MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE EMLŐS SEJTEK JELÁTVITELI FOLYAMATAIBAN

VÁRNAI PÉTER

SEMMELWEIS EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR ÉLETTANI INTÉZET

BUDAPEST

2010

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.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés	1
1 1 Az inozitol lipidek mint hírvivő molekulák	2
1.2 Az inozitol 1.4.5-triszfoszfát receptor	. 4
1.3 A kapacitatív Ca^{2+} -beáramlás.	. 4
2. Célkitűzések	8
3. Módszerek	
3.1 Molekuláris biológia	9
3.2 Sejtvonalak, transzfekció	10
3.3 Konfokális mikroszkópia	11
3.4 Sejtek letapadásának mérése	11
3.5 Sejtek szétterülésének vizsgálata	12
3.6 Foszfolipáz C aktivitás mérése	12
3.7 Fehérje expresszió kinetikájának mérése	13
3.8 Citoplazmatikus [Ca ²⁺] mérése egyedi sejtekben	13
3.9 Mangán quench mérés egyedi sejtekben	14
3.10 Citoplazmatikus [Ca ²⁺] mérése sejtszuszpenzióban	14
3.11 Fluoreszcens rezonancia energiatranszfer mérése sejtszuszpenzióban	15
3.12 Total internal reflection mikroszkópia	15
3.13 A transzferrin receptor endocitózisának mérése áramlásos citometriával	16
3.14 Rekombináns fehérjék előállítása	16
3.15 <i>In vitro</i> kötési vizsgálatok	16
4. Eredmények és Megbeszélés	18
4.1 A lipidkötés és a plazmamembrán lokalizáció összefüggésének vizsgálata	
PtdInsP ₂ -kötő pleksztrin homológia domének esetében	18
4.1.1 A p130-as fehérje GFP-vel jelölt PH doménje nem kötődik a plazma-	
membránhoz	18
4.1.2 A PLCδ ₁ PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék inozitol-foszfát kötésének	
összehasonlítása	19
4.1.3 A PLC δ_1 PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék PtdIns P_2 -kötő	
képességének összehasonlítása	21
4.1.4 A PLC δ_1 PH C-terminális részében található, β 5 és β 6 redők közötti szakasz	
szerepet játszik a plazmamembrán lokalizáció kialakulásában	24
4.1.5 A PLC δ_1 és a PLC δ_4 PH domének inozitol-foszfát kötésének	
és membránlokalizációjának összehasonlítása	26
4.2 Deding D. 1-84% DII dománaly szerek egy 1/44 ferri sign (1)	30
4.2 Fluinsr3-koto FH domenek osszenasoniito iunkcionalis vizsgalata	29
4.2.1 A Fums <i>P</i> ₃ koleste kepes, nuoreszcens tenerjenez tuzionalt PH domenek	20
tikesztiese, sejteti betüll lokalizaciojuk vizsgalata	29
4.2.2 A I tullist 3-KOLO F II uollellek hatása a sejtek telapauasala	
4.2.3 A FILITISF 3-KOLO F TI UUTHETIEK HALASA A SEJIEK SZELLETÜLESELE	32

424 A PtdInsPa-kötő PH domének hatása a seitekben EGE ingerlés során	
hekövetkező PI Cy aktiválódásra	32
4 2 5 A PtdIns P ₂ -kötő PH domének hatása a seitek fehérie expresszáló kénességére	32
4 2 6 Az inozitol lipid kötést nem befolvásoló ugyanakkor funkcionálisan nem	
működő Akt és GRP1 PH domén mutánsok vizsgálata	.36
4 2 7 A GRP1 PH doménie és az Arf6 fehérie közötti kölcsönhatás kimutatása	39
	•
4.3 Az InsP ₃ receptor aktiválódás molekuláris mechanizmusának vizsgálata	.41
4.3.1 A citoplazmatikusan expresszált Ins P_3 -kötő domének hatása az ATP	
ingerléssel kiváltott Ca ²⁺ -szignálra	.41
4.3.2 Az ER citoplazmatikus felszínére irányított InsP ₃ -kötő domének hatása az	
ATP ingerléssel kiváltott Ca ²⁺ -szignálra	44
4.3.3 Az InsP ₃ receptor ER citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő	
doménje a sejten belüli Ca ²⁺ -raktárak ürülését idézi elő	44
4.3.4 Az InsP ₃ receptor ER citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő	
doménje aktiválja az endogén InsP ₃ receptorokat	46
4.3.5 Az InsP ₃ receptor ligandkötő doménjének C-terminális, helikális szerkezetű	
része felelős az aktiváló hatásért	.48
4.3.6 Az InsP ₃ receptor aktiválódásának lehetséges mechanizmusa	51
4.3.7 A lokális InsP ₃ pufferolás funkcionális jelentőségének vizsgálata	.52
4.4 A sejtmembrán PtdInsP ₂ szintjének változtatására alkalmas rendszer	
fejlesztése és jellemzése	. 54
4.4.1 A plazmamembrán PtdIns P_2 mennyiségének csökkentésére alkalmas	
molekularis rendszer kidolgozasa	. 55
4.4.2 A plazmamemoran PtdIns P_2 depleciojanak natasa a Ca -szignalra	. 57
4.4.5 A plazmamemoran PtdIns P_2 depleciojanak natasa a Trp Nis csatornara	39
4.4.4 A plazmamemoran Plains P_2 depleciojanak natasa a transzierrin és az EGF	<i>C</i> 1
A A 5 A PtdIns P. depléciós módszer széles körű felhasználása, a rendszer további	01
feilesztése	63
	. 05
45 A kanacitatív Ca ²⁺ beáramlás molekuláris mechanizmusának vizsgálata	65
4 5 1 A fluoreszcensen jelölt STIM1 molekula expressziójának és sejten belüli	. 00
lokalizációiának kancsolata	65
4 5 2 A fluoreszcensen jelölt STIM1 molekula reverzibilisen jelzi az ER	ve
$[Ca^{2+}]$ -iának változását	66
$4.5.3$ A STIM1 molekula mozgása nem függ a plazmamembrán PtdIns P_2	
szintiétől	.68
4.5.4 A STIM1 és Orai1 molekulák expressziójának hatása a Ca ²⁺ -szignálra	68
4.5.5 A plazmamembrán és az ER közötti mesterséges kapcsolat, a "rapa-folt"	
kialakítása	72
4.5.6 A "rapa-folt" hatása a STIM1 molekula lokalizációjára	.73
4.5.7 A fluoreszcens fehérjével jelölt Orai1 molekula működésének jellemzése	.74
4.5.8 A "rapa-folt" hatása az Orai1 molekula lokalizációjára	75
4.5.9 A plazmamembrán és endoplazmás retikulum közötti réstávolság	
növelésének hatása a STIM1 és Orai1 molekulákra	. 79
4.5.10 A kapacitatív Ca ²⁺ -beáramlásért felelős molekuláris komplex felépítésének	
modellie	79

	4.5.11 A plazmamembránban található PtdIns(4) <i>P</i> hatása a STIM1/Orai1-mediált Ca ²⁺ -beáramlásra	79
5.	Az új tudományos eredmények összefoglalása	81
6.	A kutatás jelentősége	82
7.	Irodalomjegyzék	83
8.	 Saját közlemények 8.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények 8.2 A Ph.D. fokozat megszerzését követő egyéb közlemények 8.3 A Ph.D. fokozat megszerzése előtti közlemények 	90 92 94
9.	Függelék: az értekezés alapjául szolgáló, legfontosabbnak ítélt öt eredeti közlemények másolata	96

Rövidítések jegyzéke

Alet	Akt szerin-treonin kináz protein kináz B	
ΔησΗ	angiotenzin II	
Arf	ADP ribozilációs faktor	
ARNO	Arf nucleotide-binding-site opener	
AT1 recentor	1-es tínusú angiotenzin II recentor	
Rtk	Bruton tirozin kináz	
CFP	cián fluoreszcens fehérie	
DAG	diacilglicerol	
EGF	enidermális növekedési faktor	
FKBP12	FK 506-kötő fehérie	
FRB domén	FKBP12 és rapamycin kötő domén	
FRET	fluoreszcens rezonancia energia transzfer	
GRP1	general receptor for phosphoinositides-1	
GST	glutation S-transferáz	
InsP ₃	inozitol 1 4 5-triszfoszfát	
IP ₃ R	inozitol 1 4 5-triszfoszfát receptor	
IP ₃ R-LBD	inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor ligandkötő domén	
GFP	zöld fluoreszcens fehérie	
LPA	lizofoszfát sav	
mRFP	monomerikus piros fluoreszcens fehérje	
mTOR	mammalian target of rapamicin	
Ni ²⁺ -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	
РКС	protein kináz C	
PLC	foszfolipáz C	
PtdIns	foszfatidilinozitol	
PtdInsP	foszfatidilinozitol 4-biszfoszfát	
PtdInsP ₂	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	

1. Bevezetés

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 válaszát 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 (Hokin és Hokin, 1953). Munkájuk nyomán hamarosan elfogadottá vált, hogy számos hormon és neurotranszmitter hatásmechanizmusában az egyik legfontosabb kezdeti lépés a (PLC) foszfolipáz C enzim aktiválódása, ami a plazmamembránban található foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát (PtdInsP₂) hidrolízisét eredményezi. A keletkező két termék, az inozitol (1,4,5)-triszfoszfát (Ins P_3) és a diacilglicerol (DAG) hatására aztán létrejön a Ca²⁺-szignál, illetve aktiválódik a protein-kináz C enzim, amelyek fontos szerepet játszanak a biológiai válasz elindításában. A foszfolipid lebomlása és a Ca²⁺-jel kialakulása közötti kapcsolat akkor lett érthető, amikor Robert Michell felvetette az foszfoinozitol és a citoplazmatikus [Ca²⁺] változás közötti kapcsolatot (Michell, 1975). Ezt a feltételezést Irvine és Berridge az InsP₃ hatására bekövetkező, nem mitokondriális raktárakból történő Ca²⁺felszabadulás felfedezésével bizonyított (Streb és mtsai, 1983). Ettől a ponttól kezdve az InsP₃ és citoplazmatikus [Ca²⁺] változáson keresztül működő hírvivő rendszer kutatása felgyorsult. Az InsP₃ receptor és a Ca²⁺-raktárak ürülése következtében aktiválódó kapacitatív Ca²⁺-beáramlás (lásd alább) 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 PtdInsP₂, mint az InsP₃ és a DAG előanyaga rendelkezik.

1.1 Az inozitol lipidek mint hírvivő molekulák

Miközben a hírvívő rendszerrel kapcsolatban egyre több fontos részlet vált ismertté; azonosították például a PLC enzim több altípusát és a PKC enzimcsalád számos tagját, továbbá felfedezték a PtdIns P_2 keletkezésében résztvevő foszfatidilinozitol 4-kináz (PI 4kináz), és 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) (Auger és mtsai, 1989; Otsu és mtsai, 1991; Schu és mtsai, 1993). 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 enzimről tudunk. Az enzimekről, beleértve az általuk katalizált folyamatokat, a közelmúltban jelent meg egy kiváló összefoglaló közlemény (Sasaki és mtsai, 2009). 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 PtdInsP₂ kötését fedezték fel (Harlan és mtsai, 1994), 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 (Lemmon, 2008). 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 PLC δ_1 fehérje PH doménjének felhasználásával sikerült egy PtdIns P_2 kimutatására alkalmas szondát létrehozni (Stauffer és mtsai, 1998; Varnai és Balla, 1998), amit aztán sok, egyéb lipidek (PtdIns P_3 , PtdIns(3)P, PtdIns(4)P) kimutatására alkalmas szonda követett (Varnai és Balla, 2007). A módszer igen hasznosnak bizonyult egyrészt a különböző sejtorganellumok inozitol lipid tartalmának azonosításában, másrészt a lipidek élettani szerepének, jelentőségének vizsgálatában is alapvető módszerré vált (1. ábra).



1. ÁBRA Az inozil lipidek kimutatása fluoreszcens fehérjével jelölt lipidkötö domének alkalmazásával A feltüntetett szondákkal a következő inozitol lipidek kimutatására alkalmasak: $PLC\delta_1PH$ -GFP–PtdIns P_2 a plazmamembránban, AktPH-GFP–PtdIns P_3 a plazmamembránban, EEA1-FYVE-GFP–PtdIns(3)P a korai endoszómában, GFP-OSBP-PH–PtdIns(4)P a Golgi-ban és GFP-OSH2 tandem–PtdIns(4)P a plazmamembránban. (Varnai és Balla, 2006 alapján)

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 foszfoinozitid 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 sejtorganellumok 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 sejtalak kialakulása és a sejtmozgás. Az inozitol lipidek részt vesznek a legkülönfélébb patológiás állapotok kifejlődésében is (pl. sejttranszformáció, metasztázis, vírus- és baktériumfelvétel) (Carlton és Cullen, 2005; Downes és mtsai, 2005; Lecompte és mtsai, 2008; Michell, 2008).

1.2 Az inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor

Az InsP₃ molekula kötőhelyének leírását követően (Spät és mtsai, 1986), az InsP₃ receptort számos szövetből sikerült eleinte csak kitisztítani, végül egér kisagyból, ahol igen nagy mennyiségben található, megklónozni (Furuichi és mtsai, 1989). Három különböző típusát, és több splice variánsát azonosították különféle rágcsáló illetve humán szövetekből (Blondel és mtsai, 1993; Mignery és Sudhof, 1990; Sudhof és mtsai, 1991). Az InsP3 receptor egy hatalmas, mintegy 3000 aminosavból álló, a rianodin receptorral rokon fehérje. Legnagyobb mennyiségben az ER-ban található, de egyéb membránokból (plazmamembrán, nukleáris membrán, Golgi) is kimutatták (Rossier és mtsai, 1991). A fehérje működésének legfontosabb eleme nyilvánvalóan a csatornafunkció, melyen keresztül létrejön a Ca²⁺-szignál kezdetéért felelős ER-ból való Ca²⁺-kiáramlás. Azonban esetleges jelenléte az egyéb kompartmentekben, illetve az ER és a más organellumok (plazmamembrán, mitokondrium) között kialakuló kapcsolatok területén felveti annak lehetőségét, hogy más funkciója is lehet. Az InsP₃ receptor szabályozása összetett: legfontosabb két eleme a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ és maga az InsP₃ kötés, de ezen kívül több foszforilációs helyet, és számos citoplazmatikus fehérjével való kapcsolatát leírták (Foskett és mtsai, 2007). 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.

1.3 A kapacitatív Ca²⁺-beáramlás

A legtöbb sejttípusban az ingerlés hatására létrejövő kezdeti, általában igen nagymértékű, de átmeneti citoplazmaikus [Ca²⁺] emelkedést egy fenntartott Ca²⁺-szint fokozódás követi, melynek létrejöttében a kívülről történő, extracelluláris Ca²⁺-beáramlás játszik elsődleges szerepet. Magyarázatára Putney vezette be 1986-ban az úgynevezett "kapacitatív Ca²⁺beáramlás" teóriát, amely szerint az Ins*P*₃-mal üríthető intracelluláris Ca²⁺-raktárak Ca²⁺- tartalmának csökkenése vezet a plazmamembránon keresztüli Ca²⁺-beáramláshoz (Putney, 1986). A teóriának egyik fontos pillére az a megfigyelés, miszerint a mechanizmus beindulásához nem feltétlenül szükséges a PLC enzim aktiválása (azaz InsP3 képződés). A Ca^{2+} -raktárak Ins P_3 -tól független ürítése -amit elérhetünk például a raktárak Ca^{2+} -felvételét gátló SERCA inhibitor thapsigargin adásával- is elégséges a Ca²⁺-beáramlás fokozásához. Bár elektrofiziológiai módszerekkel sikerült azonosítani egy, a tulajdonságai alapján kapacitatív Ca²⁺-beáramlásnak tűnő áramot (I_{CRAC}) (Hoth és Penner, 1992; Zweifach és Lewis, 1993), aminek jellemzése "egy csatorna" szinten is megtörtént (Kerschbaum és Cahalan, 1999), 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 kapacitatív Ca²⁺-áramért felelős csatornának, azonban az azonosságot nem sikerült megnyugtatóan tisztázni (Parekh és Putney, 2005; Venkatachalam és Montell, 2007). Ugyancsak számos elképzelés született annak magyarázatára, hogy mi lehet a kapcsolat a belső Ca²⁺-raktárak és a Ca²⁺-beáramlás között. Berridge például már 1995-ben felvetette, hogy az InsP₃ recepor és a plazmamembrán közötti fizikai kapcsolat szerepet játszhat ennek a jelenségnek a kialakulásában (Berridge, 1995), de ezt az elképzelést máig sem sikerült igazolni. Mérföldkő volt a kapacitatív Ca^{2+} -beáramlás kutatásában az a felismerés, hogy egy immunológiai kórkép, a súlyos kombinált immunhiány (SCID) lényege a kapacitatív Ca2+beáramlás károsodása (Partiseti és mtsai, 1994), 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 Ca²⁺-raktárak [Ca²⁺]-jának érzékelésére (Liou és mtsai, 2005; Roos és mtsai, 2005). 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 kapacitatív Ca²⁺-csatornának bizonyuló fehérjét, amit Orai1-nek neveztek el (Vig és mtsai, 2006; Zhang és mtsai, 2006). A két fehérje együttes expressziójával számos sejtes rendszerben sikerült a kapacitatív Ca²⁺-beáramlásnak megfelelő jelenséget létrehozni, és bizonyítani, hogy e két fehérje képezi a kapacitatív Ca-beáramlás molekuláris alapját (Luik és Lewis, 2007; Mercer és mtsai, 2006; Peinelt és mtsai, 2006; Soboloff és mtsai, 2006). 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 (2. ábra és 3. ábra). Mutációs megközelítéssel

bizonyítani, hogy az Orai1 molekula valóban Ca²⁺-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 (Cahalan, 2009; Schindl és mtsai, 2009; Varnai és mtsai, 2009).

hSTIM1	EF	SA	M TM c	oiled-coil		D		S/P	K
1	54 101	120	204 215 234 238		389	484	60	0 629	672 685
hSTIM2	EF	SA	M TM c	oiled-coil		D	P/H/E		ĸ
1	57 105	123	205 219 238 242		393	487 52	3 595 6	30 651	730 746

2. ÁBRA A humán STIM1 és STIM2 molekulák doménfelépítése

EF: luminális alacsony affinitású Ca^{2+} -kötőhely, SAM (steril α motif): oligomerizáció, TM: transzmembrán domén, D: savas aminosavakban gazdag rész, K: bázikus aminosavakban gazdag rész, S/P: szerin/prolin aminosavakban gazdag rész, P/H/E: prolin/hisztidin/glutamátsav aminosavakban gazdag rész. (Varnai és mtsai, 2009 alapján)



3. ÁBRA A humán Orai1 feltételezett szerkezete, és az Orai1, 2 és 3 molekulák aminosavsorrendjének összehasonlítása

A molekula a szerkezet predikció alapján négy transzmembrán (TM1-4) doménnel rendelkezik, N- és Cterminális végei a citoplazmába nyúlnak. A színes karikák a felsorolt funciókért felelős konzervált aminosavakat jelzik. (Varnai és mtsai, 2009 alapján) Összefoglalásként a 4. ábrán ábrázoltam a foszfoinozitid, $InsP_3$ és citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ változáson keresztül működő jelpályát. Munkánk során célunk a jelátalakítási folyamat molekuláris mechanizmusainak tisztázása volt, amit alapvetően a molekuláris kölcsönhatások feltárásával igyekeztünk elérni.



4. ÁBRA A foszfoinozitid, Ins*P*₃, citoplazmatikus [Ca²⁺] jelpálya sematikus ábrázolása GPCR: G proteinhez kapcsolt receptor, TKR: tirozin-kináz receptor, PM: plazmamembrán, Mito: mitokondrium.

2. Célkitűzések

- 1. Az inozitol lipid-kötő doménnel rendelkező molekulák plazmamembrán lokalizációs képessége alapvető szerepet játszik működésükben. PtdInsP₂ 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 PtdInsP₃-függő sejtfunkciókra 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 kölcsönhatás ért, 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 pufferolás 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 PtdInsP₂ tartalmának akut csökkentésére élő sejtben. A módszer működését ismerten PtdInsP₂-függő folyamatokra gyakorolt hatás kimutatásával kívántuk ellenőrizni.
- 5. A kapacitatív Ca²⁺-beáramlásért felelős, újonnan azonosított humán STIM1 és Orai1 molekulák fluoreszcens fehérjével jelölt verzióinak elkészítésével és felhasználásával tisztázni kívántuk aktivációjuk kinetikáját, illetve a köztük kialakuló kölcsönatás 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.

3. Módszerek

3.1 Molekuláris biológia

A táblázatban azokat a fehérjéket tüntettem fel, amelyekkel munkánk során foglalkoztunk. A konstrukciók készítésekor a fehérjéket kódoló DNS génbankban hozzáférhető szekvenciájából indultunk ki.

fehérje	faj	génbank azonosító	
Akt	humán	X61037	
ARNO	humán	X99753	
Btk	humán	X58957	
FKBP12	humán	NM_054014	
GAP43	humán	NM_002045	
GRP1	humán	AJ005197	
1-es típusú InsP ₃ receptor (SII+)	humán	D26070	
Lyn	humán	NM_002350	
mTOR (FRB)	humán	NM_004958	
Orai1	humán	BC015369	
p130 fehérje	patkány	D45920	
$PLC\delta_1$	humán	U09117	
$PLC\delta_4$	patkány	NM_080688	
Sac1 foszfatáz	humán	NM_014016	
STIM1	humán	NM_003156	
UBC6	élesztő	X73234	
TGN38	humán	BC008461	
IV-es típusú foszfoinozitid 5-foszfatáz	humán	NM_019892	

A fúziós fehérjék készítésekor a fehérjék megfelelő darabját polimeráz láncreakció segítségével, Pfu DNS polimeráz (Fermentas) alkalmazásával állítottuk elő, és a megfelelő restrikciós 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, kereskedelemben 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 sejtlizátumot 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.

3.2 Sejtvonalak, transzfekció

Kísérleteinkhez általában NIH 3T3, COS-7 és Hek 293 (ATCC) sejtvonalakat használtunk. A sejteket a forgalmazó által javasolt médiumban (10 % borjúszérummal, valamint penicillin és streptomicin antibiotikumokkal kiegészített DMEM), 5 % CO₂ 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 (esetleg a benne lévő 25 mm-es #1 típusú fedőlemezre), amit a HEK sejtek esetében poli-L-lizinnel (2 ml 0,001 %-os oldat) előkezeltünk. A transzfekciót a gyártó előírásának megfelelően végeztük, az alábbi táblázatnak megfelelően (az adatok egy lyukra vonatkoznak). A kísérletekre a transzfekciót követő 24-36 óra elteltével került sor.

szövettenyésztő edény sejtszám		μg DNS / μl OPTI-MEM	µl Lipofectamine / µl OPTI-MEM	végtérfogat (µl OPTI-MEM)	
10 cm-es Petri	3 millió	5 / 500	12,5 / 500	6000	
35 mm-es Petri, 6-lyukú edény	300 ezer	2 / 100	2 / 100	1200	
24-lyukú edény	133 ezer	1 / 50	1,5 / 50	500	
96-lyukú edény*	80 ezer	1 / 25	0,5 / 25	200	

*96-lyukú edény esetében a sejteket a transzfekcióval egyidőben szélesztettük

A vad típusú és az Ins P_3 receptor hiányos DT40 sejteket ugyancsak az ATCC által javasolt médiumban tartottuk, és elektroporézissel transzfektáltuk (10 millió sejt és 15 µg DNS / 0,5 ml OPTI-MEM (Invitrogen) 290 V, 28 ms). Fedőlemezre egy nappal később, csak a kísérlet előtt ültettük le a sejteket (lásd még 3.8 fejezet).

