

Válasz Dr. Csernoch László opponensi bírálói véleményére

Szeretném megköszönni Dr. Csernoch Lászlónak, a MTA doktorának doktori értekezésem bírálatát, értékes kérdéseit.

A feltett kérdésekre válaszaim a következők:

1. A 10. ábrán bemutatott kísérletsorozattal célunk az volt, hogy egy PtdInsP₂ kötésre amúgy képes PH domént (a p130-as fehérje PH doménjét) úgy változtassunk meg, hogy az a plazmamembránhoz is kötődjön. Azonban miután nagyon-nagyon sok variációját elkészítettem az említett PH doménnek, sokáig egyik sem mutatott membránlokalizációt. Ezek után az a kiméra, amit a 10. ábra negyedik sorában láthatunk nemhogy szép, hanem csodálatos lokalizációnak bizonyult. Komolyra fordítva a szót, a membránlokalizáció mértéke a konfokális mikroszkópos felvételeken valóban nehezen ítéltető meg, különösen, ha egy konstrukció a citoplazmában is nagy mennyiségben jelen van. Lehet ugyan számolni egy membrán/citoplazma intenzitás arányt, ahogy azt tettük például a 12. ábrán bemutatott kísérletben, azonban tekintettel arra, hogy nehéz pontosan megmondani, mely pixelek felelnek meg a plazmamembránnak, az eredmény elég pontatlan lesz. Ennek kiküszöbölésére végeztük el a FRET vizsgálatokat, ami persze azt jelentette, hogy valamennyi PH domén kiméra esetében el kellett készíteni a CFP-s és YFP-s verziókat, azonban a FRET mérések esetén a PtdInsP₂ lebontás, és ily módon a lokalizáció megszűnésének hatására bekövetkező hányados változásból már objektív módon következtetni lehetett a kezdeti lokalizáció mértékére. A plazmamembrán lokalizációra tehát nem a konfokális képek, hanem az energiatranszfer mérésekből következtettünk.
2. A kérdés teljesen jogos. Mi magunk mindig is a PLCδ1 enzim PH doménjét vizsgáltuk és alkalmaztuk a sejtekben található PtdInsP₂ kimutatására, ugyanis *in vitro* mérésekből tudott volt, hogy nagy affinitással és specifikusan képes kötni ezt a lipidet. A PLCδ4 enzim PH doménje egy kollaborációs együttműködés keretében került a kezembe abból a munkacsoportból, ahol ezt az enzimet megklónozták (J Biol Chem 271, 25). Kérdésük az volt, hogy a PLCδ1 PH doménhez képest a PLCδ4 PH doménjének milyen a PtdInsP₂-kötő képessége, és hogy ez szerepet játszik-e az enzim intracelluláris lokalizációjában. A PLCδ3 esetében nem történt ilyen jellegű megkeresés, ezért ezzel nem is foglalkoztam.
3. A 14-17. ábrák olyan funkcionális vizsgálatokat mutatnak, amelyek jelátalakításában PtdInsP₃ képződésnek szerepe van. Erre utal a folyamatok nagymértékű wortmannin érzékenysége. A kiindulási munkahipotézisünk szerint, ha a sejtekben olyan doméneket expresszálunk, amelyek képesek kötődni a PtdInsP₃-hoz, akkor azt várjuk, hogy affinitásuktól függően különböző mértékben ugyan, de hasonlóan gátolják ezeket a folyamatokat (domináns negatív hatás). Tehát a kísérleteket kell összehasonlítani abból a szempontból, hogy az egyes PH domének egységesen viselkednek-e. És azt találtuk, hogy nem. Például volt olyan funkció, amit az egyik PH domén gátolt, míg egy másik funkciót ugyanaz a PH domén nem befolyásolt, vagy éppen fokozott. Természetesen számolhattunk volna szignifikanciát is az egyes PH domének hatásosságának összehasonlítására egy-egy sejtfunkción belül, de mint említettem, ebben az esetben nem ez volt a kérdés. Az eltérő gátlási mintázat ugyanis csak ahhoz kellett, hogy kidolgozzuk azt a munkahipotézist, mi szerint a megfelelő membránlokalizáció nemcsak a lipidkötéstől hanem más interakcióktól is függ, és amit aztán a megfelelő mutációkkal bizonyítottunk is. Konkrétan válaszolva a kérdésre, a 14. ábrán a Btk és a lipidet nem kötő R28C mutáns között azért nincs különbség, mert ez a PH domén (akárcsak az Akt PH) a sejtek letapadását nem befolyásolja. Az ARNO és a GRP1 PH domén azonban igen. Hogy a gátlást a 3G mutáns miért nem védte ki, az valóban kicsit bővebb magyarázatra szorul. Az

