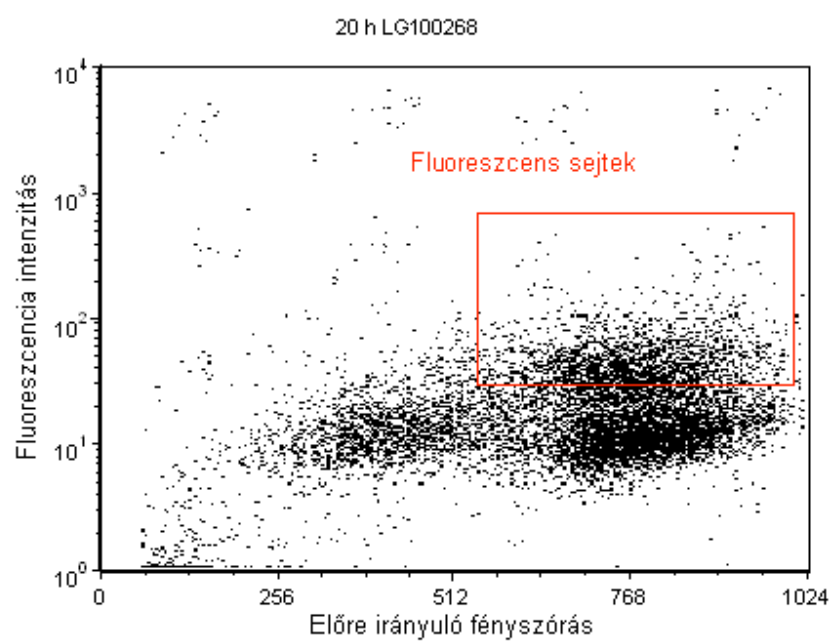
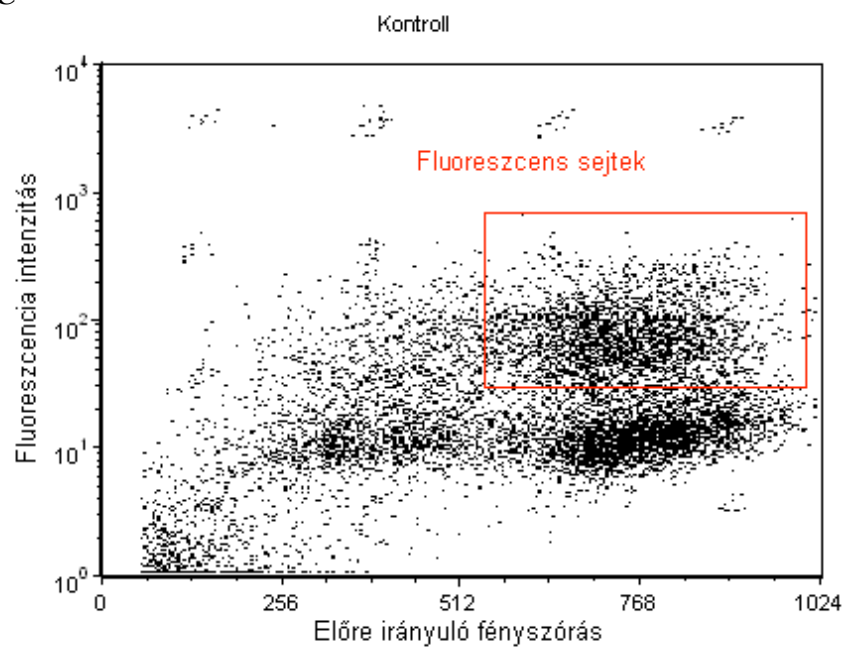
5. EREDMÉNYEK

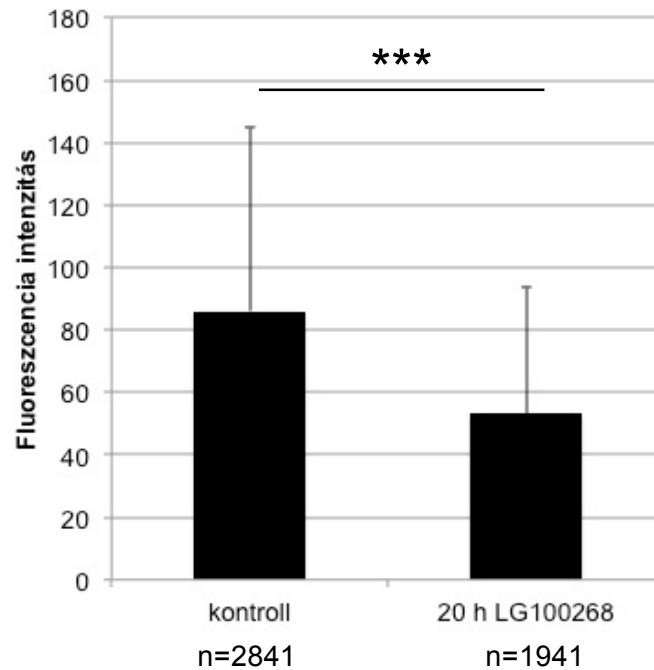
5.1 Az RXR α ligandfüggő degradációjának kimutatása Western blottal és áramlási citométerrel

Első lépésként választ kerestünk arra, hogy a receptorfehérjén található GFP befolyásolja-e a degradációt, valamint reprodukálható-e a Western-blot segítségével kimutatott ligand-indukált lebomlás áramlási citométerrel is. Ennek érdekében LG100268 agonista liganddal kezelt, GFP-RXR-t közepes ill. magas szinten expresszáló stabilan transzfektált HeLa sejtek egy részéből Western-blot segítségével mutattuk ki az RXR α fehérje szintjének változását, míg ugyanazon ligandkezelt sejtpopulációból származó sejtekben áramlási citométerrel vizsgáltuk az esetleges fluoreszcencia intenzitáscsökkenést, ami a receptorfehérje, és a hozzá fuzionált GFP lebomlását jelezheti. Mind a GFP-RXR α fúziós fehérjét közepes szinten expresszáló, mind a fúziós fehérjét magas szinten expresszáló HeLa sejtvonalban az LG100268 RXR-specifikus agonista ligandkezelés csökkenti az élő, fluoreszcens sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitását (6. és 7. ábrák). Ez jelzi, hogy a ligandkezelés hatására a fúziós fehérje jelentős része elbomlott a GFP-vel együtt, jelezve, hogy a receptorfehérjén lévő GFP a proteaszómális degradációs folyamatot nem gátolja. Látható, hogy a Western-blottal kimutatható ligand-indukált degradációs folyamat reprodukálható áramlási citométerrel is, egy jobban kvantifikálható módon.

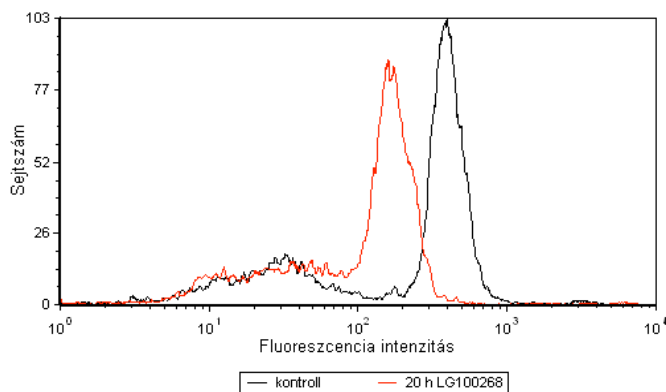
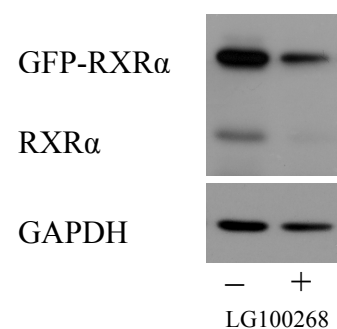