3.3 Konfokális mikroszkópia

A konfokális mérésekhez a sejteket 35 mm-es Petri csészébe helyezett, 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 ul mérőoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérőoldat összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM MgSO₄, 1,2 mM CaCl₂, 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. A folyamatok időbeliségének követésekor a képeket általában 10 másodpercenként vettük fel. Az alkalmazott ingerereket 200 µl térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. Általában 1,5 µm-es optikai rétegvastagsággal, és 1,6 µs-os pixel expozícióval dolgoztunk. Különösen a rövidebb hullámhosszok esetén, törekedtünk az ingerlő lézerfény intenzitásának csökkentésére, amit azonban az erősítés növelés okozta zajnövekedés limitált. 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.

3.4 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 széleszettük, majd CO₂ inkubátorba tettük. 30 perc elteltével a sejteket kétszer 4 °Cos 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.

3.5 Sejtek szétterülésének vizsgálata

A vizsgálat 20 µg/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 µg/ml TRITCfalloidinnal 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.

3.6 Foszfolipáz C aktivitás mérése

A foszfoipáz C aktivitásának méréséhez protonnal jelzett inozitollal jelöltük a sejtek inozitol tartalmú molekuláit, úgymint a PtdIns P_2 -t, majd a PLC aktiválása után elválasztottuk és mértük a termelődött Ins P_3 , illetve bomlástermékének az Ins P_2 -nek a mennyiségét. A méréshez a sejteket (COS-7) 24-lyukú szövetkultúra edénybe tettük le, és transzfektáltuk a vizsgálni kívánt fehérjéket 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 sejtkultúra médiumot használtunk. Másnap a sejteket az ingerlés előtt 10 mM LiCl-dal kezeltük, amivel az ingerlés során (20-30 perc) keletkezett Ins P_3 és a belőle származó Ins P_2 további bomlását megakadályoztuk. A kísérlet végén a sejteket lizáltuk, a

keletkezett Ins*P*₂-t és Ins*P*₃-t szeparáltuk, aktivitásukat megmértük (Hunyady és mtsai, 1994). A kísérlet során három párhuzamossal dolgoztunk, melyekből átlagértéket számoltunk.

3.7 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 sejtkultúra 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.

3.8 Citoplazmatikus [Ca²⁺] mérése egyedi sejtekben

Az alkalmazott tranziens transzfekcióval a sejtvonalakban mintegy 25-30 %-os transzfekciós hatásfokot 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 helyezett, 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 µM szulfin-pirazonnal kiegészített mérőoldatban oldott 2 µM Fura-2/AM (Invitrogen) Ca²⁺-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 ul mérőoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérőoldat összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM MgSO₄, 1,2 mM CaCl₂, 10 mM glükóz, 10 mM Na-Hepes, pH 7,4. A digitális képalkotó 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 expresszálódott 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 µl térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. Az adatok rögzítésére és feldolgozására a MetaFluor (Molecular Devices) programcsomagot használtuk. A citoplazmatikus [Ca²⁺] követésére a 340 és 380 nm-es ingerléskor 505 nm-en mérhető fényintenzitás hányadosát számoltuk. A [Ca²⁺] számszerűsítéséhez szükséges kalibrációt nem végeztünk. Erre a kísérleteinkben nem volt szükség, hiszen csak a változásra voltunk kíváncsiak. A rendszer mérésenként mintegy 10-15 transzfektálódott, kontroll sejt egyidejű mérését tette lehetővé.

3.9 Mangán quench mérés egyedi sejtekben

A Mn^{2+} quench mérések az egyedi sejtes citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ méréshez hasonló módon történtek a következő eltérésekkel: 1.) mivel az endoplazmás retikulumon keresztüli Mn^{2+} áramot kívántuk mérni szükséges volt az ER Fura-2-vel való feltöltése. Ezt nagyobb mennyiségű (5 µM), és hosszabb idejű (120 perc) Fura-2/AM töltéssel értük el. 2.) a sejteket 10 perces 15 µg/ml digitonin kezeléssel permeabilizáltuk, és citoplazmatikus mérőoldatot használtunk (10 mM NaCl, 120 mM KCl, 2,2 mM MgCl₂, 1 mM KHPO₄, 2 mM ATP, 10 mM foszfokreatin, 20 egység/ml kreatin foszfokináz, 20 mM K-Hepes, pH 7,2. Az oldatkészítéshez használt vizet a Ca²⁺-mentesítés érdekében Chelex 100 oszlopon (BioRad) szűrtük. 3.) a Fura-2 excitálására a $[Ca^{2+}]$ -tól független, izobesztikus pontnak megfelelő 360/10 nm-es fényt alkalmaztunk.

3.10 Citoplazmatikus [Ca²⁺] mérése sejtszuszpenzióban

A szuszpenziós citoplazmatikus [Ca²⁺] méréseket 37 °C-on, küvettás fluoriméterben (PTI) végetük, 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 töltöttünk (3.8 fejezet). 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.

3.11 Fluoreszcens rezonancia energiatranszfer mérése sejtszuszpenzióban

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 fénnyel 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 hányadost az 525 és 475 nm-en mért intenzitásokból számoltuk a megfelelő korrekciók (autofluoreszcencia, háttér) elvégzése után.

3.12 Total internal reflection mikroszkópia

A total internal reflection (TIRF) mérésekhez a sejteket 35 mm-es Petri csészébe helyezett, 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 ul mérőoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérőoldat összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM MgSO₄, 1,2 mM CaCl₂, 10 mM glükóz, 10 mM Na-Hepes, pH 7,4. A mérésekhez egy kétcsatornás, Olympus TIRF rendszert használtunk, amely PlanApo 60x/1,45 objektívvel, Hammamatsu 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 követésekor a képeket általában 10 másodpercenként vettük fel. Az alkalmazott ingereket 200 µl térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. Azokban a mérésekben, ahol a fluoreszcensen jelzett fehérjék mozgása mellett azzal párhuzamosan a sejtek citoplazmatikus [Ca²⁺]-t is követni akartuk, a sejteket a kísérletet megelőzően, a Fura-2 töltés körülményeivel egyezően (lásd 3.8 fejezet), 3 µM Fluo-4/AM Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük.

3.13 A transzferrin receptor endocitózisának mérése áramlásos citometriával

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 négy egyenlő részre osztottuk (kb. 1 millió/ml sejt). Ezután a sejteket az adott kísérletnek megfelelőn kezeltük. Az Alexa Fluor 488-cal jelzett transzferrin konjugátumot (Invitrogen) 5 µg/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 tanszferrin 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.

3.14 Rekombináns fehérjék előállítása

Számos konstrukció esetében szükséges volt a fúziós fehérjék rekombináns fehérjeként való előállítása is. Ehhez a fúziós fehérjéket 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 A₆₀₀=0,6 értékig. Következő lépésként a fehérjeexpressziót szobahőmérsékleten 7 órán keresztül 300 μM izopropil-1-tio-β-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 Ni²⁺-NTA-agaróz gyöngyökkel (Qiagen) inkubáltuk (5 mM imidazol 1 óra 4 °C). Mosást követően a nikkelhez kötődött rekombináns fehérjét 1 M-os imidazollal eluáltuk, az imidazolt kihigítottuk, a fehérjét töményítettük, végül 5 mM ditiotreitolt (DTT) tartalmazó standard foszfát puffert tartalmazó sóoldatban (PBS) 4 °C-on tároltuk. A fehérjéket SDS gélben futattuk, Coomassie festéssel láthatóvá tettük, illetve mennyiségük megállapítására albumin standardokhoz hasonlítottuk.

3.15 In vitro kötési vizsgálatok

Az Ins P_3 és Ins P_4 kötés során használt oldat összetétele a következő volt: 50 mM Na-Hepes, 50 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 10 μ M CaCl₂, pH 7,4. A kötés mérése 4 °C-on, 50 μ l térfogatban történt, amely tartalmazta a tríciummal jelzett Ins P_3 -t (0,74 kBq, ami 0,5 nM-nak felelt meg) vagy Ins P_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 µl γ-globulin (10 mg/ml) és 50 µl polietilén-glikol 6000 (30 %) adásával állítottuk le (Fukuda és mtsai, 1996). 5 perc elteltével a kötött és nem kötött jelzett Ins P_3 -t 10 perces 10.000 g-s centrifugálással választottuk szét. A csapadék, azaz a kötött mennyiség aktivitását 100 µl 2 %-os SDS-ben történt felvételt követően folyadékszcintillációs számlálóban határoztuk meg.

A PIP strip membránokra szárított inozitol lipidek (Echelon) kötésének kimutatását (Kavran és mtsai, 1998) 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 (Dowler és mtsai, 2000).

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 μ g) és hasonló tömegű rekombináns YFP-PH fúziós fehérjét használtunk. A fehérjéket 400 μ l 1mM MgCl₂-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.

4. Eredmények és Megbeszélés

4.1 A lipidkötés és a plazmamembrán lokalizáció összefüggésének vizsgálata PtdIns*P*₂kötő pleksztrin homológia domének esetében

Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy a PLC δ_1 enzim pleksztrin homológia (PH) doménje (1-170 aminosavak), amely képes a 4-es és 5-ös pozícióban foszforilált inozitol gyűrű nagy affinitású és specifikus kötésére, felhasználható a plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének kimutatására. Ehhez a PH domént zöld fluoreszcens fehérjével jelöltük, majd az így létrehozott fúziós fehérjét (PLC δ_1 PH-GFP) sejtekben expresszálva, konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk annak sejten belüli lokalizációját (Varnai és Balla, 1998). 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_2 kötésére. Így került látóterünkbe a PLC δ_1 enzimmel nagyfokú homológiát mutató, de enzimaktivitással nem rendelkező úgynevezett 130 kDa molekulatömegű fehérje (p130), amelyről ismert volt, hogy rendelkezik egy Ins P_3 -t specifikusan kötő PH doménnel (95-233 aminosavak) (Kanematsu és mtsai, 1992). Kontrollvizsgálatokhoz izoláltam az 1-es típusú humán Ins P_3 receptor ligandkötésért felelős darabját (224-605 aminosavak) (Yoshikawa és mtsai, 1996), amit az N-terminális végén szintén fluoreszcens fehérjével jelöltem.

4.1.1 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 δ_1 PH-GFP konstrukcióval, amely PtdIns P_2 -kötésének megfelelően szépen kirajzolta a plazmamembránt (5. ábra a panel), sem a p130-as fehérje PH doménje (p130PH-GFP), sem az Ins P_3 receptor ligand-kötő doménje (GFP-IP₃R-LBD) nem mutatott plazmamembrán lokalizációt, hanem a citoplazmában helyezkedett el (5. ábra b és c panelek). Míg a GFP-IP₃R-LBD esetében ez nem volt meglepő, a PLC δ_1 PH doménhez nagyon hasonló p130 PH domén esetében nem erre az eredményre számítottunk. A két citoplazmatikus konstrukció különbséget mutatott abból a szempontból, hogy míg a p130PH-GFP hasonlóan a GFP-hez egyértelműen jelen volt a sejtmagban, a GFP-IP₃R-LBD alig volt képes bejutni a sejtmagba. Az eltérés a fúziós fehérjék méretbeli különbségének tudható be. Míg a p130PH-GFP fehérje

mintegy 40 kDa, a GFP-IP₃R-LBD molekulatömege meghaladja a 60 kDa-t (5. ábra d panel). Megjegyzendő, hogy a fluoreszkáló képesség megőrzése érdekében az SDS-PAGE vizsgálatokhoz a mintákat nem forraltuk, azaz a fehérjék nem voltak tökéletesen denaturált állapotban, aminek következtében a méretükre vonatkozóan a gélben való futásuk alapján csak becslést lehet adni.



5. ÁBRA InsP₃ kötésre képes, fluoreszcens fehérjéhez fuzionált fehérje domének sejten belüli lokalizációja (a-c), illetve a fúziós fehérjék SDS-PAGE képe (d)

A fehérje doméneket NIH 3T3 sejtekben expresszáltuk, sejten belüli lokalizációjukat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Ezt a GFP-vel történt jelölés tette lehetővé, ami a PLC δ_1 PH és a p130PH esetében a fehérjék C-terminális végén, míg az Ins P_3 receptor (IP₃R) (224-605) esetében annak N-terminális végén történt. A fúziós fehérjéket kódoló DNS-t bakteriális expressziós vektorba klónoztuk át, és C-terminálisan hexahisz címkével jelöltük, ami lehetővé tette az *E. Coli*-ban szintetizált rekombináns fehérjék tisztítását Ni²⁺-NTA oszlopokon. Az így kapott fehérjéket (forralás nélkül) SDS-PAGE módszerrel szétválasztottuk, a gélben lévő fehérjecsíkokat a fluoreszcencia kimutatására alkalmas foszforimager-rel láthatóvá tettük (d). 1: GFP, 2: PLC δ_1 PH-GFP, 3: p130PH-GFP, 4: GFP-IP₃R (224-605). (Varnai és mtsai, 2002 alapján)

4.1.2 A PLC δ_l 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. Ez az elképzelés egyrészt a kristálystruktúra eredményekből, másrészt pedig azokból a megfigyelésekből adódott, miszerint egy adott foszfoinozitid molekula kötés szempontjából helyettesíthető a foszfátcsoportok elhelyezkedésének alapján neki megfelelő inozitol-foszfát molekulával, tehát a PtdIns(4,5) P_2 Ins(1,4,5) P_3 -tal, a PtdIns(3,4,5) P_3 Ins(1,3,4,5) P_4 -tal. E modell alapján, amennyiben egy fehérje domén Ins P_3 -kötő képessége nem ér el egy bizonyos értéket, az magyarázatul szolgálhat a plazmamembrán lokalizáció hiányára vonatkozóan. Első lépésként tehát összehasonlítottuk a PLC δ_1 és a p130-as fehérje PH doménjeinek Ins P_3 -kötő képességét. Az Ins P_3 kötés vizsgálata *in vitro* kötési mérésekkel történt tríciummal jelzett Ins P_3 felhasználásával. Ehhez a PLC δ_1 PH-GFP és a p130PH-GFP fűziós fehérjéket megfelelő formában elő kellett állítani, ami egyrészt a kódoló szekvencia bakteriális expressziós vektorba történő átklónozását, illetve a fehérjék tisztítását jelentette. Amint azt a 6. ábra mutatja, a két fehérje Ins P_3 kötése lényegében azonosnak bizonyult. Az IC₅₀ értékek (átlag ± átlag hibája): PLC δ_1 PH-GFP 17±0,4 nM n=8, p130PH-GFP 22±8 nM n=9. A GFP-IP₃R-LBD fehérje Ins P_3 kötésenek mérésekor az irodalmi adatoknak megfelelően nagyobb affinitásra utaló értékeket kaptunk: IC₅₀=4±2 nM n=6. Megjegyzendő, hogy a PLC δ_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 megegyzett (6. ábra). Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a plazmamembrán lokalizáció hiánya sem a p130PH-GFP, sem a GFP-IP₃R-LBD esetében nem magyarázható a kisebb affinitású inozitol-foszfát kötéssel.





Az *in vitro* kötési vizsgálatokban *E. Coli*-ban expresszált és Ni²⁺-NTA oszlopokon tisztított rekombináns fehérjét használtunk. Az ábrán a fehérjék által kötött, jelzett Ins P_3 mennyiségét, mint a bound 0 %-át ábrázoltuk az alkalmazott hideg inozitol-foszfátok koncentrációjának függvényében (kör: Ins(1,4,5) P_3 , háromszög: Ins(1,3,4,5) P_4 , fordított háromszög: Ins P_6 , átlag ± S.E.M.). (Varnai és mtsai, 2002 alapján)

4.1.3 A PLCδ₁PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék PtdInsP₂-kötő képességének összehasonlítása

Miután a PLC δ_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. A PtdIns(4,5) P_2 kötés vizsgálathoz a plazmamembránban található PtdIns P_2 -től eltérően, a jobb vízoldékonyság biztosítása végett, rövidebb szénláncot (C₈) tartalmazó PtdIns P_2 származékot használtuk. Amint az a 7. ábrán látható, az IC₅₀-nek megfelelő leszorítási értékek a PtdIns(4,5) P_2 esetében sem különböztek (átlag ± átlag hibája): PLC δ_1 PH-GFP 91±24 nM n=4, p130PH-GFP 91±17 nM n=4.



7. ÁBRA A PLCδ₁PH-GFP és a p130PH-GFP fúziós fehérjék diC₈-PtdInsP₂-kötő képességének összehasonlítása

Az *in vitro* kötési vizsgálatokban *E. Coli*-ban expresszált és Ni²⁺-NTA oszlopokon tisztított rekombináns fehérjét használtunk. Az ábrán a fehérjék által kötött jelzett Ins P_3 mennyiségét, mint a bound 0 %-át ábrázoltuk az alkalmazott hideg diC₈-PtdIns P_2 koncentrációjának függvényében. (átlag ± S.E.M.). (Varnai és mtsai, 2002 alapján)

A PLC δ_1 PH-GFP és a p130PH-GFP fehérjék inozitol lipid-kötő képességének összehasonlítását az Echelon cég által forgalmazott, úgynevezett PIP strip membránok alkalmazásával is elvégeztük. Ennek a módszernek a lényege, hogy a fehérjék kötődését vizsgáljuk olyan membránokhoz, amelyekre különböző természetes foszfoinozitideket, illetve azok különböző mennyiségét vitték fel cseppek formájában. A membránokat a rekombináns fehérjékkel inkubáljuk, majd a membránhoz kötődött fehérje molekulákat GFP ellenes, poliklonális antitest alkalmazásával, Western blot technikával tesszük láthatóvá. Ebben az esetben a foszforimager-rel történő leolvasás a membrán nagy autofluoreszcenciája miatt nem kivitelezhető. Jelet azokon a helyeken kapunk, ahol olyan inozitol lipidek találhatók, amelyeket a vizsgált fehérjék képesek kötni. Amint az a 8. ábrán látható, a sejtekben látott, a PLC δ_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 hasonlónak bizonyult.



8. ÁBRA A PLCδ₁PH-GFP és a p130PH-PH fúziós fehérjék PIP strip membránokra felvitt inozitol lipidekhez kötődésének összehasonlítása

Az *in vitro* kötési vizsgálatokban *E. Coli*-ban expresszált és Ni²⁺-NTA oszlopokon tisztított rekombináns fehérjét használtunk. A membránokat 100 pmol fehérje jelenlétében 4 °C fokon inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd GFP ellenes antitesttel, Western blot technikával tettük láthatóvá a feltüntetett inozitol lipidekhez kötődött rekombináns PH doméneket. A nem specifikus kötés kimutatására a PLC δ_1 PH Ins P_3 -t nem kötő, R40L mutánsát használtuk. Az ábra B részén látható számok a membránra felvitt lipidmennyiséget jelzik pmol-ban. Az A panelen valamennyi lipidfolt 100 pmol inozitol lipidet tartalmazott. (Varnai és mtsai, 2002 alapján) 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 (Varnai és mtsai, 2002). 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 hozzáférésben.

Összefoglalva eddigi eredményeinket elmondhatjuk, hogy rendelkezünk két PH doménnel, melyek inozitol-foszfát- és foszfoinozitid-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 PLCô₁PH 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 kezdtünk, melyek célja a molekulák feltételezett, inozitol lipid kötéstől független kölcsönhatásért felelős részének azonosítása volt.

4.1.4 A PLC δ_1 PH C-terminális részében található, β 5 és β 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. Tekintettel arra, hogy a Ins P_3 kötésben szerepet játszó aminosavak a PH domének N-terminális részén találhatóak (például K30, K32, R40, K57 a PLC δ_1 PH esetében (Ferguson és mtsai, 1995)), a PH doméneket kódoló DNS közepére terveztem olyan restrikciós vágóhelyet (EcoR V), amely az aminosav összetételt egyik PH doménben sem befolyásolta, ugyanakkor lehetővé tette a β 4 és β 5 redők között a fehérjéket kódoló DNS vágását, ily módon a PLC δ_1 (1-71)-p130(166-233)PH-GFP, illetve a p130(95-164)-PLC δ_1 (71-170)PH-GFP kimérák létrehozását. A β 4 és β 5 redők közötti pontban történő csere a PLC δ_1 PH doménjének kristálystruktúrája alapján is jó választásnak tűnt, mivel ez a pont két viszonylag független részre osztja a domént (9. ábra).



9. ÁBRA A PLCδ₁PH kristályszerkezete a hozzá kötődő InsP₃ molekulával (A), illetve a PLCδ₁ és a p130 fehérje PH domének közötti aminosav homológia (B)

A kristálystruktúrában (1MAI) (Ferguson és mtsai, 1995) kék és zöld színnel jelöltük a molekula azon részeit, amelyeket a kimérákban felcseréltem. Piros színnel jelöltük azt a fehérjedarabot (B részen a bekeretezett rész), amely ugyancsak cserére került a két doménben. A homológiában piros és kék betűk jelölik az egymással azonos, vagy egymással helyettesíthető aminosavakat, míg a nyilak a β redőknek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2002 alapján)

A membránlokalizáció vizsgálatát egyrészt konfokális mikroszkópiával, másrészt fluoreszcens rezonancia energia transzfer (FRET) méréssel is ellenőriztük. Ez utóbbi lényege, hogy a vizsgált fúziós fehérjékben a GFP-t CFP vagy YFP molekulákra cseréltük, melyek között megfelelő közelség és molekulaorientáció esetén energiatranszfer mérhető. Amennyiben a CFP-vel és YFP-vel jelzett fehérjék 1:1 arányú expressziója elér egy bizonyos szintet, a plazmamembránhoz kötődő fehérjék esetében kialakul az energiatranszferhez szükséges molekuláris közelség, míg a plazmamembrán lokalizáció megszűnése esetén az energiatranszfer csökken. Az energiatranszfer mértékére az úgynevezett FRET hányadosból

következtethetünk. Ez egy olyan számszerűsíthető paraméter, aminek csökkenése jelen körülmények között a domének membránlokalizációjának csökkenését jelzi. A PH domének plazmamembránról történő leválását a PtdIns(4,5) P_2 szint esését ionomicin adásával hoztuk létre. Az ionomicin a citoplazmatikus [Ca²⁺] emelésével aktiválja a PLC enzimet, aminek következménye a plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének csökkenése, és a PH domének membránlokalizációjának megszűnése. Jól látható ez a PLC δ_1 PH esetében (10. ábra legfelső sor, illetve van der Wal és mtsai, 2001). Az ionomicin hatására bekövetkező FRET hányados változásból a nyugalmi plazmamembrán lokalizációra következtethetünk.