ARNO fehérje a humán populációban 2G és 3G formában egyaránt előfordul (JBC 275, 3221). Ugyan a 3G mutáns jelentősen kisebb PtdInsP₃-kötő képességgel rendelkezik, azért képes a PtdInsP₃ specifikus kötésére (JBC 275, 32816, 4. ábra), ami magyarázza a 2G-hez hasonló hatását. Az igazi, lipid kötésre nem képes mutációt az ARNO-val nagyfokú hasonlóságot mutató GRP1 fehérje esetében készítettük el (R284C). Ez a mutáns a sejtek letapadásának mérésekor még nem állt rendelkezésre, azonban a szétterülés mérésekor már igen, és amint az a 15. ábrán jól látszik, valóban ki is védte a GRP1 gátló hatását.

4. Az előző pontban részben válaszoltam a kérdésre. A „+wm” megjelölés két oszlop esetében valóban szerencsétlen és félreérthető. Az egyik a GFP, a másik a BtkPH-GFP (szomszédos oszlopok) esetre vonatkozik.
5. A Ca²⁺ mérések során sosem alkalmaztam kalibrációt, ugyanis mindig elegendő volt az az információ, hogy a citoplazmatikus Ca²⁺-szint emelkedik-e vagy sem, illetve hogy a maximális értékét milyen késéssel éri el. Az ábra szövegben utaltam arra, hogy a melegebb színek magasabb Fura hányadosnak felelnek meg. A “vad típus” megjelölés a az InsP₃-kötő doménokra vonatkozik, ami létrehozta a Ca²⁺-jel késését, illetve teljes gátlását. Emellett kontrollként olyan mutánsokat is használtunk, amelyek nem kötik az InsP₃-t, és amelyek megnyugtató módon nem is gátolták a Ca²⁺-szignál kialakulását. Ezekkel a kísérletekkel azonban azt kívántuk bemutatni, hogy az InsP₃ puffrolásnak funkcionális következménye van a sejtekben. Az InsP₃-kötő doménok InsP₃-kötő képességét korábban *in vitro* InsP₃-kötési assay-ben pontosan meghatároztuk (6. ábra), a közleményben és a dolgozatban csupán érdekességgént, illetve a módszer érzékenységeinek szemléltetésére jegyeztem meg, hogy ez az affinitás különbség még a funkcionális mérések során is érzékelhető volt, azonban ezt a különbséget szigorú statisztikai vizsgálatokkal valóban nem támasztottam alá.
6. Megállapítottuk, hogy az endogén receptor aktivációért az InsP₃ receptor LBD-jén belül a C-terminális 427-605 aminosavakból álló helikális rész a felelős, ami egészen jól átfed az úgynevezett RIH (rianodin receptor és InsP₃ receptor homológia) domének egyikével. Ezek a RIH domének olyan mintegy 200 aminosavból álló domének, amelyek nagyfokú azonosságot mutatnak a ryanodin és az InsP₃ receptorok között, illetve más fehérjében is megtalálhatók (TIBS 25, 48). Érdekes módon az InsP₃ receptorban és a rianodin receptorban egyaránt két-két darab RIH domén található (patkány 1-es típusú InsP₃ receptor: 462-677 és 1164-1371, humán rianodin 1 receptor: 431-643 és 2157-2365). A kérdés az volt, hogy amennyiben ezeket a darabokat az ER felszínére irányítjuk, képesek lesznek-e az izolált LBD-hez hasonlóan aktiválni az endogén InsP₃ receptort. Ha igen, akkor ezzel funkciót rendelhetünk a RIH domének mellé. Valamennyi konstrukció elkészült, azonban aktivációt nem sikerült kimutatnunk, tehát ez a hipotézis nem igazolódott. A RIH doménon kívül más próbálkozásunk nem volt, és erre vonatkozó irodalmi adatot sem ismerek.
7. Ezekben a kísérletekben a fluoreszcensen jelölt STIM1-t és az Orai1-t együttesen expresszáltuk a sejtekben. Mivel az Orai1 jelöletlen volt, az oszcillációt mutató sejtekről csak annyit tudunk mondani, hogy bennük a STIM1 expressziója viszonylag magas volt, és azt csak feltételezzük, hogy ez egyben nagyobb Orai1 expressziót is jelentett. Az Orai1 overexpressziója egyébként általában nem oszcillációt, hanem inkább a Ca²⁺-szignál gátlását eredményezi. Esetünkben nagy valószínűséggel arról van szó, hogy a Ca²⁺-raktárak ürítésének hatására az egyidejű STIM1/Orai1 overexpresszió hatalmas mértékű Ca²⁺-beáramlás hoz létre, amit a tapszigarginnal történt ingerlés is mutat. Figyelemre méltó, hogy az oszcilláció kizárólag a Ca²⁺-mobilizáló hormonnal történt ingerlés esetén jelentkezett, tehát létrejöttében nagy valószínűséggel a PLC vagy az InsP₃ receptor Ca²⁺ által történő szabályozásának, és nem az Orai1 esetleges inaktivációjának vagy a STM1 és

