

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE  
EMLŐS SEJTEK JELÁTVITELI FOLYAMATAIBAN**

**VÁRNAI PÉTER**



**SEMMELWEIS EGYETEM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
ÉLETTANI INTÉZET**

**BUDAPEST, 2010**



## I. Bevezetés és Célkitűzések

A sejtek működése szempontjából alapvetően fontos környezethez való alkalmazkodásuk. Az alkalmazkodás első lépése a környezet ingereinek érzékelése, amit az információ továbbítása követ a sejtek megfelelő választ kialakító végrehajtó molekulákhoz. Azokat a mechanizmusokat, amelyek ezért a továbbító funkcióért felelősek jelpályáknak nevezzük. A környezeti ingerek és az érzékelést végző receptorok sokféleségének megfelelően, a jelpályákból is több áll a sejtek rendelkezésére. Tekintettel arra, hogy a sejteket a környezet felől minden pillanatban ingerek sokasága éri, ezeknek a jelpályáknak fontos feladata az érzékelt információ feldolgozása, a végső válasz kialakítása, amiből adódóan felépítésük és működésük rendkívül bonyolult.

Az inozitol származékok sejten belüli jelentőségének felfedezése a Hokin házaspár érdeme. Munkájuk nyomán hamarosan elfogadottá vált, hogy számos hormon és neurotranszmitter hatásmechanizmusában az egyik legfontosabb kezdeti lépés a foszfolipáz C (PLC) enzim aktiválódása, ami a plazmamembránban található foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát (PtdIns $P_2$ ) hidrolízisét eredményezi. A keletkező két termék, az inozitol (1,4,5)-triszfoszfát (Ins $P_3$ ) és a diacilglicerol (DAG) hatására aztán létrejön a  $Ca^{2+}$ -szignál, illetve aktiválódik a protein-kináz C enzim, amelyek fontos szerepet játszanak a biológiai válasz elindításában. A foszfolipid lebomlása és a  $Ca^{2+}$ -jel kialakulása közötti kapcsolat akkor lett érthető, amikor Robert Michell felvetette az foszfoinozitol és a citoplazmatikus [ $Ca^{2+}$ ] változás közötti kapcsolatot. Ezt a feltételezést Irvine és Berridge az Ins $P_3$  hatására bekövetkező, nem mitokondriális raktárakból történő  $Ca^{2+}$ -felszabadulás felfedezésével bizonyított. Ettől a ponttól kezdve az Ins $P_3$  és citoplazmatikus [ $Ca^{2+}$ ] változáson keresztül működő hírvivő rendszer kutatása felgyorsult. Az Ins $P_3$  receptor és a  $Ca^{2+}$ -raktárak ürülése következtében aktiválódó kapacitív  $Ca^{2+}$ -beáramlás felfedezésével gyakorlatilag a 80-as évek közepére úgy tűnt, hogy ugyan sok részletkérdés vár még tisztázásra, de a hírvivő rendszer alapvetően ismertté vált. A foszfoinozitidekkel kapcsolatosan elfogadottá vált az az elképzelés, hogy lényeges biológiai jelentőséggel a PtdIns $P_2$ , mint az Ins $P_3$  és a DAG előanyaga rendelkezik.

## Az inozitol lipidek mint hírvivő molekulák

Miközben a hírvivő rendszerrel kapcsolatban egyre több fontos részlet vált ismertté; azonosították például a PLC enzim több altípusát és a PKC enzimcsalád számos tagját, továbbá felfedezték a  $\text{PtdInsP}_2$  keletkezésében résztvevő foszfatidilinozitol 4-kináz (PI 4-kináz), és  $\text{PtdIns}(4)P$  5-kináz enzimeket, az inozitol lipid kutatás területén két olyan alapvető felfedezés történt, amely alapjaiban változtatta meg a jelpályáról alkotott képet. 1.) a sejtekben olyan foszfatidilinozitol kináz enzimeket találtak, amelyek az inozitolgyűrűt a 3-as szénatomon képesek foszforilálni (PI 3-kináz). Ettől kezdve folyamatosan növekedett azoknak az ismert enzimeknek a száma, amelyek a különféle inozitol lipidek közötti átalakulásokat katalizálják, aminek megfelelően a különféle sejtmembránokban sikerült kimutatni a 3-as, 4-es és 5-ös szénatomon foszforilált foszfoinozitidek valamennyi variációját. Napjainkban az emberi genom ismeretében 19 darab kináz, és 28 darab foszfatáz aktivitással rendelkező enzimiről tudunk. Az enzimekről, beleértve az általuk katalizált folyamatokat, a közelmúltban jelent meg egy kiváló összefoglaló közlemény. 2.) a másik hatalmas horderejű lépés annak felfedezése volt, hogy bizonyos fehérje domének foszfoinozitidek nagy affinitású szelektív kötésére képesek. Elsőként az úgynevezett pleksztrin homológia (PH) domének  $\text{PtdInsP}_2$  kötését fedezték fel, de a későbbiekben számos egyéb doménről (PTB, FERM, PDZ, FYVE, PX, ENTH) derült ki, sőt olykor az egész fehérje molekula szükséges a lipid interakcióhoz. Ezekről a doménekről napjainkra már szintén elképesztő mennyiségű adat, és kiváló összefoglaló közlemények áll rendelkezésre. A domének szekvenciája mellett nagyon sok esetben ismert a kristályszerkezet és a lipidkötési szelektivitás, azonban az, hogy lipidkötés milyen mértékben határozza meg a domének membránlokalizációját munkánk kezdetekor még kevésbé volt tudott.

Az inozitol lipidek kötésére képes domének felfedezése lehetővé utat nyitott egy olyan molekuláris módszer kidolgozásához, amelyről több mint tíz év távlatában már egyértelműen bebizonyosodott, hogy alapvetően meghatározta az inozitol lipidek jelentőségének megismerését. A módszer lényege, hogy amennyiben egy lipidkötő domént fluoreszcens fehérjével megjelölünk, egy olyan fúziós fehérjét kapunk, amely a sejtekben expresszálva a domén lipidkötő tulajdonságától függően lehetővé teszi a sejtmembránokban lévő inozitol lipidek konfokális mikroszkóppal történő kimutatását, mennyiségük változásának követését. Elsőként a humán  $\text{PLC}\delta_1$

fehérje PH doménjének felhasználásával sikerült egy PtdIns $P_2$  kimutatására alkalmas szondát létrehozni, amit aztán sok, egyéb lipidek (PtdIns $P_3$ , PtdIns(3) $P$ , PtdIns(4) $P$ ) kimutatására alkalmas szonda követett. A módszer igen hasznosnak bizonyult egyrészt a különböző sejtorganellek inozitol lipid tartalmának azonosításában, másrészt a lipidek élettani szerepének, jelentőségének vizsgálatában is alapvető módszerré vált.

A különféle inozitol lipid származékok és az őket kötni képes fehérje domének felfedezésével a jelátalakítási folyamatoknak egy új mechanizmusa bontakozott ki. Ennek lényege, hogy a lipidkötő doménnel rendelkező fehérjék a membránokhoz képesek kötődni, ami a jelátalakító folyamatok szempontjából nagy jelentőséggel bíró molekuláris komplexek kialakulásához vezet. Mivel a kölcsönhatás kialakulását a membránok foszfoinozítid mennyisége, és a jelenlévő foszfolipid típusa határozza meg, a lipidek szabályozásával a jelpályák is jelentősen befolyásolhatók. Csupán az elsőként leírt PH domént tartalmazó fehérjék száma meghaladja a kétszázat, és hasonló számban lehetnek jelen a többi domént tartalmazó fehérjék is. Mindezek alapján ma már elfogadott, hogy a sejtorganellek membránjában található, különféle típusú inozitol lipidek (például PtdIns(3) $P$  az endoszómában, PtdIns(4) $P$  a Golgi-ban és az endoplazmás retikulumban (ER), PtdIns(5) $P$ , PtdIns(4) $P$ , PtdIns(4,5) $P_2$ , PtdIns(3,4,5) $P_3$  a sejtmembránban) alapvető sejtfunciók létrejöttében és szabályozásában játszanak meghatározó szerepet. Ilyen funkciók például a sejtproliferáció, az apoptózis, a trafficking, az endocitózis, a fagocitózis, a sejttalak kialakulása és a sejtmozgás. Az inozitol lipidek részt vesznek a legkülönbözőbb patológias állapotok kifejlődésében is (pl. sejtttranszformáció, metasztázis, vírus- és baktériumfelvétel).

### **Az inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor**

Az Ins $P_3$  molekula kötőhelyének leírását követően, az Ins $P_3$  receptort számos szövetből sikerült eleinte csak kitisztítani, végül egér kisagyból, ahol igen nagy mennyiségben található, megklónozni. Három különböző típusát, és több splice variánsát azonosították különféle rágcsáló illetve humán szövetekből. Az Ins $P_3$  receptor egy hatalmas, mintegy 3000 aminosavból álló, a rianodin receptorról rokon fehérje. Legnagyobb mennyiségben az ER-ban található, de egyéb membránokból (plazmamembrán, nukleáris membrán, Golgi) is kimutatták. A fehérje működésének legfontosabb eleme nyilvánvalóan a csatornafunkció, melyen keresztül létrejön a Ca<sup>2+</sup>-szignál

kezdetéért felelős ER-ból való  $\text{Ca}^{2+}$ -kiáramlás. Azonban esetleges jelenléte az egyéb kompartmentekben, illetve az ER és a más organelumok (plazmamembrán, mitokondrium) között kialakuló kapcsolatok területén felveti annak lehetőségét, hogy más funkciója is lehet. Az  $\text{InsP}_3$  receptor szabályozása összetett: legfontosabb két eleme a citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  és maga az  $\text{InsP}_3$  kötés, de ezen kívül több foszforilációs helyet, és számos citoplazmatikus fehérjével való kapcsolatát leírták. Bár a receptorról nagyon sok információ áll rendelkezésre, bizonyos kérdések, mint például az egyes altípusok jelentősége, vagy a ligandkötésre bekövetkező aktiváció molekuláris mechanizmusa, nem teljesen tisztázottak.

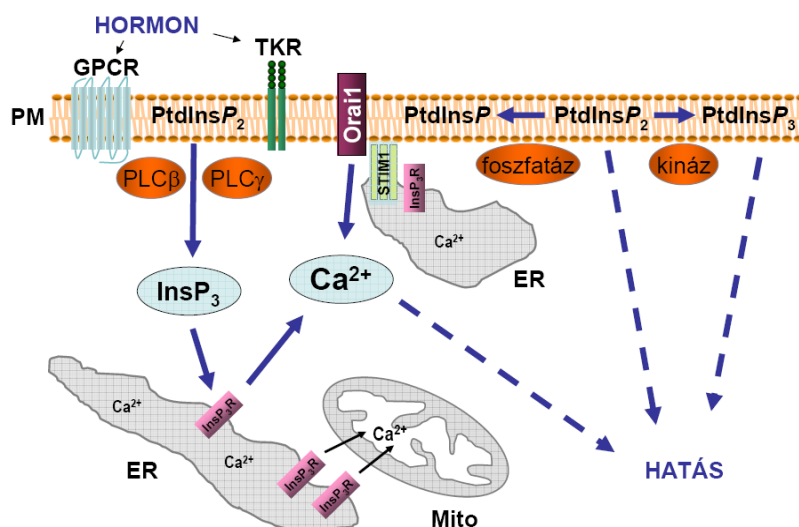
### **A kapacitív $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás**

A legtöbb sejttypusban az ingerlés hatására létrejövő kezdeti, általában igen nagymértékű, de átmeneti citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  emelkedést egy fenntartott  $\text{Ca}^{2+}$ -szint fokozódás követi, melynek létrejöttében a kívülről történő, extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás játszik elsődleges szerepet. Magyarozatára Putney vezette be 1986-ban az úgynevezett "kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás" teóriát, amely szerint az  $\text{InsP}_3$ -mal üríthető intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának csökkenése vezet a plazmamembránon keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramláshoz. A teóriának egyik fontos pillére az a megfigyelés, miszerint a mechanizmus beindulásához nem feltétlenül szükséges a PLC enzim aktiválása (azaz  $\text{InsP}_3$  képződés). A  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak  $\text{InsP}_3$ -tól független ürítése -amit elérhetünk például a raktárak  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételét gátló SERCA inhibitor thapsigargin adásával- is elégséges a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás fokozásához. Bár elektrofiziológiai módszerekkel sikerült azonosítani egy, a tulajdonságai alapján kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásnak tűnő áramot ( $I_{\text{CRAC}}$ ), aminek jellemzése "egy csatorna" szinten is megtörtént, magának a csatornának az azonosítása hosszú ideig váratot magára. Az időközben ismertté vált Trp csatornák között szintén voltak olyanok, amelyekről sokan úgy gondolták, hogy megfelelnek a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -áramért felelős csatornának, azonban az azonosságot nem sikerült megnyugtatóan tisztázni. Ugyancsak számos elképzelés született annak magyarázatára, hogy mi lehet a kapcsolat a belső  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak és a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás között. Berridge például már 1995-ben felvetette, hogy az  $\text{InsP}_3$  receptor és a plazmamembrán közötti fizikai kapcsolat szerepet játszhat ennek a jelenségnek a kialakulásában, de ezt az elképzelést máig sem sikerült igazolni. Mérföldkő volt a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás kutatásában az a felismerés, hogy egy immunológiai kórkép, a

súlyos kombinált immunhiány (SCID) lényege a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás károsodása, azonban ez a felfedezés sem vezetett a csatorna azonosításához.