10. ÁBRA A PLCδ₁ és a p130 fehérje PH doménjeiből készített kimérák membránlokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkóppal (képek) és fluoreszcens rezonancia energia transzfer (FRET) technikával (görbék)

A FRET mérésekhez a sejteket az adott PH domének CFP-s és YFP-s verzióját kódoló plazmiddal 1:1 arányban transzfektáltuk. A jobb transzfekciós hatásfok miatt a mérésekhez COS-7 sejteket használtunk. 24-36 óra elteltével a sejteket tripszinnel emésztettük, reszuszpendáltuk. A méréshez sejtszuszpenziót használtunk. A mérés során a sejteket 425 nm-es fénnyel világítottuk meg, és mértük az emissziót 475 és és 525 nm-en. A CFP és YFP közötti energiatranszfer mértékére az 525/475-ös, úgynevezett FRET hányadosból következtettünk. A PH domének és a plazmamembrán közötti kölcsönhatás erősödése fokozza a FRET hányados értékét, míg ellenkező esetben annak csökkenését tapasztaljuk. A mérés során a PtdIns P_2 teljes lebontásához szükséges magas citoplazmatikus [Ca²⁺]-t 10 μ M ionomicin adásával, míg a PtdIns P_2 reszintézist a [Ca²⁺]-t csökkentő 5 mM BAPTA adásával értük el mindkét módszer esetében. A lokalizáció mértékére az ionomicin adására bekövetkező változásból következtettünk. (Varnai és mtsai, 2002 alapján)

A konfokális és a FRET adatok egymást erősítve azt mutatták, hogy a p130PH Cterminálisa elrontotta a PLC δ_1 PH plazmamembrán lokalizációs képességét (10. ábra felülről harmadik sor), míg a PLC δ_1 PH C-terminális részével a p130PH szép plazmamembrán lokalizációt mutatott (10. ábra felülről negyedik sor). 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 δ_1 és a p130 fehérje PH domének egymásnak megfelelő darabjainak cserélgetésével végül sikerült egy olyan, a β 6 és β 7 redők közötti, csupán nyolc aminosavból álló minimális doménhez eljutnunk, amely biztosította a p130PH membránhoz való kötődését (10. ábra legalsó sor), tehát szerepet játszik a PLC δ_1 PH plazmamembrán lokalizációjának kialakulásában.

4.1.5 A PLC δ_1 és a PLC δ_4 PH domének inozitol-foszfát kötésének és membránlokalizációjának összehasonlítása

Mint a PLC enzimek általában, a PLC δ_4 is rendelkezik egy PH doménnel (Nagano és mtsai, 1999), amivel kapcsolatban, hasonlóan a p130 fehérje PH doménjéhez, ugyancsak felmerült, hogy alkalmas lehet a PtdIns P_2 kimutatására. Ahogy azt a PLC δ_1 és a p130 fehérje kapcsán ismertettem, a PLC δ_4 esetében is izoláltam a PH doménjét (ez a homológia alapján az 1-163 aminosavak), C-terminálisan megjelöltem GFP-vel, valamint elkészítettem a rekombináns fehérje előállításához szükséges bakteriális expressziós plazmidot, illetve magát a rekombináns fehérjét is (Lee és mtsai, 2004). Az *in vitro* Ins P_3 kötési vizsgálat alapján a PLC δ_4 PH is nagy affinitással és szelektíven képes kötni az Ins P_3 -t, azonban az affinitás értéke a PLC δ_1 PH doménre jellemző értéknél az Ins P_3 és az Ins $(1,3,4,5)P_4$ kötés esetében egyaránt közel egy nagyságrenddel kisebbnek bizonyult (11. ábra).

A kisebb affinitású Ins P_3 kötésnek megfelelően a PLC δ_4 PH-GFP emlős sejtekben expresszálva ugyan a PLC δ_1 PH-nál kisebb mértékben, de egyértelmű plazmamembrán lokalizációt mutatott (12. ábra A panel). Humán AT1 receptort stabilan expresszáló HEK 293 sejtekben szubmaximális angiotenzin II, azaz Ca²⁺-mobilizáló agonista ingerléssel, a PLC β enzim aktiválásával átmeneti PtdIns(4,5) P_2 szint csökkenést hoztunk létre. Elvégezve a lokalizáció mértékéből adódó különbséget kiküszöbölő normalizálást, a PLC δ_1 PH-GFP és a PLC δ_4 PH-GFP konstrukciók gyakorlatilag egyformán alkalmasnak bizonyultak a plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének követésére (12. ábra B panel). Megjegyzendő, hogy a teljes hosszúságú PLC δ_4 enzim (szemben a plazmamembránhoz kötődő PLC δ_1 -gyel) a sejtekben az ER-ban található, azaz lokalizációjában a PH doménje nem játszik szerepet. Ennek oka talán a PH domén gyenge lipid kötése, de az is lehet, hogy a molekulán belül a PH domén egyszerűen rejtett helyzetben van (Lee és mtsai, 2004).



11. ÁBRA A PLC δ_1 és a PLC δ_4 PH domének inozitol-foszfát kötésének összehasonlítása Az *in vitro* kötési vizsgálatokban *E. Coli*-ban expresszált és Ni²⁺-NTA oszlopokon tisztított rekombináns fehérjét használtunk. Az ábrán a fehérjék által kötött jelzett Ins P_3 mennyiségét, mint a bound 0 %-át ábrázoltuk az alkalmazott hideg inozitol Ins P_3 vagy Ins P_4 koncentrációjának függvényében (telt szimbólum: PLC δ_1 PH-GFP, üres szimbólum: PLC δ_4 PH-GFP, átlag ± S.E.M, n=3 az Ins P_3 , és n=4 az Ins P_4 esetében). (Lee és mtsai, 2004 alapján)

A plazmamembrán $PtdIns(4,5)P_2$ szintjének csökkentése, illetve a lipidkötés elrontása (például PLC δ_1 R40L mutáció) a PLC δ_1 enzim PH domén membránlokalizációjának azonnali megszűnéséhez vezet, következésképpen a PH domén lokalizációjában a PtdIns(4,5)P₂ molekulák és a PH domén közötti kölcsönhatásának meghatározó szerepe van. Ez derült ki a PLC₆₄ PH domén plazmamembrán lokalizációjának vizsgálata során is, amennyiben a kisebb affinitású InsP₃-kötő képesség gyengébb lokalizációt eredményezett, miközben a PH domén funkcionálisan nem mutatott különbséget. A PLC δ_1 és a p130 fehérje PH doménjeinek összehasonlításával ugyanakkor sikerült egy olyan, nyolc aminosavból álló szakaszt azonosítanunk, amely az adatok alapján fontos szerepet játszik a membránlokalizáció kialakulásában. Tekintettel arra, hogy nincsen olyan adat, ami arra utalna, hogy ezek az aminosavak szerepet játszanak az inozitol lipidek kötésében, joggal feltételezhetünk egy lipidkötéstől független PH domén és plazmamembrán kölcsönhatást. Az aminosavak (VFKDQRNT) vizsgálata önmagában nem árul el sokat arra vonatkozóan, milyen típusú interakció jön létre. A peptidszakasz méretét tekintve nagyon valószínű, hogy specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatás alakul ki, illetve erre utalnak azok a kutatások is, amelyek során más PH domének esetében fehérjékkel való interakciót mutattak ki (Barr és mtsai, 2000;



Tsukada és mtsai, 1994). A fehérje partner kimutatása és azonosítása természetesen további vizsgálatokat igényel.

12. ÁBRA A PLCδ₁ és a PLCδ₄ PH domének membránlokalizációjának (A), illetve a plazmamembrán PtdIns(4,5)P₂ szintjének követésére való alkalmazhatóságuknak (B) összehasonlítása

A fluoreszcens fehérjével láthatóvá tett doméneket AT1 receptort stabilan expresszáló HEK 293 sejtekben fejeztük ki, sejten belüli elhelyezkedésüket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Összehasonlítva a PLC δ_1 PH domén nyugalmi lokalizációjával, szembetűnő a PLC δ_4 PH-GFP igen gyenge plazmamembrán lokalizációja. A másik különbség, hogy a PLC δ_4 PH-GFP konstrukció a sejtmagon belül is megjelölt bizonyos struktúrákat, ami a PLC δ_1 PH-GFP esetén még akkor sem volt látható, amikor az levált a plazmamembránról. A plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének változtatására a sejteket 0 időpontnál 1 μ M angiotenzin II-vel ingereltük, amely az AT1 receptoron keresztül a PLC β aktiválásával a PtdIns P_2 szint átmenti csökkenését hozta létre, amit a PH domének transzlokációjának kimutatásával követtünk. A folyamat kinetikájának szemléltetésére a felvételeket 15 másodpercenként készítettük. Az A panel ezek közül az ingerlést követő 90. és 180. másodpercnél rögzített felvételeket mutatja, míg a B panelen a plazmamembrán lokalizáció számszerűsített és statisztikailag feldolgozott értékei láthatók. Ehhez a vizsgált sejtek esetében a kiválasztott időpontoknál a konfokális képeken lemértük a plazmamembránban (pm) és a citoplazmában (cit) a fluoreszcencia intenzitást, majd ebből I_{pm}/I_{cit} hányadost számoltunk. Ennek változása a plazmamembrán lokalizáció mértékére utal (Varnai és Balla, 2008). Az eltérő nyugalmi lokalizáció korrigálására az arányokat a kiindulási értékre normalizáltuk, majd ábrázoltuk (átlag ± S.E.M, n=11). (Lee és mtsai, 2004 alapján)

4.2 PtdInsP₃-kötő PH domének összehasonlító funkcionális vizsgálata

Hasonlóan az előző fejezetben már említett, a sejtekben található membránok PtdIns P_2 tartalmának kimutatására irányuló vizsgálatokhoz, a membránokban lévő PtdIns P_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 (Varnai és mtsai, 1999). A PtdIns P_3 kimutatására irányuló, főként morfológiai (konfokális) 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. Ez az egységes gátló hatás azonban már a legelső funkcionális mérésnél elmaradt, ezért egy átfogó vizsgálatba kezdtünk, melyben különböző sejtfunkciókat vizsgáltunk. 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.

4.2.1 A PtdInsP₃ kötésre képes, fluoreszcens fehérjéhez fuzionált PH domének elkészítése, sejten belüli lokalizációjuk vizsgálata

A vizsgálathoz olyan GFP-vel jelzett PH doméneket választottunk, melyek PtdInsP₃, illetve ennek megfelelően $Ins(1,3,4,5)P_4$ kötési képessége az irodalomból ismert volt, illetve korábban magunk is vizsgáltuk (Balla és mtsai, 2000). 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 (Ogasawara és mtsai, 2000), érdekes módon a különbség a PH doménben van (egy glicin többlet a β1 és β2 redők között – 3G), ezért az ARNO esetében mindkét PH domént elkészítettük. A PtdInsP₃-kötő képesség ellenőrzésére a fluoreszcens fehérjéhez fuzionált PH doméneket emlős sejtben expresszáltuk, és sejten belüli lokalizációjukat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Ismert, hogy NIH 3T3 sejtben PDGF hatására aktiválódik a PI 3kináz enzim, ami a sejtmembránban fokozza a PtdInsP3 szintézisét. PtdInsP3-kötő képességüknek megfelelően, a szérum mentes médiumban tartott sejtekben kezdetben citoplazmatikus elhelyezkedést mutató fúziós fehérjék az inger hatására kötődtek a plazmamembránhoz (13. ábra). 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 (13. ábra).



13. ÁBRA PtdInsP₃ kötésre képes, fluoreszcens fehérjéhez fuzionált PH domének sejten belüli, wortmannin-függő lokalizációja

A fehérje doméneket NIH 3T3 sejtekben tranziensen expresszáltuk, sejten belüli lokalizációjukat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Ezt a GFP-vel történt jelölés tette lehetővé, ami a Btk-PH és az Akt-PH esetében a fehérjék C-terminális végén, míg a GRP1-PH és az ARNO-PH-k esetében azok N-terminális végén történt. A sejteket a mérés előtt 3 órán keresztül szérum mentes médiumban tartottuk (control). PDGF kezelés hatására az ARNO (3G) kivételével egyértelmű plazmamembrán lokalizációt tapasztaltunk, ami az alkalmazott 300-nM-os koncentrációban PI 3-kináz gátlást eredményező wortmannin kezeléssel gátolható volt (wm). (Varnai és mtsai, 2005b alapján)

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.

4.2.2 A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtek letapadására

A fibroblaszt eredetű sejtvonalak közös jellemzője, hogy sejtkultúra 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 módszer lényege, hogy az adott idő alatt letapadt sejtek mennyiségének megállapítására a sejteket lizáltuk, forralás nélkül SDS-gélben megfuttattuk, majd foszforimager-rel láthatóvá tettük a sejtek által expresszált fúziós fehérjéket, amiből a letapadt sejtmennyiségre következtettünk. A folyamat PI 3-kináz-függő voltát wortmannin
adásával ellenőriztük. Kontrollként GFP-t önmagában expresszáló sejteket alkalmaztunk. Mint azt a 14. ábra mutatja, a COS-7 sejtek 30 perc alatt történő letapadását 300 nM wortmannin szépen gátolta. 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, PtdIns*P*₃ kötésük ellenére nemhogy gátlást nem láttunk, a sejtek letapadóképessége inkább erősebbnek tűnt. Ez azonban valószínűleg nem valódi hatás, sokkal inkább a GFP-s kontrollból adódott, amennyiben az igen erős GFP expresszió toxikus hatást gyakorolt a sejtekre.



14. ÁBRA A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtek letapadására

A letapadás mértékének mérésére az adott, GFP-vel jelzett PH doméneket tranziensen expresszáló COS-7 sejteket használtunk. A mérésbe bevitt összes sejt (c), illetve a 30 perc alatt letapadt sejtek (a) mennyiségét a bennük expresszálódott fúziós fehérjék kimutatásával (sejtek lizálása, SDS-PAGE, leolvasás foszforimager-ben) végeztük (A), ami ily módon pontos kvantitatív értéket eredményezett (B). Kontrollként csak GFP-t expresszáló sejteket alkalmaztuk, az adatokat ennek %-ában fejeztük ki (átlag ± S.E.M., n=5). Az R28C mutáció a Btk-PH inozitol lipid-kötő képességének megszűnését eredményezte. A folyamat PI 3-kináz függőségét a wortmannin (wm) gátló hatásának kimutatásával ellenőriztük. A mérések duplikátumban készültek. (Varnai és mtsai, 2005b alapján)

4.2.3 A PtdInsP₃-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 PtdIns*P*₃ függését nem wortmannin-nal, hanem egy ugyancsak szelektív PI 3-kináz gátlószerrel, az LY424002-vel ellenőriztük, ugyanis a wortmannin igen fényérzékeny, ezért olyan mérésekben, ahol nagy intenzitású megvilágítás történik (ilyen például a konfokális technika), kerültük a használatát. 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 (15. ábra). 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 (15. ábra).

4.2.4 A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtekben EGF ingerlés során bekövetkező PLCγ aktiválódásra

Az EGF receptor ingerlését követő jelpályák egyike a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ emelkedés, amit a PLC γ aktiválódás következtében keletkező Ins P_3 hoz létre. Az Ins P_3 , illetve metabolikus terméke, az Ins P_2 mennyiségének méréséből tehát következtetni lehet a PLC aktivitás változására. Tríciummal jelzett inozitollal töltött COS-7 sejtekben 30 perces, 100 ng/ml-es EGF ingerlés során a kumulatív Ins P_3 és Ins P_2 mennyiség a nyugalmi érték mintegy kétszeresére emelkedett (16. ábra, GFP-s kontroll). 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 (16. ábra). Ez a serkentő hatás kivédhető volt 300 nM wortmannin előkezeléssel, illetve a lipidkötésre képtelen kontrollban (Btk-PH R28C mutáns) is elmaradt, azaz kialakulásának feltétele a Btk-PH domén és PtdIns P_3 közötti kölcsönhatás létrejötte (16. ábra).

4.2.5 A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtek fehérje expresszáló képességére

A tranziens transzfekciót követően, a sejtbe juttatott plazmidban kódolt fehérje expressziójának szintén igen összetett folyamat, amely számos lépésből, úgymint

transzkripció és transzláció mértéke, sejtnövekedés és sejtosztódás szabályozása, tevődik össze. 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. Feltételeztük, hogy az egyetlen aminosav különbség az expressziós sajátosságokat nem befolyásolja. A mérés során gátló hatást kizárólag az Akt PH domént expresszáló sejtekben tapasztaltunk (17. ábra).



15. ÁBRA A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtek szétterülésére

A szétterülés mértékének mérésére az adott, GFP-vel jelzett PH doméneket tranziensen expresszáló COS-7 sejteket használtunk. A sejteket a szélesztés után 10 perccel fixáltuk, majd a falloidinnel történt aktinfestés után konfokális mikroszkópban vizsgáltuk (A). A PH domén expresszió mértékének megítélésére a falloidin kimutatása mellett a GFP jelenlétét is vizsgáltuk, azaz a képeket két csatornán rögzítettük. Kontrollként csak GFP-t expresszáló sejteket alkalmaztuk. Az R25C az Akt-PH, az R284C mutáció a GRP1-PH, az R28C mutáció pedig a Btk-PH inozitol lipid-kötő képességének megszűnését eredményezi. A folyamat PI 3-kináz függőségét az LY424002 (Ly) gátló hatásának kimutatásával ellenőriztük. 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 (átlag ± S.E.M., n=3-6) (B). (Varnai és mtsai, 2005b alapján)



16. ÁBRA A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtekben EGF ingerlés során bekövetkező PLCγ aktiválódásra

A PLC γ aktivitás mértékére a sejtek inozitol-foszfát tartalmának (Ins P_2 és Ins P_3) növekedéséből következtettünk. Az inozitol-foszfátok kimutatásának érdekében a sejtek inozitol raktárait tríciummal jelzett inozitollal jelöltük. A keletkező Ins P_3 és Ins P_2 metabolizmusának gátlását, az EGF ingerlés előtti 30 perces 10 mM LiCl előkezeléssel értük el. Az inozitol-foszfátokat Dowex oszlopokon választottuk szét. A mérésekhez az adott, GFP-vel jelzett PH doméneket tranziensen expresszáló COS-7 sejteket használtunk. Kontrollként csak GFP-t expresszáló sejteket alkalmaztuk, az adatokat ennek %-ában fejeztük ki (B). Az R28C mutáció a Btk-PH inozitol lipid-kötő képességének megszűnését eredményezi. A hatások PI 3-kináz függőségét a wortmannin (wm) gátló hatásának kimutatásával végeztük. A mérések duplikátumban készültek, az adatokat átlag ± S.E.M. formában ábrázoltuk (n=3-6, kivéve Akt-PH, amely n=2) (Varnai és mtsai, 2005b alapján)

Összefoglalva a funkcionális vizsgálatokat 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 PLCγ 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 PLCγ aktivitást. Végezetül az Akt-PH gyakorlatilag minden esetben hatástalan volt, kivéve a fehérje expressziót, amit egyedüli PH doménként egyértelműen gátolt. A sor kiegészíthető a kollaborációban végzett Akt aktivitás méréssel, amit az Akt-PH a várakozásoknak megfelelően gátolt, a Btk-PH ugyancsak gátolt, míg a GRP1 és ARNO PH nem befolyásolt (Varnai és mtsai, 2005b).

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.



17. ÁBRA A PtdInsP₃-kötő PH domének hatása a sejtek fehérje expresszáló képességére

A fehérje expresszió mértékére az adott, GFP-vel jelzett PH doméneket tranziensen expresszáló COS-7 sejtek GFP fluoreszcenciájának méréséből következtettünk. Mivel az egyes konstrukciók expressziójának mértéke jelentős eltérést mutatott (A), az adott konstrukció hatására bekövetkező sejtnövekedés megítélésére a fluoreszcencia értékeket az adott konstrukció lipid kötésre nem képes mutánsának esetében mért fluoreszcencia értékekhez viszonyítottuk. Ezek a mutánsok a Btk-, Akt-, GRP1- és ARNO-PH domének esetében megfelelő sorrendben az R28C, az R25C, az R284C és az ARNO-PH 3G konstrukciók voltak. Az így kapott hányados ily módon már valóban csak a sejtek növekedésének mértékére utalt, amit 3 napon keresztül követtünk (B). Átlag \pm S.E.M., n=3. (Varnai és mtsai, 2005b alapján)

A hipotézis bizonyítására most is arra volt szükség, hogy olyan PH domént hozzunk létre, amely a vad típussal megegyező inozitol lipid-kötő képeséggel rendelkezik, ugyanakkor nem képes a vad típusra jellemző hatást kifejteni. A PtdIns P_2 -kötő PLC δ_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.

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

A PH domének szerkezetében olyan aminosavakat kerestünk, amelyek az inozitol lipidek kötését feltételezhetően nem befolyásolják, nem konzerváltak, tehát nem a szerkezetet stabilizáló aminosavak, ugyanakkor a membrán felé mutató, lehetőleg töltéssel bíró oldallánccal rendelkeznek, esetleg foszforilálhatók. E megfontolások alapján választottuk ki az Akt PH doménben a 34-es treonint, illetve a GRP1 PH doménben a 307-es izoleucint és a 340-es lizint.

Az Akt-PH vizsgálatakor 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, melyek a PI 3-kináz enzim aktiválásakor szép plazmamembrán lokalizációt mutattak COS-7 és HEK 293 sejtekben egyaránt (18. ábra A panel). A továbbiakban ellenőriztük egyrészt a mutánsok PtdIns*P*₃ kötését (18. ábra B panel), majd sor került a funkcionális vizsgálatra, azaz a fehérje expresszió kinetikájának mérésére. Amint az a 18. ábra B és D paneleken látható, 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. A mérések az Akt-PH domén mutánsok tesztelése során látottakkal gyakorlatilag egyező eredménnyel zárultak (19. ábra). A különbség csak annyi volt, hogy GRP1 mutánsok plazmamembrán lokalizációs képességét HEK sejtekben nézve csökkentnek találtuk (akárcsak a p130PH esetében, lásd 4.1 fejezet), ezért részletesebben foglalkoztunk a mutánsok foszfoinozitol- és inozitol-foszfát-kötő képességének meghatározásával. A kötés affinitásának pontosabb megítélésére a PtdIns P_3 kötés kimutatása mellett *in vitro* Ins P_4 kötési vizsgálatokat is végeztünk (19. ábra B és C panelek). Végső soron 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 (19. ábra D panel). Ismételten megjegyzendő, hogy az említett mutációk a PH domének (figyelembe véve a PtdIns P_2 -re specifikus PLC δ_1 enzim PH doménjét is) azonos felszínén helyezkednek el (9. ábra A panel, 18. ábra D panel, és 19. ábra D panel), ami megerősítette elképzelésünket, miszerint a feltételezett kölcsönhatásban a membránnal érintkező rész lehet érintett.



18. ÁBRA Az Akt PH doménjében található T34 aminosav vizsgálata

A T34-es aminosav mutációit véletlen mutagenezissel hoztuk létre. A kapott mutánsok közül a funkcionális vizsgálatok elvégzése előtt első lépésben kiválasztottuk azokat, amelyeknél a PH domén inozitol lipid-kötő képessége nem károsodott. Az inozitol lipid-kötő képességre egyrészt a PH domén membránlokalizációjából (A), másrészt in vitro PtdInsP₃-kötő képességéből következtettünk (B). A: A vad típusú, illetve a T34D, F vagy L mutánsokat COS-7 és HEK293 sejtekben tranziensen expresszáltuk. A PI 3-kináz aktivitásának fokozását, illetve a sejtmembrán PtdInsP3 szintjének tartós emelését pervanadát adásával hoztuk létre. A sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Kontrollként a lipidkötésre képtelen, R25C mutánst használtuk. B: A fúziós fehérjéket kódoló DNS-t bakteriális expressziós vektorba klónoztuk át, és C-terminálisan hexahisz címkével jelöltük, ami lehetővé tette az E. Coli-ban szintetizált rekombináns fehérjék tisztítását Ni2+-NTA oszlopokon. Az így kapott fehérjék PtdInsP₃-kötő képességét olyan agaróz gyöngyök kötésével teszteltük, melyekhez PtdInsP₃-t konjugáltak, és amelyek centrifugálással elválaszthatók. A kötés mértékét a felülúszóban maradt fúziós fehérjék (sn) és a gyöngyhöz kötődött, azaz a centrifugálás után pelletbe kerülő fehérjék mérésével határoztuk meg (futtatás SDS-gélben, majd leolvasás foszforimager-rel). A kötött mennyiséget a teljes mennyiség %-ában ábrázoltuk (átlag ± S.E.M., n=3). C: ez a panel nem képezi részét az értekezésnek. D: A vad típusú és a mutáns PH domének hatása a sejtek növekedésére az idő függvényében. Részletekért lásd a 16. ábrát. E: Az InsP₄-t kötő Akt-PH domén kristálystruktúrája (1H10) (Thomas és mtsai, 2002). A nyíl a T34 aminosavat jelöli. (Varnai és mtsai, 2005b alapján)





A: A vad típusú GRP1-PH-t, illetve az I307E és a K340L mutánsokat COS-7 és HEK293 sejtekben tranziensen expresszáltuk. A PI 3-kináz aktivitásának fokozását, illetve a sejtmembrán PtdIns P_3 szintjének tartós emelését pervanadát adásával hoztuk létre. A sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Kontrollként a ligandkötésre képtelen, R284C mutánst használtuk. **B**: A fehérjék PtdIns P_3 kötése. Részletekért lásd a 17. ábrát. Átlag ± S.E.M., n=2. **C**: A fehérjék Ins P_4 affinitásának vizsgálata. Az *in vitro* inozitol-foszfát kötési vizsgálat részleteiért lásd a 6. ábrát. Átlag ± S.E.M., n=3. **D**: A vad típusú és mutáns PH domének hatása a sejtek szétterülésére. Részletekért lásd a 14. ábrát. **E**: Az Ins P_4 -t kötő GRP1-PH domén kristálystruktúrája (1FHX) (Ferguson és mtsai, 2000). A nyíl az I304 és a K 340 aminosavakat jelöli. (Varnai és mtsai, 2005b alapján)

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 (20. ábra).



