

Válasz Dr. Panyi György opponensi bírálói véleményére

Szeretném megköszönni Dr. Panyi Györgynek, a MTA doktorának doktori értekezésem bírálatát, elgondolkodtató kérdéseit.

Válasz az általános észrevételekre:

Az inozitol lipidek átalakulásait végző enzimek közül, amelyeket a 4. ábrán mint „kinázok” és „foszfatázok” jelöltem, jelenleg egészen pontosan 19 db kinázt és 28 db foszfatázt ismerünk. Ezek részletes felsorolását feleslegesnek tartottam, azonban az összefoglaló közleményre, amely valamennyit részletesen bemutatja (Sasaki és mtsai 2009), ugyan kicsit nehezen megtalálható helyen, a 4.4.1 fejezetben hivatkoztam.

Egyetértek, hogy talán egyszerűbb lett volna közös néven nevezni az általában használt extracelluláris oldatot. Egyébként van is neve, amit a napi rutin során használunk, egy amerikai kollégámról neveztem el, ezt azonban nem akartam a dolgozatban alkalmazni. Viszont annak, hogy minden módszernél megtalálható az oldat összetétele, annyi előnye azért van, hogy nem kell keresgetni más fejezetben ezt az információt. A szuszpenziós mérések során használt médium (3.10 fejezet) valóban megegyezett az egysejtes mérések során alkalmazottal (3.8 fejezet).

Az egyes fejezetek közötti összefüggést, az egységes képet a Kutatás jelentősége fejezetben próbáltam felvázolni, ami valószínűleg túlságosan szűkszavúra sikeredett. Előadásomban megpróbálom érvényesíteni ezt a szempontot is.

A feltett kérdésekre válaszaim a következők:

1. Amennyiben azt látjuk, hogy a membránlokalizáció megszüntetésének (jelen esetben a PtdInsP_2 depléciónak) nincsen hatása a FRET hányados változására, akkor annak legvalószínűbb oka a fluoreszcensen jelzett fehérjék alacsony expressziója. A membrán lokalizációt mutató PH domének esetében ugyanis az úgynevezett aspecifikus FRET-ről van szó, amikor is az energiatranszfer nem a molekuláris interakció (ennek következménye a specifikus FRET), hanem az igen kis kompartmentben bekövetkező hatalmas koncentrációnövekedésből adódó közelség hatására jön létre. Azt, hogy adott esetben specifikus vagy aspecifikus energiatranszferről van-e szó legegyszerűbben úgy lehet eldönteni, hogy vizsgálni kell az energiatranszfer létrejöttét a fluoreszcens fehérjék expressziójának függvényében. A specifikus FRET gyakorlatilag valamennyi, már mérhető jel esetében kialakul és elér egy bizonyos értéket, míg az aspecifikus FRET egy bizonyos expressziós szint felett jelenik meg, és egy ideig egyenes arányban változik az expresszióval. Ezekből a mérésekből lehet egyébként meghatározni a méréshez szükséges expressziós szintet is.
2. A bíráló kérdésével tökéletesen rávilágított a konfokális mikroszkópos megközelítés és az energiatranszfer mérés közötti különbségre. Abban az esetben ugyanis, amikor egy egyébként a membránokhoz valamilyen mértékben kötődő fehérje a citoplazmában is elég nagy mennyiségben jelen van, a konfokális mikroszkóppal nem tudjuk megkülönböztetni a két frakciót. Ezzel szemben a FRET mérést nem befolyásolja adott konstrukció citoplazmatikus jelenléte. Az energiatranszferhez szükséges molekuláris közelség, ami egyébként jóval kisebb a mikroszkóp felbontásánál, pontosabban e közelség változása a membránlokalizáció megszűnése következtében jól mérhető FRET jelet ad. Ezért tehát a konfokális képeken a lokalizáció számszerűsítésével nem is próbálkoztunk. Mint említettem, a fluoreszcens fehérjék citoplazmatikus jelenléte (pl. CFP és/vagy YFP) a

FRET mérést nem befolyásolja, megfelelő korrekciók elvégzésével (háttér és átbeszélés korrekció) még a hányados abszolút változásai is azonossá tehetők.