Az áttörés csak mintegy 20 év elteltével következett be. Két munkacsoport siRNS technika alkalmazásával és hatalmas mennyiségű gén tesztelésére kiterjedő szűrővizsgálattal egymástól függetlenül azonosított végre egy fehérjét, a STIM1-t, amelyről megállapították, hogy az az ER-ban található, és hogy képes a  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak  $[\text{Ca}^{2+}]$ -jának érzékelésére. Részben a STIM1 ismeretében, újabb szűrési, illetve a SCID-es betegek családfája alapján végzett genetikai vizsgálatokkal alig egy évvel a STIM1 felfedezése után sikerült azonosítani egy újabb, a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornának bizonyuló fehérjét, amit Orai1-nek neveztek el. A két fehérje együttes expressziójával számos sejtes rendszerben sikerült a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásnak megfelelő jelenséget létrehozni, és bizonyítani, hogy e két fehérje képezi a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás molekuláris alapját. A két fehérje azonosítását követően a kutatás hatalmas lendülettel indult meg, minek következtében a STIM és Orai fehérjék típusai és domén szerkezete rövid időn belül ismertté vált. Mutációs megközelítéssel bizonyítani, hogy az Orai1 molekula valóban  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornaként működik, ismertté vált a STIM1 raktárürülést követő aktivációjának molekuláris mechanizmusa, jelenleg is intenzív kutatás tárgya mindkét molekula esetében a szerkezet és funkció kapcsolatának jellemzése, az altípusok közötti különbségek feltárása, illetve a más molekulákkal való kölcsönhatások azonosítása.

Az alábbi ábra a foszfoinozítid,  $\text{InsP}_3$  és citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  változáson keresztül működő jelpályát mutatja. Munkánk során célunk a jelátalakítási folyamat molekuláris mechanizmusainak tisztázása volt, amit alapvetően a molekuláris kölcsönhatások feltárásával igyekeztünk elérni.



## *Célkitűzések*

1. Az inozitol lipid-kötő doménnel rendelkező molekulák plazmamembrán lokalizációs képessége alapvető szerepet játszik működésükben. PtdIns $P_2$  kötésére képes, fluoreszcens fehérjével jelölt PH domének inozitol lipid, inozitol-foszfát és membránlokalizációs tulajdonságainak összehasonlításával vizsgálni kívántuk a lipidkötés szerepét a lokalizáció létrejöttében, élő sejtekben.

2. Az Akt, a Btk, a GRP1 és az ARNO fehérjék fluoreszcens fehérjével jelölt PH doménjeinek PtdIns $P_3$ -függő sejtfunciókra gyakorolt hatásait terveztük összehasonlítani. A vizsgálattal ugyancsak a lipidkötő képesség és a funkcionális hatásosság közötti kapcsolat összefüggéseire vonatkozóan kívántunk adatokat gyűjteni. A lipidkötéstől független kölcsönhatás kimutatása esetén vizsgálni kívántuk, hogy a molekula mely része felelős a kölcsönhatásért, illetve felmerült a kölcsönhatásban részt vevő egyéb molekulák esetleges azonosítása is.

3. Az 1-es típusú humán Ins $P_3$  receptor fluoreszcensen jelölt ligandkötő doménjének felhasználásával és intracelluláris régiókba irányításával vizsgálni kívántuk a lokális Ins $P_3$  pufferralás hatását, illetve a ligandkötő domén esetleges kölcsönhatásainak következményét emlős sejtekben.

4. A foszoinozitidek mennyiségének gyors és specifikus változtatása nagymértékben elősegítheti jelentőségük vizsgálatát. Éppen ezért molekuláris módszert terveztünk kidolgozni, amely alkalmas a plazmamembrán PtdIns $P_2$  tartalmának akut csökkentésére élő sejtben. A módszer működését ismertén PtdIns $P_2$ -függő folyamatokra gyakorolt hatás kimutatásával kívántuk ellenőrizni.

5. A kapacitív  $Ca^{2+}$ -beáramlásért felelős, újonnan azonosított humán STIM1 és Ora1 molekulák fluoreszcens fehérjével jelölt verzióinak elkészítésével és felhasználásával tisztázni kívántuk aktivációjuk kinetikáját, illetve a köztük kialakuló kölcsönhatás molekuláris részleteit. Mesterséges, becsülhető réstávolsággal rendelkező kapcsolatot terveztünk létrehozni a plazmamembrán és az ER között élő sejtben, és vizsgálni e kapcsolat hatását a STIM1 és Ora1 molekulákra.



## II Módszerek

### **Molekuláris biológia**

A konstrukciók készítésekor a fehérjéket kódoló DNS génbankban hozzáférhető szekvenciájából indultunk ki. A fúziós fehérjék készítésekor a fehérjék megfelelő darabját polimeráz láncreakció segítségével, Pfu DNS polimeráz (Fermentas) alkalmazásával állítottuk elő, és a megfelelő restriktív vágás után általában pEGFP-C1 vagy pEGFP-N1 (Clontech) emlős expressziós plazmidokba illesztettük, így a sejtekben fluoreszcensen jelölt fúziós fehérjéket kaptunk. Templátként vagy a megfelelő fajból származó agyi cDNS-t, vagy az adott fehérje szekvenciáját tartalmazó, kereskedelembe hozzáférhető klónt használtunk. A fehérjedomének fluoreszcens jelölésekor arra törekedtünk, hogy az adott fehérjedomén fúziós fehérjében való elhelyezkedése (N- vagy C-terminális), a teljes hosszúságú fehérjében való elhelyezkedésnek feleljen meg. A fúziós fehérjékben gyakran szükségessé vált az eredeti zöld fluoreszcens fehérje cseréje más típusú fluoreszcens fehérjére (CFP, YFP, mRFP). A szükséges mutánsokat Quikchange pontmutációs eljárással hoztuk létre (Stratagene). A konstrukciókat egyrészt szekvenálással ellenőriztük, másrészt a sejtekben expresszált fehérjék épségének ellenőrzésére a sejtlyázatot SDS gélben megfuttattuk, és a fúziós fehérjéket fluoreszcens szkenneléssel (foszforimager) tettük láthatóvá. A mintákat a fluoreszcencia megőrzése érdekében nem forraltuk, így a fehérjék csak részlegesen voltak denaturálva, ami azonban elegendő volt méretük becslésére, illetve az esetleges degradáció kizárására.

### **Sejtvonalak, transzfekció**

Kísérleteinkhez általában NIH 3T3, COS-7 és HEK 293 (ATCC) sejtvonalakat használtunk. A sejteket a forgalmazó által javasolt médiumban (10 % borjúsérummal, valamint penicillin és streptomycin antibiotikumokkal kiegészített DMEM), 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében 37 °C-on tartottuk. A sejteket tranziensen transzfektáltuk Lipofectamine, később Lipofectamine 2000 (Invitrogen) felhasználásával. A transzfekcióhoz a sejteket a transzfekciót megelőző nap szélesztettük a megfelelő szövetkultúra edénybe (fedőlemezre), amit a HEK sejtek esetében poli-L-lizinnel (2 ml 0,001 %-os oldat) előkezeltünk. A transzfekciót a gyártó előírásának

megfelelően végeztük. A kísérletekre a transzfekciót követő 24-36 óra elteltével került sor.

A vad típusú és az  $InsP_3$  receptor hiányos DT40 sejteket ugyancsak az ATCC által javasolt médiumban tartottuk, és elektroporézissel transzfektáltuk. Fedőlemezsre egy nappal később, csak a kísérlet előtt ültettük le a sejteket.

### **Konfokális mikroszkópia**

A konfokális mérésekhez a sejteket 35 mm-es Petri csészébe helyeztük, alkohollal tisztított fedőlemezsre ültettük le. Közvetlenül a mérés előtt a fedőlemezsreket, rajtuk a sejtekkel, óvatosan egy AttoFluor (Invitrogen) kamrába helyeztük, majd egyszeri mosást követően 800  $\mu$ l mérőoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérőoldat összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM  $MgSO_4$ , 1,2 mM  $CaCl_2$ , 10 mM glükóz, 10 mM Na-Hepes, pH 7,4. Az évek során számos konfokális rendszert használtunk (BioRad MRC-1024, Zeiss 410, Zeiss 510, Zeiss 510-Meta); közös jellemzőjük, hogy minden esetben inverz mikroszkópra voltak építve. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. Több fluoreszcens fehérje egyidejű jelenléte esetén előkísérletekben a fehérjéket külön expresszáló sejteken ellenőriztük a csatornák közötti átbeszélést, illetve a megfelelő filterek, tükrök, és mérési módszer kiválasztásával olyan mérési körülményeket hoztunk létre, hogy az átbeszélés ne okozzon a mérés folyamán problémát.

### **Sejtek letapadásának mérése**

A méréshez 10 cm-es szövetkultúra edényben tartott és transzfektált COS-7 sejteket használtunk. A transzfekciót követő napon a sejteket 3 perces tripszines emésztéssel felszedtük, és három egyenlő részre osztottuk. Az egyik adagot Laemmli pufferben azonnal lizáltuk, míg a másik kettőt 2 ml sejtkultúra médiumban vettük fel, 35 mm-es szövetkultúra edénybe szélesztettük, majd  $CO_2$  inkubátorba tettük. 30 perc elteltével a sejteket kétszer 4 °C-os foszfát pufferes sóoldattal mostuk, majd szintén Laemmli pufferben vettük fel. A mintákat ultrahanggal kezeltük, forralás nélkül SDS gélben futtattuk, majd a géleket Storm 860 foszforimagerrel (Molecular Devices) szkenneltük, a megfelelő fluoreszcens fehérjéknek megfelelő csíkok fluoreszcenciájának mértékét számszerűsítettük. Mivel a kiindulási és a 30 perc alatt letapadt sejtek mennyiségét az expresszált fluoreszcens fehérjék mennyiségéből számoltuk, a vizsgálat során csak azoknak a

sejteknek a letapadását vizsgáltuk, amelyek sikeresen transzfektálódtak. A letapadás mértékének számolásakor a két párhuzamos mérésben letapadt sejtekből származó értékek átlagát a kiindulási értékhez viszonyítottuk, és annak %-ában fejeztük ki.

### **Sejtek szétterülésének vizsgálata**

A vizsgálat 20  $\mu\text{g/ml}$  fibronektinnel 2 órán keresztül 37 °C-on kezelt fedőlemezek készítésével kezdődött. Mosás után a fedőlemezek előkészítését 1 óra 37 °C-os 1 mg/ml zsírsavmentes borjúalbumin inkubációval folytattuk, majd szárítottuk. A méréshez 10 cm-es szövetkultúra edényben tartott és transzfektált COS-7 sejteket használtunk. A transzfekciót követő napon a sejteket 3 perces tripszines emésztéssel felszedtük és az előkezelt fedőlemezekre szélesztettük. Tíz perc elteltével a sejteket 4 % paraformaldehiddel fixáltuk (10 perc), majd PBS-ben oldott 0,2 % Triton X-100-szal permeabilizáltuk (5 perc). Végül a sejtek morfológiájának azonosítása érdekében PBS-ben oldott, 20 perces 0,1  $\mu\text{g/ml}$  TRITC-falloidinnal aktinfestést végeztünk, majd a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A fúziós fehérjét expresszáló sejtek kiválasztására falloidin kimutatása mellett a fluoreszcens fehérje (GFP) jelenlétét is vizsgáltuk, azaz a képeket két csatornán rögzítettük. Három csoportot különböztettünk meg: nem szétterült (nincsenek nyúlványok), részlegesen szétterült (csak néhány lamellopódium) és szétterült. A statisztikához minden csoportból 100 sejtet értékeltünk és a részlegesen szétterült sejteket nem számoltuk be a szétterülés mértékét kifejező %-os értékbe. A szubjektív faktor jelentőségének csökkentésére a morfológia értékelését igyekeztünk vakon végezni, azaz csak a vizsgálat végeztével néztük meg, hogy az éppen osztályozott sejtek milyen fúziós fehérjét expresszáltak.

### **Foszfolipáz C aktivitás mérése**

A foszfoipáz C aktivitásának méréséhez protonnal jelzett inozitollal jelöltük a sejtek inozitol tartalmú molekuláit, úgymint a  $\text{PtdIns}P_2$ -t, majd a PLC aktiválása után elválasztottuk és mértük a termelődött  $\text{Ins}P_3$ , illetve bomlástermékének az  $\text{Ins}P_2$ -nek a mennyiségét. A méréshez a sejteket (COS-7) 24-lyukú szövetkultúra edénybe tettük le, és transzfektáltuk a vizsgálni kívánt fehérjét kódoló DNS-t tartalmazó plazmiddal. Annak érdekében, hogy csak azoknak a sejteknek a válaszát mérjük, amelyek sikeresen transzfektálódtak, a sejtekben endogén módon jelen nem lévő (vagy csak kis

mennyiségben megtalálható) receptorokat is tranziensen expresszáltunk (például EGF receptort), és a PLC aktiválódást ezen receptorok ingerlésével váltottuk ki. A transzfekciót követően a sejteket protonnal jelzett inozitollal egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Az inozitol specifikus aktivitásának növelése érdekében inozitol mentes sejt kultúra médiumot használtunk. Másnap a sejteket az ingerlés előtt 10 mM LiCl-dal kezeltük, amivel az ingerlés során (20-30 perc) keletkezett  $InsP_3$  és a belőle származó  $InsP_2$  további bomlását megakadályoztuk. A kísérlet végén a sejteket lizáltuk, a keletkezett  $InsP_2$ -t és  $InsP_3$ -t szeparáltuk, aktivitásukat megmértük. A kísérlet során három párhuzamossal dolgoztunk, melyekből átlagértéket számoltunk.