20. ÁBRA A PH domének membránhoz való kötődésének és működésének modellje Az ábra jobb oldalán egy olyan fehérje látható, amely a membránhoz való kötődést követően képes kifejteni hatását. Ez a hatás gátolható egy izolált PH doménnel, amennyiben az képes beilleszkedni az adott molekuláris komplexbe (ábra bal oldala). Ennek alapvető feltétele a membránban található megfelelő foszforiláltságú inozitol lipidhez való kötődés, azonban ezen túlmenően, más típusú, például fehérje-fehérje kölcsönhatások is szükségesek lehetnek. (Varnai és Balla, 2006 alapján)

4.2.7 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. Egy kollaborációs munka során, amikor a GRP1-PH domén esetleges Arf6 kötése merült fel, 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 (21. ábra). 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, hogy a lipidkötésre képtelen mutáns (R284C) nem köti az aktív Arf6-ot nem meglepő. Ennél sokkal fontosabb megfigyelés, hogy az I307E és K340L mutációk ugyancsak megakadályozzák a PH domén kötődését az Arf6-hoz, ami egyértelműen bizonyítja egyrészt a kötés specificitását, másrészt pedig a mutált aminosavak szerepét a lipidkötéstől független, protein-protein kölcsönhatásban.



21. ÁBRA A GRP1 PH domén és az Arf6 fehérje közötti interakció vizsgálata

A: A kötési mérésekhez a YFP-GRP1-PH fúziós fehérjét, valamint a mutánsait kódoló DNS-t bakteriális expressziós vektorba klónoztuk át, és C-terminálisan hexahisz címkével jelöltük, ami lehetővé tette az *E. Coli*ban szintetizált rekombináns fehérjék tisztítását Ni²⁺-NTA oszlopokon. Az így kapott fehérjéket forralás nélkül futattuk SDS-gélben, majd foszforimager-rel vizsgáltuk (A). Az *in vitro* kötési vizsgálat során a YFP-Grp1-PH fúziós fehérjét, illetve ennek mutánsait (20-20 µg) azonos tömegű, Sepharose gyöngyhöz kötött GST-Arf6 fehérjével (T27N-inaktív vagy Q76L-konstitutívan aktív) inkubáltuk 30 nM Ins*P*₄ jelenlétében, vagy anélkül. A gyöngyök elválasztását követően a PH doméneket foszforimager leolvasással, az Arf fehérjéket Coomassie festéssel tettük láthatóvá a kötött fehérjéket (B). YFP-GRP1-PH kötést csak az aktív Arf6 mutatott. A kötés további feltétele, hogy a PH doménnek Ins*P*₄ kötött formában kellett lennie. A GRP1-PH inozitol-foszfát kötésre alkalmatlan mutánsánál (R284C) az interakció nem jött létre, illetve az inozitol lipid-kötő képesség ellenére ugyancsak nem alakult ki kapcsolat az I307E és a K340L mutánsok esetében. (Cohen és mtsai, 2007 alapján)

4.3 Az InsP₃ receptor aktiválódás molekuláris mechanizmusának vizsgálata

A 4.1-es fejezetben már részletesen ismertettem, munkánk során izoláltunk és fluoreszcensen megjelöltünk egy olyan PH domént, amely ugyan a plazmamembránhoz képtelen volt kötődni, ugyanakkor nagy affinitással kötötte az InsP₃-t. Ez a PH domén a p130-as fehérje Nterminális részében található (95-233 aminosavak). Elkészítettünk egy másik InsP3 kötésre képes fehérje domént is, amely a humán 1-es típusú InsP3 receptorból származott (224-605 aminosavak). Ugyan az InsP₃ receptorral kapcsolatban elfogadott, hogy az ER-ban található, ahová ligandja, a plazmamembránban keletkező InsP₃ diffúzióval jut el, napvilágot láttak olyan adatok is, melyek szerint az InsP₃ receptorok más organellumok membránjában is jelen vannak (Pinton és mtsai, 1998), illetve szerepet játszanak az ER és egyéb sejtalkotók (mitokondrium, plazmamembrán) közötti kommunikációban (Boulay és mtsai, 1999; Csordas és mtsai, 1999; Jaconi és mtsai, 2000; Parekh, 2003). E speciális elhelyezkedésű InsP₃ receptorok, illetve a lokálisan kialakuló InsP₃ szint jelentőségének vizsgálatára kezdtünk egy olyan molekuláris rendszer kidolgozásába, ami véleményünk szerint alkalmas lehet az intracelluláris tér jól körülírt kompartmentjeiben az InsP₃ koncentráció manipulációjára, oly módon, hogy ismert targetszekvenciák felhasználásával ezekre a helyekre irányítjuk az InsP₃kötő fehérje doméneket. Mint látni fogjuk, már a munka első lépéseinél olyan eredmények születtek, amelyek az eredeti terveket teljesen más irányba fordították, és magának az ER-ban elhelyezkedő Ins P_3 receptornak a működésére vonatkozóan szolgáltattak adatokat.

A kísérletek során lényegében a már bemutatott fúziós fehérjéket használtuk azzal a különbséggel, hogy áttértünk a párhuzamos citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ mérést nem befolyásoló monomerikus piros fluoreszcens fehérje (mRFP) használatára (Campbell és mtsai, 2002), amit egységesen, a p130PH és az Ins*P*₃ receptor ligandkötő domén (IP₃R-LBD) esetében is annak N-terminális végéhez kapcsoltunk. Ez a változtatás a domének Ins*P*₃-kötő képességét nem befolyásolta.

4.3.1 A citoplazmatikusan expresszált InsP₃-kötő domének hatása az ATP ingerléssel kiváltott Ca²⁺-szignálra

Az Ins P_3 -kötő domének hatásának vizsgálatára egy olyan sejtes rendszert állítottunk be, amelyben hormonális ingerlésre egyrészt szelektíven lehetett aktiválni az Ins P_3 /Ca²⁺-s jelpályát, ugyanakkor az ingerlés nem okozott hatalmas PLC aktivitás növekedését. Szempont volt továbbá, hogy a sejt elég nagy legyen ahhoz, hogy később a sejtorganellumokhoz történő irányítás hatékonyságát fénymikroszkópos módszerekkel követni tudjuk. Erre tökéletesnek tűnt a COS-7 sejt, mivel rendelkezik G_q heterotrimer G fehérjét aktiváló P_{2Y} purinerg receptorral, ugyanakkor elhanyagolható benne a P_{2X} receptorok mennyisége, valamint a mérete is megfelelő.

A citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ méréséhez a sejteket Fura-2 fluoreszcens indikátorral töltöttük meg, amit 340 és 380 nm-en ingereltük, a festék által kibocsátott fényt pedig 505 nm-en mértük. A mért fényintenzitásokból a 340/380 hullámhosszoknak megfelelő hányadost számolva, egy olyan értéket kapunk, amely arányos az élettani körülmények között előforduló citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ változással. A sejtekben az Ins*P*₃-kötő doméneket tranziensen expresszáltuk, és digitális képalkotó rendszerben mértük a Fura-2 intenzitást. Tekintettel arra, hogy a domének mRFP-vel voltak jelölve, az mRFP-re jellemző hullámhosszok beállításával a Fura-2 mérésével párhuzamosan követni tudtuk az Ins*P*₃-kötő fúziós fehérjék expresszióját is egyedi sejtekben.

Amint az a 22. ábra A paneljén látszik, 50 µM ATP hatására a COS-7 sejtekben létrejött a Ca²⁺-szignál (fekete görbe), amit a citoplazmatikus mRFP-IP₃R-LBD domén expresszió-függő módon gátolt. Egyrészt az amplitúdó nagysága csökkent, másrészt a Ca2+csúcs kialakulásához szükséges idő növekedett. Ez utóbbit az mRFP-IP₃R-LBD expresszió függvényében ábrázolva, és a pontokra egyenest illesztve, annak meredeksége 18,3x10⁻³-nak adódott (r²=0,467) (22. ábra B panel). Összehasonlításul az mRFP-p130PH doménnel is elvégeztük a méréseket, amely hasonló hatással volt a Ca^{2+} -szignálra, azonban a kisebb Ins P_{3-} kötő affinitásnak megfelelően az illesztett egyenes meredeksége is alacsonyabb lett: 7,7x10⁻³ (r²=0,261) (22. ábra B panel). Az affinitáskülönbség kimutathatósága kiválóan mutatta a mérőrendszer érzékenységét. Megjegyzendő, hogy a sejtek egy részében, különösen magas expressziós szinteknél nem alakult ki a Ca^{2+} -szignál. Ezeket a sejteket a statisztikai analízisnél nem vettük figyelembe. A 22. ábra C paneljén a sejtekben mért Ca²⁺-válaszok átlaga látható. Figyelemre méltó, hogy míg a citoplazmatikus $InsP_3$ kötése a kezdeti citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ emelkedést jelentősen gátolta, a fenntartott fázist egyik InsP₃ puffer jelenléte sem befolyásolta érdemlegesen (piros görbék). Az InsP₃ kötésre képtelen mutánsokat expresszáló sejtek (K508A mutáció az IP₃R-LBD esetében, illetve az R134L mutáció a p130PH esetében) (kék görbék) a nem transzfektálódott sejtekkel (fekete görbék) tökéletesen egyező Ca2+-választ mutattak. Mindezek az eredmények azt igazolták, hogy az agonista ingerlés során keletkező InsP₃ mennyiségét a citoplazmatikus pufferolással képesek voltunk befolyásolni.



22. ÁBRA Az InsP₃ receptor ligandkötő doménjének (mRFP-IP₃R-LBD) hatása az ATP-vel kiváltott citoplazmatikus Ca²⁺-szignálra

A humán 1-es típusú InsP₃ receptor ligandkötő doménjét (224-605) N-terminálisan mRFP-vel jelöltük (mRFP-IP3R-LBD), COS-7 sejtekben tranziensen expresszáltuk, és digitális képalkotó rendszerrel vizsgáltuk. A citoplazmatikus [Ca²⁺] követésére a sejteket Fura-2 Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük. A Ca²⁺szignált 50 µM ATP adásával váltottuk ki, amely COS-7 sejtekben Ga fehérjéhez kapcsoló P2Y receptorokon keresztül hat. A: a felső képek a Fura-2 340/380 nm-es ingerlésekor, 505 nm-en mért emisszióinak hányadosát mutatják színkódolva. A melegebb színek, magasabb hányadosnak, és ily módon magasabb citoplazmatikus [Ca²⁺]-nak felelnek meg. Az időértékek az ATP adásától eltelt időt jelzik. A grafikon az egyedi sejtek válaszát mutatja az idő függvényében. A [Ca²⁺] méréssel párhuzamosan a sejtek mRFP intenzitását is mértük (grafikon melletti kép). A sötétebb szín magasabb expressziónak felel meg. Látható, hogy az mRFP-IP₃R-LBD citoplazmatikusan helyezkedik el (lásd még 5. ábra). A grafikonon a fekete görbe, a nem transzfektálódott sejtek válaszát mutatja, míg a többi görbéhez tartozó expresszió a szomszédos képről a színkód alapján határozható meg. Az mRFP-IP₃R-LBD expresszió növekedése egyre jelentősebben befolyásolta a Ca²⁺-szignált. Egyrészt a csúcs kialakulásának késését eredményezte, másrészt az amplitúdót csökkentette. Igen nagy expressziós szint mellett a Ca²⁺-szignál nem jött létre. B: a pontok az egyedi sejtek Ca²⁺-válasza során a csúcs késését ábrázolják az mRFP-IP₃R-LBD expressziójának függvényében. Összehasonlításul az InsP₃-t kisebb affinitással kötő mRFPp130PH (lásd 4.1 fejezet) esetében is elvégeztük a méréseket. Kontrollként mindkét esetben az adott fehérje domén InsP₃-t nem kötő mutánsát alkalmaztuk (K508R és R134L). C: az egyedi sejtek válaszának átlaga (fekete: nem transzfektálódott sejtek, piros: vad típusú, InsP₃-t kötő domének, kék: InsP₃-t nem kötő mutánsok. A jobb láthatóság érdekében a szórást nem tüntettük fel. (Varnai és mtsai, 2005a alapján)

4.3.2 Az ER citoplazmatikus felszínére irányított InsP₃-kötő domének hatása az ATP ingerléssel kiváltott Ca²⁺-szignálra

A megfelelő irányító szekvencia kiválasztására egy ER rezidens fehérjét kerestünk, amelyről ismert, hogy a lokalizációért a fehérjének mely szakasza felelős. Így került látóterünkbe az UBC6 fehérje, pontosabban annak hidrofób C-terminális darabja (233-250 aminosavak) (Yang és mtsai, 1997). Kiegészítve az Ins*P*₃-kötő doméneket ezzel a target szekvenciával (mRFP-IP₃R-LBD-ER) meg is kaptuk az ER lokalizációt, amit luminálisan expresszálódó fehérjék kolokalizációjának kimutatásával igazoltunk (23. ábra A panel).

Ezek után megvizsgáltuk a konstrukciók hatását az ATP-vel kiváltott citoplazmatikus [Ca²⁺] változásra. Mint azt a 23. ábra B panel mutatja, az mRFP-p130PH esetében lényegében a citoplazmatikusan expresszált fúziós fehérje hatásával egyező képet kaptunk, azaz a kezdeti csúcs késését. Ezt a hatást az R134L mutáns nem hozta létre. Bár a vad típusú IP₃R-LBD alkalmazásakor első ránézésre úgy tűnt, hogy a citoplazmában kifejezett és az ER felszínére irányított doméneknek, ahogy azt a p130PH esetében láttuk, azonos a Ca²⁺-jelre gyakorolt hatásuk, azaz főként a Ca²⁺-csúcs késését és amplitúdójának redukcióját okozzák, alaposabb analízissel két lényeges különbség vált világossá. 1.) az ER felszínén megjelenő mRFP-IP₃R-LBD-t tartalmazó sejtekben a citoplazmatikus [Ca²⁺] az ATP adását megelőzően már kismértékben emelkedett volt. 2.) ugyanakkor a kontroll sejtekhez képest jelentős eltérést találtunk a fenntartott fázis amplitúdójában (23. ábra B panel - piros görbe). Még szembetűnőbb volt a citoplazmatikus és az ER-hoz irányított konstrukciók közötti különbség az InsP₃ kötésre képtelen K508A mutáns esetében. Az ER-hoz rányított mutáns ugyanis a Ca²⁺-csúcs késén kívül a vad típusra jellemző valamennyi hatást produkálta (23. ábra B panel - kék görbe és 23. ábra C panel). Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a közös hatások az $InsP_3$ receptor ligandkötő doménjére jellemzőek, viszont kialakulásukban a konstrukciók InsP₃ kötésének nincs jelentősége.

4.3.3 Az InsP₃ receptor ER citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő doménje a sejten belüli Ca²⁺-raktárak ürülését idézi elő

Megvizsgálva olyan anyagok hatását, melyek mindegyike a Ca²⁺-raktárakból való Ca²⁺felszabaduláson keresztül vezet a citoplazmatikus [Ca²⁺] emelkedésére; úgymint thapsigargin (SERCA gátlószer), alacsony koncentrációjú ionomicin (100 nM), illetve thimerosal (Ins*P*₃ receptor agonista), azt tapasztaltuk, hogy az ER-hoz targetált IP₃R-LBD, Ins*P*₃-kötő képességétől függetlenül, gátló hatást eredményezett (24. ábra A és B panelek). Ezt a hatást sem a citoplazmatikus mRFP-IP3R, sem az ER-hoz targetált mRFP-p130PH-ER esetében nem tapasztaltuk (24. ábra A panel).



23. ÁBRA Az InsP₃ receptor endoplazmás retikulum (ER) citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő doménjének (mRFP-IP₃R-LBD-ER) hatása az ATP-vel kiváltott citoplazmatikus Ca²⁺-szignálra

A: a fúziós fehérjék ER citoplazmatikus felszínéhez történő irányítását az UBC6 fehérje C-terminális irányító szekvenciájával értük el. A lokalizáció ellenőrzésére COS-7 sejteket az ER lumenében expresszálódó fehérjét kódoló plazmiddal kotranszfektáltuk, és konfokális mikroszkópban kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk. **B**: az egyedi sejtek Ca²⁺-válaszának átlaga az idő függvényében. Összehasonlításul a méréseket a p130PH estében is elvégeztük. Részletekért lásd a 21. ábrát. (Fekete: nem transzfektálódott sejtek, piros: vad típusú, Ins*P*₃-t kötő, ER-hoz irányított domének kék: Ins*P*₃-t nem kötő, ugyancsak ER-hoz irányított mutánsok.) **C**: a pontok az egyedi sejtek Ca²⁺-válasza során a csúcs amplitúdójának maximális értékét mutatják az feltüntetett fúziós fehérjék expressziójának függvényében. (Varnai és mtsai, 2005a alapján)

Lehetséges magyarázatként felmerült, hogy a jelenséget, a vad típusú mRFP-IP₃R-LBD-ER fehérje és a K508A mutáns használatakot egyaránt a raktárak Ca^{2+} -tartalmának csökkenése okozza. Ez egyrészt magyarázná a felszabadítható Ca^{2+} -mennyiségének csökkenését, másrészt a kapacitatív Ca^{2+} -beáramlás fokozásával, az emelkedett nyugalmi

 $[Ca^{2+}]$ -t. Az elképzelés igazolására kétféle, független kísérleti megközelítést alkalmaztunk: 1.) megvizsgáltuk a sejtmembránon keresztüli nyugalmi Ca2+-beáramlást egy egyszerű, Ca2+mentes külső médiumban végzett rekalcinálás hatására bekövetkező, citoplazmatikus [Ca²⁺] méréssel. A 24. ábra C paneljének megfelelően, az mRFP-IP₃R-LBD-ER alkalmazásakor fokozott [Ca²⁺] emelkedést kaptunk, ami a fokozott nyugalmi Ca²⁺-beáramlás következménye. Ehhez a hatáshoz nem volt szükség $InsP_3$ pufferolásra, az $InsP_3$ kötésre nem képes ligandkötő domén is mutatta a jelenséget. 2.) a másik, teljesen független megközelítésben az ER Ca²⁺-permeabilitását vizsgáltuk oly módon, hogy az ER-t feltöltöttük Fura-2 festékkel, majd permeabilizáltuk a sejteket és vizsgáltuk a Mn²⁺ adását követő fluoreszcencia változást 360 nm-es excitáció esetén. Ezen a hullámhosszon a Fura-2 fluoreszcenciája nem függ a festék Ca²⁺-kötésétől, tehát az esetleges változás a Mn²⁺ raktárakban való megjelenésének és Furához kötődésének tulajdonítható (Mn²⁺ quench technika). Mint az a 24. ábra D paneljén jól látható, az mRFP-IP₃R-LBD-ER expressziójakor a kontrollként használt egyéb konstrukciókhoz képest sokkal meredekebb volt a Fura-2 fluoreszcencia csökkenése, ami megfelel a Mn²⁺ fokozott raktárba áramlásának. Feltételezve, hogy a Mn²⁺ képes a Ca²⁺-csatornákon átjutni, ez egyben az ER fokozott Ca²⁺-permeabilitását jelenti, ami a sejtek nyugalmi állapotának megfelelő koncentrációk esetén Ca²⁺-vesztést eredményez. Fontos kiemelni, hogy az InsP₃ kötésre nem képes ligandkötő domén ebben az esetben is hatásos volt, tehát a Ca²⁺-raktárak ürülése független a lokális InsP₃ koncentráció változástól.

4.3.4 Az InsP₃ receptor ER citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő doménje aktiválja az endogén InsP₃ receptorokat

A következő nyilvánvaló kérdés, vajon miként képes az Ins P_3 receptor ligandkötő doménje fokozni a Ca²⁺-kiáramlást a raktárakból. Az ER-ból történő Ca²⁺-felszabadulás esetén az Ins P_3 receptor esetleges érintettsége nyilvánvalóan felmerül. Annak vizsgálatára, hogy az ER-hoz irányított Ins P_3 receptor ligandkötő domén hatásában az endogén Ins P_3 receptor szerepet játszik-e, a kísérleteket egy Ins P_3 receptorral nem rendelkező sejtvonalon is elvégeztük. A DT40 egy csirkéből származó limfoblaszt sejtvonal, amelyből a vad típusú mellett olyan sejtvonal is létezik, amelyben mindhárom típusú Ins P_3 receptor expresszióját homológ rekombinációval megszüntették (TKO) (Sugawara és mtsai, 1997).

Első menetben megvizsgáltuk, hogy a vad típusú sejtekben működik-e a Ca^{2+} -s jelátviteli pálya, illetve milyen mértékű ennek károsodása az Ins P_3 receptor hiánya következtében. A 25. ábra A panelje mutatja, hogy a vad típusú sejtekben az IgM antitesttel

kiváltott, PLC γ -mediált citoplazmatikus Ca²⁺-szint emelkedés a TKO sejtekben valóban elmaradt. Kaffeinnel, ami a rianodin receptorok aktiválásán keresztül hoz létre Ca²⁺-felszabadulást, nem lehetett érdemlegesen növelni a citoplazmatikus [Ca²⁺]-t (25. ábra A panel), ami arra utal, hogy a DT40-es sejtekben rianodin receptor nem expresszálódik.