C

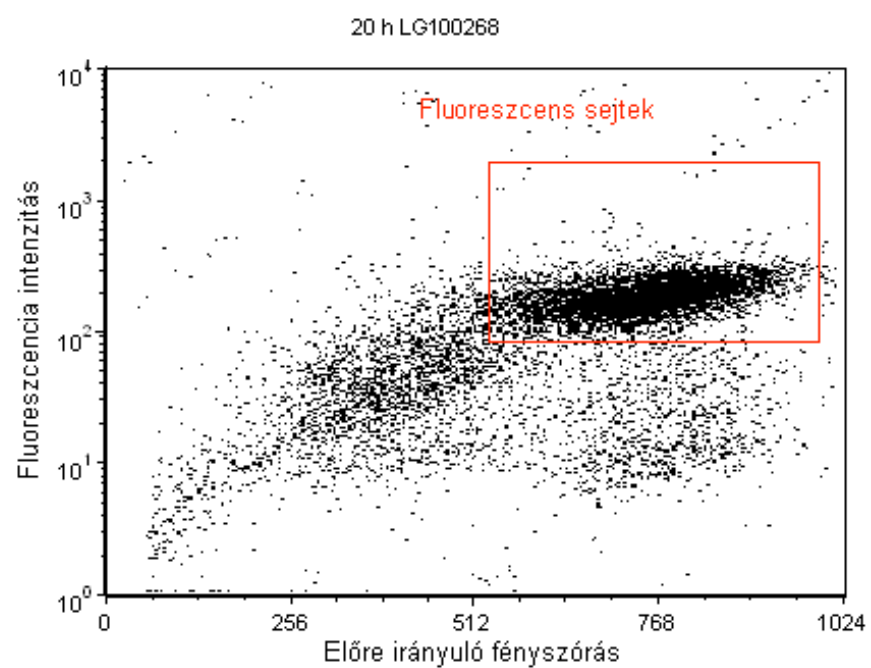
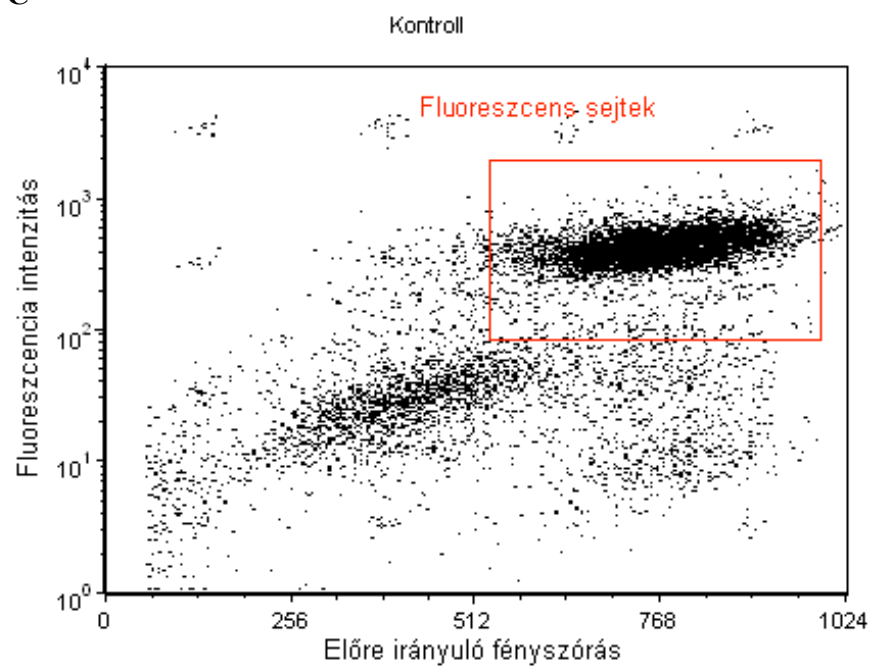


D

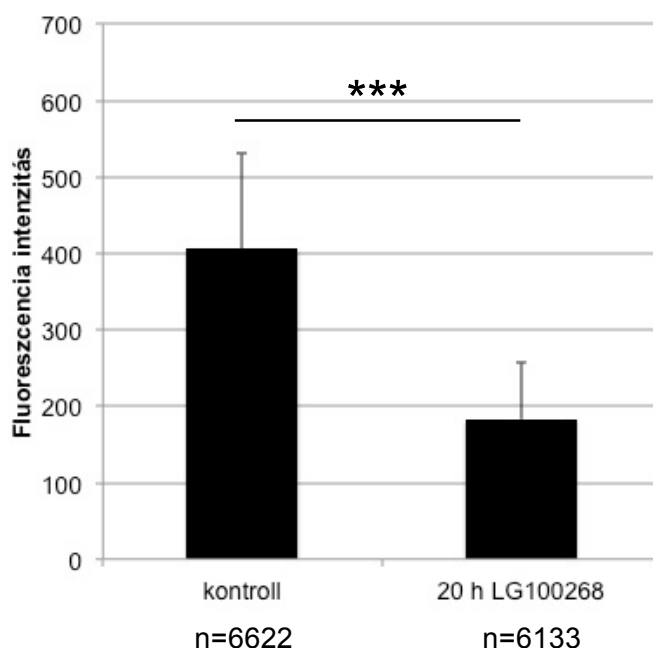
6. ábra. Az GFP-RXR α fehérjét közepes szinten expresszáló HeLa sejtekben a sejtek nagyobb része nem fluoreszcens, a fluoreszcens sejtek intenzitása közepes szintű. A fluoreszcencia intenzitás görbéjének balra tolódása jelzi a 20 h LG100268 kezelés (1 μ M) hatására végbemenő degradációt (A). 20 h LG100268 kezelés (1 μ M) következtében látható a GFP-RXR α fúziós fehérje szintjének csökkenése. Az endogén fehérjeszint változása kevésbé markáns (B). Az áramlási citométer által detektált sejtpopulációból egy kapu képzésével kiválasztottuk az elkülönülő fluoreszcens sejtpopulációt, amelynek intenzitásváltozása a dot ploton nyomon követhető (C). Ezen kapuba eső sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása a 20 h LG100268 kezelés (1 μ M) hatására szignifikánsan ($p < 0,0001$) csökkent (D).

A**B**

C



D



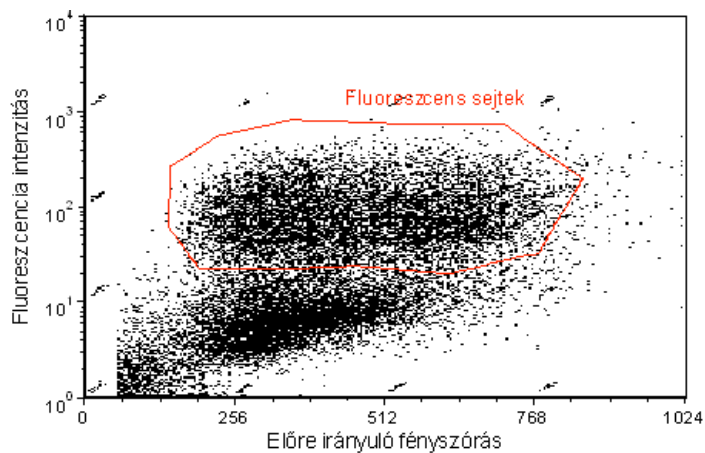
7. ábra. Az GFP-RXR α fehérjét magas szinten expresszáló HeLa sejtekben a fluoreszcencia intenzitás görbéjén látható, hogy ezek a sejtek nagyobb fluoreszcencia intenzitást mutatnak, és a sejteknek nagy része fluoreszcens. A görbe balra tolódása jelzi a 20 h LG100268 kezelés (1 μ M) hatására végbemenő degradációt (A). 20 h LG100268 kezelés (1 μ M) következtében látható a GFP-RXR α fúziós fehérje szintjének csökkenése. Az endogén fehérjeszint változása jobban megfigyelhető (B). Az áramlási citométer által detektált sejtekből egy kapu képzésével kiválasztottuk az elkülönülő fluoreszcens sejtpopulációt amelynek intenzitásváltozása a dot ploton nyomonkövethető (C). Ezen kapuba eső sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása a 20 h LG100268 kezelés (1 μ M) hatására szignifikánsan ($p < 0,0001$; $n = 6622/6133$) csökkent (D).