### **Fehérje expresszió kinetikájának mérése**

A fluoreszcensen jelzett fehérjék expresszióját több napon keresztül terveztük vizsgálni. Mivel több fehérjekonstrukció párhuzamos méréséről volt szó, a mérést 96-lyukú szövettenyésztő edényre állítottuk be. Tekintettel arra, hogy olyan fúziós fehérjék expressziójának követése volt a feladat, amelyek fluoreszcens fehérjével minden esetben jelölve voltak, egyszerűen a sejtek fluoreszcenciáját követtük a mérésre alkalmas Ascent FL (Thermo LabSystems) vagy Mithras LB940 (Berthold) „plate reader” segítségével. Így a mérés során csak azokat a sejteket vizsgáltuk, melyek sikeresen transzfektálódtak. Mivel a fenol vörös zavarta a fluoreszcencia mérést, a vizsgálat során a sejteket fenol vörös mentes sejt kultúra médiumban tartottuk. A méréseket 4 párhuzamossal végeztük, és a mért értékeket kísérletenként átlagoltuk. A fluoreszcencia értékeket az első mért értékre (transzfekció után 21 órával) normalizáltuk.

### **Citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ mérése egyedi sejtekben**

Az alkalmazott tranziens transzfekcióval a sejt vonalakban mintegy 25-30 %-os transzfekciós határfokot értünk el. Azt, hogy melyik sejt expresszálja a kérdéses fúziós fehérjét, a jelölésre használt fluoreszcens fehérje kimutatásával lehetett eldönteni. Ehhez olyan mérőrendszert kellett kiépíteni, amely alkalmas az egyedi sejtek megkülönböztetésére, azaz a  $[Ca^{2+}]$  méréshez használt fluoreszcens indikátor kimutatásán túl az adott fluoreszcens fehérje mérésére is. Ennek az igénynek felel meg az alábbi digitális képalkotó rendszer. A mérésekhez a sejteket 35 mm-es Petri csészébe helyeztük, alkohollal tisztított fedőlemezekre ültettük le. A DT40-es

sejtek esetében ehhez a fedőlemezeket Cell-Tak-kel (Collaborative BioMedical Products) előkezeltük. A mérés előtt a sejteket 1 ml 200  $\mu\text{M}$  szulfín-pirazonnal kiegészített mérőoldatban oldott 2  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM (Invitrogen)  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük (45 perc szobahőmérséklet). Közvetlenül a mérés előtt a fedőlemezeket, rajtuk a sejtekkel, óvatosan egy AttoFluor (Invitrogen) kamrába helyeztük, majd egyszeri mosást követően 800  $\mu\text{l}$  mérőoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérőoldat összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM glükóz, 10 mM Na-Hepes, pH 7,4. A digitális képkalkoló rendszer alapját egy Olympus IX70 típusú inverz mikroszkóp képezte, amely ORCA-ER (Hamamatsu), később a nagyobb látótér rögzítését lehetővé tevő MicroMAX:1024BFT (Princeton Instruments) CCD kamerával volt felszerelve. A Fura-2 excitációhoz szükséges 340/10 és 380/10 nm-es megvilágítást, illetve a sejtekben expresszáldott fluoreszcens fehérjék ingerléséhez szükséges fényt (mRFP esetén ez 470/10 nm volt) Lambda DG-4 (Sutter) fényforrás biztosította, míg az emissziós oldalon a kibocsátott fény szűrését a megfelelő filter beépítésével értük el (Fura-2 esetében 525/36 nm, mRFP esetében 640/50 nm). A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A folyamatok időbeliségének követésekor a képeket általában 5 másodpercenként vettük fel. Az alkalmazott ingerereket 200  $\mu\text{l}$  térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. Az adatok rögzítésére és feldolgozására a MetaFluor (Molecular Devices) programcsomagot használtuk. A citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  követésére a 340 és 380 nm-es ingerléskor 505 nm-en mérhető fényintenzitás hányadosát számoltuk. A  $[\text{Ca}^{2+}]$  számszerűsítéséhez szükséges kalibrációt nem végeztünk. Erre a kísérleteinkben nem volt szükség, hiszen csak a változásra voltunk kíváncsiak. A rendszer mérésenként mintegy 10-15 transzfektálódott és adott fehérjét valamilyen mértékben expresszáldó, valamint 25-30 nem transzfektálódott, kontroll sejt egyidejű mérését tette lehetővé.

### **Mangán quench mérés egyedi sejtekben**

A  $\text{Mn}^{2+}$  quench mérések az egyedi sejtes citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  méréshez hasonló módon történtek a következő eltérésekkel: 1.) mivel az endoplazmás retikulumon keresztüli  $\text{Mn}^{2+}$  áramot kívántuk mérni szükséges volt az ER Fura-2-vel való feltöltése. Ezt nagyobb mennyiségű (5  $\mu\text{M}$ ), és hosszabb idejű (120 perc) Fura-2/AM töltéssel értük el. 2.) a sejteket 10 perces 15

$\mu\text{g/ml}$  digitonin kezeléssel permeabilizáltuk, és citoplazmatikus mérőoldatot használtunk (10 mM NaCl, 120 mM KCl, 2,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{KHPO}_4$ , 2 mM ATP, 10 mM foszfokreatin, 20 egység/ml kreatin foszfokináz, 20 mM K-Hepes, pH 7,2. Az oldatkészítéshez használt vizet a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentesítés érdekében Chelex 100 oszlopon (BioRad) szűrtük. 3.) a Fura-2 excitálására a  $[\text{Ca}^{2+}]$ -tól független, izobesztikus pontnak megfelelő 360/10 nm-es fényt alkalmaztunk.

### **Citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ mérése sejtuszuspenzióban**

A szuszpenziós citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  méréseket 37 °C-on, küvettás fluoriméterben (PTI) végeztük, amely mind az excitációs oldalon (PTI DeltaScan), mind az emissziós oldalon monokromátorral volt ellátva. Mérésenként egymillió sejtet használtunk, melyeket Fura-2/AM festékkel az egyedi sejtek mérésével egyező módon. A mérés folyamán az adatokat 2 pontpár / másodperc gyakorisággal gyűjtöttük, és ugyancsak a 340 és 380 nm-es gerjesztés esetén 505 nm-en mérhető fényintenzitás hányadosát számoltuk.

### **Fluoreszcens rezonancia energiatranszfer mérése sejtuszuspenzióban**

A szuszpenziós fluoreszcens rezonancia energiatranszfer (FRET) mérésekhez 10 cm-es Petriben tartott, transzfektált sejteket használtunk. Közvetlenül a mérés előtt a sejteket rövid, 3 perces tripszines emésztéssel felszedtük, reszuszpendáltuk. A transzfekció és az expresszió mértékétől függően egy 10 cm-es Petriből általában 2-3 mérésre elegendő sejtet nyertünk. A méréseket 37 °C-on, küvettás fluoriméterben (PTI) végeztük, amely mind az excitációs oldalon (PTI DeltaScan), mind az emissziós oldalon 2-2 monokromátorral volt ellátva, így alkalmas volt FRET mérésekre. A mérés során a sejteket 425/6 nm-es fényel világítottuk meg (CFP ingerlése), és mértük a CFP és YFP által kibocsátott fényt 475/6 illetve 525/6 nm-en (2 pontpár / másodperc). A CFP-vel és YFP-vel jelölt molekulák közelségét jellemző FRET hányadosot az 525 és 475 nm-en mért intenzitásokból számoltuk a megfelelő korrekciók (autofluoreszcencia, háttér) elvégzése után.

### **Total internal reflection mikroszkópia**

A total internal reflection (TIRF) mérésekhez a sejteket 35 mm-es Petri csészébe helyeztük, alkohollal tisztított fedőlemezekre ültettük le.

Közvetlenül a mérés előtt a fedőlemezeket, rajtuk a sejtekkel, óvatosan egy AttoFluor (Invitrogen) kamrába helyeztük, majd egyszeri mosást követően 800  $\mu$ l mérőoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérőoldat összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glükóz, 10 mM Na-Hepes, pH 7,4. A mérésekhez egy kétcsatornás, Olympus TIRF rendszert használtunk, amely PlanApo 60x/1,45 objektívvel, Hamamatsu EM-CCD kamerával, illetve külön fókuszálható 488 nm-es és 568 nm-es lézerekkel volt felszerelve. A rendszert az Openlab szoftver irányította (Improvision), azonban a képeket a mérés után azonnal TIFF formátumban exportáltuk, és a további analízisre a MetaMorph programot (Molecular Devices) használtuk. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A folyamatok időbeliségének követésékor a képeket általában 10 másodpercenként vettük fel. Az alkalmazott ingereket 200  $\mu$ l térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. Azokban a mérésekben, ahol a fluoreszcensen jelzett fehérjék mozgása mellett azzal párhuzamosan a sejtek citoplazmatikus [Ca<sup>2+</sup>]-t is követni akartuk, a sejteket a kísérletet megelőzően, a Fura-2 töltés körülményeivel egyezően, 3  $\mu$ M Fluo-4/AM Ca<sup>2+</sup>-érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük.

**A transzferrin receptor endocitózisának mérése áramlásos citometriával**  
A méréshez 10 cm-es szövetkultúra edényben tartott és transzfektált COS-7 sejteket használtunk. A transzfektációt követő napon a sejteket 3 perces tripszines emésztéssel felszedtük, és négy egyenlő részre osztottuk (kb. 1 millió/ml sejt). Ezután a sejteket az adott kísérletnek megfelelően kezeltük. Az Alexa Fluor 488-cal jelzett transzferrin konjugátumot (Invitrogen) 5  $\mu$ g/ml koncentrációban alkalmaztuk. A kísérletet 2 % paraformaldehid adásával állítottuk le, amivel egyben fixáltuk is a sejteket. A méréseket FACScan (Becton Dickinson) műszeren mértük. Az mRFP-vel jelzett fehérjéket tartalmazó sejteket a piros csatornán (FL2) mért érték alapján azonosítottuk, és az ezekben mért zöld intenzitás (FL1) értékéből következtettünk a felvett transzferrin mennyiségére. Tekintettel arra, hogy mindkét csatorna esetében a megvilágítást ugyanaz a 488 nm-es fény jelentette, a mérés során kihasználtuk az mRFP azon tulajdonságát, hogy rendelkezik egy kisebb, de mégis jelentős excitációs csúccsal 488 nm közelében, ami ily módon gerjesztette a fehérjét.

## Rekombináns fehérjék előállítása

Számos konstrukció esetében szükséges volt a fúziós fehérjék rekombináns fehérjeként való előállítása is. Ehhez a fúziós fehérjét kódoló DNS-t pET-23b bakteriális expressziós vektorba klónoztuk át (Novagen), minek során egyúttal egy C-terminális hat hisztidinből álló nikkelt kötő címkét is kaptak. A plazmidokkal BL-21-es *E. Coli* baktériumokat transzformáltunk (Novagen), melyeket aztán 100 ml LB-ben 37 °C-on növesztettünk  $A_{600}=0,6$  értékig. Következő lépésként a fehérjeexpressziót szobahőmérsékleten 7 órán keresztül 300  $\mu$ M izopropil-1-tio- $\beta$ -galaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk. A baktériumokat lízis pufferben (20 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8,0) ultrahanggal feltártuk, majd a 10.000 g-s (30 perc 4 °C) fugálás után kapott felülúszót  $Ni^{2+}$ -NTA-agaróz gyöngyökkel (Qiagen) inkubáltuk (5 mM imidazol 1 óra 4 °C). Mosást követően a nikkellehez kötődött rekombináns fehérjét 1 M-os imidazollal eluáltuk, az imidazolt kihigítottuk, a fehérjét töményítettük, végül 5 mM ditioneitol (DTT) tartalmazó standard foszfát puffert tartalmazó sóoldatban (PBS) 4 °C-on tároltuk. A fehérjét SDS gélben futattuk, Coomassie festéssel láthatóvá tettük, illetve mennyiségük megállapítására albumin standardokhoz hasonlítottuk.

## *In vitro* kötési vizsgálatok

Az  $InsP_3$  és  $InsP_4$  kötés során használt oldat összetétele a következő volt: 50 mM Na-Hepes, 50 mM KCl, 0,5 mM  $MgCl_2$ , 10  $\mu$ M  $CaCl_2$ , pH 7,4. A kötés mérése 4 °C-on, 50  $\mu$ l térfogatban történt, amely tartalmazta a tríciummal jelzett  $InsP_3$ -t (0,74 kBq, ami 0,5 nM-nak felelt meg) vagy  $InsP_4$ -t (1,1 nCi, ami 1 nM-nak felelt meg) és a nem jelzett inozitol származékokat különböző koncentrációban. A kötési reakciót mintegy 200 ng rekombináns fehérje adásával indítottuk. 10 perc inkubáció után a folyamatot 5  $\mu$ l  $\gamma$ -globulin (10 mg/ml) és 50  $\mu$ l polietilén-glikol 6000 (30 %) adásával állítottuk le. 5 perc elteltével a kötött és nem kötött jelzett  $InsP_3$ -t 10 perces 10.000 g-s centrifugálással választottuk szét. A csapadék, azaz a kötött mennyiség aktivitását 100  $\mu$ l 2 %-os SDS-ben történt felvételt követően folyadékszintillációs számlálóban határoztuk meg.