24. ÁBRA Az InsP₃ receptor endoplazmás retikulum (ER) citoplazmatikus felszínéhez irányított ligandkötő doménjének (mRFP-IP₃R-LBD-ER) hatása a sejten belüli Ca²⁺-raktárakra, illetve az ER Ca²⁺-permeabilitására

A méréseket Fura-2 Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltött COS-7 sejteken végeztük digitális képalkotó eljárás alkalmazásával. A sejten belüli raktárakból felszabadítható Ca²⁺-mennyiség becslésére a citoplazmatikus [Ca²⁺] változásából (A-C), az ER Ca²⁺-permeabilitására a Ca²⁺-beáramlás Mn²⁺ quench technikával történő meghatározásából következtettünk (D). Ez utóbbi esetében a Ca²⁺-permeabilitás fokozását Ins*P*₃ adással idéztük elő. A sejtekben expresszált konstrukciókat és az alkalmazott ingereket az egyedi grafikonokon tüntettük fel. A görbék az egyedi sejtek válaszának átlagát mutatják az idő függvényében. A színkód (ahol nincsen külön feltüntetve): fekete: nem transzfektálódott sejtek, piros: vad típusú, Ins*P*₃-t kötő domének kék: Ins*P*₃-t nem kötő mutánsok. Azokban az esetekben, ahol rekalcinálást alkalmaztunk, a sejteket a rekalcinálás előtt 8 percig Ca²⁺-mentes, 100 µM EGTA-t tartalmazó médiumban tartottuk. (Varnai és mtsai, 2005a alapján)

A nagy kérdés, hogy mi a következménye az mRFP-IP₃R-LBD-ER konstrukció expressziójának a DT40-es sejtekben. Amint azt a 25. ábra B részén látszik, a vad típusú

sejtekben, hasonlóan a COS-7 sejtekhez, thapsigargin adására jelentősen kisebb a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ emelkedés, tehát a raktárak ürülése ebben a sejtvonalban is bekövetkezett, és a hatás továbbra sem függött a ligandkötő domén Ins P_3 kötésétől. Teljesen más a helyzet a TKO sejtekben. Mint látható, ezekben a konstrukció expressziója teljesen hatástalannak mutatkozott, a felszabadítható Ca^{2+} mennyisége a kontroll és a transzfektálódott sejtekben nem különbözött. A Ca^{2+} -raktárak ürüléséhez tehát szükséges az endogén Ins P_3 receptorok jelenléte, következésképp az ER-hoz irányított IP₃R-LBD az ott lévő endogén Ins P_3 receptorokat aktiválva hozza létre a raktárak Ca^{2+} -tartalmának csökkenését.

4.3.5 Az InsP₃ receptor ligandkötő doménjének C-terminális, helikális szerkezetű része felelős az aktiváló hatásért

A szerkezetre vonatkozó kezdeti mutációs (Yoshikawa és mtsai, 1999), illetve kristálystruktúra adatok (Bosanac és mtsai, 2002) arra utalnak, hogy a ligandkötő domén két jól megkülönböztethető félből, az N-terminális β redőket (224-423 aminosavak) és a C-terminális α hélixeket (427-605 aminosavak) magába foglaló darabokból áll, melyek szendvicsként fogják közre az Ins*P*₃ molekulát (26. ábra A panel). Mivel a ligandkötő domén endogén receptort aktiváló hatásában az Ins*P*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 (26. ábra B panel).

Ismert, hogy az Ins*P*₃ receptor N-terminális vége (1-223 aminosavak) gátolja a receptor működését (Yoshikawa és mtsai, 1999). Mivel a gátlás mechanizmusára vonatkozóan csak feltételezések voltak, megvizsgáltuk ennek a gátló doménnek a hatását az aktivációs folyamatban. A receptor elejét is tartalmazó ligandkötő domén (1-605 aminosavak) Ins*P*₃-kötő affinitását az irodalmi adatnak megfelelően közel egy nagyságrenddel kisebbnek találtuk (26. ábra C panel - bal oldali grafikon). Mivel az endogén receptorok aktiválása nem függ a ligandkötő domén Ins*P*₃ kötésétől, a kisebb Ins*P*₃ affinitástól függetlenül értékelendő, hogy az N-terminális darab jelenléte a receptor aktiválási képesség jelentős csökkenését eredményezte (26. ábra C panel - jobb oldali grafikon), ami hozzájárulhat az N-terminális 223 aminosavra jellemző gátló hatás kialakulásához.

Végezetül, annak bizonyítására, hogy fizikai kölcsönhatás szükséges az endogén receptorok aktiválásához, készítettem egy olyan konstrukciót, amelyben a LBD domén és az irányító szekvencia közé merev helikális linkert építettem be (9-szer ismétlődő EAAAR



aminosavak). Amint az a 26. ábra D panelen látszik, a ligandkötő domén mintegy 5 nm-es eltávolítása az ER felszínétől, az endogén receptoron kifejtett aktiváló hatást megszüntette.

25. ÁBRA Az endogén $InsP_3$ receptorok szerepe az endoplazmás retikulum (ER) citoplazmatikus felszínéhez irányított $InsP_3$ receptor ligandkötő domén (mRFP-IP₃R-LBD-ER) hatására bekövetkező Ca^{2+} -raktár ürülésben

A: a vad típusú és az Ins P_3 receptort nem tartalmazó (TKO) DT40-es sejtek működésének ellenőrzésére citoplazmatikus [Ca²⁺] méréseket végeztünk Fura-2 fluoreszcens festékkel töltött sejtekben. Míg a vad típusú sejtekben az antitest (IgM) ingerlésre bekövetkező [Ca²⁺] emelkedéshez szükséges az Ins P_3 receptorok működése, az IgM hatástalansága a TKO sejtekben az Ins P_3 receptorok teljes hiányát igazolja. Kaffein adására a citoplazmatikus [Ca²⁺] nem változott, jelezvén, hogy a rianodin receptorokkal nem kell számolnunk ezekben a sejtekben. Thapsigargin (Tg) adására mindkét sejtvonalban azonnali citoplazmatikus [Ca²⁺] emelkedést tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a Ca²⁺-raktárak teltségi állapota azonos a két sejtvonalban. **B**: A görbék az egyedi sejtek válaszának átlagát mutatják az idő függvényében vad típusú (wild type) és Ins P_3 receptor hiányos (TKO) DT40 sejtekben thapsigargin (Tg) ingerlést követően. Fekete: nem transzfektálódott sejtek, piros: mRFP-IP₃R-LBD-ER, kék: mRFP-IP₃R-LBD-ER (K508A). A TKO sejtek kontroll sejtekkel egyező válasza a raktárak ürülésének elmaradását mutatja. (Varnai és mtsai, 2005a alapján)



26. ÁBRA A szerkezet és funkció összefüggésének vizsgálata az InsP₃ receptor ligandkötő doménjében

A: az InsP₃ receptor ligandkötő doménjének struktúrája (1N4K) (Bosanac és mtsai, 2002), illetve a struktúra alapján elkészített konstrukciók sematikus felépítése. B: Az ER-hoz irányított InsP₃ receptor (mRFP-IP₃R-ER) N-terminális β redőkból álló (224-423), illetve C-terminális α hélixeket tartalmazó darabjának (427-605) hatása az endogén $InsP_3$ receptorokra. A raktározott Ca^{2+} mennyiségére a felszabaduló Ca^{2+} citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ -t emelő hatásának méréséből következtettünk. A raktárak ürítését ATP vagy thapsigargin (Tg) adásával váltottuk ki. A fekete görbék a nem transzfektálódott sejtek Ca²⁺-válaszát mutatják. C: az InsP₃ receptor N-terminális (1-223) darabjának hatása a ligandkötő domén működésére. Bal oldali grafikon: a fúziós fehérjékből készített rekombináns fehérjék in vitro InsP₃ kötése (részletekért lásd 5. és 6. ábrák). mRFP-IP3R (224-605) n=2, mRFP-IP3R (1-605) n=3 (átlag \pm S.E.M.). Jobb oldali grafikon: az mRFP-IP₃R-LBD-ER (\pm 1-223 darab) hatása az endogén InsP₃ receptorokra. Tekintettel a várható mennyiségi különbségekre, ebben az esetben az összehasonlítást statisztikailag is szigorúan ellenőrzött körülmények között végeztük. A görbék esetében az átlag ± S.E.M. értékeket ábrázoltuk, a konstrukciók expressziója szempontjából pedig kizárólag a 2000-8000 intenzitás tartományba eső sejteket vettük figyelembe. mRFP expresszió: mRFP-IP3R (224-605) esetében 4222 (n=116), mRFP-IP₃R (1-605) esetében 4516 (n=80). D: a LBD-t az ER-tól eltávolító helikális linker (9x EAAAR) hatása a lokalizációra és a Ca^{2+} -raktárak ürülését eredményező endogén Ins P_3 receptor aktivációra. (Varnai és mtsai, 2005a alapján)

4.3.6 Az InsP₃ receptor aktiválódásának lehetséges mechanizmusa

Az InsP₃ 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 (27. ábra A panel). Bár a fehérjéről rendkívül sokat tudunk (Devogelaere és mtsai, 2008; Foskett és mtsai, 2007), az a folyamat, amin keresztül az InsP₃ molekula kötés a csatorna nyitásához vezet, jelenleg is tisztázatlan kérdés. Magyarázatként két elképzelés létezett: az egyik szerint a ligandkötést követő konformációváltozás a regulátoros doménen keresztül fejti ki hatását, és így aktiválja a csatornát (Uchida és mtsai, 2003). A modell gyenge pontja annak feltételezése, hogy az InsP₃ molekula kötődése ilyen hatalmas konformáció változást képes előidézni. Napvilágot látott azonban egy másik elképzelés is, mely szerint a ligandkötő és a csatorna domén közvetlen kapcsolatban áll egymással, tehát a ligandkötő doménben bekövetkező konformáció változás közvetlenül vezethet a csatorna nyitásához. Bár biokémiai módszerekkel kimutatták a két domén közötti kapcsolatot (Boehning és Joseph, 2000), a kölcsönhatás funkcionális következményét nem sikerült bizonyítani. Vizsgálatainkkal élő sejtekben igazoltuk, hogy a humán 1-es típusú InsP₃ 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, rajta keresztül az intracelluláris ER raktárakból Ca²⁺ áramlik ki. Ily módon sikerült direkt funkcionális adatokkal alátámasztani a közvetlen aktivációt feltételező modellt. Az a megfigyelés, hogy a hatáshoz nem szükséges az InsP₃ kötés 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 (27. ábra B panel).

Számos kérdés azonban továbbra is tisztázásra vár. A csatorna domén oldaláról ugyan történt előrelépés azt illetően, pontosan mely aminosavak vesznek részt az interakcióban (Schug és Joseph, 2006), a ligandkötő domén esetében ez a kérdés még tisztázásra vár. Szintén nincsen megnyugtató válasz arra vonatkozóan, hogy a funkcionális tetramer szerkezeten belül intra- vagy intermolekuláris kölcsönhatásról van-e szó. Ugyancsak nem tudjuk, hogy a feltételezett aktivációs mechanizmus valamennyi Ins*P*₃ receptor típus esetében működik-e, illetve ami még érdekesebb kérdés, hogy létezik-e hasonló mechanizmus a csatorna régióban az Ins*P*₃ receptorokkal különösen nagy hasonlóságot mutató rianodin receptorral. Végezetül érdekes lenne megvizsgálni, hogy befolyásolja-e a hatás kialakulását az irányítás típusa, vagyis hogy melyik fehérjéből származik az irányításhoz használt szekvencia.

Ez utóbbi kérdéskör boncolgatása egy teljesen új, az endoplazmás retikulum felszínének mikrodomén eloszlására vonatkozó kutatást indíthat el.



27. ÁBRA Az InsP₃ receptor ligandkötésre bekövetkező aktiválódásának modellje A: Az InsP₃ receptor sematikus szerkezete. B: Az ábra jobb oldala az InsP₃ hatására bekövetkező, a bal oldala pedig az InsP₃ kötéstől függetlenül, a ligandkötő domén ER felszínhez irányításának hatására létrejövő aktivációt mutatja. A molekula C-terminális, α hélixeket tartalmazó, aktivációért felelős része (zöld) nyugalomban fedett állapotban van, viszont InsP₃ kötés esetén hozzáférhetővé válik, és saját magához, vagy a csatornát alkotó komplexben egy másik molekulához kötődik, ily módon fokozva a Ca²⁺-áram kialakulását.

4.3.7 A lokális InsP₃ pufferolás funkcionális jelentőségének vizsgálata

Az Ins P_3 -t eltérő mértékben kötő (p130PH és IP₃R-LBD, illetve a nem kötő mutánsaik), különféle szubcelluláris kompartmentekbe irányított (citoplazma, szubplazmalemmáris régió, ER, Golgi, endoszómák és mitokondrium környéke, sejtmag), illetve fluoreszcensen is jelölt fúziós fehérjéket, azaz a kifejlesztett lokális Ins P_3 pufferolására alkalmas molekuláris eszköztárat kollaboráció keretében számos laboratóriumban használták, és használják. Ezeknek a vizsgálatoknak egy része már lezárult, és jelentős felfedezéseket eredményezett. Sikerült kimutatni például a szinkronizált ER-ból történő Ca²⁺-felszabadulás jelentőségét a mitokondriális Ca²⁺-szignál kialakulásában (Lin és mtsai, 2005). Egy másik munkában a mitokondrium felszínére targetált IP₃R-LBD-nal az Ins P_3 receptorok szerepét írtuk le az ER és mitokondrium között kialakuló funkcionális kölcsönhatásban (Szabadkai és mtsai, 2006). Egy harmadik kollaborációban a sejtmagba irányított IP₃R-LBD alkalmazásával, ami a sejtmagban az Ins P_3 szignalizáció gátlását idézte elő, sikerült részleteiben jellemezni a májsejtek működésében szerepet játszó növekedési receptorokból kiinduló jelpályát (Gomes és mtsai, 2007). Ezek a munkák lényegében az általam készített konstrukciókra épültek, azonban tekintettel arra, hogy a kísérletek kivitelezésében nem vettem részt, az adatok részletes bemutatása és tárgyalása nem része az értekezésnek.

4.4 A sejtmembrán PtdIns*P*₂ szintjének változtatására alkalmas rendszer kidolgozása és jellemzése

Az irodalmi bevezetőben említettem, hogy az utóbbi évek egyik nagy felfedezése annak felismerése, hogy a különféle foszfoinozitidek lényegében második hírvivőként működnek, azaz szignalizációs folyamatokban mennyiségük változásának fontos következménye lehet. Hidrofób természetükből adódóan membránokban helyezkednek el, és csak igen kis mennyiségben vannak jelen, ezért az inozitol lipidek vizsgálata nem könnyű. Lehet ugyan különféle foszfoinozitideket adni a sejtekhez, azonban ezek membránba épülése nehezen kontrollálható, és külső adásukkal csak mennyiségük növelését érhetjük el. A másik módszer, hogy a sejtekben expresszálunk, vagy ellenkezőleg, kiütünk olyan enzimeket, amelyek a foszfoinozitidek közötti átalakulásokat katalizálják. Ennek a beavatkozásnak azonban az lehet a következménye, hogy az enzimek tartós jelenléte vagy hiánya a sejtek inozitol lipid anyagcseréjét alapvetően megváltoztatja, például különböző kompenzatórikus folyamatokat indít be; a következmény az inozitol lipidek eredeti funkciójának megváltozása, ami normál körülmények között játszott szerepük leírását nagyon megnehezíti. Az enzimek farmakológiás befolyásolása ugyancsak járható út lenne, nem véletlen, hogy a gyógyszergyárak intenzíven dolgoznak ilyen típusú vegyületek előállításán, ezek azonban még csak korlátozottan állnak rendelkezésre. Összefoglalva elmondhatjuk, nincsenek olyan módszerek, amelyekkel az inozitol lipidek mennyiségét megbízhatóan, szelektíven, nagy hatékonysággal és gyorsan változtatni lehet.

Többször említettem azokat a munkákat, amelyek során PH doménekre épülő, megfelelően tervezett szondák alkalmazásával sikerült kimutatnunk a sejtmembánokban lévő foszfoinozitideket, köztük a PtdIns P_2 -t és a PtdIns P_3 -t (Varnai és Balla, 1998; Varnai és mtsai, 1999). A lokális Ins P_3 hatások vizsgálata során (4.3 fejezet) ugyanakkor jelentős tapasztalatra tettünk szert az expresszált fehérjék különböző membránok citoplazmatikus felszínéhez való irányításban (plazmamembrán, endoplazmás retikulum, mitokondrium, Golgi, korai endoszóma). Mindezek alapján 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 PtdIns P_2 szintjének csökkentésével próbálkoztunk.

4.4.1 A plazmamembrán PtdInsP₂ 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 (Inoue és mtsai, 2005; Muthuswamy és mtsai, 1999; Terrillon és Bouvier, 2004). 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 része tartalmaz egy olyan szekvenciát (1-20 aminosavak), amely a Golgi-ban történő lipid módosítást követően (palmitoiláció) a fehérjét a plazmamembránba juttatja (Tanimura és mtsai, 2004). Ennek a szekvenciának a felhasználásával sikerült elérnünk, hogy a fluoreszcensen jelölt FRB domén a plazmamembránhoz kerüljön. A PtdInsP₂ metabolizálására, lebontására számos elvi lehetőség adódott, úgymint PI 3-kinázok, 4-, illetve 5-foszfatázok alkalmazása (Sasaki és mtsai, 2009). Választásunk a IV-es típusú foszfoinozitid 5-foszfatázra esett, ugyanis erről az enzimről egyrészt elég sok irodalmi adat állt rendelkezésre (Kisseleva és mtsai, 2000; Kong és mtsai, 2000), másrészt úgy ítéltük meg, hogy a reakció következtében bekövetkező PtdIns(4)P emelkedés az, ami legkevésbé zavarja meg a sejtek nyugalmi inozitol háztartását. (Ebből a szempontból nem jött szóba például a PLC enzim valamelyik típusa, hiszen az InsP₃-t generál, ami számos jelpálya aktiválódást vonja maga után.) A IV-es típusú foszfoinozitid 5foszfatázról tudott volt, hogy az enzim endogén membrán lokalizációval rendelkezik, amit a C-terminális CAAX domén megfelelő mutációjával (C641A) megszüntettünk. Az is ismert volt, hogy az enzim N-terminális darabja (1-213 aminosavak) csökkenti az 5-foszfatáz aktivitást. A teljes hosszúságú, és az N-terminális darabot nem tartalmazó 5-foszfatáz domén (214-vég aminosavak) felhasználása tehát lehetővé tette, hogy különböző mértékben aktív konstrukciókat tervezzünk, amelyek az FKBP12-t és a fluoreszcens fehérjét is tartalmazzák. A konstrukciók felépítését a 28. ábra A panelje mutatja, míg a B panelen a rapamicines rendszer működésének elvét szemléltettem. Ennek lényege, hogy rapamicin adását követően az addig citoplazmatikus FKBP-5-foszfatáz fúziós fehérje a plazmamembránhoz transzlokálódik, és ott a PtdInsP2-ből az 5-ös szénatomon lévő foszfátcsoport eltávolításával abból PtdIns(4)P-t készít.

A rendszer működésének tesztelésére a konstrukciókat kódoló DNS-ekkel COS-7 sejteket transzfektáltunk. A plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének kimutatására a sejtekben ugyancsak tranziensen expresszált fluoreszcensen jelzett PLC δ_1 PH szondát használtuk, a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A rendszer optimális működése esetén az várható, hogy a dimerizáció aktiválását követően az enzim megjelenik a plazmamembránon, bontja a PtdIns P_2 -t, amit a PH domén plazmamembránról való leválása jelez.



28. ÁBRA A sejtmembrán PtdInsP₂ szintjének változtatására alkalmas rendszer működéséhez szükséges fehérje konstrukciók és a működés elvének sematikus ábrázolása

A: A rendszer két részből áll: egyrészt a GAP43 fehérje irányító szekvenciáját (1-20 aminosavak) N-terminálisan tartalmazó és fluoreszcensen jelölt (CFP vagy mRFP) FRB doménből (targeting constructs), másrészt az FKBP12-hez fuzionált és fluoreszcensen is jelölt (mRFP) 5-foszfatáz aktivitású fehérjéből (cytosolic constructs). Ez utóbbit két formában készítettük el: a teljes hosszúságú enzimet (5-ptase-FL), illetve a nagyobb enzimaktivitással rendelkező, csak a foszfatáz aktivitásért felelős domént (5-ptase-Gom) használtuk, mindkét esetben roncsolva az enzim endogén plazmamembrán lokalizációjáért felelős C-terminális CAAX domént (C641A mutáció). Az FKBP12-es konstrukcióból kontrollvizsgálatok céljára elkészítettük a foszfatázt nem tartalmazó fúziós fehérjét is (FKBP only). **B**: Rapamicin hatására az FRB domén és FKBP12 fehérje között nagy affinitású kapcsolat jön létre, minek következtében a citoplazmatikusan elhelyezkedő 5-foszfatáz aktivitással rendelkező konstrukció a plazmamembránhoz transzlokálódik. Ennek következménye a plazmamembránban lévő PtdInsP₂ átalakulása PtdIns(4)*P*-tá. (Varnai és mtsai, 2006 alapján)

Rapamicin adása előtt a PLC δ_1 PH-GFP szonda plazmamembránhoz kötött állapotban volt, ami alapvetően fontos információ, hiszen azt mutatja, hogy a citoplazmatikus 5-foszfatáz aktivitás nem befolyásolta a membrán PtdIns P_2 szintjét (29. ábra A panel felső sor). Rapamicin (100 nM) adása után 30 másodperccel, az enzim látványos plazmamembrán lokalizációját megelőzve, a PLC δ_1 PH-GFP megjelent a citoplazmában (29. ábra A panel középső sor), ami azt jelenti, hogy igen kevés enzim (ebben a kísérletben a nagyobb aktivitású verziót használtuk) transzlokációja már elegendő a plazmamembrán PtdIns P_2 mennyiségének csökkentéséhez. Három perc elteltével az enzim plazmamembrán lokalizációja is egyértelművé vált (29. ábra A panel alsó sor).

A PtdInsP₂ mennyiség változás kinetikájának és mértékének pontosabb követése érdekében a PH domén mozgását a 4.1 fejezetben már ismertetett szuszpenziós FRET technika alkalmazásával is elvégeztük. Ebben az esetben a PtdInsP₂ kimutatására a rapamicines rendszer két eleme mellett PLCS₁PH-CFP és PLCS₁PH-YFP szondákat is expresszáltunk a sejtekben. A PtdInsP2 szint esését a FRET hányados csökkenése mutatta. A teljes PtdInsP₂ depléciót a kísérlet végén 10 µM ionomicin adásával hoztuk létre. Amint az a 29. ábra B részén látszik, 100 nM rapamicin egy percen belül hatalmas PtdInsP₂ koncentráció esést eredményezett, a PtdInsP₂ szint ionomcin adásával már csak minimálisan volt tovább csökkenthető. 10 nM rapamicin lassabban ugyan, de szintén jelentős PtdInsP₂ depléciót alakított ki, míg 1 nM rapamicin esetén a PtdInsP₂ szint változása éppen csak kimutatható volt. A továbbiakban 100 nM rapamicint használtunk a kísérletekben. Amennyiben az eddig használt 5-foszfatáz domén helyett a teljes hosszúságú enzimet tartalmazó konstrukciót expresszáltuk a sejtekben, a kisebb enzimaktivitásnak megfelelően kisebb mértékű PtdInsP₂ depléciót kaptunk (29. ábra C panel piros görbe), míg 5-foszfatáz hiányában a rapamicin teljesen hatástalannak bizonyult (29. ábra C panel fekete görbe). A továbbiakban rutinszerűen az aktívabb verziót használtuk.

4.4.2 A plazmamembrán PtdInsP₂ depléciójának hatása a Ca²⁺⁻-szignálra

Ezek után olyan sejtfunkciókat kerestünk, amelyekben a plazmamembrán PtdIns P_2 szint változásának jelentőséget tulajdonítanak. Ilyen például a Ca²⁺-mobilizáló agonisták hatására kialakuló Ca²⁺-szignál, ahol egyrészt az Ins P_3 szintézisében fontos a plazmamembrán PtdIns P_2 mennyisége, másrész a fenntartott fázis kialakításáért felelős kapacitatív Ca²⁺-áram esetleges PtdIns P_2 érzékenysége is felmerül.