5.2 A ligandfüggő degradáció időbeli lefolyása

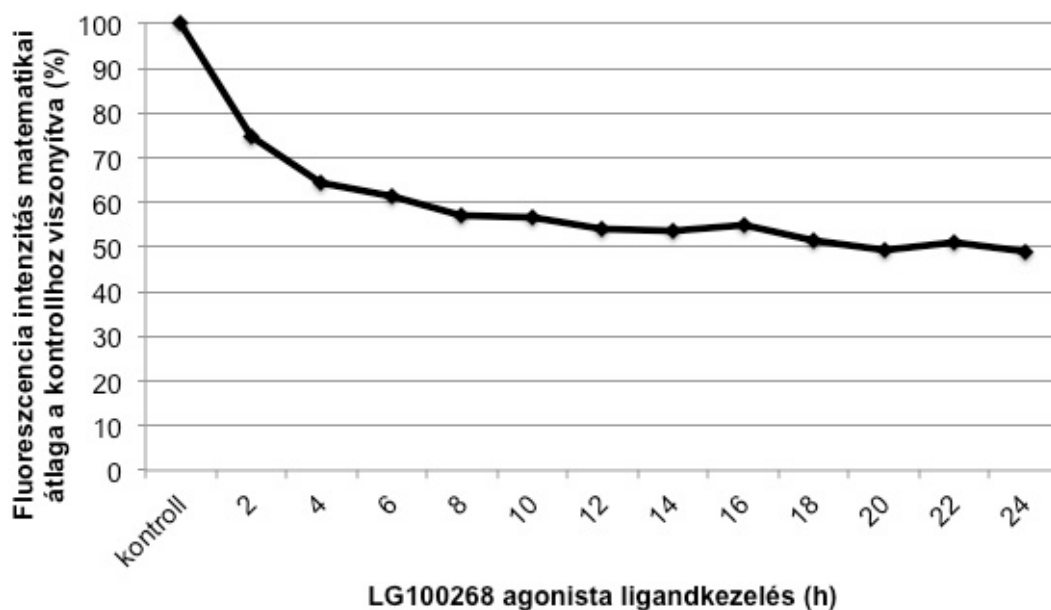
A receptorfehérje proteaszómális degradációja – legalábbis részben – védekezési mechanizmus a túlzott stimulációval szemben. Éppen ezért kíváncsiak voltunk arra, milyen hosszú ligandstimuláció szükséges a degradáció megindulásához, és hogyan változik ez a folyamat egy 24 órás intervallumban. Ezért megvizsgáltuk 24 órán keresztül, különböző ideig LG100268 liganddal kezelt sejtpopulációk átlagos fluoreszcencia intenzitását. A GFP-RXR α -t közepes szinten expresszáló HeLa sejtvonallal dolgoztunk tovább, annak érdekében, hogy a többlet fehérjével kevésbé zavarjuk meg a sejtműködést. Az adatokból, nyilvánvaló, hogy az

RXR α lebomlása nem lineáris, az első 8 órában a legintenzívebb, ezt követően az intenzitásváltozás minimális (8. ábra).

A



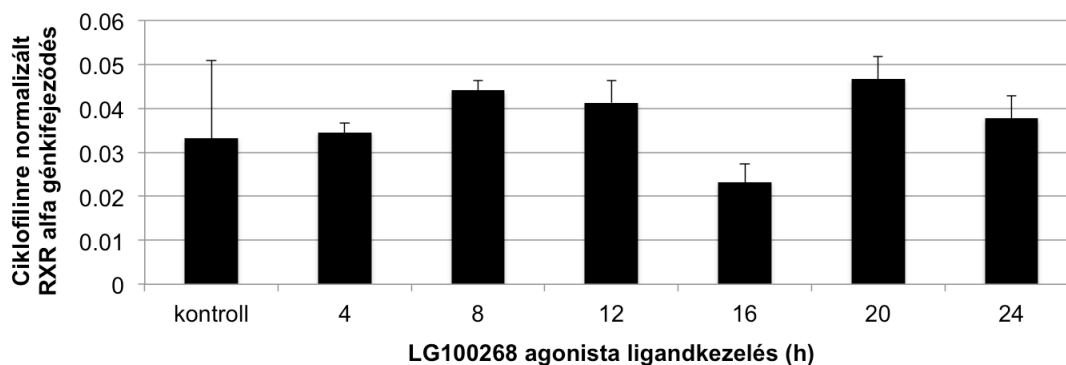
B



8. ábra. GFP-RXR α fúziós fehérjét közepes szinten expresszáló HeLa sejtekből egy kapu segítségével kiválasztottuk a fluoreszcens sejtpopulációt (A), majd az a kapuba eső sejtek fluoreszcencia intenzitásának átlagát vizsgáltuk a különböző ideig 1 μ M LG100268 liganddal kezelt sejtpopulációk esetében, viszonyítva a kontroll sejtekhez (B).

5.3 A degradáció és receptor expresszió viszonya

Felmerül a kérdés, vajon a degradáció hatására változik-e a receptor mRNA szintű expressziója, azaz a sejt válaszol-e a receptor lebomlására annak fokozott transzkripciójával? Esetleg magyarázható-e a 8 óra ligandkezelés utáni csökkent lebomlás a receptor fokozott transzkripciójával? A kérdés megválaszolására különböző ideig liganddal kezelt sejtpopulációkban vizsgáltuk meg az RXR α fehérje RNS szintű kifejeződését (9. ábra). Az eredményekből egyértelmű, hogy a fent leírt degradációs folyamat és a receptorgén kifejeződése között nincs kapcsolat. Ez várható is, hiszen csak így valósítható meg a receptorszintek időbeli és térbeli regulációja a lebontásuk révén.



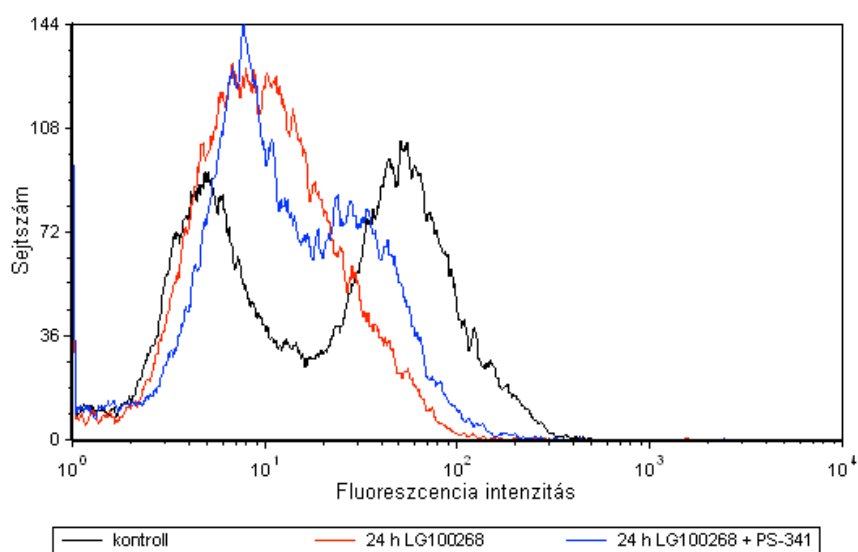
9. ábra. Az RXR α RNS szintű expressziója különböző ideig 1 μ M LG100268 liganddal kezelt sejtpopulációkban.