A PIP strip membránokra szárított inozitol lipidek (Echelon) kötésének kimutatását 5 ml kötési pufferben végeztük, melynek összetétele a következő volt: 150 mM NaCl, 2 mM nátrium-pirofoszfát, 0,1 % Tween 20, 3 % lipid mentes borjú szérum albumin, 10 mM Tris, pH 7,5. A membránokat 90 percig blokkoltuk a kötési pufferrel, majd ezt követően került sor a 100 pmol



rekombináns fehérjével való inkubációra 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Mosást követően a lipidekhez kötődött fehérjéket GFP ellenes antitest felhasználásával, Western-blot technikával tettük láthatóvá.

A PtdIns $P_3$  kötés kimutatására olyan agaróz gyöngyöt használtunk, melyeknek felszínére PtdIns $P_3$  molekulákat rögzítettek (Echelon). A kötési vizsgálatokban a gyártó utasítását követtük. A kötött és nem kötött fehérje frakciókat (forralás nélkül) SDS-PAGE alkalmazásával, és foszforimager-rel történt leolvasással tettük láthatóvá, illetve mérhetővé.

Az Arf6 fehérje és GRP1 PH domének közötti kölcsönhatás vizsgálatára a tisztításra is használt glutation Sepharose 4B-hez kötött (Amersham) Arf6 fehérjét (20  $\mu$ g) és hasonló tömegű rekombináns YFP-PH fúziós fehérjét használtunk. A fehérjéket 400  $\mu$ l 1mM MgCl $_2$ -t, 1mM DTT-t, 0,2 % Tritont X-100-at és 0,1 % Tween 20-t tartalmazó standard foszfát pufferben (pH 7,2) 3 órán keresztül Ins(1,3,4,5) $P_4$  jelenlétében vagy anélkül 4 °C-on inkubáltuk. A gyöngyöket kétszer mostuk 1-1 ml térfogatban, majd a kötött és nem kötött frakciókban (forralás nélkül) SDS-PAGE alkalmazását követően a fluoreszcens fehérjék kimutatására a gélt foszforimager-rel leolvastuk, míg az Arf6 fehérjéket Coomassie festéssel tettük láthatóvá.

### III. Eredmények és Megbeszélés

#### *A lipidkötés és a plazmamembrán lokalizáció összefüggésének vizsgálata PtdInsP<sub>2</sub>-kötő pleksztrin homológia domének esetében*

Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy a PLC $\delta_1$  enzim pleksztrin homológia (PH) doménje (1-170 aminosavak) felhasználható a plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> szintjének kimutatására. Eredményeink megerősítése céljából, illetve, hogy az inozitol lipidek kimutatására irányuló munkát folytassuk, igyekeztünk más fehérje doméneket is izolálni, amelyek ugyancsak képesek PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kötésére. Így került látóterünkbe a PLC $\delta_1$  enzimmel nagyfokú homológiát mutató, de enzimaktivitással nem rendelkező úgynevezett 130 kDa molekulatömegű fehérje (p130), amelyről ismert volt, hogy rendelkezik egy InsP<sub>3</sub>-t specifikusan kötő PH doménnel (95-233 aminosavak). Kontrollvizsgálatokhoz izoláltam az 1-es típusú humán InsP<sub>3</sub> receptor ligandkötésért felelős darabját (224-605 aminosavak), amit az N-terminális végén szintén fluoreszcens fehérjével jelöltem.

#### **A p130-as fehérje GFP-vel jelölt PH doménje nem kötődik a plazmamembránhoz**

Elkészítve e fehérje domének GFP-vel jelölt verzióját azt tapasztaltuk, hogy szemben a PLC $\delta_1$ PH-GFP konstrukcióval, amely PtdInsP<sub>2</sub>-kötésének megfelelően szépen kirajzolta a plazmamembránt, sem a p130-as fehérje PH doménje (p130PH-GFP), sem az InsP<sub>3</sub> receptor ligand-kötő doménje (GFP-IP<sub>3</sub>R-LBD) nem mutatott plazmamembrán lokalizációt, hanem a citoplazmában helyezkedett el. Míg a GFP-IP<sub>3</sub>R-LBD esetében ez nem volt meglepő, a PLC $\delta_1$  PH doménhez nagyon hasonló p130 PH domén esetében nem erre az eredményre számítottunk.

#### **A PLC $\delta_1$ PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék inozitol-foszfát kötésének összehasonlítása**

Vizsgálataink idején a PH domének membránlokalizációjának mechanizmusáról elfogadott volt, hogy azok lényegében a membránban található foszfoinozitidekhez, pontosabban a citoplazma felé néző, különféle mértékben foszforilált inozitol gyűrűhöz kötődnek. E modell alapján, amennyiben egy fehérje domén InsP<sub>3</sub>-kötő képessége nem ér el egy bizonyos értéket, az magyarázatul szolgálhat a plazmamembrán lokalizáció hiányára

vonatkozóan. Első lépésként tehát összehasonlítottuk a PLC $\delta_1$  és a p130-as fehérje PH doménjeinek Ins $P_3$ -kötő képességét. A két fehérje Ins $P_3$  kötése lényegében azonosnak bizonyult. Az IC $_{50}$  értékek (átlag  $\pm$  átlag hibája): PLC $\delta_1$ PH-GFP 17 $\pm$ 0,4 nM n=8, p130PH-GFP 22 $\pm$ 8 nM n=9. A GFP-IP $_3$ R-LBD fehérje Ins $P_3$  kötésének mérésekor az irodalmi adatoknak megfelelően nagyobb affinitásra utaló értékeket kaptunk: IC $_{50}$ =4 $\pm$ 2 nM n=6. Megjegyzendő, hogy a PLC $\delta_1$ PH-GFP és a p130PH-GFP fehérjék esetében nemcsak az Ins $P_3$ , hanem az Ins(1,3,4,5) $P_4$  és Ins $P_6$  kötése is megegyezett. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a plazmamembrán lokalizáció hiánya sem a p130PH-GFP, sem a GFP-IP $_3$ R-LBD esetében nem magyarázható a kisebb affinitású inozitol-foszfát kötéssel.

### **A PLC $\delta_1$ PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék PtdIns $P_2$ -kötő képességének összehasonlítása**

Miután a PLC $\delta_1$ PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék inozitol-foszfát kötési karakterisztikája nem tért el egymástól, különösen érdekessé vált annak vizsgálata, vajon találunk-e különbséget PtdIns $P_2$  kötésükben. Lehetséges ugyanis, hogy a zsírsav oldalláncok okozhatnak különbséget a foszforilált inozitol gyűrű kötésében, ahogy azt az Ins $P_3$  receptor ligand kötő doménje esetében is feltételezzük. Az IC $_{50}$ -nek megfelelő leszorítási értékek a PtdIns(4,5) $P_2$  esetében sem különböztek (átlag  $\pm$  átlag hibája): PLC $\delta_1$ PH-GFP 91 $\pm$ 24 nM n=4, p130PH-GFP 91 $\pm$ 17 nM n=4.

A PLC $\delta_1$ PH-GFP és a p130PH-GFP fehérjék inozitol lipid-kötő képességének összehasonlítását az úgynevezett PIP strip membránok alkalmazásával is elvégeztük. A sejtekben látott, a PLC $\delta_1$ PH-GFP és a p130PH-GFP eltérő membránlokalizációját magyarázó különbséget ezzel a módszerrel sem tapasztaltunk. Mindkét fúziós fehérje alapvetően a PtdIns(4,5) $P_2$ -hoz kötődött, és a kötés affinitása is hasonlóan bizonyult.

Ahhoz, hogy a valóságos, sejtmembránokban kialakuló állapotot még jobban megközelítsük, kollaboráció keretében liposzómába épített PtdIns $P_2$  alkalmazásával is megismételtük az összehasonlító kötési vizsgálatot, de különbség a két PH domén között így sem volt. Ezzel kizártuk azt a lehetőséget is, hogy a p130PH-GFP fúziós fehérje olyan térbeli formával rendelkezik, ami akadályozza a membránban elhelyezkedő PtdIns $P_2$  molekulához való hozzáférést.

Van tehát két PH domén, melyek inozitol-foszfát- és foszfoinozítid-kötő képessége tökéletesen egyezik; ugyanakkor az egyik képes kötődni a

plazmamembránhoz, a másik viszont a plazmamembrán lokalizáció legkisebb jelét sem mutatja. Mindez nem magyarázható azzal a modellel, miszerint a PH domének membránlokalizációja a membránban lévő lipidekhez való kötődésük következménye. Magyarázatként a modellt kiegészítettük azzal a megállapítással, hogy bár elfogadjuk, hogy a PH domének esetében az inozitol lipid kötés szükséges feltétele a membránlokalizációnak, vannak esetek, amikor ez önmagában nem elegendő a lokalizációhoz. Ezzel tehát azt feltételeztük, hogy esetünkben a PLC $\delta_1$ PH molekula és a plazmamembrán között más típusú kölcsönhatás is kialakul, amely szükséges a lokalizációhoz. A p130PH esetében a membránlokalizáció hiányát e kölcsönhatás elégtelensége okozná. A hipotézis igazolására olyan szerkezeti vizsgálatokba kezdünk, melyek célja a molekulák feltételezett, inozitol lipid kötéstől független kölcsönhatásért felelős részének azonosítása volt.

### **A PLC $\delta_1$ PH C-terminális részében található, $\beta 5$ és $\beta 6$ redők közötti szakasz szerepet játszik a plazmamembrán lokalizáció kialakulásában**

A szerkezeti vizsgálatok során, első lépésként, a PH domének aminosav sorrendjének összehasonlítása alapján kimérákat készítettünk. Megállapítottuk, hogy a p130PH C-terminális része elrontotta a PLC $\delta_1$ PH plazmamembrán lokalizációs képességét, míg a PLC $\delta_1$ PH C-terminális részével a p130PH szép plazmamembrán lokalizációt mutatott. Mindez azt jelenti, hogy a molekulának a C-terminális fele tartalmaz olyan aminosavakat, amelyek felelőssé tehetőek a PH domének és a plazmamembrán közötti kölcsönhatás kialakulásában. A PLC $\delta_1$  és a p130 fehérje PH domének egymásnak megfelelő darabjainak cserélgetésével végül sikerült egy olyan, a  $\beta 6$  és  $\beta 7$  redők közötti, csupán nyolc aminosavból álló minimális doménhez eljutnunk, amely biztosította a p130PH membránhoz való kötődését, tehát szerepet játszik a PLC $\delta_1$ PH plazmamembrán lokalizációjának kialakulásában.

### ***PtdInsP $_3$ -kötő PH domének összehasonlító funkcionális vizsgálata***

Hasonlóan a membránok PtdInsP $_2$  tartalmának kimutatására irányuló vizsgálatokhoz, korábban a membránokban lévő PtdInsP $_3$  követésére is létrehoztunk egy olyan készletet, amely fluoreszcensen jelzett,

PtdIns(3,4,5) $P_3$ -t szelektíven és nagy affinitással kötő PH doméneket tartalmaz. A PtdIns $P_3$  kimutatására irányuló, főként morfológiai megközelítés mellett, ezeket a fúziós fehérjéket olyan jelpályák vizsgálatára is fel kívántuk használni, amelyekben a PtdIns $P_3$  hírvivő molekulaként működik. A PtdIns $P_3$ -hoz való kötődés következményeként e PH doménektől azt vártuk, hogy felfüggesztik az adott jelpálya működését, azaz domináns negatív hatást váltanak ki. A sejtfunkciók kiválasztásakor egyetlen szempontunk volt, hogy a jelpálya részeként aktiválódjon a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI 3-kináz) enzim, aminek következtében számolhattunk a PtdIns $P_3$  molekula megjelenésével.

### **A PtdIns $P_3$ kötésre képes, fluoreszcens fehérjéhez fuzionált PH domének elkészítése, sejten belüli lokalizációjuk vizsgálata**

A vizsgálathoz olyan GFP-vel jelzett PH doméneket választottunk, melyek PtdIns $P_3$ , illetve ennek megfelelően Ins(1,3,4,5) $P_4$  kötési képessége az irodalomból ismert volt, illetve korábban magunk is vizsgáltuk. Ilyen a Bruton-féle tirozin kináz (Btk) PH doménje (1-177 aminosavak), az Akt fehérje (más néven protein kináz B) PH doménje (1-167 aminosavak), a GRP1 PH doménje (267-399 aminosavak), illetve az ARNO protein PH doménje (239-399 aminosavak). Ez utóbbi fehérje a sejtekben két formában is megtalálható, érdekes módon a különbség a PH doménben van (egy glicin többlet a  $\beta 1$  és  $\beta 2$  redők között – 3G), ezért az ARNO esetében mindkét PH domént elkészítettük. PtdIns $P_3$ -kötő képességüknek megfelelően, a szérum mentes médiumban tartott sejtekben a kezdetben citoplazmatikus elhelyezkedést mutató fúziós fehérjék PDGF inger hatására kötődtek a plazmamembránhoz. Kivételt jelentett az ARNO-PH domén imént említett 3G mutánsa, amely esetében nem tapasztaltunk látható változást. Annak megerősítésére, hogy a PH domének membránlokalizációja valóban a keletkező PtdIns $P_3$  hatására alakult ki, a sejteket wortmannin-nal kezeltük, ami az alkalmazott alacsony, 300 nM-os koncentrációban a PI 3-kinázok szelektív gátlószere. A várakozásnak megfelelően ez a beavatkozás valóban megszüntette a plazmamembrán lokalizációt.