29. ÁBRA A rapamicin hatása a plazmamembrán PtdInsP₂ szintjének változására

A: A COS-7 sejtekben a PtdInsP₂ depléciós rendszer mellett (PM-FRB-CFP - nincs mutatva és mRFP-FKBP-5ptase-dom - középső oszlop), a plazmamembránban lévő PtdInsP₂ szint kimutatására alkalmas, fluoreszcensen jelzett PLC1PH domént is expresszáltuk (PLC6₁PH-GFP - bal oldali oszlop). A 100 nM rapamicin hatását konfokális mikroszkóppal követtük. 30 másodperccel a rapamicin adása után az mRFP-FKBP-5-ptase-dom membránhoz történő lokalizációja még alig látható, ugyanakkor a PLCő₁PH-GFP már levált a membránról, ami a PtdInsP₂ szint csökkenésének egyértelmű jele. 3 perccel az ingerlés után már az FKBP-s konstrukció membránlokalizációja is jól látszik. **B**: A plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének kvantitatív mérésére a PLC δ_1 PH mozgást CFP-vel és YFP-vel jelölt PH domének alkalmazásával, FRET technikával végeztük, sejtszuszpenzióban. A módszert részletesen ismertettem a 4.1.4 fejezetben, illetve a 10. ábrán. A teljes PtdInsP2 depléciót 10 µM ionomicin adásával hoztuk létre. A rapamicin 1 nM-os koncentrációban már mérhető PtdInsP₂ depléciót eredményez, 10 nM esetén hatása jelentős, azonban lassú. 100 nM rapamicinnel 1percen belül közel maximális PtdInsP₂ depléció hozható létre. C: A kisebb enzimaktivitásnak megfelelően a teljes hosszúságú 5foszfatáz enzimet tartalmazó konstrukció hatása jelentősen kisebb (piros görbe) a csak enzimaktivitásért felelős domént tartalmazó konstrukció hatásánál (kék görbe). Foszfatáz aktivitás hiánya esetén a rapamicin adására nem változik a PtdInsP₂ szint (fekete görbe). Ezekben a mérésekben 100 nM rapamicint alkalmaztunk. Felhívom a figyelmet arra, hogy a kék görbe már a kiindulási helyzetben a fekete alatt van. Ez a kis különbség valamennyi mérés esetén megfigyelhető volt, és azt mutatja, hogy a nagyobb 5-foszfatáz aktivitással rendelkező konstrukció citoplazmatikus formájában is képes kifejteni némi hatást a plazmamembrán PtdInsP₂ szintjére. (Varnai és mtsai, 2006 alapján)

A méréseket Fura-2 fluoreszcens festékkel töltött COS-7 sejteken végeztük, a Ca²⁺szignált a 4.3-as fejezetben tárgyalt módon, 50 μ M ATP-vel hoztuk létre. A rapamicin adására, azaz a plazmamembrán PtdIns*P*₂ depléciójára másfél perccel az ATP ingerlés után került sor, a fenntartott fázis szakaszában. A mérés 10 μ M LPA adásával zárult, mely a kontroll sejtekben (30. ábra A panel fekete görbe) ismételt Ca²⁺-felszabadulást váltott ki. Rapamicin hatására a fenntartott fázis azonnali csökkenését tapasztaltuk, és elmaradt az LPA adást követő Ca²⁺-válasz is (30. ábra A panel piros görbe). Kontrollként olyan méréseket végeztünk, amelyekben az FKBP-s konstrukció nem tartalmazta az 5-foszfatáz enzimet. Ezekben a rapamicinnek semmilyen hatása nem volt a sejtekre, tehát a kísérletekben kapott változás valóban a PtdIns*P*₂ depléció következménye volt (30. ábra B panel). A kisebb 5foszfatáz aktivitású konstrukció alkalmazásakor a fenntartott fázis gátlása megtörtént, azonban a nagyobb 5-foszfatáz aktivitással bíró konstrukció esetén látottaktól eltérően, LPAval lehetséges volt újabb Ca²⁺-jel kiváltása.

Annak eldöntésére, hogy a fenntartott fázis gátlása a kapacitatív csatornára gyakorolt hatás vagy az Ins P_3 keletkezés hiányában a raktárak Ca²⁺-mal való töltődése következtében jön létre, a Ca²⁺-raktárakat thapsigargin adásával ürítettük, és így aktiváltuk a kapacitatív Ca²⁺-áramot. A 30. ábra D panel alapján ilyen körülmények között a rapamicin adásnak, azaz a plazmamembrán PtdIns P_2 szint csökkentésének nem volt kimutatható hatása a citoplazmatikus [Ca²⁺]-ra. Azt, hogy a PtdIns P_2 depléció valóban bekövetkezett, ATP ingerléssel ellenőriztük. Ez a megfigyelés tehát azt jelenti, hogy a kapacitatív Ca²⁺-áramot a plazmamembrán PtdIns P_2 mennyisége nem befolyásolja, a kapott hatásokért az Ins P_3 keletkezés hiánya a felelős. A kapacitatív Ca²⁺-áramért felelős mechanizmus foszoinozitid függésének vizsgálatáról a 4.5 fejezetben részletesebben lesz szó.

4.4.3 A plazmamembrán PtdInsP₂ depléciójának hatása a Trp M8 csatornára

Ismert, hogy a plazmamembrán PtdIns P_2 mennyisége számos ioncsatorna esetében a működés meghatározó tényezője (Suh és Hille, 2008). Annak tesztelésére, hogy a kidolgozott PtdIns P_2 depléciós rendszer alkalmazható-e ioncsatornák működésének vizsgálatára, egy Ca²⁺-szelektív csatorna, a Trp M8 csatorna működését vizsgáltuk. Kollaboráció keretében egyrészt patch-clamp technikával mértük a csatornán keresztüli ionáramot, másrészt Ca²⁺-méréseket végeztem, ahol a Ca²⁺-beáramlásra a citoplazmatikus [Ca²⁺] változás méréséből következtettünk. A Trp M8 csatornát a rapamicines rendszer működéséhez szükséges két fehérjével együtt COS-7 sejtekben expresszáltuk, majd a csatornát specifikus ligandjával, 500

 μ M mentol adásával aktiváltuk. A csatorna expressziójára a mentol hatására bekövetkező citoplazmatikus [Ca²⁺] emelkedésből, a rapamicines rendszer jelenlétére pedig a sejtek fluoreszcenciájának méréséből következtettünk. Megállapítottuk, hogy azokban a sejtekben, amelyek tartalmazták az 5-foszfatáz konstrukciót, a rapamicin hatására bekövetkező plazmamembrán PtdIns P_2 depléció következményeként a Ca²⁺-válasz mintegy felére csökkent (31. ábra piros görbék). Kontrollként az 5-foszfatázt nem tartalmazó mRFP-FKBP konstrukciót használtuk. Ezekben a sejtekben a mentolos ingerlésre kialakuló megemelkedett [Ca²⁺]-ban a rapamicin adása nem okozott változást (31. ábra fekete görbe). Az elektrofiziológia mérések ezzel a megfigyeléssel lényegében egyező eredményt adtak (Varnai és mtsai, 2006), alátámasztva, hogy a rendszer alkalmazható ioncsatornák PtdIns P_2 függésének vizsgálatára.



30. ÁBRA A plazmamembrán PtdIns P_2 depléciójának hatása a Ca²⁺-mobilizáló agonistával és thapsigarginnal kiváltott citoplazmatikus [Ca²⁺] változásra

A méréseket Fura-2 Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltött COS-7 sejteken végeztük digitális képalkotó eljárás alkalmazásával. A rapamicinnel aktiválható PtdInsP₂ depléciós rendszer FRB-s eleme valamennyi esetben az PM-FRB-CFP konstrukció volt, míg az FKBP-s tagot az ábrák fölött mutatom. Ezeket tranziensen transzfekcióval fejeztük ki a sejtekben. Ingerként 50 μ M ATP-t, 100 nM rapamicint, 10 μ M LPA-t és 200 nM thapsigargint (Tg) alkalmaztunk. A citoplazmatikus [Ca²⁺] változását a Fura-2 hányados időbeli változásának ábrázolásával mutatom. A fekete görbék a nem transzfektálódott sejtek válaszának átlagát mutatják. A PtdInsP₂ depléciós rendszert expresszáló sejtek esetében a hatást mutató átlag számolásába (piros görbék) az összehasonlítás érdekében csak olyan sejteket vettem be, amelyek az mRFP-vel jelzett FKBP-s konstrukciókat közel azonos mértékben expresszálták. Ennek értéke a következő volt (fluoreszcencia egység ± S.E.M.): A: 1705±150 (n=44), B: 1827±295 (n=18), C: 1827±217 (n=22) és D: 2117±276 (n=44). A görbék szórása kisebb volt 5%-nál, a jobb láthatóság érdekében a szórást nem ábrázoltam. Az adatok három független sejtpreparátumból készültek. (Varnai és mtsai, 2006 alapján)



31. ÁBRA A plazmamembrán PtdInsP₂ depléciójának hatása a TrpM8 csatorna aktivitására A méréseket Fura-2 Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltött COS-7 sejteken végeztük digitális képalkotó eljárás alkalmazásával. A rapamicinnel aktiválható PtdInsP₂ depléciós rendszer részein kívül (PM-FRB-CFP és mRFP-FKBP-5-ptase-dom vagy mRFP-FKBP only) a sejtek a TrpM8 csatornát is expresszálták. Ingerként 500 μ M mentolt, és 100 nM rapamicint alkalmaztunk. A csatorna aktivitásra a citoplazmatikus [Ca²⁺] változással arányos Fura-2 hányados méréséből következtettünk. A bal grafikon az egyedi sejtek válaszának átlagát és az átlag hibáját mutatja (fekete görbe mRFP-FKBP-only n=79, piros görbe mRFP-FKBP-5-ptase-dom n=76), míg a jobb oldalon néhány egyedi sejt válasza látható. (Varnai és mtsai, 2006 alapján)

4.4.4 A plazmamembrán PtdInsP₂ 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. Tekintettel arra, hogy korábban nem volt olyan eljárás, ami lehetővé tette a plazmamembrán PtdIns P_2 mennyiségének megbízható csökkentését, az elképzelést többnyire indirekt adatokkal próbálták igazolni (Jost és mtsai, 1998). A rapamicines rendszer létrehozásával azonban 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. Az endocitózis mértékére a sejtekben felhalmozódott fluoreszcencia konfokális mikroszkóppal, vagy a számszerű kifejezésre még megfelelőbb folyadékáramlásos citometriával végzett mérésekből következtettünk. Amint azt a 32. ábra mutatja, mindkét módszer alkalmazásával azt kaptuk, hogy a plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének csökkentése a transzferrin receptor endocitózisának gátlását eredményezi. Kontrollként egyrészt 5foszfatázt nem tartalmazó konstrukciót használtunk, másrészt rapamicin előkezelés nélkül is vizsgáltuk a sejtek transzferrin felvételét. Hatást azonban kizárólag a PtdIns P_2 depléció esetén tapasztaltunk.



32. ÁBRA A plazmamembrán PtdInsP₂ depléciójának hatása a transzferrin receptor endocitózisára

A: A méréseket COS-7 sejteken végeztük, melyekben expresszáltuk a rapamicinnel aktiválható PtdIns P_2 depléciós rendszer részeit (PM-FRB-CFP és mRFP-FKBP-5-ptase-dom vagy mRFP-FKBP only). A transzferrin receptor endocitózisának kimutatására Alexa Fluor 488-cal jelzett transzferrint (Invitrogen) használtunk. A konfokális mérések során egyrészt a jelzett transzferrin felvételét (első oszlop), másrészt a rapamicines rendszer jelenétére utaló mRFP fluoreszcenciát vizsgáltuk (középső oszlop). A kísérlet 100 nM rapamicin adásával kezdődött. A PtdInsP2 szint csökkenésére 3 percet hagytunk, majd következett a receptorok endocitózisának aktiválása a jelzett transzferrin adásával (5 µg/ml). A kísérleteket 33 °C-on végeztük, a képeket a transzferrin adása után 10 perccel készítettük. Az endocitózis mértékére a felhalmozódott transzferrin mennyiségéből következtettünk. A nyilak azokat a sejteket jelzik, amelyek expresszálják a PtdIns P_2 depléciós rendszert. Jól látható, hogy ezek a sejtek rapamicin előkezelés hiányában (w/o rapamycin) felvették a transzferrint, rapamicin kezelés után azonban nem. 5-foszfatáz enzim hiányában a sejtek transzferrin felvételét nem befolyásolta a rapamicin (legfelső sor). B: a folyamat számszerű jellemzése érdekében COS-7 sejteket az A panelen leírtaknak megfelelően kezeltünk, majd a képkészítésnek megfelelő időpontban fixáltunk. A mintákat (minden csoportból alkalmanként 20 ezer sejtet) áramlásos citométerrel mértük meg. Az utólagos analízis során a piros, azaz a PtdInsP₂ depléciós rendszert tartalmazó sejteket szeparáltuk, és az ezekhez tartozó zöld intenzitás értéket, tehát a felvett transzferrin mennyiségét számoltuk. Az ábra ezeknek az értékeknek a statisztikailag feldolgozott eredményét mutatja (átlag ± S.E.M, n=3). Transzferrin felvétel csökkenést egyetlen esetben, az 5-foszfatáz enzim jelenléte és rapamicines kezelés, azaz a plazmamembrán PtdInsP₂ szintjének csökkentésekor tapasztaltuk. (Varnai és mtsai, 2006 alapján)

Igen hasonló módon, Alexa Fluor 488-cal jelzett EGF felhasználásával az EGF receptor endocitózisának PtdIns P_2 függését is megvizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy ebben az esetben a ligand nem halmozódik fel a sejtekben, és a receptorok száma is sokkal kevesebb, a folyamat során a sejtekben mérhető fluoreszcencia nem érte el azt a szintet, hogy áramlásos citométerrel vizsgálni lehessen; így a folyamatot csak konfokális mikroszkóppal tudtuk követni. A mérések során egyértelműen az a kép alakult ki, hogy az EGF receptor internalizációja is érzékeny a PtdIns P_2 deplécióra (33. ábra).



33. ÁBRA A plazmamembrán PtdInsP2 depléciójának hatása az EGF receptor endocitózisára

A mérés körülményei a 32. ábrán leírtakkal megegyeztek, az egyetlen különbség, hogy Alexa Fluor 488transzferrin helyett 400 ng/ml Alexa Fluor 488-EGF-et használtunk (Invitrogen). A nyilak azokat a sejteket jelzik, amelyek expresszálják a heterodimerizációs rendszert (középső oszlop). Míg a jelzett EGF-fel láthatóvá tett receptor sejten belüli megjelenése a sejtek többségében egyértelmű (bal oldali oszlop), azokban a sejtekben, melyekben az 5-foszfatáz (mRFP-FKBP-5-ptase-dom) transzlokálódott a plazmamembránhoz az intracelluláris granulumok száma sokkal kevesebb. (Varnai és mtsai, 2006 alapján)

4.4.5 A PtdInsP₂ depléciós módszer széles körű felhasználása, a rendszer további fejlesztése A plazmamembrán PtdInsP₂ szintjének akut csökkentését lehetővé tévő konstrukciókat a rendszer közlését megelőzően elküldtük néhány laboratóriumba, ahol kollaboráció keretében vizsgálatokba kezdtek velük. Ezekből kiderült kiderült, hogy az általunk kifejlesztett rendszer számos sejttípusban működik, alkalmazásával jelentős új eredmények születtek. A rendszer egyaránt használhatónak bizonyult különböző folyamatok PtdIns(4,5)P₂ függőségének, illetve PtdIns(4,5)P₂ általi szabályozottságának kimutatására. Az előbbire példa a connexin 43 PtdIns P_2 függésének leírása (van Zeijl és mtsai, 2007), az utóbbi pedig a Trp V1 csatorna kettős PtdIns P_2 regulációja (Lukacs és mtsai, 2007). 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 rapamicines heterodimerizáció elvének felhasználásával, és megfelelő tervezéssel sikerült olyan konstrukciókat készítenünk, amelyek alkalmasak a plazmamembrán PtdInsP2 szintjének csökkentésére. Ez önmagában fontos előrelépés az inozitol lipid kutatás területén, azonban a kidolgozott módszer fő jelentősége az, hogy az FRB-t tartalmazó konstrukció más membránokba irányításával, illetve az FKBP-s konstrukciókba különféle típusú és ligandspecificitású enzim beépítésével, elvileg bármely membrán bármely inozitol lipidjének mennyiségét változtathatjuk. Néhány feltételnek viszont teljesülnie kell: szükséges, hogy az FKBP-enzim konstrukció kezdetben citoplazmatikus legyen, ebben a formájában ne hasson az adott inozitol lipidre, rapamicin hatására transzlokálódjon az adott membránhoz, és a membránnál hatásosan fejtse ki enzimatikus aktivitását. Az elmúlt évek számos próbálkozásának fő tanulsága, hogy ezeknek a feltételnek bizony nem könnyű eleget tenni. Ugyanakkor jelentős sikereket is értünk el: a TGN38-as molekula és a Sac1 4-foszfatáz (Nemoto és mtsai, 2000) felhasználásával például sikerült megvalósítanunk a Golgi membrán PtdIns(4)P tartalmának akut csökkentését, ami lehetővé tette e foszfoinozitid frakció szerepének vizsgálatát (közlés alatt). Végezetül meg kell említeni, hogy velünk párhuzamosan, hasonló molekuláris rendszer fejlesztésével más munkacsoportok is sikerrel próbálkoztak, ami a rendszer széles körben történő használhatóságának további bizonyítéka (Fili és mtsai, 2006; Suh és mtsai, 2006).

4.5 A kapacitatív Ca²⁺-beáramlás molekuláris mechanizmusának vizsgálata

A Ca²⁺-mobilizáló hormonok, neurotranszmitterek hatására aktiválódó jelpályák vizsgálatával foglalkozó kutatók érdeklődési körébe, így a mienkbe is a Ca²⁺-szignál és az inozitol lipidek egyaránt beletartoznak. Adódik ez abból a történelmi hagyatékból, miszerint hosszú ideig a foszfoinozitidek biológiai jelentőségét abban láttuk, hogy a PtdInsP₂ előanyagként szolgál az InsP₃ és DAG szintézis során. Ezen túlmenően két további tényező játszott szerepet abban, hogy a Ca²⁺-szignál kialakulásával, azon belül a fenntartott fázisért felelős kapacitatív Ca²⁺beáramlás vizsgálatával részletesen foglalkoztunk: 1.) régóta ismert, hogy a wortmannin, amely az értekezés 4.2-es fejezetében már szóba került mint a PI 3-kinázok gátlószere mikromólos koncentrációban a Ca²⁺-szignál fenntartott fázisának teljes hiányát okozza (Balla és mtsai, 2007). Ebben a magas koncentrációban a wortmannin a PtdInsP₂ keletkezésében alapvető III-as típusú PI 4-kinázokat is gátolja, ami felveti a PtdInsP₂ szerepét a gátlás kialakulásában, de a pontos mechanizmust nem sikerült tisztáznunk. 2.) abban az időben, amikor a STIM1 fehérjét, mint az endoplazmás retikulum $[Ca^{2+}]$ szenzort leírták éppen lezártuk az InsP₃ receptor aktivációra vonatkozó, 4.3-as fejezetben ismertetett kutatást. Bizonvítottuk ugyan a Ca^{2+} -raktárak Ca^{2+} -tartalmának csökkenését, de csak indirekt megfigvelések révén. Mivel a STIM1 fehérje az ER Ca²⁺-raktárak ürülését jellegzetes morfológiai változással jelzi (lásd később), úgy gondoltuk, alkalmazható lesz az InsP₃ receptorok aktiválódása következtében kialakuló raktárürülés közvetlen kimutatására.

4.5.1 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 az N-terminális targetáló szekvenciát (1-22) követően jelenjen meg a fehérjében. Mivel az irányító szekvencia a transzlációt követően lehasad a molekuláról, végső soron a fluoreszcens fehérje a STIM1 molekula luminális végén jelenik meg. A YFP-STIM1 fúziós fehérje vizsgálata már az első konfokális kísérletet alkalmával nagy izgalmat jelentett. A várt ER lokalizációt ugyanis csak a fehérjét igen kis mértékben expresszáló, alig észrevehető sejtekben láttuk. A vizsgálatra használt COS-7 sejtek döntő többségében furcsa, foltos képet kaptunk, ami semmilyen addig látott sejtalkotóra sem hasonlított (34. ábra). Később kiderült, hogy ez a foltos jelenség az ER és a plazmamembrán között kialakuló nagy kiterjedésű kapcsolatnak felel meg, ami bizonyos körülmények között jelenik meg a sejtekben, amilyen például a jelentős STIM1 fehérje expresszió. A foltok

kialakulásában feltehetően a STIM1 molekula plazmamembránba való kijutása játszik szerepet (Hauser és Tsien, 2007). Bár ennek a jelenségnek a vizsgálata is érdekes lett volna, első megközelítésben úgy gondoltuk, az ER-ban található STIM1-gyel foglalkozunk. Az a tény, hogy ehhez nagyon kis expressziójú sejteket kell vizsgálnunk komoly nehézséget jelentett a konfokális kísérletekben, de megfelelt annak az általános törekvésnek, hogy a kísérletekben törekedjünk a vizsgált fehérjék expressziójának csökkentésére elkerülve ezzel a túlprodukció esetleges nemkívánatos következményeit. E célból a YFP-STIM1 fúziós fehérjét kódoló plazmidban a promótert kicseréltük, és az általánosan használt citomegalovírus (CMV) promóter helyére a jóval kisebb transzkripciót eredményező timidin-kináz promótert építettük be. Ezt a konstrukciókban TK-val jelöltük.



34. ÁBRA A fluoreszcensen jelölt STIM1 molekula sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

A humán STIM1 fehérjét N-terminálisan YFP-vel jelöltük. A fúziós fehérjét COS-7 sejtekben tranziensen expresszáltuk, sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A fehérje lokalizációja az expresszió növelésével (balról jobbra haladva) jelentősen változott. Míg kis expresszió esetén a fehérje elsősorban az endoplazmás retikulumot rajzolta ki, expressziójának növelésével a retikuláris lokalizáció mellett foltok jelentek meg, extrém nagy expresszió esetén pedig már ezek a szinte összefüggő foltok uralták a képet. Három dimenziós analízissel egyértelműen megállapítható, hogy ezek a foltok a sejt felszínén helyezkednek el, a plazmamembrán és az ER membrán összefekvésének megfelelő területen. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

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

COS-7 sejtekben, konfokális mikroszkóppal vizsgálva, a YFP-STIM1 molekula jellegzetes változást mutatott. A nyugalomban egyenletes ER rajzolat az ATP ingerlést követően megváltozott, kis csomók jelentek meg, ami a fehérje oligomerizációjának következménye. A hormonális ingerlésre a jelenség főként a perifériás ER-ra terjedt ki. Thapsigargin adása után, amely az ER rendszer egészére kiterjedő Ca²⁺-depléciót eredményez, a csomóképződés
mértéke jelentősen erősödött (35. ábra A panel). A molekula viselkedése megfelelt a más munkacsoportok által is látott képnek, ami azt jelenti, hogy a konstrukció működőképesnek bizonyult.