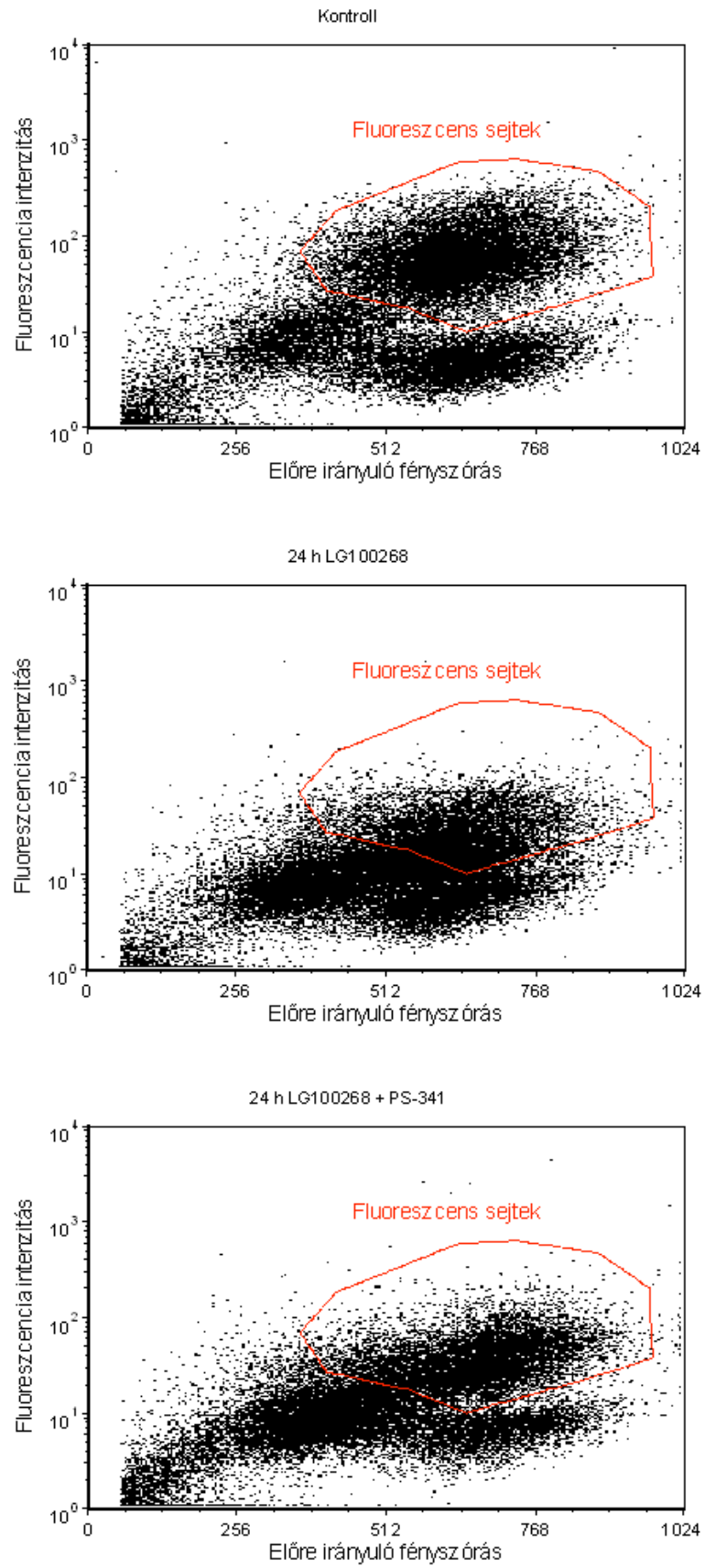
5.4 A proteaszóma gátlás hatásának vizsgálata

További célunk volt megvizsgálni a proteaszóma gátlásának hatását a beállított áramlási citometriás módszerrel. A sejteket PS-341 proteaszóma inhibitorral 1 óráig előkezeltük, majd az inhibitorral és LG100268 agonistával 24 óráig inkubáltuk a minél jobban látható hatás elérése érdekében. A stabilan transzfektált, GFP-RXR α -t közepes szinten expresszáló HeLa sejtekben a degradációs folyamat részben gátolható, azonban a kontrollal megegyező fluoreszcencia intenzitás nem állítható vissza (10. ábra). A tranziensen transzfektált AD293T sejtekben a proteaszóma inhibitor hatására a fluoreszcencia intenzitás kisebb mértékben csökken, bár itt sem éri el a kontroll sejtek szintjét (11. ábra). Annak oka, hogy a proteaszóma

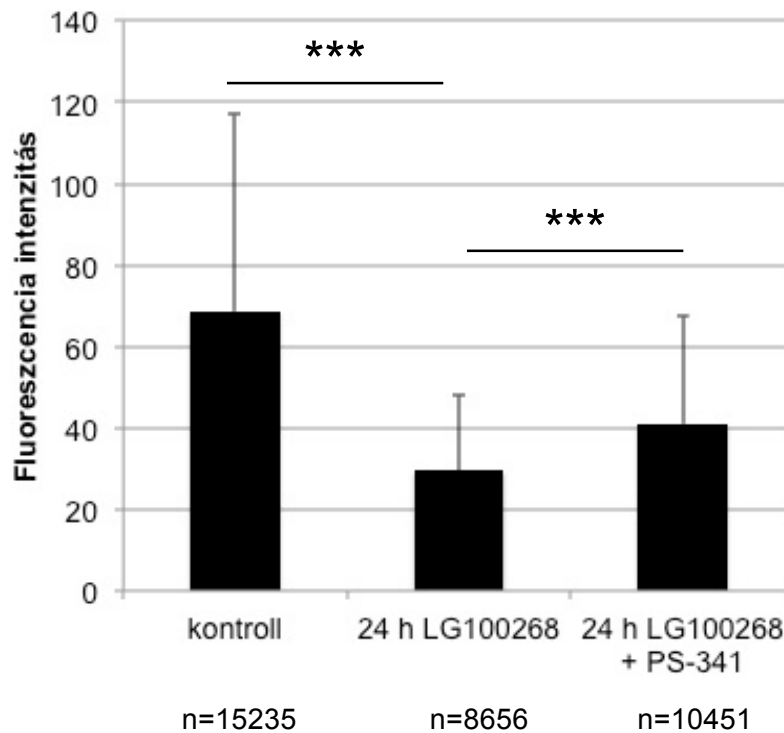
gátlásával nem tudjuk teljesen megszüntetni a fluoreszcencia intenzitás csökkenését, lehet a gátlás tökéletlensége, a proteaszóma gátlás következtében kialakuló celluláris stressz, esetleg alternatív degradációs útvonalak létezése a receptorfehérje számára. Ugyanakkor az egyértelmű, hogy a proteaszóma funkció kiesése a GFP-RXR α ligand-indukált degradációját, és ezáltal a sejtek fluoreszcencia intenzitásának esését csökkenti.