3. A PLC δ 1 PH domén esetében nem tudjuk, hogy mi lehet az a fehérje, amivel kölcsönhat a PH domén. Talán egyszer kiderül. A GRP1 esetében a dolgozatban is említtem, hogy sikerült kimutatni, hogy a PH domén és az Arf6 között alakul ki az a kölcsönhatás, ami szükséges a membránlokalizációhoz. Egy egészen új közleményben (JBC M111.233015) kristálystruktúra meghatározással a FAPP1 PH domén esetében aminosav szinten azonosítják egy másik fehérje, az Arf1 kötési részleteit. Figyelemre méltó, hogy mindkét esetben az a felszín felelős a fehérje kötésért, ahol a PLC δ 1 PH doménben azonosított 8 aminosav is található.
4. A PLC δ 1 PH doménhez képest a PLC δ 4 jelentősen kisebb affinitással kötődik a PtdInsP $_2$ -hez. Ez jól látszik a konfokális képeken (12. ábra A panel). A lokalizáció számszerűsítést követően, a normalizált görbék valóban kicsit különböző kinetikát mutatnak, azonban ezzel az elemszámmal ez nem szignifikáns különbség. A bemutatott kísérletnek az volt a lényege, hogy bizonyítsuk, élő sejtekben a PLC δ 4 PH domén is alkalmazható a PtdInsP $_2$ kimutatására. Gondolati úton elég nehéz azt kitalálni, hogy ha találnánk különbséget a kinetikák között, akkor az megfelelne annak, ami az ábrán látszik. A PLC δ 1 PH domén esetében a lipid szekvesztráció miatt ugyan több a plazmamembrán PtdInsP $_2$ tartalma, amiből angiotenzin II hatására feltehetően több InsP $_3$ keletkezik. A nagyobb Ca $^{2+}$ -szignál pozitívan befolyásolhatja a PLC aktivitást, ami csökkentheti a PtdInsP $_2$ reszintézis hatásosságát, tehát a PtdInsP $_2$ emelkedése lassabb lesz. Ugyanakkor a PLC δ 1 PH domén a nagyobb affinitás miatt előbb jelzi a PtdInsP $_2$ megjelenését. Nehéz megjósolni a folyamatok végeredményét, amennyiben a kérdést megnyugtatóan tisztázni szeretnénk, ez csak további kísérletekkel lehetséges.
5. Az ARNO fehérje a humán populációban 2G és 3G formában egyaránt előfordul (JBC 275, 3221). Ugyan a 3G mutáns jelentősen kisebb PtdInsP $_3$ -kötő képességgel rendelkezik, azért képes a PtdInsP $_3$ 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, teljes mértékben hatástalannak bizonyult, ami arra utal, hogy a gátló hatás nem az overexpresszió, hanem a lipidkötés következménye.
6. Az InsP $_3$ -kötő domének egyértelmű expresszióját mutató sejtekre az a jellemző, hogy bennük Ca $^{2+}$ -mobilizáló agonistával nem lehet Ca $^{2+}$ -szignált kiváltani. A 22. ábrán ezek a sejtek, mint nem válaszoló sejtek vannak feltüntetve. Olyan sejtekben, amelyekben igen alacsony az expresszió, olyan alacsony, hogy szinte már alig tudjuk a fluoreszcencia méréssel kimutatni, kiváltható a Ca $^{2+}$ -jel, azonban jelentős időbeli késéssel. A fluoreszcencia mérés bizonytalanságából adódóan a fluoreszcencia és a késés közötti összefüggés nagy szórást mutatott. Az említett kísérletekkel azonban azt kívántuk bemutatni, hogy az InsP $_3$ pufferoslásnak funkcionális következménye van a sejtekben. Az InsP $_3$ -kötő doménok InsP $_3$ -kötő képességét korábban *in vitro* InsP $_3$ -kötési assay-ben pontosan meghatároztuk (6. ábra), a dolgozatban és a közleményben csupán érdekességgént, illetve a módszer érzékenységének szemléltetésére jegyeztem meg, hogy ez az affinitás különbség a funkcionális mérések során is látható volt.
7. A kérdés tehát az, hogy az UBC6 enzim irányítót szekvenciájának (233-250) N-terminális végéhez kapcsolt domén az ER lumenben vagy a citoplazmában helyezkedik el. Egyrészt az irodalomban fellelhető adatok alapján is a citoplazmatikus lokalizáció a valószínű