az Orai1 közötti kommunikáció változásának van szerepe, bár ez utóbbi sem zárható ki. A mechanizmus vizsgálatára érdekes lenne például megnézni, hogy változik a sejtek InsP_3 tartalma, de ilyen típusú kísérleteket még végeztünk, illetve azt sem vizsgáltuk, hogy pontosan milyen expressziós tartományban és milyen expressziós arányok esetén figyelhető meg a jelenség.

8. A jelenségről, miszerint együttes STIM1 és Orai1 overexpresszió során jelentős időbeli eltolódás figyelhető meg a sejtek között a tapszigarginnal aktivált kapacitativ Ca^{2+} -beáramlás kialakulásában, annyit sikerült megállapítani, hogy ennek oka a STIM1 plazmamembránhoz érkezésének, egyedi sejtek között megfigyelhető eltérősége. A jelenséget ATP ingerlés esetén soha nem láttam, bár agonista hatására elsősorban a plazmamembrán közeli perifériás ER ürül, tehát az esetleges különbségeket sokkal nehezebb megfogni. Kimutatták, hogy a STIM1 kötődni képes a mikrotubulusok pozitív végén található fehérjékkel (EB1) ami alapján jelenleg úgy gondoljuk, hogy a mikrotubulusok növekedése a motorja a STIM1 ER-ban történő laterális mozgásának, tehát azt lenne érdekes megvizsgálni, hogy ilyen szempontból van-e különbség például a különböző osztódási állapotban lévő sejtek között, illetve, hogy a mikrotubuláris rendszer állapota mutat-e korrelációt a Ca^{2+} -beáramlás kialakulásával. A STIM1 expresszió és a motilitás mértéke között feltűnő összefüggést nem láttam, bár a jelenséget részletesen nem is vizsgáltam. A motilitás közvetlen mérésére sem történtek kísérletek.
9. A rapamicin hatására bekövetkező rapa-folt képződés időbeli lefolyására jellemző, hogy szinte azonnal, bizonyos pontokban kezdődik a membránok közötti kapcsolat kialakulása, majd ezek folyamatos növekedésével, néhány perc elteltével alakul ki a jellegzetes kép, ami egyébként kísértetiesen hasonlít ahhoz, amit igen jelentős STIM1 overexpresszió esetén is látunk (34. ábra), és amit a plazmamembrán és az ER nagy kiterjedésű egymáshoz simulásának tekintünk. E lefolyás összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy az ER és a plazmamembrán között nyugalomban is léteznek úgynevezett kontakt pontok, ahol esély van a plazmamembránba irányított FKBP és az ER felszínre irányított FRB találkozására. Evidensen ezeken a helyeken a két membrán távolsága olyan, hogy létre tud jönni a kapcsolat a két domén között, amit aztán a rapamicin csak stabilizál. A kontakt pontok felületüket tekintve ugyanakkor igen kis kiterjedésűek, azaz nem akadályozzák az Orai1 és a STIM1 közötti kapcsolat kialakulását, sőt azáltal, hogy egymás közelében tartják a két membránt, inkább segítik azt.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Professzor úr értékes bírálatát, kérdéseit. Köszönöm, hogy a nyilvános védés kitűzését javasolta. Egyúttal kérem Professzor urat válaszaim elfogadására.

2011. április 24.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Várnai Péter
doktorjelölt