A



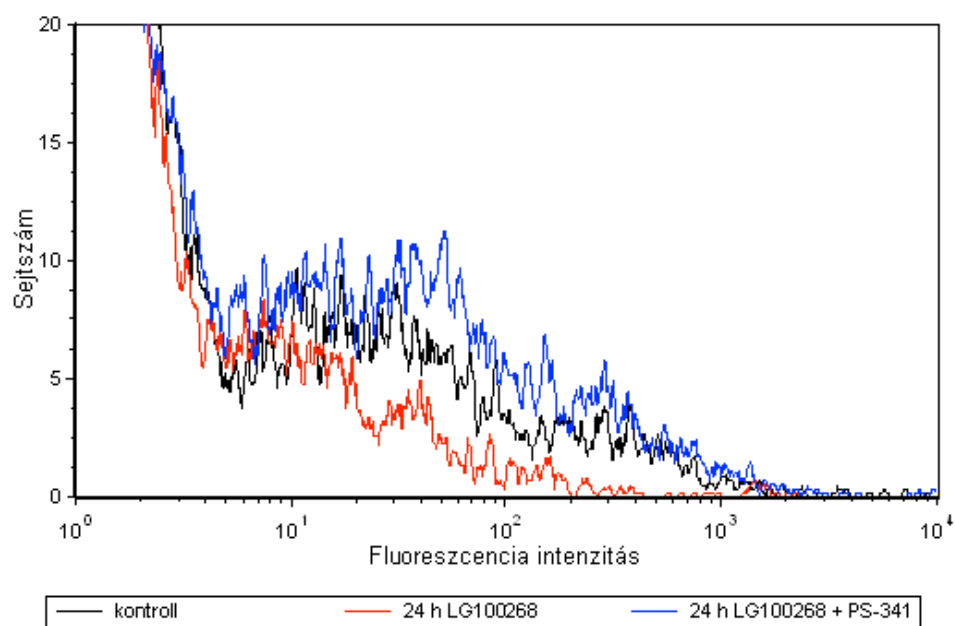
B

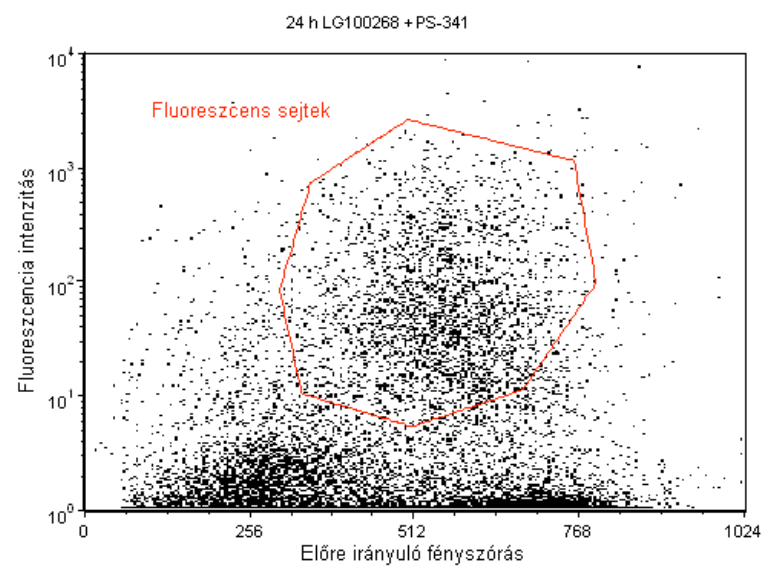
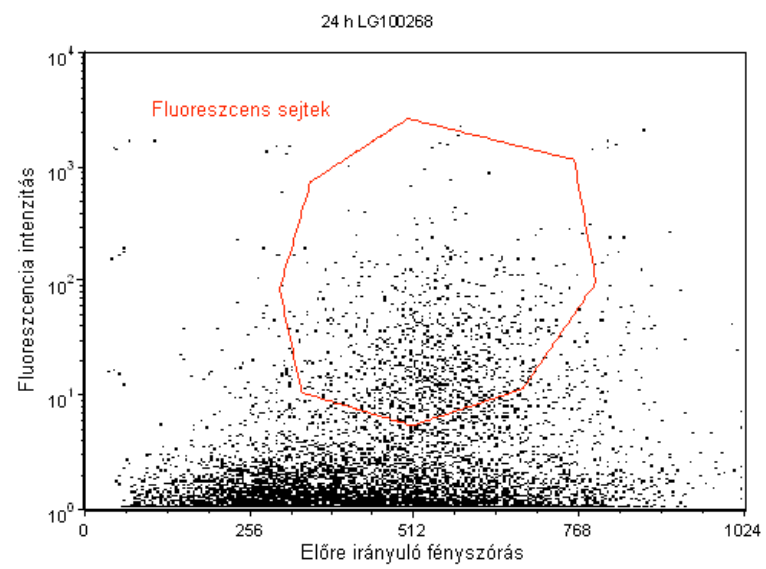
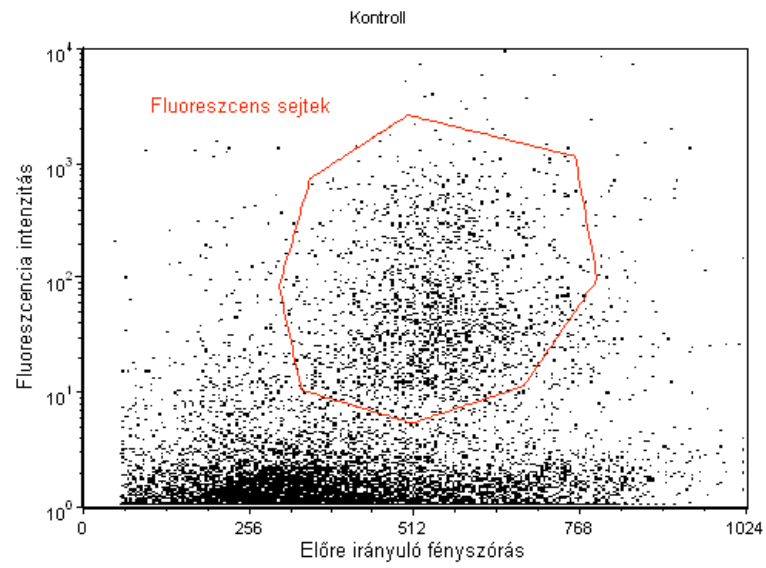
C



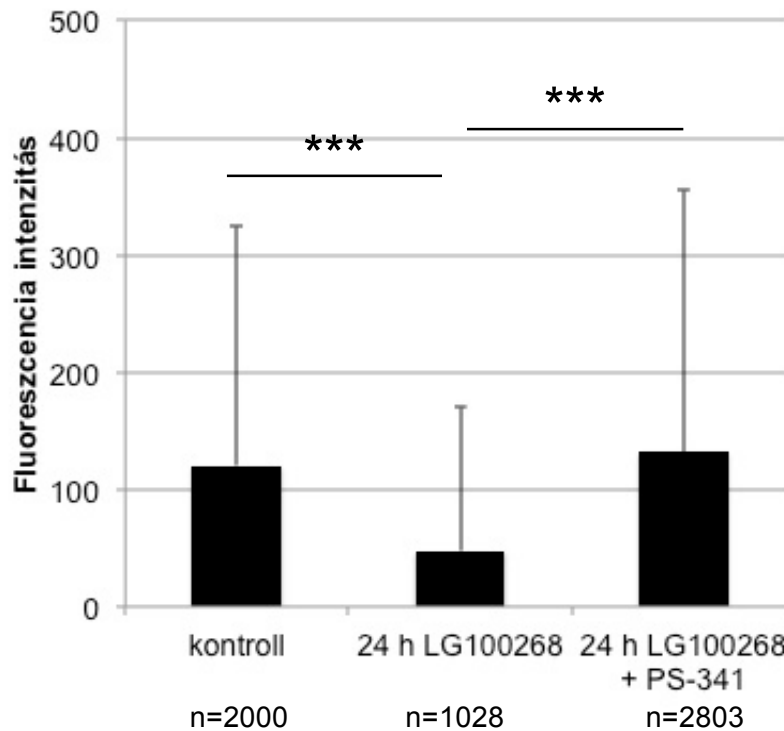
10. ábra. GFP-RXR α fehérjét közepes szinten expresszáló HeLa sejtekben az 1 μ M LG100268 ligandkezelés mellett alkalmazott 1 μ M PS-341 kezelés részben visszaállítja a ligandkezelés által eltolt görbét (A). A GFP-RXR α fúziós fehérjét közepes szinten expresszáló HeLa sejtekből egy kapu segítségével kiválasztottuk a fluoreszcens sejtpopulációt amelynek intenzitásváltozása a dot ploton nyomon követhető (B). Ezen kapuba eső sejtek átlagos intenzitása szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,0001$) 24 h LG100268 ligandkezelés (1 μ M) hatására, és a csak liganddal kezelt sejteknél szignifikánsan magasabb ($p < 0,0001$) 24 h PS-341 (1 μ M) proteaszóma inhibitor kezelés alkalmazása mellett (C).

A



B

C



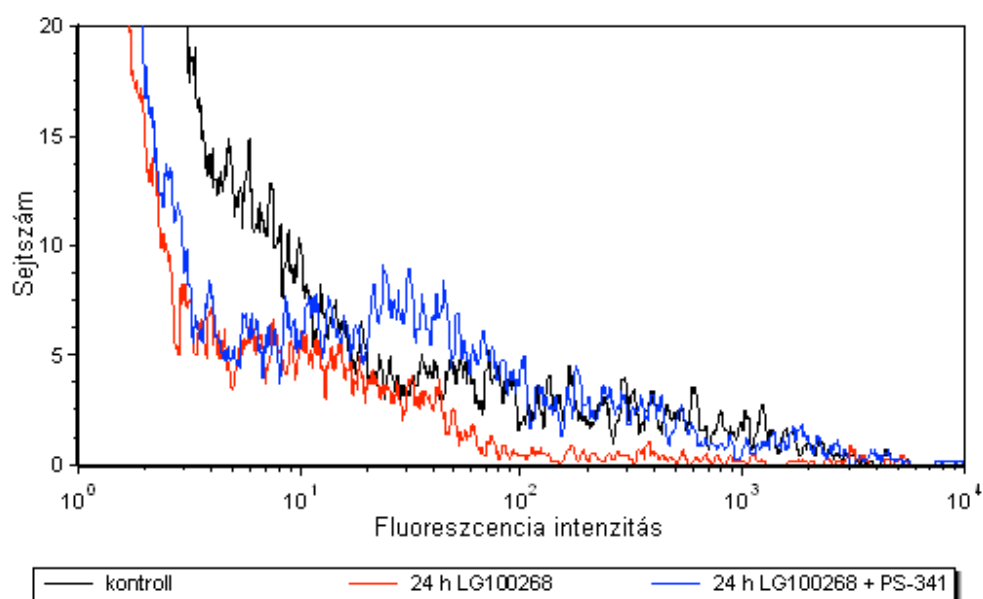
11. ábra. GFP-RXR α fehérjét expresszáló, tranziensen transzfektált AD293T sejtekben az 1 μ M LG100268 ligandkezelés mellett alkalmazott 1 μ M PS-341 kezelés részben visszaállítja a ligandkezelés által eltolt görbét (A). GFP-RXR α fehérjét expresszáló, tranziensen transzfektált AD293T sejtekből egy kapu segítségével kiválasztottuk a fluoreszcens sejtpopulációt, amelynek intenzitásváltozása a dot ploton nyomonkövethető (B). Ezen kapuba eső sejtek átlagos intenzitása szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,0001$) 24 h LG100268 ligandkezelés (1 μ M) hatására, és a csak liganddal kezelt sejteknél szignifikánsan magasabb ($p < 0,0001$) 24 h PS-341 (1 μ M) proteaszóma inhibitor kezelés alkalmazása mellett (C).