Kontroll vizsgálatok céljára valamennyi PH domén párjaként elkészítettem az inoztil lipid kötésre képtelen mutánst is. Ez a Btk-PH esetében az R28C, az Akt-PH esetében az R25C, a GRP1-PH esetében az R284C. Az ARNO-PH esetében a 3G variánst tekintettük lipidkötésre alkalmatlan mutánsnak.

### **A PtdInsP<sub>3</sub>-kötő PH domének hatása a sejtek letapadására**

A fibroblaszt eredetű sejtvonalak közös jellemzője, hogy sejt-kultúra edénybe szélesztve gyorsan letapadnak. A letapadás folyamatának vizsgálatára beállítottunk egy olyan módszert, amely lehetővé teszi, hogy csak azokat a sejteket vegyük figyelembe, amelyek a GFP-vel jelölt PH doméneket expresszálják. A folyamat PI 3-kináz-függő voltát wortmannin adásával ellenőriztük. A várakozásnak megfelelően a GFP-s kontrollhoz viszonyítva a GRP1 és az ARNO PH doméneket expresszáló sejteknél egyértelmű gátlást tapasztaltunk, még az ARNO 3G esetében is. Ugyanakkor a Btk és az Akt PH domének vizsgálatakor, PtdInsP<sub>3</sub> kötésük ellenére nemhogy gátlást nem láttunk, a sejtek letapadóképesége inkább erősebbnek tűnt.

### **A PtdInsP<sub>3</sub>-kötő PH domének hatása a sejtek szétterülésére**

A sejtek letapadása igen összetett folyamat, melynek egyik fontos lépése a sejtek úgynevezett szétterülése (spreading). A jelenség jól vizsgálható konfokális mikroszkóppal, melynek további előnye, hogy az adott PH domént expresszáló sejtek könnyen azonosíthatók. Ebben az esetben a folyamat PtdInsP<sub>3</sub> függését nem wortmannin-nal, hanem egy ugyancsak szelektív PI 3-kináz gátlószerrel, az LY424002-vel ellenőriztük. A vizsgálat a letapadási mérésekhez nagyon hasonló adatokat eredményezett: a GRP1 és ARNO PH domén esetében gyakorlatilag a PI 3-kináz gátlásával egyező mértékű gátló hatást láttunk, míg a Btk és Akt PH domének jelenléte a sejtekben hatástalannak bizonyult. Az, hogy a gátló hatás feltétele a PH domén-inozitol lipid kölcsönhatás, a GRP1-PH lipid kötésre képtelen R284C mutánsának hatástalanságából, illetve az ARNO 3G esetében kimutatható jóval kisebb mértékű gátlásból következik.

### **A PtdInsP<sub>3</sub>-kötő PH domének hatása a sejtekben EGF ingerlés során bekövetkező PLC $\gamma$ aktiválódásra**

Az EGF receptor ingerlését követő jelpályák egyike a citoplazmatikus [Ca<sup>2+</sup>] emelkedés, amit a PLC $\gamma$  aktiválódás következtében keletkező InsP<sub>3</sub> hoz létre. Az InsP<sub>3</sub>, illetve metabolikus terméke, az InsP<sub>2</sub> mennyiségének méréséből tehát következtetni lehet a PLC aktivitás változására. A PI 3-kináz részvételét a jelpályában itt is a wortmannin gátlás kimutatásával ellenőriztük. A PH domének egy része (GRP1, ARNO és Akt PH domén) a vizsgálatban gátló hatásúnak bizonyult, ugyanakkor a Btk-PH domén a GFP-

s kontrollhoz viszonyítva jelentős, mintegy másfélszeres PLC aktivitás növekedést okozott.

### **A PtdIns $P_3$ -kötő PH domének hatása a sejtek fehérje expresszálo képességére**

A mérés során a PH domének expresszióját a PH doménekhez fuzionált fluoreszcens fehérje fluoreszcenciájának mérésével követtük három napon át. Mivel a fúziós fehérjék expressziójának mértéke magából a fehérjéből adódóan különbözhet, az eredeti PH doméneket és a PtdIns $P_3$ -t nem kötő mutánsokat párhuzamosan vizsgáltuk, és az adatokat minden esetben a mutánsra normalizáltuk. A mérés során gátló hatást kizárólag az Akt PH domént expresszálo sejtekben tapasztaltunk.

Összefoglalva az eddigi megfigyeléseket megállapíthatjuk, hogy a vizsgált PH domének a különböző funkciókat eltérő mintázatban befolyásolták. Az egymással nagyfokú hasonlóságot mutató GRP1- és ARNO-PH leginkább a sejtek szétterülését és letapadását gátolta, kismértékben hatott a PLC $\gamma$  aktivitásra, míg teljesen hatástalan volt az expressziós vizsgálatban. A Btk-PH domén nem befolyásolta a letapadást és a fehérje expressziót, ugyanakkor jelentősen fokozta a sejtekben PLC $\gamma$  aktivitást. Végezetül az Akt-PH gyakorlatilag minden esetben hatástalan volt, kivéve a fehérje expressziót, amit egyedüli PH doménként egyértelműen gátolt. Hogyan lehetséges, hogy a PH domének ilyen eltérően befolyásolják ezeket a PtdIns $P_3$ -függő folyamatokat, amikor valamennyi szelektív PtdIns $P_3$ -kötő képességgel rendelkezik? A válaszra a már előző fejezetben leírt hipotézishez fordultunk. Feltételeztük, hogy a PH domének és a PtdIns $P_3$  közötti interakció csupán része annak a kölcsönhatásnak, amely ahhoz szükséges, hogy egy adott PH domén beépüljön abba a feltehetően több molekulából álló komplexbe, ahol hatását ki tudja fejteni. A hipotézis bizonyítására most is arra volt szükség, hogy olyan PH domént hozzunk létre, amely a vad típussal megegyező inozitol lipid-kötő képességgel rendelkezik, ugyanakkor nem képes a vad típusra jellemző hatást kifejteni. A PtdIns $P_2$ -kötő PLC $\delta_1$ PH esetében kapott eredmények nagy segítséget jelentettek abból a szempontból, hogy a PH domén melyik részével érdemes foglalkozni. A vizsgálatok során a funcionális szempontból jelentős különbséget mutató Akt és GRP1 PH doménekre koncentráltunk.

## **Az inozitol lipid kötést nem befolyásoló, ugyanakkor funkcionálisan nem működő Akt és GRP1 PH domén mutánsok vizsgálata**

Az Akt-PH vizsgálatokor a T34 aminosavat véletlen mutagenezissel mutáltuk, és a mutánsokat konfokális mikroszkópban vakon teszteltük. Olyan mutációt kerestünk, amelyben a PH domén PtdIns $P_3$ -kötő képessége megmaradt. Ez alapján a T34D, T34F és T34L mutánsokat választottuk ki. A megtartott inozitol lipid kötés ellenére valamennyi mutáns egyértelműen elvesztette a vad típusra jellemző gátló hatását, sőt a T34F mutánsnál az expressziós képesség emelkedéséről beszélhetünk. A GRP1-PH vizsgálata során két mutánst, az I304E és K340L mutációkat készítettük el. Megállapítottuk, hogy a megtartott lipidkötő képességük ellenére az I304E és a K340L mutánsok elvesztették a funkcionális, jelen esetben a GRP1-PH doménre jellemző, a sejtek szétterülésére kifejtett gátló hatásukat. Ismételten megjegyzendő, hogy a mutációk a PH domének (figyelembe véve a PtdIns $P_2$ -re specifikus PLC $\delta_1$  enzim PH doménjét is) azonos felszínén helyezkednek el, ami megerősítette elképzelésünket, miszerint a feltételezett kölcsönhatásban a membránnal érintkező rész lehet érintett.

A változatlan PtdIns $P_3$ -kötő tulajdonságokkal rendelkező, de a vad típusra jellemző domináns negatív hatást nem mutató mutánsok megfeleltek annak a feltételnek, ami a modell bizonyításához kellett. Ez alapján tehát kimondhatjuk, hogy a molekuláris komplex létrejöttének a lipkötés szükséges (a lipidkötésre képtelen mutánsok funkcionálisan is rosszak voltak), ugyanakkor nem elégséges feltétele, azaz a molekulák megfelelő működéséhez egyéb, feltehetően fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is feltételeznünk kell.

## **A GRP1 PH doménje és az Arf6 fehérje közötti kölcsönhatás kimutatása**

A modell működésének igazi bizonyítéka, ha találunk is olyan fehérjét, amit valamelyik PH doménünk képes kötni. A rekombináns formában előállított és GST-vel jelölt Arf6, illetve a fluoreszcensen jelölt GRP1-PH domén közötti, *in vitro* kötési mérések végzésekor végül is sikerült ilyen bizonyítékot találnunk. Az interakció kialakulásának azonban számos feltétele volt. Kellett hozzá a Q76L mutáció az Arf6-ban, ami a kis G fehérje aktív állapotát utánozta, illetve szükség volt az Ins $P_4$  jelenlétére. Ez utóbbi azt jelenti, hogy a PH domén esetében az inozitol lipid kötés következtében jön létre az a konformáció változás, ami lehetővé teszi a fehérjével való



kölcsönhatást. Mindez jól illeszkedik abba a képbe, hogy a lipidkötés szükséges feltétele a PH domén működésének.

### ***Az $InsP_3$ receptor aktiválódás molekuláris mechanizmusának vizsgálata***

#### **A citoplazmatikusan expresszált $InsP_3$ -kötő domének hatása az ATP ingerléssel kiváltott $Ca^{2+}$ -szignálra**

ATP hatására a  $G_q$ -hoz kapcsolt metabotróp  $P_{2Y}$  receptorokon keresztül COS-7 sejtekben kiváltható  $Ca^{2+}$ -szignál, amit a citoplazmatikus mRFP- $IP_3R$ -LBD domén expresszió-függő módon gátolt. Egyrészt az amplitúdó nagysága csökkent, másrészt a  $Ca^{2+}$ -csúcs kialakulásához szükséges idő növekedett. Ez utóbbit az mRFP- $IP_3R$ -LBD expresszió függvényében ábrázolva, és a pontokra egyenest illesztve, annak meredeksége  $18,3 \times 10^{-3}$ -nak adódott ( $r^2=0,467$ ). Összehasonlításként az mRFP-p130PH doménnel is elvégeztük a méréseket, amely hasonló hatással volt a  $Ca^{2+}$ -szignálra, azonban a kisebb  $InsP_3$ -kötő affinitásnak megfelelően az illesztett egyenes meredeksége is alacsonyabb lett:  $7,7 \times 10^{-3}$  ( $r^2=0,261$ ). Az affinitáskülönbség kimutathatósága kiválóan mutatta a mérőrendszer érzékenységét. Figyelemre méltó, hogy míg a citoplazmatikus  $InsP_3$  kötése a kezdeti citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  emelkedést jelentősen gátolta, a fenntartott fázist egyik  $InsP_3$  puffer jelenléte sem befolyásolta érdemlegesen. Mindezek az eredmények azt igazolták, hogy az agonista ingerlés során keletkező  $InsP_3$  mennyiségét a citoplazmatikus pufferolással képesek voltunk befolyásolni.

#### **Az ER citoplazmatikus felszínére irányított $InsP_3$ -kötő domének hatása az ATP ingerléssel kiváltott $Ca^{2+}$ -szignálra**

Az UBC6 fehérje C-terminális darabjával (233-250 aminosavak) kiegészítve, az  $InsP_3$ -kötő domének ER lokalizációt kaptunk, amit lúminálisan expresszálandó fehérjék kolokalizációjának kimutatásával igazoltunk. A vad típusú  $IP_3R$ -LBD alkalmazásakor az ER felszínére irányított domének hatása hasonlított a citoplazmában kifejezethez két különbséggel 1.) az ER felszínén megjelenő mRFP- $IP_3R$ -LBD-t tartalmazó sejtekben a citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  az ATP adását megelőzően már kismértékben emelkedett volt. 2.) a kontroll sejtekhez képest jelentős eltérést találtunk a fenntartott fázis amplitúdójában. Az ER-hoz irányított  $InsP_3$  kötésre képtelen K508A mutáns a  $Ca^{2+}$ -csúcs késén kívül a vad típusra

jellemző valamennyi hatást produkálta, tehát a konstrukciók  $InsP_3$  kötésének nem volt jelentősége.

### **Az $InsP_3$ receptor ER citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő doménje a sejten belüli $Ca^{2+}$ -raktárak ürülését idézi elő**

Megvizsgálva olyan anyagok hatását, melyek mindegyike a  $Ca^{2+}$ -raktárakból való  $Ca^{2+}$ -felszabaduláson keresztül okozza a citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  emelkedését; azt tapasztaltuk, hogy az ER-hoz targetált IP<sub>3</sub>R-LBD,  $InsP_3$ -kötő képességétől függetlenül, gátló hatást eredményezett. Lehetséges magyarázatként felmerült, hogy a jelenséget a raktárak  $Ca^{2+}$ -tartalmának csökkenése okozza. Ez magyarázná a felszabadítható  $Ca^{2+}$ -mennyiségének csökkenését, és az emelkedett nyugalmi  $[Ca^{2+}]$ -t is. Az elképzelést egyrészt a  $Ca^{2+}$ -mentes külső médiumban végzett rekalcinálás hatására bekövetkező fokozott  $[Ca^{2+}]$  emelkedés, másrészt az ER fokozott  $Ca^{2+}$ -permeabilitásának kimutatásával igazoltuk. Az  $InsP_3$  kötésre nem képes ligandkötő domén mindkét esetben is hatásos volt.