35. ÁBRA Az intracelluláris Ca²⁺-raktárak ürítésének hatása a STIM1 molekula lokalizációjára

A YFP-vel jelölt STIM1 fehérjét COS-7 sejtekben tranziensen expresszáltuk. A sejteket konfokális (A és C panelek) vagy a sejtfelszíni megjelenést kimutató TIRF mikroszkóppal szobahőmérsékleten vizsgáltuk (B panel). 50 μ M ATP adását követően jellegzetes csomósodást tapasztaltunk, ami a STIM1 molekulák oligomerizációjának következménye. A jelenség további 200 nM thapsigargin (Tg) adására igen kifejezetté vált (A és C). Az oligomerizációval együtt a STIM1 molekulák a sejtfelszínhez vándoroltak, amit a TIRF intenzitás emelkedése mutat (átlag ± S.E.M. n=8) (B). A folyamat reverzibilitásának kimutatására az ATP-t apiráz adásával lebontottuk. Az inger megszűnése az oligomerizáció és a szubplazmalemmáris lokalizáció csökkenését eredményezte (B és C panelek). Az ábrákon feltüntetett csíkok 10 μ m-nek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

Mivel az oligomerizációval párhuzamosan a STIM1 molekulák az ER plazmamembrán közeli részébe vándorolnak, ez a mozgásuk remekül követhető a szubplazmalemmáris térben lévő fluoreszcencia kimutatására alkalmas TIRF technikával. A módszer további előnye, hogy az intenzitásváltozás jól számszerűsíthető. A 35. ábra B paneljén jól látszik, hogy ATP és thapsigargin adását követően növekedett a szubplazmalemmáris fluoreszcencia, ami megfelel a STIM1 molekulák plazmamembránhoz vándorlásának. Mivel az irodalomban nem volt adat a folyamat reverzibilitására vonatkozóan, megvizsgáltuk az inger megszüntetésének következményét. Ehhez az ingerként alkalmazott extracelluláris ATP-t apiráz enzim adásával lebontottuk. Mint látható, a STIM1 molekulák azonnal eltűntek egyrészt a plazmamembrán közeléből (35. ábra B panel), másrészt az oligomerizáció is nagymértékben csökkent (35. ábra C panel), tehát a STIM1 molekula aktivációjának folyamata reverzibilis.

4.5.3 A STIM1 molekula mozgása nem függ a plazmamembrán PtdInsP2 szintjétől

A bevezetőben említettem, hogy az irodalmi és a saját megfigyelések alapján felmerült, hogy a plazmamembrán PtdIns P_2 szintje szerepet játszik a kapacitatív Ca²⁺-beáramlás szabályozásában, azonban a molekuláris részletekről nem állt rendelkezésre információ. Érdemes volt tehát megvizsgálni, vajon a STIM1 molekula aktivációját befolyásolja-e a plazmamembránban lévő PtdInsP₂ változása. Ehhez a 4.4-es fejezetben ismertetett PtdInsP₂ depléciós rendszert használtuk. Mivel a TIRF rendszer alkalmas volt két különböző fluoreszcens fehérje kimutatására, ez lehetővé tette a YFP-vel jelölt STIM1 és a mRFP-vel jelölt 5-foszfatáz enzim párhuzamos kimutatását (36. ábra). ATP hatására, amint az előző ábrán bemutattam, a STIM1 molekula megjelent a szubplazmalemmáris térben. Ugyanakkor az ATP ingerlés az FKBP-5-foszfatáz konstrukció (mRFP-FKBP-5-ptase-dom) mozgását nem befolyásolta. Amint az a 36. ábra A részén látható, rapamicin adását követően bekövetkezett az enzim transzlokációja, és ezzel párhuzamosan a STIM1 aktiváció megszűnt, viszont thapsigarginnal ismét aktiválható volt. Ez a megfigyelés azt jelenti, hogy a PtdIns P_2 szint csökkenés kapcsolatban van ugyan a STIM1 mozgásával, de a gátló hatás nem közvetlenül érvényesül a molekulán. Abban az esetben, ha a mérést Ca²⁺-mentes médiumban végezzük, a PtdInsP₂ depléció önmagában nem gátolta az ATP adásával kiváltott STIM1 aktivációt, a gátlás csak az extracelluláris [Ca²⁺] normalizálását követően jelent meg (36. ábra B panel). Mindez arra utal, hogy az aktiváció csökkenésében nem a PtdInsP₂ depléciónak, hanem a Ca²⁺-raktárak telődésének van szerepe. A plazmamembrán PtdInsP₂ szint csökkentése az InsP3 keletkezés korlátozásán keresztül elősegíti a raktárak telődését, azaz a STIM1 aktiváció ingerének megszűnését.

4.5.4 A STIM1 és Orai1 molekulák expressziójának hatása a Ca²⁺-szignálra

Több munkacsoport kimutatta, hogy a STIM1 és az Orai1 molekula együttes expressziója a Ca²⁺-szignál fenntartott fázisának jelentős növekedéséhez vezet (Mercer és mtsai, 2006;

Soboloff és mtsai, 2006), amiből arra következtettek, hogy e két fehérje elegendő a Ca²⁺beáramlásért felelős komplex kialakításához. Megerősítve ezeket az eredményeket, Fura-2 fluoreszcens festékkel töltött COS-7 sejtekben azt tapasztaltuk, hogy a thapsigarginnal vagy az ATP-vel történő ingerlés hatására bekövetkező Ca²⁺-választ a YFP-STIM1 és Orai1 együttes jelenléte valóban jelentős mértékben fokozta (37. ábra).



36. ÁBRA A plazmamembrán PtdIns*P*₂ szint csökkentésének hatása a STIM1 molekula mozgására A YFP-vel jelölt STIM1 fehérjét, illetve a rapamicines PtdIns*P*₂ depléciós rendszer konstrukcióit COS-7 sejtekben tranziensen expresszáltuk, a sejteket kétcsatornás TIRF mikroszkóppal szobahőmérsékleten vizsgáltuk. Az egyik csatornában a YFP-STIM1 fúziós fehérje raktárürítésre (50 μ M ATP, 200 nM thapsigargin (Tg)), a másikban pedig az mRFP-vel és FKBP-vel jelölt 5-foszfatáz enzim (mRFP-FKBP-5-ptase-dom) rapamicin adására bekövetkező, szubplazmalemmáris megjelenését regisztráltuk. A méréseket normál extracelluláris [Ca²⁺]-jú (A panel) vagy Ca²⁺-mentes (100 μ M EGTA) mérőoldatban végeztük (B panel). Ez utóbbi esetén a mérés folyamán a mérőoldat [Ca²⁺]-ját 2,2 mM CaCl₂ adásával állítottuk helyre. A plazmamembrán PtdIns*P*₂ depléciója a Ca²⁺-mentes közegben nem hatott a STIM1 mozgására, ami azt mutatja, hogy nem közvetlen hatásról van szó, hanem arról, hogy PtdIns*P*₂ hiányában gátolt az Ins*P*₃ szintézis, ami a Ca²⁺-raktárak töltődésén keresztül vezet a STIM1 aktiválódásának csökkenéséhez (átlag ± S.E.M. n=11 (A) és 10 (B). (Varnai és mtsai, 2007 alapján)



37. ÁBRA A YFP-STIM1 és Orai1 molekulák expressziójának hatása a Ca²⁺-szignálra

A méréseket Fura-2 Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltött COS-7 sejteken végeztük digitális képalkotó eljárás alkalmazásával. A sejtek a YFP-STIM1 és fluoreszcensen nem jelölt Orai1 molekulákat tranziensen expresszálták. A citoplazmatikus [Ca²⁺] változását 200 nM thapsigargin (Tg) (A panel) vagy 50 μ M ATP (B panel) adásával idéztük elő. A Fura-2 intenzitás mérésével párhuzamosan a sejtek YFP fluoreszcenciáját, azaz az expresszált YFP-STIM1 fehérje mennyiségét is követtük. A fekete görbék a nem transzfektálódott, kontrollnak tekintett sejtek válaszát mutatják (átlag ± S.E.M., n=20). A színes görbék az egyedi válaszoknak felelnek meg nagyobb (kék) és még éppen kimutatható (piros) YFP-STIM1 expresszió esetén. A megkülönböztetést az ATP-re adott válaszok egyértelmű különbsége indokolta. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

Az egysejtes méréstechnikának köszönhetően észrevettük, hogy míg a thapsigargin ingerlés abból a szempontból okozott jelentős különbséget a sejtek között, hogy mekkora késéssel jelenik meg a Ca²⁺-beáramlásért felelős mechanizmus aktiválódása (37. ábra A panel kék görbék), az ATP esetében a válasz jellegének expresszió-függő változása volt feltűnő. A konstrukciók kismértékű expressziója mellett látott egyszerű Ca²⁺-jel növekedés (37. ábra B panel piros görbék) nagyobb expressziójú sejteknél oszcilláló jellegű válaszba ment át (37. ábra B panel kék görbék). Érdekes módon az ATP után adott thapsigargin hatására az egyedi

sejtek válasza közötti különbség nagymértékben csökkent. Annak tisztázására, hogy miből adódik a thapsigargin ingerlés során megfigyelhető, sejtek közötti különbség, a citoplazmatikus [Ca²⁺] méréseket a STIM1 mozgás követésével kombináltuk. Mivel ezeket a vizsgálatokat TIRF mikroszkópiával végeztük, a [Ca²⁺] mérésére Fura-2 helyett a GFP-hez hasonlító spektrális karakterisztikával rendelkező Fluo-4 festéket alkalmaztuk. A STIM1 mozgás követésére pedig a fehérje mRFP-vel jelölt verzióját használtuk. Amint az a 38. ábrán megfigyelhető, thapsigargin hatására a STIM1 transzlokációban is jelentős különbség alakult ki a sejtek között (A panel), azonban a STIM1 mozgás az egyedi sejtekben párhuzamosan változott a Ca²⁺-jel emelkedésével (B panel). A különbség oka tehát a STIM1 vándorlás egyedi sejtekben való eltéréséből adódott.



38. ÁBRA A thapsigargin hatására bekövetkező STIM1 mozgás a citoplazmatikus [Ca²⁺] emelkedéssel párhuzamosan változik

A méréseket Fluo-4 Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel töltött, fluoreszcensen jelölt STIM1 és fluoreszcensen nem jelölt Orai1 molekulákat tranziensen expresszáló COS-7 sejtekeben, szobahőmérsékleten végeztük kétcsatornás TIRF mikroszkóppal. Az egyik csatornában a Fluo-4 intenzitás változását, a másikban a YFP-STIM1 fúziós fehérje megjelenését rögzítettük. A STIM1 molekula 200 nM thapsigargin (Tg) hatására bekövetkező szubplazmalemmáris megjelenését egyedi sejtekben mutatom (A panel). A jobb áttekinthetőség érdekében a párhuzamosan mért citoplazmatikus [Ca²⁺] változást három sejt esetében hasonlítottuk össze (B panel). Jól látható, hogy azokban a sejtekben, amelyeknél a STIM1 transzlokáció hosszabb ideig tartott, a citoplazmatikus Ca²⁺-szignál fenntartott fázisnak megfelelő része ugyancsak később alakult ki. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

4.5.5 A plazmamembrán és az endoplazmás retikulum közötti mesterséges kapcsolat, a "rapa-folt" kialakítása

A 4.4-es fejezetben leírtam, miként alkalmaztuk a rapamicin aktiválta heterodimerizációs rendszert egyes citoplazmatikus fehérjék plazmamembránhoz irányítására. A munka során felvetődött, vajon megvalósítható lenne-e két membrán közötti kapcsolat létrehozása hasonló elven. Ehhez a rendszer mindkét tagját, tehát az FRB domént és az FKBP12 fehérjét, membránok felszínére kell irányítani figyelembe véve azt, hogy kölcsönhatásuk során az FKBP12 C-terminális vége és az FRB domén mindkét vége azonos irányba mutat (Choi és 1996). A kapacitatív Ca²⁺-beáramlásért felelős komplex vizsgálatához a mtsai, plazmamembrán és az ER közötti kapcsolat változtatására volt szükség, ezért az FKBP12-t a plazmamembránhoz, az FRB-t pedig az ER felszínére irányítottuk. A plazmamembránhoz irányítást ebben az esetben is egy N-terminális target szekvencia segítségével értük el, ami azonban a Lyn fehérjéből származott (1-20 aminosavak) (Inoue és mtsai, 2005), de a targetálás mechanizmusának szempontjából (palmitoiláció és mirisztoiláció) a korábban használt szekvenciával egyezett. Az ER targetáláshoz szintén egy másik fehérje, az ER rezidens Sac1 foszfatáz C-terminális irányító szekvenciáját (521-587 aminosavak) használtuk (Nemoto és mtsai, 2000), amit az FRB domén C-terminális végéhez kötöttünk. Kimutatásuk és vizsgálhatóságuk érdekében mindkét fehérjét fluoreszcens fehérjével is jelöltem, tehát végül is a következő két konstrukció jött létre: PM-FKBP-mRFP és CFP-FRB-ER.

A konstrukciókat COS-7 sejtekben kifejezve, és konfokális mikroszkópban vizsgálva, azok a saját irányító szekvenciájuknak megfelelő lokalizációt mutatták, tehát a PM-FKBPmRFP konstrukció a plazmamembrán, a CFP-FRB-ER konstrukció pedig ER lokalizációt mutatott (39. ábra A panel a-c képek). Rapamicin (100 nM) adását követően mindkét konstrukció lokalizációja megváltozott. Perceken belül kolokalizáló pontok jelentek meg, amelyek folyamatosan növekedtek, és továbbra is tökéletes kolokalizációt adtak (39. ábra A panel d-i képek). A kialakult morfológiai kép nagyon hasonlított ahhoz, amit a jelentős STIM1 expresszió esetén tapasztaltunk (34. ábra). Úgy gondoljuk, hogy a folyamat azokban a pontokban kezdődik, 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 mesterségesen összekapcsolt plazmamembrán-ER területeket "rapa-folt"-nak neveztük el. Fontos megjegyezni, hogy a "rapa-folt" kialakulása az ER centrális struktúráját alapvetően nem befolyásolta (39. ábra B panel).



39. ÁBRA A plazmamembrán és az endoplazmás retikulum közötti mesterséges kapcsolat, a "rapa-folt" kialakulása

COS-7 sejteket a plazmamembránhoz irányított és fluoreszcens fehérjével jelölt FKBP-t (PM-FKBP-mRFP) és az ER citoplazmatikus felszínéhez irányított, ugyancsak fluoreszcensen jelölt FRB domént (CFP-FRB-ER) kódoló DNS-sel transzfektáltuk. A mindkét fehérjét expresszáló sejteket szobahőmérsékleten konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A képek, amelyeket a fluoreszcens fehérjéknek megfelelő csatornákban rögzítettünk, a sejtek tapadási felszínének rétegében készültek. A konstrukciók a mérések elején az irányításuknak megfelelő lokalizációt mutatták, azaz a CFP-szignál az ER-nak (panel A, b kép), az mRFP-szignál pedig a plazmamembránnak felelt meg (panel A, a kép). Rapamicin (100 nM) hatására a konstrukciók 1-2 percen belül jellegzetes morfológiai változáson mentek át, egymással tökéletes fedést mutató, foltszerű struktúrák jelentek meg, melyeket "rapa-folt"-nak neveztünk el (A panel, d-i képek). Felhívom a figyelmet a nagymértékű STIM1 expresszió esetén látott struktúrákkal való hasonlóságra (34. ábra). Az ER struktúra egyidejű kimutatásával (FRB-t nem tartalmazó GFP-ER konstrukció koexpresszió) a "rapa-folt" kialakulása ellenére az ER retikuláris struktúrája alapvetően intakt maradt (B panel). Az egyesített képeken a zöld szín a CFP-vel vagy GFP-vel, a piros szín az mRFP-vel jelölt konstrukciót mutatja. Az ábrákon feltüntetett csíkok 10 µm-nek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

4.5.6 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 is (40. ábra a-c képek). Az alkalmazott gyors és erőteljes Ca²⁺-raktár ürítés (ATP és thapsigargin együttes adásával) a "rapa-folt"-okat nem befolyásolta, viszont a STIM1 aktiválódás jeleként bekövetkezett a fehérje oligomerizációja, és megjelentek a STIM1 csomók (40. ábra d-i). Az egyesített

képeken, különösen a nagyított felvételen (40. ábra i kép) jól látszik, hogy a STIM1 csomók nem véletlenszerűen jelentek meg, hanem szigorúan a foltok szélénél helyezkedtek el. Fordított esetben, vagyis amikor először a STIM1-et aktiváltuk, és rapamicin adásával ezt követően hoztuk létre a "rapa-folt"-okat, ismételten a szoros kapcsolat jeleit tapasztaltuk, de itt a foltok a STIM1 csomókból kiindulva, kivételesen azokat körbevéve jöttek létre (41. ábra).



40. ÁBRA A "rapa-folt" meghatározza az aktiválódott STIM1 molekulák lokalizációját

COS-7 sejteket a "rapa-folt" kialakításához szükséges PM-FKBP-mRFP-t és CFP-FRB-ER-t, illetve a csökkentett expresssziójú TK-YFP-STIM1 molekulát kódoló DNS-sel transzfektáltuk, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A mérés során első lépésként 100 nM-os rapamicin ingerléssel létrehoztuk a jellegzetes "rapa-folt"-okat. A STIM1 ER lokalizációjának megfelelően a YFP-STIM1 ilyenkor megjelent a "rapa-folt"-oban (felső sor). A Ca²⁺-raktárak intenzív ürítésének hatására (50 μM ATP és 200 nM thapsigargin (Tg) együttes adása) a STIM1 oligomerizáció következtében megjelentek a jellegzetes csomók, amelyek szigorúan a "rapa-folt"-ok szélénél helyezkedtek el (f és nagyobb nagyításban az i kép). Az egyesített képeken a zöld szín a YFP-vel, a piros szín az mRFP-vel jelölt konstrukciót mutatja. Az ábrákon feltüntetett csíkok 10 μm-nek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

4.5.7 A fluoreszcens fehérjével jelölt Orai1 molekula működésének jellemzése

A STIM1 molekulák az oligomerizációt és a plazmamembránhoz jutásukat követően kapcsolatba lép a kapacitatív Ca²⁺-csatorna Orai1-gyel. A STIM1 molekula és a "rapa-folt" között kialakuló sajátos kapcsolat felfedezése után fontos volt megvizsgálni, vajon a "rapa-folt" befolyásolja-e, és ha igen, akkor miként az Orai1 molekulát. Ehhez azonban ez utóbbit is láthatóvá kellett tennünk, ezért a C-terminális végén fluoreszcens fehérjével jelöltük. Tanulva a korábbi tapasztalatokból, miszerint mindig olyan színű konstrukció lenne a legideálisabb, ami még éppen nincs, a CFP-vel, YFP-vel és mRFP-vel jelölt Orai1-t is elkészítettem. Amint

azt a 42. ábra mutatja, a molekula úgy viselkedett, ahogy az irodalmi adatok alapján várható volt: a plazmamembránban helyezkedett el (A panel), a STIM1-gyel együtt expresszálva fokozta a thapsigarginnal kiváltott Ca²⁺-jelet (B panel), és megjelent a Ca²⁺-raktárak ürítését követően kialakult STIM1 csomókban (C panel). Az Orai1-t önmagában expresszálva ez utóbbi morfológiai változást nem tudtunk kimutatni (42. ábra D panel), feltehetően az igen alacsony endogén STIM1 expresszió miatt.



41. ÁBRA A plazmamembránhoz vándorolt STIM1 oligomer meghatározza a "rapa-folt" kialakulását COS-7 sejteket a "rapa-folt" kialakításához szükséges PM-FKBP-mRFP és CFP-FRB-ER konstrukciókat, valamint a csökkentett expressziójú TK-YFP-STIM1 molekulát kódoló DNS-sel transzfektáltuk. A fehérjéket expresszáló sejteket szobahőmérsékleten konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (TK-YFP-STIM1 és PM-FKBP-mRFP). A mérés során első lépésként a Ca²⁺-raktárakat 200 nM-os thapsigargin ingerléssel ürítettük, minek következtében kialakultak a jellegzetes STIM1 csomók (a kép). Ez a beavatkozás a PM-FKBP-mRFP plazmamembrán lokalizációját nem befolyásolta. Ezután következett a "rapa-folt"-ok kialakítása 100 nM rapamicin adásával. Három perc elteltével a foltok már szépen kialakultak. A STIM1 oligomerekkel való kapcsolat ebben az esetben is egyértelmű (f és nagyobb nagyításban az i kép). Különbséget legfeljebb annyiban tapasztaltunk, hogy helyenként a "rapa-folt" lényegében körbevett egy STIM1 csomót (nyilak). Az egyesített képeken a zöld szín a YFP-vel, a piros szín az mRFP-vel jelölt konstrukciót mutatja. Az ábrákon feltüntetett csíkok 10 μm-nek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

4.5.8 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 eltűnt (43. ábra A panel). Ilyen körülmények között a raktárak ürítésének hatására az Orai1 molekula STIM1 expresszió nélkül is mutatta a

csomóképződést a foltok szélénél (43. ábra B panel), a jelenség azonban STIM1 együttes expressziójával jelentősen fokozható volt (43. ábra C panel). Az észlelt morfológiai változások magyarázatára azt feltételeztük, hogy abban elsődleges az Orai1 molekulák kiszorulása a mesterséges kapcsolat, azaz a "rapa-folt"-ok területéről, és minden más jelenség (STIM1 csomók elhelyezkedése a folt szélénél, endogén STIM1 "bekoncentrálódás" és ebből adódóan az Orai1 csomók megjelenése) ennek tulajdonítható.





A humán Orai1 molekulát C-terminálisan fluoreszcens fehérjével jelöltük. A kapott fúziós fehérjét COS-7 sejtekben expresszálva, és konfokális mikroszkóppal vizsgálva, szép plazmamembrán lokalizációt kaptunk (A panel). Annak ellenőrzésére, hogy a konstrukció funkcióképes Ca²⁺-csatornaként működik, Fura-2-vel töltött COS-7 sejtekben YFP-STIM1 molekulával koexpresszáltuk, és vizsgáltuk a 200 nM thapsigargin (Tg) adására bekövetkező citoplazma [Ca²⁺] (B panel) és a konstrukciók lokalizációjának (C panel) változását. Az STIM1 és Orai1 konstrukciókat egyaránt expresszáló sejtekben a kontroll sejtekhez képest (fekete görbe) hatalmas citoplazmatikus [Ca²⁺] növekedést kaptunk, ami a csatorna működésének egyértelmű jele (piros görbék), illetve konfokális mikroszkóppal nézve a sejteket, egyértelmű volt az Orai1 molekula megjelenése a STIM1 csomókban. Érdekes módon ez utóbbi jelenség abban az esetben, ha a sejtek az Orai-YFP-t önmagukban expresszálták, nem volt megfigyelhető (D panel). Az egyesített képeken a zöld szín a CFP-vel, a piros szín a YFP-vel jelölt konstrukciót mutatja. Az ábrán feltüntetett csík 10 μm-nek felel meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)



43. ÁBRA A "rapa-folt" kialakítása befolyásolja az Orai1 molekulák membránon belüli elhelyezkedését COS-7 sejteket a "rapa-folt" kialakításához szükséges PM-FKBP-CFP és CFP-FRB-ER konstrukciókat, valamint az Orai1-YFP molekulát kódoló DNS-sel transzfektáltuk. A fehérjéket expresszáló sejteket szobahőmérsékleten konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Orai1-YFP és "rapa-folt"). A jellegzetes "rapa-folt"-okat 100 nM rapamicin adásával hoztuk létre (A panel, a kép). A plazmamembrán azon részeiről, ahol a "rapa-folt" létrejött, az Orai1-YFP eltűnt (A panel, b kép). Különösen jól látszik ez a két csatorna egymásra vetített képén, ahol a piros szín felel meg a "rapa-folt"-nak, míg a zöld az Orai1-nek (A panel, c kép). Ilyen körülmények között a Ca²⁺-raktárak ATP/Tg koktéllal történő ürítése esetén már kimutatható az Orai1 molekulák csomókban való megjelenése, melyek ebben az esetben is jellegzetesen a "rapa-folt"-ok szélénél helyezkedtek el (B panel). A jelenség jelentősen fokozható a STIM1 fehérje koexpressziójával (TK-YFP-STIM1) (C panel). Az ábrákon feltüntetett csíkok 10 µm-nek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

Eddigi megfigyeléseket összefoglalva megállapíthatjuk, úgy tűnik, az Orai1 molekula túl nagy, egyszerűen nem fér el a két membrán közötti résben. Felmerült, hogy az Orai1 méretnövekedése nem a fluoreszcens fehérjével való jelölés miatt következett-e be. Mivel azonban a STIM1 molekula kiszorulását a "rapa-folt"-ból azokban a kísérletekben is észleltük, ahol a rapás rendszer fehérjéi mellett csak a YFP-STIM1-et expresszálták a sejtek (az tehát kizárólag az endogén Orai1 molekulával léphetett kölcsönhatásba), ezt a feltételezést kizárhatjuk (40. ábra). Ha azonban a membránok közötti réstávolság növelésével az Orai1 molekula kiszorulását képesek lennénk megakadályozni, az komoly érv lenne a nem jelölt Orail méretére is vononatkozó megállapítások helyessége mellett.