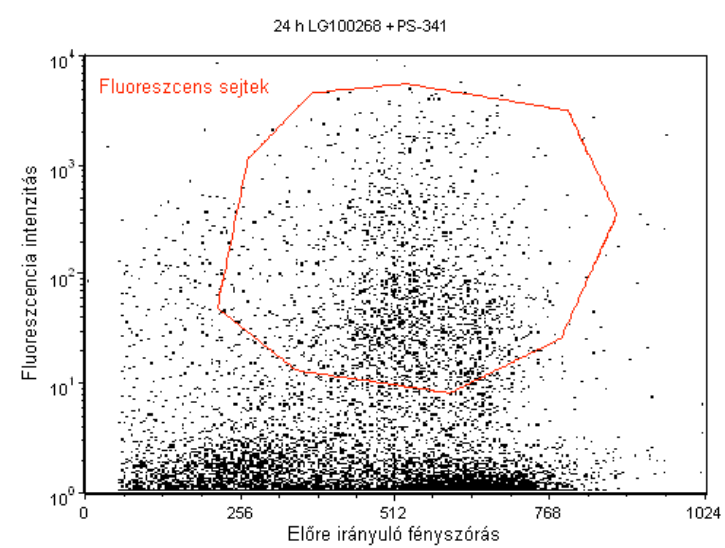
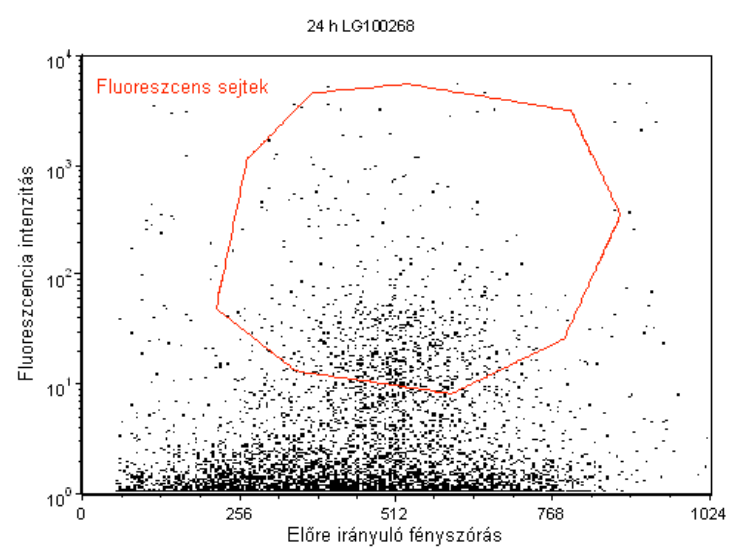
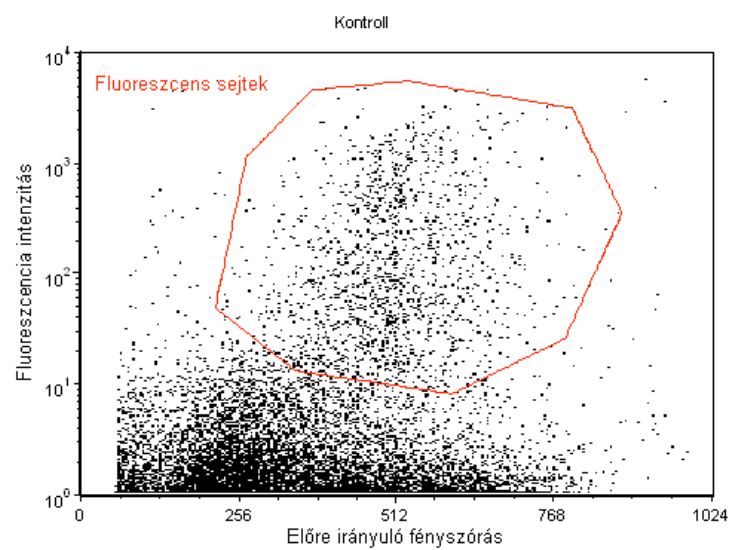
5.5 A ligandkötő domén degradációjának vizsgálata

A beállított áramlási citometriás módszerrel megkíséreltük kimutatni a ligandkötő domén degradációját agonista stimuláció hatására. A fent ismertett irodalmi adatok alapján az LBD önmaga is képes ligandfüggő módon lebomlani, jelezve, hogy az RXR ubikvitinációjához és degradációjához elegendő az agonista megkötését követő konformációs változás, a DNS-sel történő interakció nem szükséges. GFP-RXR α LBD fúziós fehérjével tranziensen transzfektált AD293T sejteken vizsgáltuk az LBD ligandstimulációra bekövetkező bomlását, ill. a

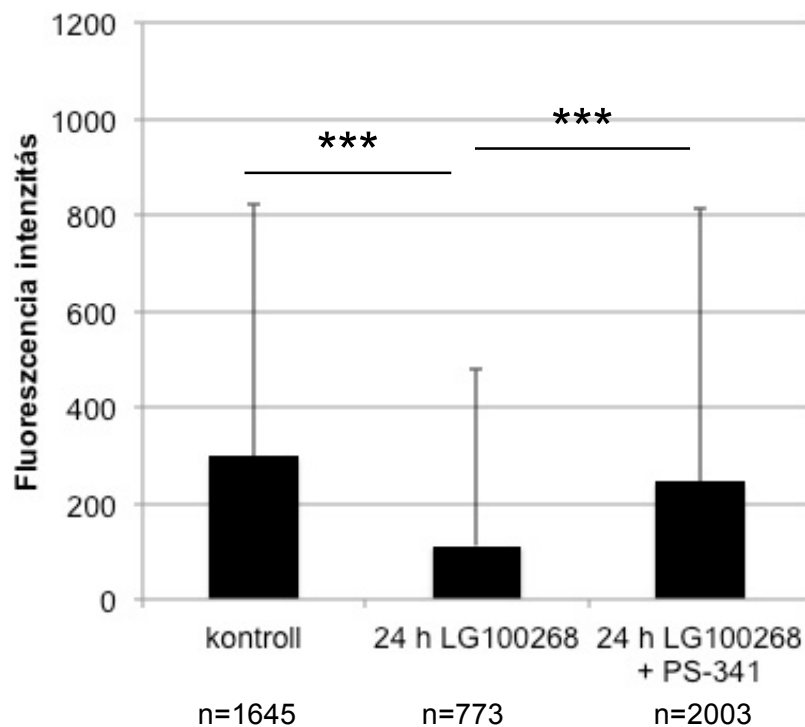
proteaszóma gátlás hatását a folyamatra. Eredményeink egybevágóak az irodalmi adatokkal: 24 óra ligandkezelés hatására megfigyelhető a sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitásának csökkenése a fúziós fehérje bomlása miatt. A folyamat hasonlóan a teljes magreceptort hordozó fúziós fehérjével transzfektált sejtekhez, PS-341 proteaszóma inhibitorral gátolható (12. ábra).

A



B

C



12. ábra. GFP-RXR α LBD fehérjét expresszáló, tranziensen transzfektált AD293T sejtekben az 1 μ M LG100268 ligandkezelés mellett alkalmazott 1 μ M PS-341 kezelés részben visszaállítja a ligandkezelés által eltolt görbét (A). GFP-RXR α fehérjét expresszáló, tranziensen transzfektált AD293T sejtekből egy kapu segítségével kiválasztottuk a fluoreszcens sejtpopulációt, amelynek intenzitásváltozása a dot ploton nyomonkövethető (B). Ezen kapuba eső sejtek átlagos intenzitása szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,0001$) 24 h LG100268 ligandkezelés (1 μ M) hatására, és a csak liganddal kezelt sejteknél szignifikánsan magasabb ($p < 0,0001$) 24 h PS-341 (1 μ M) proteaszóma inhibitor kezelés alkalmazása mellett (C).