### **Az $InsP_3$ receptor ER citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő doménje aktiválja az endogén $InsP_3$ receptorokat**

A DT40 egy csirkéből származó limfoblaszt sejtvonal, amelyből a vad típusú mellett olyan sejtvonal is létezik, amelyben mindhárom típusú  $InsP_3$  receptor expresszióját homológ rekombinációval megszüntették (TKO). Míg a vad típusú DT40 sejtekben, thapsigargin adására jelentősen kisebb volt a citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  emelkedés, tehát a raktárak ürülése ebben a sejtvonalban is bekövetkezett, a TKO sejtekben a konstrukció expressziója teljesen hatástalannak mutatkozott. A  $Ca^{2+}$ -raktárak ürüléséhez tehát szükséges az endogén  $InsP_3$  receptorok jelenléte, következésképp az ER-hoz irányított IP<sub>3</sub>R-LBD az ott lévő endogén  $InsP_3$  receptorokat aktiválva hozza létre a raktárak  $Ca^{2+}$ -tartalmának csökkenését.

### **Az $InsP_3$ receptor ligandkötő doménjének C-terminális, helikális szerkezetű része felelős az aktiváló hatásért**

A ligandkötő domén két jól megkülönböztethető félből, az N-terminális  $\beta$  redőket (224-423 aminosavak) és a C-terminális  $\alpha$  hélixeket (427-605 aminosavak) magába foglaló darabokból áll, melyek szendvicseként fogják közre az  $InsP_3$  molekulát. Mivel a ligandkötő domén endogén receptort aktiváló hatásában az  $InsP_3$  kötés nem játszik szerepet, megvizsgáltuk, hogy

a domén melyik fele közvetíti ezt a hatást. A kérdésre a mérések egyértelmű választ adtak, miszerint az ER-hoz irányított C-terminális darab esetében bekövetkezik a raktárak ürülése, míg az N-terminális darab teljesen hatástalan.

### **Az $InsP_3$ receptor aktiválódásának lehetséges mechanizmusa**

Az  $InsP_3$  receptor hatalmas fehérje, mintegy 3000 aminosavból áll. Külön érdekessége, hogy a ligandkötésért, illetve a csatornafunkcióért felelős rész a fehérje két végén helyezkedik el, melyek között egy úgynevezett regulátoros régió található. Vizsgálatainkkal élő sejtekben igazoltuk, hogy a humán 1-es típusú  $InsP_3$  receptor ER-hoz irányított N-terminális ligandkötő doménje és az ER-ban lévő endogén receptorok csatorna funkcióért felelős része között kölcsönhatás jöhet létre, melynek következményeként a csatorna aktiválódik. A hatáshoz nem szükséges az  $InsP_3$  kötése, ami arra utal, hogy a ligandkötés következtében kialakuló konformáció változás ahhoz szükséges, hogy a ligandkötő domén aktivációért felelős része szabaddá váljon, és a kölcsönhatás kialakuljon. Szerkezeti vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a hatásért a ligandkötő domén C-terminális, helikális felépítésű része felelős.

### ***A sejtmembrán $PtdInsP_2$ szintjének változtatására alkalmas rendszer kidolgozása és jellemzése***

Az inozitol lipidek vizsgálata hidrofób természetükből és igen kis mennyiségükből adódóan nem könnyű feladat. A megismerésükre felhasználható metodikák körének bővítése érdekében elhatároztuk, létrehozunk egy, az inozitol lipidek mennyiségének változtatására alkalmas rendszert. A terv a következő volt: citoplazmatikus formájukban hatástalan enzimeket gyorsan és célzottan különféle membránokhoz irányítunk, ahol aztán enzimaktivitásuknak megfelelően megváltoztatják a különböző foszfoinozitidek mennyiségét. Első menetben a plazmamembrán  $PtdInsP_2$  szintjének csökkentésével próbálkoztunk.

### **A plazmamembrán $PtdInsP_2$ mennyiségének csökkentésére alkalmas molekuláris rendszer kidolgozása**

A membránhoz történő irányítás megvalósításához a szignalizációs folyamatok során már több esetben sikeresen alkalmazott, rapamicinnel aktiválható heterodimerizációs rendszerből indultunk ki. Ehhez egy fehérje

domént, az mTOR-ból származó FRB domént, illetve egy citoplazmatikus fehérjét, a humán FKBP12-t kellett a fehérjekonstrukciókba megfelelően beépíteni. A GAP43 fehérje N-terminális szekvenciájának (1-20 aminosavak) felhasználásával sikerült elérnünk, hogy a fluoreszcensen jelölt FRB domén a plazmamembránhoz kerüljön. A PtdInsP<sub>2</sub> lebontására a IV-es típusú foszfoinozítid 5-foszfátáz választottuk. A teljes hosszúságú, és az N-terminális darabot nem tartalmazó 5-foszfátáz domén (214-vég aminosavak) felhasználásával különböző mértékben aktív konstrukciókat terveztünk, amelyek az FKBP12-t és a fluoreszcens fehérjét is tartalmazták. A rendszer működésének lényege, hogy rapamicin adását követően az FKBP és FRB között kapcsolat jön létre, tehát az addig citoplazmatikus FKBP-5-foszfátáz fúziós fehérje a plazmamembránhoz transzlokálódik, és ott a PtdInsP<sub>2</sub>-ből az 5-ös szénatomon lévő foszfátcsoport eltávolításával abból PtdIns(4)P-t készít. A plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> szintjének kimutatására a sejtekben ugyancsak tranziensen expresszált fluoreszcensen jelzett PLCδ<sub>1</sub>PH szondát használtuk. Rapamicin adása előtt a PLCδ<sub>1</sub>PH-GFP szonda plazmamembránhoz kötött állapotban volt. Rapamicin adása után 30 másodperccel, az enzim látványos plazmamembrán lokalizációját megelőzve, a PLCδ<sub>1</sub>PH-GFP megjelent a citoplazmában, ami azt jelenti, hogy igen kevés enzim transzlokációja már elegendő a plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> mennyiségének csökkentéséhez.

### **A plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> depléciójának hatása a Ca<sup>2+</sup>-szignálra**

Ezek után olyan sejtfunciókat kerestünk, amelyekben a plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> szint változásának jelentőséget tulajdonítanak. Ilyen például a Ca<sup>2+</sup>-mobilizáló agonisták hatására kialakuló Ca<sup>2+</sup>-szignál. Rapamicin hatására a fenntartott fázis azonnali csökkenését tapasztaltuk, és elmaradt az LPA adást követő Ca<sup>2+</sup>-válasz is. Kontrollként olyan méréseket végeztünk, amelyekben az FKBP-s konstrukció nem tartalmazta az 5-foszfátáz enzimet. Ezekben a rapamicinnek semmilyen hatása nem volt a sejtekre.

### **A plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> depléciójának hatása a Trp M8 csatornára**

Ismert, hogy a plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> mennyisége számos ioncsatorna esetében a működés meghatározó tényezője. Annak tesztelésére, hogy a kidolgozott PtdInsP<sub>2</sub> depléciós rendszer alkalmazható-e ioncsatornák működésének vizsgálatára, egy Ca<sup>2+</sup>-szelektív csatorna, a Trp M8 csatorna működését vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy azokban a sejtekben, amelyek

tartalmazták az 5-foszfátáz konstrukciót, a rapamicin hatására bekövetkező plazmamembrán PtdIns $P_2$  depléció következményeként a Ca<sup>2+</sup>-válasz mintegy felére csökkent, tehát a rendszer alkalmazható ioncsatornák PtdIns $P_2$  függésének vizsgálatára.

### **A plazmamembrán PtdIns $P_2$ depléciójának hatása a transzferrin és az EGF receptor endocitózisára**

A klatrin mediált endocitózisban számos olyan fehérje vesz részt, amely képes PtdIns $P_2$  kötésre (arresztin-2, dinamin, klatrin, adaptor protein-2, epszin stb.); érthető tehát, hogy a folyamat szabályozásában a plazmamembrán PtdIns $P_2$  szintjének változása, mint lehetséges tényező már sokakban felmerült. A rapamicines rendszer létrehozásával megnyílt az út az endocitózis lipid függésének vizsgálatára. Elsőként a sejtekben lévő endogén transzferrin receptor endocitózisát vizsgáltuk. Az endocitózist Alexa Fluor 488 fluorokrómmal jelzett transzferrin felhasználásával tettük láthatóvá. A konfokális mikroszkóppal és a folyadékáramlásos citometriával végzett mérésekkel egyaránt azt kaptuk, hogy a plazmamembrán PtdIns $P_2$  szintjének csökkentése a transzferrin receptor endocitózisának gátlását eredményezi. Igen hasonló módon, Alexa Fluor 488-cal jelzett EGF felhasználásával az EGF receptor endocitózisának PtdIns $P_2$  függését is megvizsgáltuk. A mérések során egyértelműen az a kép alakult ki, hogy az EGF receptor internalizációja is érzékeny a PtdIns $P_2$  deplécióra.

### **A PtdIns $P_2$ depléciós módszer széles körű felhasználása, a rendszer további fejlesztése**

A rendszer egyaránt használhatóan bizonyult különböző folyamatok PtdIns(4,5) $P_2$  függőségének, illetve PtdIns(4,5) $P_2$  általi szabályozottságának kimutatására. Az előbbire példa a connexin 43 PtdIns $P_2$  függésének leírása, az utóbbi pedig a Trp V1 csatorna kettős PtdIns $P_2$  regulációja. A PtdIns $P_2$  depléciós rendszert jelenleg is számos laboratóriumban használják, a kapott eredmények minden bizonnyal további előrelépést fognak jelenteni a plazmamembránban található PtdIns $P_2$  hatásainak feltérképezésében.

A kidolgozott módszer fő jelentősége, hogy az FRB-t tartalmazó konstrukció más membránokba irányításával, illetve az FKBP-s konstrukciókba különféle típusú és ligandspecifitású enzim beépítésével, elvileg bármely membrán bármely inozitol lipidjének mennyiségét változtathatjuk. A TGN38-as molekula és a Sac1 4-foszfátáz

felhasználásával például sikerült megvalósítanunk a Golgi membrán PtdIns(4)P tartalmának akut csökkentését, ami lehetővé tette a foszfoinozitud frakció szerepének vizsgálatát.

### ***A kapacitív $Ca^{2+}$ -beáramlás molekuláris mechanizmusának vizsgálata***

A  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormonok, neurotranszmitterek hatására aktiválódó jelpályák vizsgálatával foglalkozó kutatók érdeklődési körébe, így a mienkbe is a  $Ca^{2+}$ -szignál és az inozitol lipidek egyaránt beletartoznak.

#### **A fluoreszcensen jelölt STIM1 molekula expressziójának és sejten belüli lokalizációjának kapcsolata**

A fluoreszcensen jelölt STIM1 molekula elkészítésekor a fluoreszcens fehérjét kódoló DNS szekvenciát úgy építettük be, hogy a fluoreszcens fehérje a STIM1 molekula luminális végén jelenik meg. ER lokalizációt csak a fehérjét igen kis mértékben expresszáló, alig észrevehető sejtekben láttuk. A vizsgálatra használt COS-7 sejtek döntő többségében furcsa, foltos képet kaptunk, amiről kiderült, hogy az ER és a plazmamembrán között kialakuló nagy kiterjedésű kapcsolatnak felel meg. Az expresszió csökkentése érdekében a YFP-STIM1 fúziós fehérjét kódoló plazmidban a promótert kicseréltük, és az általánosan használt citomegalovírus promóter helyére a jóval kisebb transzkripciót eredményező timidin-kináz promótert építettük be.

#### **A fluoreszcensen jelölt STIM1 molekula reverzibilisen jelzi az endoplazmás retikulum $[Ca^{2+}]$ változását**

COS-7 sejtekben a YFP-STIM1 molekula által mutatott egyenletes ER rajzolat az ATP ingerlést követően megváltozott, a perifériás ER helyén kis csomók jelentek meg, ami a fehérje oligomerizációjának következménye. Thapsigargin adása után a csomóképződés mértéke jelentősen erősödött. A molekula viselkedése megfelelt a más munkacsoportok által is látott képnek, ami azt jelenti, hogy a konstrukció működőképesnek bizonyult. Mivel az irodalomban nem volt adat a folyamat reverzibilitására vonatkozóan, megvizsgáltuk az inger megszüntetésének következményét. A STIM1 molekulák azonnal eltűntek egyrészt a plazmamembrán közeléből, másrészt

az oligomerizáció is nagymértékben csökkent, tehát a STIM1 molekula aktivációjának folyamata reverzibilis.