(citoplazmába juttatott antitestekkel kimutatható az UBC6 fehérje), másrészt a p130-as fehérje PH doménjével kapott adataink is erre utalnak. Ez utóbbi esetében ugyanis a szintén N-terminálisan elhelyezkedő, ER-hoz targetált InsP_3 -kötő domén a citoplazmatikus verzióval megegyező hatást gyakorolt a Ca^{2+} -szignálra, ami azt jelenti, hogy az ER citoplazmatikus felszínén található (22. és 23. ábra). Ahogy a bíráló javasolta, fluoreszcencia quenching-gel, vagy más fluoreszcens eljárással (pl. FRET) vizsgálható lenne a kérdés, különösen, ha rendelkezésre állna egy biztosan felszíni vagy luminális fehérje. Ilyen vizsgálatok azonban nem történtek.

8. Az ER-hoz irányított InsP_3 receptor LBD-nal a lokális InsP_3 koncentrációját kívántuk csökkenteni, és a lokális InsP_3 hatásokat vizsgálni. Az, hogy ez a konstrukció aktiválja az endogén receptorokat, egy meglehetősen meglepő felfedezés volt, nem is fogom elfelejteni soha, amikor rájöttem. A lehetséges hatásmechanizmus után kutatva találtunk egy közleményt, amelyben biokémiai módszerekkel kimutatták, hogy a receptor LBD-ja képes kötődni a C-terminális pórus doménhez (Boehning és mtsa 2000). Munkánk jelentősége, hogy igazoltuk ennek a kölcsönhatásnak a funkcionális következményét élő sejtben, és megállapítottuk, hogy InsP_3 kötéstől függetlenül, a LBD C-terminális helikális darabja elegendő a kölcsönhatáshoz, illetve ezen információk ismeretében módosítottuk a receptor aktivációját magyarázó modellt. Arra vonatkozóan, hogy a LBD hatását ugyanazon a fehérjén, a tetramer egy másik tagján, esetleg egy másik tetrameren fejt ki, kísérleteinkből nem vonható le következtetés.
9. A TrpM8 csatornáról valóban jól ismert, hogy működéséhez szükséges a plazmamembránban jelen lévő PtdInsP_2 . A 31. ábra az eredeti közlemény megfelelő ábrájának csak egy részét mutatja, azt a kísérletet, amit valóban én végeztem, amikor is a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció változásából következtettem a csatorna nyitottsági állapotára. Ami azonban ez esetben igazán érdekes, az ábra másik részén van, ami egy patch-clamp mérés (Rohács Tibor kollaborációs együttműködés), és amiből kiderül, hogy a PtdInsP_2 depléciós rendszer patch-clamp körülmények között is működik. Evidensen ez utóbbi adatok és a konklúzió kimaradt a dolgozatból.
10. Igen, ez a jó hír, a kicsit rossz hír pedig az, hogy többet is. Az utóbbi időszakban számos közlemény jelent meg, amelyekben olyan fehérjékről számolnak be, melyek kötődnek az Orai1-hez. Az egyik, egy úgynevezett CRAC regulator 2A (Nature Cell Biology 12, 436), amelyről kimutatták, hogy része a STIM1-Orai1 komplexnek. E fehérje tartalmaz egy EF-hand-et, ily módon érzékelni képes a citoplazmatikus Ca^{2+} -szintet. Ez utóbbi emelkedése során leválik az Orai1-ről, aminek következménye a komplex szétesése, tehát egy negatív visszacsatolás valósulhat meg ezzel a mechanizmussal. Egy másik fehérje a Golli (Biochem J 430, 453), amelyik overexpresszáva gátolja az Orai1-t, ugyanakkor e gátlás a STIM1 overexpressziójával kivédhető. E fehérjéről szintén kimutatták, hogy része a komplexnek. Aztán ott vannak a Trp csatornák. Ez év márciusában jelent meg egy közlemény, amely a TrpC1-ről mutatja ki, hogy kapcsolódni képes a STIM1-Orai1 komplexhez (PLoS Biol 9, e1001025).

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