6. MEGBESZÉLÉS

A magreceptorok családjába tartozó retinoid X receptor fontos szerepet játszik a differenciációban és homeosztázisban. A magreceptorok között egyedülálló módon számos más magreceptorral heterodimert képezve központi eleme a magreceptor-mediált transzkripció szabályozásnak. Ligand-indukált degradációjának szerepe az ubikvitin-proteaszóma rendszer által valószínűleg többoldalú. Védekezési mechanizmusként óvja a sejtet a túlzott hormonstimulációtól, ezen kívül kikapcsolja a hormonális szignált, végül az ubikvitin-proteaszóma rendszer a transzkripció szabályozás részeként is funkcionál.

Munkánk során a receptor degradációjának vizsgálatához a fehérjekimutatás technikája mellett egy új eszközt, az áramlási citometriát alkalmaztuk. Eredményeink alapján a GFP-RXR α fúziós fehérjét expresszáló sejtekben a degradációs folyamat nyomonkövethető, kvantitatív módon és sejtpopulációkra szelektíven kiértékelhető. A beállított áramlási citometriás módszert alkalmazva sikerült meghatároznunk a degradáció 24 órás időgörbéjét, amely megmutatta, hogy a folyamat az első 8 órában a legintenzívebb. A sejtek RNS szintű RXR expresszióját vizsgálva megállapítható, hogy a ligandstimulus hatására a receptor transzkripciója nem növekszik. Egybevágva az irodalmi adatokkal sikerült a proteaszómát gátolva a degradációs folyamatot csökkentenünk. Fluoreszcens fehérjével jelölt RXR α -LBD-t transzfektálva a sejtekbe, sikerült detektálnunk a ligandkötő domén önálló degradációját ligand hatására, amelyet korábban szintén nem mutattak ki ilyen módszerrel.

A degradációs folyamat pontos részleteinek megismerése, kinetikájának, szabályozásának leírása a magreceptorok expressziójának vagy bomlásának megváltozásával járó klinikai kórképek kezelésében is előrelépést jelenthet. Erre jó példa az akut promyelocytás leukémia, amely az akut myeloid leukémia egy altípusa. A betegekben egy transzlokáció révén a PML (promyelocyta) gén és a RAR α magreceptor génje között létrejön egy fúziós fehérje, ami domináns negatív hatással bír az RXR/RAR heterodimerrel szemben, erősen köti a korepresszorokat, így az RAR α -indukált gének transzkripcióját gátolja. Ez differenciálatlan hematopoieticus sejtek felszaporodását okozza a csontvelőben. A betegség mortalitási rátája az 1970-es évekig 100% volt. Ezt követően került felismerésre, hogy ATRA (all-transz retinsav) adagolásával kiváltható a fúziós fehérje degradációja a ligandkötést követő RAR degradáció miatt, így a csontvelői differenciációs folyamat folytatódni tud (Fang et al., 2010). Az ATRA terápiás adagolása azonban egy igen súlyos mellékhatással, az ún. retinsav szindróma (dyspnoe, láz, súlycsökkenés, perifériás ödéma) fellépésével járhat (Breccia et al.,

2008). Az RAR degradáció kinetikájának, szabályozásának pontosabb ismeretével új molekuláris célpontok ismerhetők meg, amelyek segítségével hatékonyabb terápiás eljárások dolgozhatók ki az APL esetében.

A beállított áramlási citometriás módszert felhasználva megkezdjük az RXR retinoid jelátvitel szempontjából legfontosabb heterodimerizációs partnere, az RAR degradációs folyamatának vizsgálatát. Ilyen módon sikerült megismernünk az RAR degradáció kinetikáját, amely az RXR-hez hasonló időbeli lefutást mutat (az adat nincs ábrázolva). Célunk, hogy a magreceptorok családjának további tagjaira is kiterjesszük vizsgálatunkat. Továbbá heterodimerizációra képtelen mutánsokkal vizsgálni szeretnénk az ilyen módon nagy mennyiségben képződő RXR homodimerek degradációját. Ezen kívül a jövőben mindenképp szükséges megvizsgálni különböző kináz inhibitorok hatását a bomlás mértékére, mivel a degradáció foszforilációs szabályozása még korántsem tisztázott teljesen. Felmerül a specifikus degradációgátlás lehetősége egyes receptorok, esetleg izotípusok szintjén, akár a foszforiláció, akár az ubikvitináció modulálásával. Valószínűleg a receptordegradáció specifikus gátlásával az egyes receptorok mennyisége, transzkripció aktivitása növelhető volna olyan kórképekben, ahol a receptor csökkent expressziót mutat a sejtekben. Így az RAR β expressziója csökkent ösztrogén receptor negatív emlőrák esetén, míg ATRA-rezisztens petefészekrák esetén az RAR α és RXR α kifejeződése csökkent (Fields et al., 2007). Végül szeretnénk az eddig használt módszertani eszköztárt tovább bővíteni FRET (Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer) méréssel, amely segítségével lehetőségünk nyílna az RXR magreceptor és heterodimerizációs partnerei interakcióinak, illetve ezzel egyidejűleg a fluoreszcensen jelölt receptorok különböző ligandstimulusokra fellépő degradációjának detektálására. Ilyen módon további kapcsolatokra derülhet fény a különböző fehérje-fehérje interakciók és a degradációs folyamat megindulása között.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tisztelettel mondok köszönetet témavezetőimnek, Dr. Nagy László professzor úrnak és Brázda Péter PhD hallgatónak a munkámhoz nyújtott segítségükért és fáradhatatlan támogatásukért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Fésüs László professzor úrnak, amiért lehetővé tette tudományos diákköri munkámat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Biokémiai- és Molekuláris Biológiai Intézetben.

Gyakorlati tanácsaikért és segítségükért köszönet illeti Béládi Márta és Fürtös Ibolya laborasszisztenseket.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adachi, S., M. Okuno, et al. (2002) Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35(2): 332-340.
2. Ádám, V. (2006) Orvosi biokémia. Budapest, Medicina.
3. Adam-Stitah, S., L. Penna, et al. (1999) Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 274(27): 18932-18941.
4. Ahuja, H. S., A. Szanto, et al. (2003) The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. *J Biol Regul Homeost Agents* 17(1): 29-45.
5. Alarid, E. T. (2006) Lives and times of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 20(9): 1972-1981.
6. Alberts, B. (2002) Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
7. Alberts, B. (2009) Essential cell biology. New York, Garland Science.
8. Aranda, A. and A. Pascual (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81(3): 1269-1304.
9. Bastien, J. and C. Rochette-Egly (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16.
10. Baumann, C. T., H. Ma, et al. (2001) The glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) localizes in discrete nuclear foci that associate with ND10 bodies and are enriched in components of the 26S proteasome. *Mol Endocrinol* 15(4): 485-500.
11. Bhat, K. P., A. D. Truax, et al. (2010) Phosphorylation and ubiquitination of degron proximal residues are essential for class II transactivator (CIITA) transactivation and major histocompatibility class II expression. *J Biol Chem* 285(34): 25893-25903.
12. Blanquart, C., O. Barbier, et al. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem* 277(40): 37254-37259.
13. Boudjelal, M., J. J. Voorhees, et al. (2002) Retinoid signaling is attenuated by proteasome-mediated degradation of retinoid receptors in human keratinocyte HaCaT cells. *Exp Cell Res* 274(1): 130-137.
14. Boudjelal, M., Z. Wang, et al. (2000) Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha in human keratinocytes. *Cancer Res* 60(8): 2247-2252.