### **A STIM1 molekula mozgása nem függ a plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> szintjétől**

Irodalmi és a saját megfigyelések alapján felmerült, hogy a plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> szintje szerepet játszik a kapacitív Ca<sup>2+</sup>-beáramlás szabályozásában, azonban a molekuláris részletekről nem állt rendelkezésre információ. A PtdInsP<sub>2</sub> depléciós rendszer alkalmazásával érdemes volt tehát megvizsgálni, hogy vajon a STIM1 molekula aktivációját befolyásolja-e a plazmamembránban lévő PtdInsP<sub>2</sub> változása. ATP hatására a STIM1 molekula megjelent a szubplazmalemmáris térben. Rapamicin adását követően a STIM1 aktiváció megszűnt, viszont thapsigarginnal ismét kiváltható volt. Méréseink alapján az aktiváció csökkenésében azonban nem PtdInsP<sub>2</sub> depléciónak, hanem a Ca<sup>2+</sup>-raktárak telődésének van elsődleges szerepe. A plazmamembrán PtdInsP<sub>2</sub> szint csökkentése az InsP<sub>3</sub> keletkezés korlátozásán keresztül elősegíti a raktárak telődését, azaz a STIM1 aktiváció ingerének megszűnését.

### **A STIM1 és Orai1 molekulák expressziójának hatása a Ca<sup>2+</sup>-szignálra**

A STIM1 és az Orai1 molekula együttes expressziója a thapsigarginnal vagy az ATP-vel történő ingerlés hatására bekövetkező Ca<sup>2+</sup>-szignál fenntartott fázisát jelentős mértékben fokozta. Az egysejtes mérés technikának köszönhetően észrevettük, hogy míg a thapsigargin ingerlés abból a szempontból okozott jelentős különbséget a sejtek között, hogy mekkora késéssel jelenik meg a Ca<sup>2+</sup>-beáramlásért felelős mechanizmus aktiválódása, az ATP esetében a válasz jellegének expresszió-függő változása volt feltűnő. Thapsigargin hatására a STIM1 transzlokációban is jelentős különbség alakult ki a sejtek között, azonban a STIM1 mozgás az egyedi sejtekben párhuzamosan változott a Ca<sup>2+</sup>-jel emelkedésével. A különbség oka tehát a STIM1 vándorlás egyedi sejtekben való eltéréséből adódott.

### **A plazmamembrán és az endoplazmás retikulum közötti mesterséges kapcsolat, a „rapa-folt” kialakítása**

Az FKBP12 fehérje plazmamembránhoz, illetve az FRB domén ER felszínéhez irányítással egy olyan molekuláris rendszert hoztunk létre, melyben rapamicin-függő módon a plazmamembrán és az ER között

mesterséges kapcsolat („rapa-folt”) alakítható ki. A plazmamembrán irányításhoz a Lyn fehérje target szekvenciáját (1-20 aminosavak), az ER targetáláshoz a Sac1 foszfatáz irányító szekvenciáját (521-587 aminosavak) használtuk. A folyamat azokban a pontokban kezdődött, ahol a plazmamembrán és az ER között nyugalomban is van kapcsolat (plazmamembrán-ER kontakt pontok), majd újabb és újabb fehérjék megjelenésével és a rapamicin-mediálta kapcsolatok kialakulásával a két membrán közötti kapcsolat egyre nagyobb felületre terjedt ki.

### **A „rapa-folt” hatása a STIM1 molekula lokalizációjára**

A STIM1 molekula nyugalmi ER-lokalizációjának megfelelően, kialakítva a „rapa-folt”-okat, azt tapasztaltuk, hogy azok tartalmazzák a YFP-STIM1 fehérjét. Az alkalmazott gyors és erőteljes  $\text{Ca}^{2+}$ -raktár ürítés hatására megjelentek a rapa csomók, amelyek szigorúan a foltok szélénél helyezkedtek el.

### **A fluoreszcens fehérjével jelölt Orai1 molekula működésének jellemzése**

Megvizsgáltuk, vajon a „rapa-folt” befolyásolja-e, és ha igen, akkor miként az Orai1 molekulát. A C-terminális végén fluoreszcens fehérjével jelölt Orai1 a plazmamembránban helyezkedett el, a STIM1-gyel együtt expresszálva fokozta a thapsigarginnal kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet, és megjelent a  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak ürítését követően kialakult STIM1 csomókban. Önmagában expresszálva csomóképződést nem mutatott.

### **A „rapa-folt” hatása az Orai1 molekula lokalizációjára**

A „rapa-folt”-ok kialakítása a fluoreszcens fehérjével jelölt Orai1 molekula plazmamembrán elhelyezkedését jelentősen megváltoztatta. A molekula továbbra is a plazmamembránban maradt, azonban a „rapa-folt” területéről kiszorult, jelezvén, hogy az Orai1 túl nagy, egyszerűen nem fér el a két membrán közötti részben.

### **A plazmamembrán és endoplazmás retikulum közötti réstávolság növelésének hatása a STIM1 és Orai1 molekulákra**

A membránok közötti réstávolság növelése érdekében az FRB-s és FKBP-s konstrukciókat módosítottuk, egy-egy merev 5 nm hosszúságú linkert építettünk be a targetszekvenciák mellé. Amennyiben a „rapa-folt”-okat ezekkel az új konstrukciókkal hoztuk létre, az Orai1-YFP molekula nem



szorult ki a „rapa-folt”-ból, sőt a STIM1/Orai1 rendszer aktiválását követően az Orai1 molekulák a „rapa-folt”-ok területére koncentráálódtak. Csomók megjelenését sem a STIM1, sem az Orai1 esetében nem láttuk, tehát ebben a speciális esetben a két molekula közötti kölcsönhatás kialakulása a STIM1 oligomerizációja nélkül bekövetkezett.

### **A kapacitív $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásért felelős molekuláris komplex felépítésének modellje**

Mivel az Orai1 molekula mérete önmagában nem indokolja, hogy kiszoruljon a mesterségesen kialakított plazmamembrán-ER részből, feltételezzük, hogy az Orai1 egy feltehetően több molekulából álló komplex részeként helyezkedik el a plazmamembránban. A kapcsolat létrehozására használt fehérjék méretének becsléséből úgy gondoljuk, hogy a komplex mérete biztosan meghaladja az 5 nm-t, de nem nagyobb 12-14 nm-nél.

### ***Az új tudományos eredmények összefoglalása***

1. Kimutattuk, hogy a foszfolipáz C enzim PH doménjének  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  kötése szükséges, de nem elégséges feltétele a domén és a plazmamembrán közötti kölcsönhatás kialakulásának. Megállapítottuk, hogy a PH domén  $\beta 6$  és  $\beta 7$  redők közötti része, az inozitol lipid kötésétől függetlenül szerepet játszik a kölcsönhatásban.

2. Kimutattuk, hogy  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  kötésére képes PH domének funkcionálisan eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. Az Akt és a GRP1 fehérjék PH doménjében pontmutánsok létrehozásával bizonyítottuk, hogy az eltérés háttérében az inozitol lipid kötést nem érintő kölcsönhatások állnak. A GRP1 PH doménjének esetében kimutattuk a közte és az Arf6 fehérje közötti kapcsolatot.

3. Megállapítottuk, hogy az endoplazmás retikulum citoplazmatikus felszínére irányított humán 1-es típusú  $\text{InsP}_3$  receptor N-terminális, ligandkötésért felelős doménje az endogén  $\text{InsP}_3$  receptorokkal kölcsönhatva, azok aktiválására képes. Ugyancsak kimutattuk, hogy a hatásért a ligandkötő domén C-terminális, helikális szerkezetű része felelős.

4. A rapamicinnel aktiválható heterodimerizációs rendszer felhasználásával molekuláris rendszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas élő sejtben a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének akut csökkentésére. A rendszer alkalmazásával kimutattuk a  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormonnal létrehozott  $Ca^{2+}$ -szignál, a Trp M8 ioncsatorna, valamint a transferrin és az EGF receptor endocitózisának PtdIns $P_2$  érzékenységét.

5. Kimutattuk, hogy a fluoreszcens fehérjével jelölt humán STIM1 molekula  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormon hatására bekövetkező oligomerizációja és plazmamembránhoz jutása reverzibilis folyamat. A rapamicinnel aktiválható heterodimerizációs rendszer felhasználásával molekuláris rendszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas élő sejtben a plazmamembrán és az endoplazmás retikulum között mesterséges kapcsolat kialakítására. Megállapítottuk, hogy a kapacitív  $Ca^{2+}$ -beáramlásért egy olyan molekulakomplex felelős, amely a STIM1-en és Orai1 fehérjéken kívül más fehérjé(ke)t is tartalmaz.

### *A kutatás jelentősége*

Az értekezésben bemutatott kutatómunka alap kutatás, melynek célja az inozitol lipidekből kiinduló, illetve ennek részeként a citoplazmatikus  $Ca^{2+}$  koncentráció emelésén keresztül folyó jelátalakítási folyamatok jellemzése, a résztvevő molekulák, illetve a molekulák között kialakuló kölcsönhatások azonosítása. A kapott eredmények a sejtek működésére vonatkozó ismereteinket bővítik, jelentőségüket csak évek, évtizedek távlatából lehet megítélni. Kivétel ez alól a rapamicinnel indukálható heterodimerizációs rendszerrel kapcsolatos tevékenység, mivel e rendszer felhasználásával alapvetően új, molekuláris eszköztárakat hoztunk létre. Bár a PtdIns $P_2$  depléciós rendszer és a mesterséges membránkapcsolat kidolgozásával célunk elsősorban a saját kutatási területünk jobb megismerése volt, azonban e technikák a jelátalakítási folyamatok számos, általunk nem vizsgált területén is alkalmazhatók, illetve fejlesztésük akár biotechnológiai innovációként is elképzelhető.

## IV. Saját közlemények

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

Impakt faktor: **120,868**

Független hivatkozások száma: **363**

(A közlemények felsorolása tematikus, az értekezésben tárgyalt sorrendnek megfelelő.)

1. **P. Varnai**, X. Lin, S.B. Lee, G. Tuymetova, T. Bondeva, A. Spat, S.G. Rhee, G. Hajnoczky, and T. Balla, Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130  
**J Biol Chem**, 2002. 277(30):27412-22. **IF: 6,696**
2. S.B. Lee, **P. Varnai**, A. Balla, K. Jalink, S.G. Rhee, and T. Balla, The pleckstrin homology domain of phosphoinositide-specific phospholipase Cdelta4 is not a critical determinant of the membrane localization of the enzyme  
**J Biol Chem**, 2004. 279(23):24362-71. **IF: 6,355**
3. **P. Varnai**, T. Bondeva, P. Tamas, B. Toth, L. Buday, L. Hunyady, and T. Balla, Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin-homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P3 suggest their interaction with protein binding partners  
**J Cell Sci**, 2005. 118(Pt 20):4879-88. **IF: 6,543**
4. **P. Varnai** and T. Balla, Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains  
**Biochim Biophys Acta**, 2006. 1761(8):957-67. **IF: 3,117** (review)
5. L.A. Cohen, A. Honda, **P. Varnai**, F.D. Brown, T. Balla, and J.G. Donaldson, Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains  
**Mol Biol Cell**, 2007. 18(6):2244-53. **IF: 6,028**
6. **P. Varnai**, A. Balla, L. Hunyady, and T. Balla, Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases Ca<sup>2+</sup> via endogenous IP3R channels  
**Proc Natl Acad Sci U S A**, 2005. 102(22):7859-64. **IF: 10,231**
7. \*X. Lin, \***P. Varnai**, G. Csordas, A. Balla, T. Nagai, A. Miyawaki, T. Balla, and G. Hajnoczky, Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins  
**J Biol Chem**, 2005. 280(13):12820-32. **IF: 5,854**

8. \*G. Szabadkai, \*K. Bianchi, \***P. Varnai**, D. De Stefani, M.R. Wieckowski, D. Cavagna, A.I. Nagy, T. Balla, and R. Rizzuto, Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels  
**J Cell Biol**, 2006. 175(6):901-11. **IF: 10,152**
9. D.A. Gomes, M.A. Rodrigues, M.F. Leite, M.V. Gomez, **P. Varnai**, T. Balla, A.M. Bennett, and M.H. Nathanson, C-met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals  
**J Biol Chem**, 2008. 283(7):4344-51. **IF: 5,520**
10. **P. Varnai**, B. Thyagarajan, T. Rohacs, and T. Balla, Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells  
**J Cell Biol**, 2006. 175(3):377-82. **IF: 10,152**
11. L. van Zeijl, B. Ponsioen, B.N. Giepmans, A. Ariaens, F.R. Postma, **P. Varnai**, T. Balla, N. Divecha, K. Jalink, and W.H. Moolenaar, Regulation of connexin43 gap junctional communication by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**J Cell Biol**, 2007. 177(5):881-91. **IF: 9,598**
12. V. Lukacs, B. Thyagarajan, **P. Varnai**, A. Balla, T. Balla, and T. Rohacs, Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides  
**J Neurosci**, 2007. 27(26):7070-80. **IF: 7,490**
13. **P. Varnai** and T. Balla, Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains  
**Pflugers Arch**, 2007. 455(1):69-82. **IF: 3,842** (review)
14. **P. Varnai**, T. Balla, Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains  
**Methods**, 2008. 46(3): 167-176. **IF: 3,291** (review)
15. **P. Varnai**, B. Toth, D.J. Toth, L. Hunyady, and T. Balla, Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex  
**J Biol Chem**, 2007. 282(40):29678-90. **IF: 5,581**
16. A. Balla, J.K. Yeun, **P. Varnai**, Z. Szentpetery, Z. Knight, K.M. Shokat, and T. Balla, Maintenance of Hormone-sensitive Phosphoinositide Pools in the Plasma Membrane Requires Phosphatidylinositol 4-Kinase III $\alpha$   
**Mol Biol Cell**, 2008. 19(2):711-21. **IF: 5,558**
17. **P. Varnai**, L. Hunyady, T. Balla, STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry  
**TIPS**, 2009. 30(3): 118-28. **IF: 9,340** (review)