15. Breccia, M., R. Latagliata, et al. (2008) Clinical and biological features of acute promyelocytic leukemia patients developing retinoic acid syndrome during induction treatment with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Haematologica* 93(12): 1918-1920.
16. Brown, N. S., A. Smart, et al. (2000) Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-gamma-deficient mouse. *J Clin Invest* 106(1): 73-79.
17. Callige, M., I. Kieffer, et al. (2005) CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor {alpha} by the proteasome. *Mol Cell Biol* 25(11): 4349-4358.
18. Chen, J. D. and R. M. Evans (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548): 454-457.
19. Conaway, R. C., C. S. Brower, et al. (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 296(5571): 1254-1258.
20. Dace, A., L. Zhao, et al. (2000) Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 8985-8990.
21. de Lera, A. R., W. Bourguet, et al. (2007) Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov* 6(10): 811-820.
22. de Urquiza, A. M., S. Liu, et al. (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290(5499): 2140-2144.
23. Dennis, A. P. and B. W. O'Malley (2005) Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93(2-5): 139-151.
24. Fang, Y., X. Zhou, et al. (2010) The ubiquitin-proteasome pathway plays essential roles in ATRA-induced leukemia cells G0/G1 phase arrest and transition into granulocytic differentiation. *Cancer Biol Ther* 10(11): 1157-1167.
25. Ferry, C., M. Gianni, et al. (2009) SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes via its interaction with SRC-3. *J Biol Chem* 284(12): 8127-8135.
26. Fields, A. L., D. R. Soprano, et al. (2007) Retinoids in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 102(4): 886-898.
27. Germain, P., P. Chambon, et al. (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58(4): 760-772.
28. Gianni, M., A. Bauer, et al. (2002) Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J* 21(14): 3760-3769.

29. Gianni, M., A. Tarrade, et al. (2003) The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers. *J Biol Chem* 278(36): 34458-34466.
30. Gillette, T. G., F. Gonzalez, et al. (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16): 5904-5909.
31. Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82(2): 373-428.
32. Haas, A. L. and T. J. Siepmann (1997) Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J* 11(14): 1257-1268.
33. Hauser, S., G. Adelmant, et al. (2000) Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* 275(24): 18527-18533.
34. Henrich, L. M., J. A. Smith, et al. (2003) Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol* 23(17): 5979-5988.
35. Hershko, A. and A. Ciechanover (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
36. Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548): 397-404.
37. Huang, J., W. C. Powell, et al. (2002) Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res* 62(16): 4812-4819.
38. Huss, J. M., F. H. Levy, et al. (2001) Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O₂-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 276(29): 27605-27612.
39. Ijpenberg, A., N. S. Tan, et al. (2004) In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 23(10): 2083-2091.
40. Imai, T., M. Jiang, et al. (2001) Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 224-228.
41. Kang, Z., A. Pirskanen, et al. (2002) Involvement of proteasome in the dynamic assembly

- of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* 277(50): 48366-48371.
42. Kastner, P., J. M. Grondona, et al. (1994) Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78(6): 987-1003.
 43. Kastner, P., M. Mark, et al. (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* 10(1): 80-92.
 44. Kopf, E., J. L. Plassat, et al. (2000) Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 275(43): 33280-33288.
 45. Koues, O. I., R. K. Dudley, et al. (2009) The 19S proteasome positively regulates histone methylation at cytokine inducible genes. *Biochim Biophys Acta* 1789(11-12): 691-701.
 46. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705.
 47. Krezel, W., V. Dupe, et al. (1996) RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17): 9010-9014.
 48. Lange, C. A., T. Shen, et al. (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1032-1037.
 49. Lattuada, D., P. Vigano, et al. (2007) Accumulation of retinoid X receptor-alpha in uterine leiomyomas is associated with a delayed ligand-dependent proteasome-mediated degradation and an alteration of its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 21(3): 602-612.
 50. Lefebvre, B., Y. Benomar, et al. (2010) Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans. *J Clin Invest* 120(5): 1454-1468.
 51. Lemotte, P. K., S. Keidel, et al. (1996) Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* 236(1): 328-333.
 52. Li, M., A. K. Indra, et al. (2000) Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* 407(6804): 633-636.
 53. Lonard, D. M., Z. Nawaz, et al. (2000) The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 5(6): 939-948.
 54. Lonard, D. M. and W. O'Malley B (2007) Nuclear receptor coregulators: judges, juries,

- and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27(5): 691-700.
55. Mangelsdorf, D. J., U. Borgmeyer, et al. (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6(3): 329-344.
 56. Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83(6): 841-850.
 57. Marsaud, V., A. Gougelet, et al. (2003) Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17(10): 2013-2027.
 58. Masuyama, H. and P. N. MacDonald (1998) Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem* 71(3): 429-440.
 59. McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108(4): 465-474.
 60. Metivier, R., G. Penot, et al. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115(6): 751-763.
 61. Murata, S., H. Yashiroda, et al. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(2): 104-115.
 62. Nagaich, A. K., G. V. Rayasam, et al. (2004) Subnuclear trafficking and gene targeting by steroid receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1024: 213-220.
 63. Nagy, L., H. Y. Kao, et al. (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 13(24): 3209-3216.
 64. Nawaz, Z., D. M. Lonard, et al. (1999) Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 1858-1862.
 65. Nawaz, Z. and B. W. O'Malley (2004) Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol Endocrinol* 18(3): 493-499.
 66. Nomura, Y., T. Nagaya, et al. (1999) 9-cis-retinoic acid decreases the level of its cognate receptor, retinoid X receptor, through acceleration of the turnover. *Biochem Biophys Res Commun* 260(3): 729-733.
 67. Nuclear Receptors Nomenclature, C. (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97(2): 161-163.
 68. Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for

- the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270(5240): 1354-1357.
69. Osburn, D. L., G. Shao, et al. (2001) Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions. *Mol Cell Biol* 21(15): 4909-4918.
 70. Palombella, V. J., O. J. Rando, et al. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78(5): 773-785.
 71. Perissi, V. and M. G. Rosenfeld (2005) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(7): 542-554.
 72. Pickart, C. M. (1997) Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* 11(13): 1055-1066.
 73. Pickart, C. M. and M. J. Eddins (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 55-72.
 74. Prufer, K., C. Schroder, et al. (2002) Degradation of RXRs influences sensitivity of rat osteosarcoma cells to the antiproliferative effects of calcitriol. *Mol Endocrinol* 16(5): 961-976.
 75. Rechsteiner, M. and S. W. Rogers (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21(7): 267-271.
 76. Reid, G., M. R. Hubner, et al. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11(3): 695-707.
 77. Rochette-Egly, C. (2005) Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* 280(38): 32565-32568.
 78. Ross, S. A., P. J. McCaffery, et al. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80(3): 1021-1054.
 79. Sadowski, M. and B. Sarcevic (2010) Mechanisms of mono- and poly-ubiquitination: Ubiquitination specificity depends on compatibility between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine. *Cell Div* 5: 19.
 80. Sarff, M. and J. Gorski (1971) Control of estrogen binding protein concentration under basal conditions and after estrogen administration. *Biochemistry* 10(13): 2557-2563.
 81. Schrader, E. K., K. G. Harstad, et al. (2009) Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol* 5(11): 815-822.
 82. Shen, T., K. B. Horwitz, et al. (2001) Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-

- activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21(18): 6122-6131.
83. Strasser, K., S. Masuda, et al. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417(6886): 304-308.
 84. Sun, L., S. A. Johnston, et al. (2002) Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 296(4): 991-999.
 85. Szabó, G. (2009) *Sejtbiológia*. Budapest, Medicina.
 86. Szanto, A., V. Narkar, et al. (2004) Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2: S126-143.
 87. Tsai, H. W., J. A. Katzenellenbogen, et al. (2004) Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology* 145(6): 2730-2738.
 88. Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2(1): 13-28.
 89. Vivat-Hannah, V., W. Bourguet, et al. (2003) Separation of retinoid X receptor homo- and heterodimerization functions. *Mol Cell Biol* 23(21): 7678-7688.
 90. Wallace, A. D. and J. A. Cidlowski (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276(46): 42714-42721.
 91. Wan, Y. J., D. An, et al. (2000) Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 20(12): 4436-4444.
 92. Webster, J. C., C. M. Jewell, et al. (1997) Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem* 272(14): 9287-9293.
 93. Yokota, K., H. Shibata, et al. (2004) Proteasome-mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocr Res* 30(4): 611-616.
 94. Zhu, J., M. Gianni, et al. (1999) Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 14807-14812.

FÜGGELÉK

A bemutatott eredményekhez való saját hozzájárulás:

- sejtenyésztés,
- ligandkezelés
- transzformálás
- plazmid izolálás
- tranziens transzfekció
- Western-blot fehérjekimutatás
- áramlási citometriás mérések
- áramlási citometriás eredmények kiértékelése
- RNS tisztítás
- RT-PCR
- qPCR mérések