18. M.K. Korzeniowski, M.A. Popovic, Z. Szentpetery, **P. Varnai**, S.S. Stojilkovic, T. Balla, Dependence of STIM1/Orai1-mediated Calcium Entry on Plasma Membrane Phosphoinositides  
**J Biol Chem**, 2009. 284(31):21027-35. **IF: 5,520** (2008)

### *A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei*

Impakt faktor: **128,098**

Független hivatkozások száma: **1158**

1. A. Horvath, G. Szabadkai, **P. Varnai**, T. Aranyi, C.B. Wollheim, A. Spat, and P. Enyedi, Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and in insulin producing cells  
**Cell Calcium**, 1998. 23(1):33-42. **IF: 2,874**
2. **P. Varnai**, G.L. Petheo, J.K. Makara, and A. Spat, Electrophysiological study on the high K<sup>+</sup> sensitivity of rat glomerulosa cells  
**Pflugers Arch**, 1998. 435(3):429-31. **IF: 2,529**
3. F. Deak, G. Nagy, **P. Varnai**, E. Madarasz, and A. Spat, Calcium current activated by potassium ions in voltage-clamped rat hippocampal pyramidal neurones  
**J Physiol**, 1998. 508 ( Pt 3):735-45. **IF: 4,727**
4. T. Balla, **P. Varnai**, Y. Tian, and R.D. Smith, Signaling events activated by angiotensin II receptors: what goes before and after the calcium signals  
**Endocr Res**, 1998. 24(3-4):335-44. **IF: 1,258**
5. **P. Varnai** and T. Balla, Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools  
**J Cell Biol**, 1998. 143(2):501-10. **IF: 12,785**
6. G. Szabadkai, **P. Varnai**, and P. Enyedi, Selective inhibition of potassium-stimulated rat adrenal glomerulosa cells by ruthenium red  
**Biochem Pharmacol**, 1999. 57(2):209-18. **IF: 2,755**
7. **P. Varnai**, K.I. Rother, and T. Balla, Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells  
**J Biol Chem**, 1999. 274(16):10983-9. **IF: 7,666**
8. T. Balla, T. Bondeva, and **P. Varnai**, How accurately can we image inositol lipids in living cells?  
**Trends Pharmacol Sci**, 2000. 21(7):238-41. **IF: 10,377**

9. M. Geiszt, J.B. Kopp, **P. Varnai**, and T.L. Leto, Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney  
**Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000. 97(14):8010-4. **IF: 10,789**
10. J. van der Wal, R. Habets, **P. Varnai**, T. Balla, and K. Jalink, Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer  
**J Biol Chem**, 2001. 276(18):15337-44. **IF: 7,258**
11. X. Zhao, **P. Varnai**, G. Tuymetova, A. Balla, Z.E. Toth, C. Oker-Blom, J. Roder, A. Jeromin, and T. Balla, Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells  
**J Biol Chem**, 2001. 276(43):40183-9. **IF: 7,258**
12. T. Balla and **P. Varnai**, Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules  
**Science STKE**, 2002. 2002(125):PL3. **IF: -**
13. T. Bondeva, A. Balla, **P. Varnai**, and T. Balla, Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells  
**Mol Biol Cell**, 2002. 13(7):2323-33. **IF: 7,599**
14. B. Mihalik, Z. Gaborik, **P. Varnai**, A.J. Clark, K.J. Catt, and L. Hunyady, Endocytosis of the AT1A angiotensin receptor is independent of ubiquitylation of its cytoplasmic serine/threonine-rich region  
**Int J Biochem Cell Biol**, 2003. 35(6):992-1002. **IF: 3,571**
15. A. Balla, G. Tuymetova, A. Tsiomenko, **P. Varnai**, and T. Balla, A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1  
**Mol Biol Cell**, 2005. 16(3):1282-95. **IF: 6,520**
16. G. Csordas, C. Renken, **P. Varnai**, L. Walter, D. Weaver, K.F. Buttle, T. Balla, C.A. Mannella, and G. Hajnoczky, Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria  
**J Cell Biol**, 2006. 174(7):915-21. **IF: 10,152**
17. G. Szanda, P. Koncz, **P. Varnai**, and A. Spat, Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake with and without the formation of high-Ca<sup>2+</sup> microdomains  
**Cell Calcium**, 2006. 40(5-6):527-37. **IF: 4,118**
18. L. Szidonya, K. Supeki, E. Karip, G. Turu, **P. Varnai**, A.J. Clark, and L. Hunyady, AT1 receptor blocker-insensitive mutant AT1A angiotensin receptors reveal the presence of G protein-independent signaling in C9 cells  
**Biochem Pharmacol**, 2007. 73(10):1582-92. **IF: 4,006**

19. Z.E. Toth, D. Zelena, Z. Mergl, E. Kirilly, **P. Varnai**, E. Mezey, G.B. Makara, and M. Palkovits, Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain  
**J Neurochem**, 2008. 104(3):653-66. **IF: 4,500**
20. T. Balla and **P. Varnai**, Visualization of Cellular Phosphoinositide Pools with GFP-Fused Protein-Domains  
**Curr. Protoc. Cell Biol**, 2009. 42: 24.4.1-24.4.27. **IF: -**
21. G. Turu, **P. Varnai**, P. Gyombolai, L. Szidonya, L. Offertaler, G. Bagdy, G. Kunos, L. Hunyady, Paracrine Transactivation of the CB1 Cannabinoid Receptor by AT1 Angiotensin and Other Gq/11 Protein-coupled Receptors  
**J Biol Chem**, 2009. 284(25):16914-21. **IF: 5,520 (2008)**
22. M. Szekeres, G. Turu, A. Orient, B. Szalai, K. Süpeki, M. Cserzo, **P. Varnai**, L. Hunyady, Mechanisms of angiotensin II-mediated regulation of aldosterone synthase expression in H295R human adrenocortical and rat adrenal glomerulosa cells  
**Mol Cell Endocrinol**, 2009. 302(2):244-53. **IF: 3,611 (2008)**
23. D. Hargitai, A. Pataki, G. Raffai, M. Füzi, T. Dankó, L. Csernoch, **P. Varnai**, G.P. Szigeti, A. Zsembery, Calcium entry is regulated by Zn(2+) in relation to extracellular ionic environment in human airway epithelial cells  
**Respir Physiol Neurobiol**, PMID 199995619 **IF: 2,035 (2008)**
24. B. Enyedi, **P. Varnai**, M. Geiszt, Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1-L $\alpha$  and intraluminal calcium  
**Antioxid Redox Signal**, PMID: 20095866 **IF: 6,190 (2008)**

### ***A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények***

Impakt faktor: **49,896**

Független hivatkozások száma: **197**

1. T. Balla, **P. Varnai**, Z. Hollo, and A. Spat, Effects of high potassium concentration and dihydropyridine Ca<sup>2+</sup>(+)-channel agonists on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells  
**Endocrinology**, 1990. 127(2):815-22. **IF: 4,438**
2. T. Balla, Z. Hollo, **P. Varnai**, and A. Spat, Angiotensin II inhibits K(+)-induced Ca<sup>2+</sup> signal generation in rat adrenal glomerulosa cells  
**Biochem J**, 1991. 273(Pt 2):399-404. **IF: 3,749**
3. G. Hajnoczky, **P. Varnai**, Z. Hollo, S.B. Christensen, T. Balla, P. Enyedi, and A. Spat, Thapsigargin-induced increase in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration and

aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells: interaction with potassium and angiotensin-II

**Endocrinology**, 1991. 128(5):2639-44.

**IF: 4,534**

4. W.F. Pralong, L. Hunyady, **P. Varnai**, C.B. Wollheim, and A. Spat, Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells

**Proc Natl Acad Sci U S A**, 1992. 89(1):132-6.

**IF: 10,480**

5. G. Hajnoczky, **P. Varnai**, L. Buday, A. Farago, and A. Spat, The role of protein kinase-C in control of aldosterone production by rat adrenal glomerulosa cells: activation of protein kinase-C by stimulation with potassium

**Endocrinology**, 1992. 130(4):2230-6.

**IF: 4,771**

6. N. Demaurex, W. Schlegel, **P. Varnai**, G. Mayr, D.P. Lew, and K.H. Krause, Regulation of Ca<sup>2+</sup> influx in myeloid cells. Role of plasma membrane potential, inositol phosphates, cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>], and filling state of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores

**J Clin Invest**, 1992. 90(3):830-9.

**IF: 8,389**

7. **P. Varnai**, N. Demaurex, M. Jaconi, W. Schlegel, D.P. Lew, and K.H. Krause, Highly co-operative Ca<sup>2+</sup> activation of intermediate-conductance K<sup>+</sup> channels in granulocytes from a human cell line

**J Physiol**, 1993. 472:373-90.

**IF: 4,795**

8. O.N. Osipenko, **P. Varnai**, A. Mike, A. Spat, and E.S. Vizi, Dopamine blocks T-type calcium channels in cultured rat adrenal glomerulosa cells

**Endocrinology**, 1994. 134(1):511-4.

**IF: 4,413**

9. **P. Varnai**, O.N. Osipenko, E.S. Vizi, and A. Spat, Activation of calcium current in voltage-clamped rat glomerulosa cells by potassium ions

**J Physiol**, 1995. 483 ( Pt 1):67-78.

**IF: 4.327**

\*osztott elsőszerzőség

Valamennyi közlemény összesített impakt faktora:

**298,862**

Összes / független hivatkozások száma:

**2045 / 1718**

Hirsch index (összes / csak független hivatkozással számolva): **24 / 21**



## ***Köszönetnyilvánítás***

*Köszönetemet fejezem ki Dr. Spät András akadémikus úrnak, aki először gyakorlatvezetőként, majd a diákkörös és a Ph.D. évek alatt témavezetőként megszerettette velem az élettant, és felkeltette érdeklődésemet a tudomány iránt. Köszönöm Dr. Fonyó Attila, Dr. Spät András és Dr. Hunyady László professzor uraknak, hogy intézetvezetőként biztosították számomra a lehetőséget, hogy az Élettani Intézet tagja lehessek. Vitathatatlan érdemük a tudományos megismerést alapvető értéknek tekintő, őszinte intézeti légkör megteremtése, ami a kutatómunka alapvető feltétele.*

*Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Balla Tamásnak, hiszen az értekezésben bemutatott tudományos munka döntő része az ő laboratóriumában készült. A vele való szakmai és baráti kapcsolat alapvetően meghatározta eddigi pályámat.*

*Köszönet Dr. Enyedi Péternek, Dr. Hajnóczky Györgynek, Dr. Szabadkai Györgynek és Dr. Rohács Tibornak a gondolatébresztő beszélgetésekért, a közös munkákért. Köszönettel tartozom valamennyi munkatársamnak hasznos tanácsaikért, az építő kritikákért. Lelkesítő volt együtt dolgozni a diákkörösökkel és a doktorandusz hallgatókkal, akiknek az együttműködéséért szintén hálás vagyok. A laboratóriumi asszisztensek és a gazdasági személyzet lelkiismeretes munkája ugyancsak köszönetet érdemel.*

*Végezetül köszönettel tartozom családomnak azért a békés és szerető légkörért, amellyel a mindennapokban körülvesznek. Türelmük és segítségük meghatározó szerepet játszott az értekezés elkészültében.*

## Rövidítések jegyzéke

Akt	Akt szerin-treonin kináz, protein kináz B
AngII	angiotenzin II
Arf	ADP ribozilációs faktor
ARNO	Arf nucleotide-binding-site opener
AT1 receptor	1-es típusú angiotenzin II receptor
Btk	Bruton tirozin kináz
CFP	cián fluoreszcens fehérje
DAG	diacilglicerol
EGF	epidermális növekedési faktor
FKBP12	FK506-kötő fehérje
FRB domén	FKBP12 és rapamycin kötő domén
FRET	fluoreszcens rezonancia energia transzfer
GRP1	general receptor for phosphoinositides-1
GST	glutation S-transferáz
InsP <sub>3</sub>	inozitol 1,4,5-triszfoszfát
IP <sub>3</sub> R	inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor
IP <sub>3</sub> R-LBD	inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor ligandkötő domén
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
LPA	lizofoszfát sav
mRFP	monomerekus piros fluoreszcens fehérje
mTOR	mammalian target of rapamicin
Ni <sup>2+</sup> -NTA	nikkel-nitrilotriacetic acid-agaróz
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PI 3-kináz	foszfatidilinozitol 3-kináz
PI 4-kináz	foszfatidilinozitol 4-kináz
PH domén	pleksztrin homológia domén
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PtdIns	foszfatidilinozitol
PtdInsP	foszfatidilinozitol 4-biszfoszfát
PtdInsP <sub>2</sub>	foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát
SDS-PAGE	nátriumdodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis
S.E.M.	az átlag hibája
STIM1	stromal interaction molekula 1
UBC6	ubiquitin-konjugáló enzim 6
TIRF mikroszkópia	total internal reflection mikroszkópia
Trp csatorna	tranziens receptor potenciál csatorna
YFP	sárga fluoreszcens fehérje