44. ÁBRA A plazmamembrán és endoplazmás retikulum közötti réstávolság növelésének hatása a STIM1 és Orai1 molekulákra

A réstávolság növeléséhez az FKBP-s konstrukcióba a plazmamembránhoz irányító szekvencia és az FKBP fehérje közé, az FRB-s konstrukcióba pedig az ER-hoz irányító szekvencia és az FRB domén közé egy-egy helikális linkert (9 x EAAAR) építettünk be (PM-LL-FKBP-CFP és CFP-FRB-LL-ER). COS-7 sejteket a "rapa-folt" kialakításához szükséges FKBP-s és FRB-s konstrukciókat, valamint az Orai1-YFP és bizonyos esetekben (B és C panel) fluoreszcensen jelzett STIM1 molekulát kódoló DNS-sel transzfektáltuk. A fehérjéket expresszáló sejteket szobahőmérsékleten konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. (Orai1-YFP és "rapa-folt"). A jellegzetes "rapa-folt"-okat 100 nM rapamicin adásával hoztuk létre (A panel, a kép). Nagyobb réstávolság esetén a plazmamembrán azon részeiről, ahol a "rapa-folt" létrejött, az Orai1-YFP már nem tűnt el (A panel, b kép). Ilyen körülmények között a Ca²⁺-raktárak ATP/Tg koktéllal történő ürítése esetén az Orai1 fehérje megjelent a "rapa-folt"-ban, és kolokalizált a STIM1-gyel (B panel). A jelenség az idő előrehaladtával egyre kifejezettebbá vált (C panel). A nagyobb réstávolság esetén a STIM1 molekula oligomerizációja elmaradt. Az ábrákon feltüntetett csíkok 10 μm-nek felelnek meg. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

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

A membránok közötti réstávolság növelésére az FRB-s és FKBP-s konstrukciókat módosítottuk, és egy-egy 45 aminosavból álló linkert építettünk be a targetszekvenciák mellé. A linkert úgy terveztük meg, hogy az 9 darab olyan aminosavból álló egységet tartalmazott (EAAAR), amelyek feltételezhetően helikális másodlagos szerkezetet alakítottak ki és képesek voltak az FRB domén és az FKBP fehérje membránoktól való eltávolítására. Amennyiben a "rapa-folt"-okat ezekkel az új konstrukciókkal hoztuk létre (PM-LL-FKBP-CFP és CFP-FRB-LL-ER – az LL jelzi a hosszú linkert), az Orai1-YFP molekula nem szorult ki a "rapa-folt"-ból (44. ábra A panel), sőt a STIM1/Orai1 rendszer aktiválását követően (ATP és thapsigargin együttes adása) az Orai1 molekulák a "rapa-folt"-ok területére koncentrálódtak (44. ábra B és C panelek). Ilyen körülmények között sem a STIM1, sem az Orai1 esetében nem láttuk jelét a csomók megjelenésének, ami azt jelenti, hogy ebben a speciális esetben a két molekula közötti kölcsönhatás kialakulása a STIM1 oligomerizációja nélkül bekövetkezett.

4.5.10 A kapacitatív Ca²⁺-beáramlásért felelős molekuláris komplex felépítésének modellje

A plazmamembrán és az ER közötti mesterséges kapcsolat kialakítása a STIM1 és az Orai1 molekulák jellegzetes lokalizációját eredményezte. A lokalizáció jellegzetessége, hogy a STIM1 és Orai1 közötti kapcsolat kialakulásakor a molekulák kizárólag a membránok összefekvése mentén voltak találhatók, ami az Orai1 kiszorulásának következménye. Mivel az Orai1 molekula mérete önmagában ezt nem indokolja, magyarázatként feltételezzük, hogy az Orai1 egy feltehetően több molekulából álló komplex részeként helyezkedik el a plazmamembránban. A membránok közötti kapcsolatot kialakító fehérjék méretének becsléséből úgy gondoljuk, hogy a komplex mérete biztosan meghaladja az 5 nm-t (45. ábra bal oldali rajz). Tekintettel arra, hogy a réstávolság növelésével képesek voltunk olyan állapotot létrehozni, melynél az Orai1-t tartalmazó fehérjekomplex már elfért a résben, a komplex méreté felülről is tudunk becslést adni. Eszerint a komplex mérete a 12-14 nm-t nem haladja meg (45. ábra jobb oldali rajz).

4.5.11 A plazmamembránban található PtdIns(4)P hatása a STIM1/Orai1-mediálta Ca²⁺beáramlásra

Egy másik kísérletsorozatban Fura-2-vel töltött COS-7 sejtek citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ jának mérése során azt találtuk, hogy a PtdIns P_2 depléció ugyan nem befolyásolta az ATP és thapsigargin (50 μ M és 200 nM) együttes adásával kiváltott kapacitatív Ca²⁺-beáramlást, de a PI 4-kináz gátlása 300 μ M LY294002-vel, a Ca²⁺-jel fenntartott fázisát gátolta. Ez a kísérlet lényegében azt az előző megfigyelésemet erősítette meg, miszerint az 1-es típusú angiotenzin II receptort stabilan expresszáló sejtekben a thapsigargin hatására megemelkedett citoplazmatikus [Ca²⁺] emelkedés PtdIns*P*₂ deplécióval nem, viszont angiotenzin II adásával gátolható volt. Mivel mindkét felállásban csökkent a plazmamembrán PtdIns(4)*P* szintje, az eredmények önmagukban felvetik a kapacitatív Ca²⁺-beáramlás PtdIns(4)*P* foszfát érzékenységének lehetőségét, amit a további vizsgálatok egyértelműen igazoltak is (Korzeniowski és mtsai, 2009). A közlemény tartalmazza ugyan az eredeti megfigyelésemet, és az általam készített konstrukciók felhasználásával készült, mivel azonban a kísérleteket mások végezték, részletes ismertetése nem része a jelen értekezésnek.



45. ÁBRA A kapacitatív Ca²⁺-beáramlásért felelős molekuláris komplex felépítésének modellje

A bal oldali rajz azt az állapotot mutatja, amikor a mesterségeses plazmamembrán és endoplazmás retikulum kapcsolat ("rapa-folt") következményeként az Orai1 molekula kiszorul a foltok szélére, és ennek következtében a STIM1 és Orai1 komplex is kizárólag a széleken tud kialakulni. A réstávolság növelésekor (jobb oldali rajz) az Orai1 molekula elfér a résben, a STIM1-Orai1 kölcsönhatás a résen belül megvalósul. Mivel az Orai1 molekula intracelluláris része nem haladja meg sem az FRB vagy FKBP konstrukciók, sem a STIM1 molekula intracelluláris darabjának méretét, feltételezzük, hogy egy nagyobb komplex részekén van jelen a plazmamembránban. A réstávolságok méretéből számolva a komplex mérete biztosan meghaladja a 6-7 nm-t, de nem nagyobb 12-14 nm-nél. (Varnai és mtsai, 2007 alapján)

5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

- 1. Kimutattuk, hogy a foszfolipáz C enzim PH doménjének PtdIns $(4,5)P_2$ 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 PtdIns(3,4,5)P₃ kötésére képes PH domének funkcionálisan eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. Az Akt és a GRP1 fehérjék PH doménjében pontmutánsok létrehozásával bizonyítottuk, hogy az eltérés hátterében 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 InsP₃ receptor N-terminális, ligandkötésért felelős doménje az endogén InsP₃ 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 Ca²⁺-mobilizáló hormonnal létrehozott Ca²⁺-szignál, a Trp M8 ioncsatorna, valamint a transzferrin és az EGF receptor endocitozisának PtdIns P_2 érzékenységét.
- 5. Kimutattuk, hogy a fluoreszcens fehérjével jelölt humán STIM1 molekula Ca²⁺-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 kapacitatív Ca²⁺-beáramlásért egy olyan molekulakomplex felelős, amely a STIM1-en és Orai1 fehérjéken kívül más fehérjé(ke)t is tartalmaz.

6. A kutatás jelentősége

Az értekezésben bemutatott kutatómunka alapkutatás, 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.

7. Irodalomjegyzék

- Auger, K. R., Serunian, L. A., Soltoff, S. P., Libby, P. and Cantley, L. C. (1989). PDGFdependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57, 167-75.
- Balla, A., Ju Kim, Y., Varnai, P., Szentpetery, Z., Knight, Z., Shokat, K. M. and Balla, T. (2007). Maintenance of Hormone-sensitive Phosphoinositide Pools in the Plasma Membrane Requires Phosphatidylinositol 4-Kinase III {alpha}. *Mol Biol Cell*.
- Balla, T., Bondeva, T. and Varnai, P. (2000). How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trends Pharmacol Sci* 21, 238-41.
- Barr, A. J., Ali, H., Haribabu, B., Snyderman, R. and Smrcka, A. V. (2000). Identification of a region at the N-terminus of phospholipase C-beta 3 that interacts with G protein beta gamma subunits. *Biochemistry* **39**, 1800-1806.
- Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry. Biochem J 312 (Pt 1), 1-11.
- Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S. and Bell, G. I. (1993). Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J.Biol.Chem.* 268, 11356-11363.
- Boehning, D. and Joseph, S. K. (2000). Direct association of ligand-binding and pore domains in homo- and heterotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *EMBO J.* 19, 5450-5459.
- Bosanac, I., Alattia, J. R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., Tong, K. I., Yoshikawa, F., Furiuchi, T., Iwai, M. et al. (2002). Structure of the inositol 1,4,5trishphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature* **420**, 696-700.
- Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K. and Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 14955-14960.
- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca(2+) entry. Nat Cell Biol 11, 669-77.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. and Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99, 7877-7882.
- Carlton, J. G. and Cullen, P. J. (2005). Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol* 15, 540-7.
- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L. and Clardy, J. (1996). Structure of the FKBP12rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273, 239-42.
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T. and Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* 18, 2244-53.

- Csordas, G., Thomas, A. P. and Hajnoczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* 18, 96-108.
- **Devogelaere, B., Verbert, L., Parys, J. B., Missiaen, L. and De Smedt, H.** (2008). The complex regulatory function of the ligand-binding domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Cell Calcium* **43**, 17-27.
- Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P. and Alessi, D. R. (2000). Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem.J.* 351, 19-31.
- Downes, C. P., Gray, A. and Lucocq, J. M. (2005). Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol* 15, 259-68.
- Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G., Fournier, E., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y. and Lemmon, M. A. (2000). Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol.Cell* 6, 373-384.
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. and Sigler, P. B. (1995). Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83, 1037-46.
- Fili, N., Calleja, V., Woscholski, R., Parker, P. J. and Larijani, B. (2006). Compartmental signal modulation: Endosomal phosphatidylinositol 3-phosphate controls endosome morphology and selective cargo sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15473-8.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K. H. and Mak, D. O. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca2+ release channels. *Physiol Rev* 87, 593-658.
- Fukuda, M., Kojima, T., Kabayama, H. and Mikoshiba, K. (1996). Mutation of the pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tertakisphosphate binding capacity. *J.Biol.Chem.* **271**, 30303-30306.
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. and Mikoshiba, K. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphatebinding protein P400. *Nature* 342, 32-38.
- Gomes, D. A., Rodrigues, M. A., Leite, M. F., Gomez, M. V., Varnai, P., Balla, T., Bennett, A. M. and Nathanson, M. H. (2007). C-met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem*.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. and Fesik, S. W. (1994). Plekstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-170.
- Hauser, C. T. and Tsien, R. Y. (2007). A hexahistidine-Zn2+-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3693-7.
- Hokin, M. R. and Hokin, L. E. (1953). Enzyme secretion and incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J.Biol.Chem.* 203, 967-977.
- Hoth, M. and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- Hunyady, L., Baukal, A. J., Balla, T. and Catt, K. J. (1994). Independence of type 1 angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *J.Biol.Chem.* **269**, 24798-24804.

- **Inoue, T., Heo, W. D., Grimley, J. S., Wandless, T. J. and Meyer, T.** (2005). An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat Methods* **2**, 415-8.
- Jaconi, M., Bony, C., Richards, S. M., Terzic, A., Arnaudeau, S., Vassort, G. and Puceat, M. (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell* 11, 1845-58.
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J. M., Lemmon, M. A. and Schmid, S. L. (1998). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* **8**, 1399-402.
- Kanematsu, T., Takeya, H., Watanabe, Y., Ozaki, S., Yoshida, M., Koga, T., Iwanaga, S. and Hirata, M. (1992). Putative inositol 1,4,5-trisphosphate binding proteins in rat brain cytosol. J Biol Chem 267, 6518-25.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y. and Lemmon, M. A. (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J.Biol.Chem.* 273, 30497-30508.
- Kerschbaum, H. H. and Cahalan, M. D. (1999). Single-channel recording of a storeoperated Ca2+ channel in Jurkat T lymphocytes. *Science* 283, 836-9.
- Kisseleva, M. V., Wilson, M. P. and Majerus, P. W. (2000). The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* 275, 20110-6.
- Kong, A. M., Speed, C. J., O'Malley, C. J., Layton, M. J., Meehan, T., Loveland, K. L., Cheema, S., Ooms, L. M. and Mitchell, C. A. (2000). Cloning and characterization of a 72-kDa inositol-polyphosphate 5-phosphatase localized to the Golgi network. *J Biol Chem* 275, 24052-64.
- Korzeniowski, M. K., Popovic, M. A., Szentpetery, Z., Varnai, P., Stojilkovic, S. S. and Balla, T. (2009). Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *J Biol Chem* 284, 21027-35.
- Lecompte, O., Poch, O. and Laporte, J. (2008). PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem Sci* **33**, 453-60.
- Lee, S. B., Varnai, P., Balla, A., Jalink, K., Rhee, S. G. and Balla, T. (2004). The pleckstrin homology domain of phosphoinositide-specific phospholipase Cdelta4 is not a critical determinant of the membrane localization of the enzyme. *J Biol Chem* 279, 24362-71.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 99-111.
- Lin, X., Varnai, P., Csordas, G., Balla, A., Nagai, T., Miyawaki, A., Balla, T. and Hajnoczky, G. (2005). Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem* 280, 12820-32.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr.Biol.* 15, 1235-1241.
- Luik, R. M. and Lewis, R. S. (2007). New insights into the molecular mechanisms of storeoperated Ca2+ signaling in T cells. *Trends Mol Med* 13, 103-7.

- Lukacs, V., Thyagarajan, B., Varnai, P., Balla, A., Balla, T. and Rohacs, T. (2007). Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci* 27, 7070-80.
- Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to coexpression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. J Biol Chem 281, 24979-90.
- Michell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim.Biophys.Acta* **415**, 81-147.
- Michell, R. H. (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 151-61.
- Mignery, G. A. and Sudhof, T. C. (1990). The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *EMBO J.* 9, 3893-3898.
- Muthuswamy, S. K., Gilman, M. and Brugge, J. S. (1999). Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* **19**, 6845-57.
- Nagano, K., Fukami, K., Minagawa, T., Watanabe, Y., Ozaki, C. and Takenawa, T. (1999). A novel phospholipase C delta4 (PLCdelta4) splice variant as a negative regulator of PLC. *J.Biol.Chem.* **274**, 2872-2879.
- Nemoto, Y., Kearns, B. G., Wenk, M. R., Chen, H., Mori, K., Alb, J. G., Jr., De Camilli, P. and Bankaitis, V. A. (2000). Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity. J Biol Chem 275, 34293-305.
- Ogasawara, M., Kim, S. C., Adamik, R., Togawa, A., Ferrans, V. J., Takeda, K., Kirby, M., Moss, J. and Vaughan, M. (2000). Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem* 275, 3221-30.
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M. J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J. J., Totty, N. F. et al. (1991). Characterization of two 85 kDa proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell* 65, 91-104.
- **Parekh, A. B.** (2003). Store-operated Ca2+ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol* **547**, 333-48.
- Parekh, A. B. and Putney, J. W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Phys. Rev.* 85, 757-810.
- Partiseti, M., Le Deist, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H. and Choquet, D. (1994). The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 269, 32327-35.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J. P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 8, 771-3.
- **Pinton, P., Pozzan, T. and Rizzuto, R.** (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *Embo J* **17**, 5298-308.

- Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D. et al. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. *J.Cell Biol.* 169, 435-445.
- Rossier, M. F., Bird, G. S. J. and Putney, J. W., Jr. (1991). Subcellular distribution of the calcium-storing inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive organelle in rat liver. *Biochem.J.* 274, 643-650.
- Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M. and Suzuki, A. (2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res* 48, 307-43.
- Schindl, R., Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Fritsch, R., Bergsmann, J. and Romanin, C. (2009). Recent progress on STIM1 domains controlling Orai activation. *Cell Calcium* 46, 227-32.
- Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D. and Emr, S. D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.
- Schug, Z. T. and Joseph, S. K. (2006). The role of the S4-S5 linker and C-terminal tail in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function. *J Biol Chem* 281, 24431-40.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W. and Gill, D. L. (2006). Orail and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 281, 20661-5.
- Spät, A., Bradford, P. G., McKinney, J. S., Rubin, R. P. and Putney, J. W. (1986). A saturable receptor for 32P-inositol-1,4,5-trisphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature* **319**, 514-516.
- Stauffer, T. P., Ahn, S. and Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P2 concentration monitored in living cells. *Curr.Biol.* 8, 343-346.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Schulz, I. (1983). Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**, 67-68.
- Sudhof, T. C., Newton, C. L., Archer, B. T., 3rd, Ushkaryov, Y. A. and Mignery, G. A. (1991). Structure of a novel InsP3 receptor. *Embo J* 10, 3199-206.
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. and Kurosaki, T. (1997). Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* 16, 3078-3088.
- Suh, B. C. and Hille, B. (2008). PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* 37, 175-95.
- Suh, B. C., Inoue, T., Meyer, T. and Hille, B. (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P2 gate KCNQ ion channels. *Science* **314**, 1454-7.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T. and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca2+ channels. *J Cell Biol* 175, 901-11.

- Tanimura, A., Nezu, A., Morita, T., Turner, R. J. and Tojyo, Y. (2004). Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-trisphosphate in single living cells. *J.Biol.Chem.* 279, 38095-38098
- Terrillon, S. and Bouvier, M. (2004). Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *Embo J* 23, 3950-61.
- Thomas, C. C., Deak, M., Alessi, D. R. and van Aalten, D. M. (2002). High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol* 12, 1256-62.
- Tsukada, S., Simon, M., Witte, O. and Katz, A. (1994). Binding of the betagamma subunits of heterotrimeric G-proteins to the PH domain of Bruton's tyrosine kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, 11256-11260.
- Uchida, K., Miyauchi, H., Furiuchi, T., Michikawa, T. and Mikoshiba, K. (2003). Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J.Biol.Chem.* **278**, 16551-16560.
- van der Wal, J., Habets, R., Varnai, P., Balla, T. and Jalink, K. (2001). Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276, 15337-44.
- van Zeijl, L., Ponsioen, B., Giepmans, B. N., Ariaens, A., Postma, F. R., Varnai, P., Balla, T., Divecha, N., Jalink, K. and Moolenaar, W. H. (2007). Regulation of connexin43 gap junctional communication by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol* 177, 881-91.
- Varnai, P., Balla, A., Hunyady, L. and Balla, T. (2005a). Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases Ca2+ via endogenous IP3R channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7859-64.
- Varnai, P. and Balla, T. (1998). 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* 143, 501-10.
- Varnai, P. and Balla, T. (2006). Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochim Biophys Acta* 1761, 957-67.
- Varnai, P. and Balla, T. (2007). Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains. *Pflugers Arch*.
- Varnai, P. and Balla, T. (2008). Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods* 46, 167-76.
- Varnai, P., Bondeva, T., Tamas, P., Toth, B., Buday, L., Hunyady, L. and Balla, T. (2005b). 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* 118, 4879-88.
- Varnai, P., Hunyady, L. and Balla, T. (2009). STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 118-28.
- Varnai, P., Lin, X., Lee, S. B., Tuymetova, G., Bondeva, T., Spat, A., Rhee, S. G., Hajnoczky, G. and Balla, T. (2002). 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* 277, 27412-22.

- Varnai, P., Rother, K. I. and Balla, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. J Biol Chem 274, 10983-9.
- Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T. and Balla, T. (2006). Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. J Cell Biol 175, 377-82.
- Varnai, P., Toth, B., Toth, D. J., Hunyady, L. and Balla, T. (2007). Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orail Complex. J Biol Chem 282, 29678-90.
- Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007). TRP channels. Annu Rev Biochem 76, 387-417.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. et al. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca2+ entry. *Science* **312**, 1220-3.
- Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacino, J. S. and Weissman, A. M. (1997). The transmembrane domain of a carboxyl-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 272, 1970-1975.
- Yoshikawa, F., Iwasaki, H., Michikawa, T., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1999). Cooperative formation of the ligand-binding site of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor by two separable domains. *J Biol Chem* 274, 328-34.
- Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1996). Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 271, 18277-84.
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9357-62.
- Zweifach, A. and Lewis, R. S. (1993). Mitogen-regulated Ca2+ current of T-lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca2+ stores. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 6295-6299.

8. Saját közlemények

8.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Impakt faktor: 120,868Független hivatkozások száma: 363

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

- 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.
- 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
- 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
- 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)
- 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
- P. Varnai, A. Balla, L. Hunyady, and T. Balla, Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases Ca2+ via endogenous IP3R channels
 Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(22):7859-64. IF: 10,231
- *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.
- *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 Ca2+ channels J Cell Biol, 2006. 175(6):901-11. IF: 10,152

- 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.
- 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)
- 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-Orail Complex
 J Biol Chem, 2007. 282(40):29678-90.
- 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 IIIα
 Mol Biol Cell, 2008. 19(2):711-21.
- 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)
- 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)

8.2 A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei

Impakt faktor: **128,098**

Független hivatkozások száma: 1158

- 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
- P. Varnai, G.L. Petheo, J.K. Makara, and A. Spat, Electrophysiological study on the high K+ sensitivity of rat glomerulosa cells Pflugers Arch, 1998. 435(3):429-31. IF: 2,529
- 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.
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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 Ca2+ uptake with and without the formation of high-Ca2+ microdomains
 Cell Calcium, 2006. 40(5-6):527-37.
 IF: 4,118
- 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.
- 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.
- 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)

- 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-Lα and intraluminal calcium
 Antioxid Redox Signal, PMID: 20095866
 IF: 6,190 (2008)

8.3 A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények

Impakt faktor: 49,896Független hivatkozások száma: 197

- T. Balla, P. Varnai, Z. Hollo, and A. Spat, Effects of high potassium concentration and dihydropyridine Ca2(+)-channel agonists on cytoplasmic Ca2+ and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells Endocrinology, 1990. 127(2):815-22. IF: 4,438
- T. Balla, Z. Hollo, P. Varnai, and A. Spat, Angiotensin II inhibits K(+)-induced Ca2+ signal generation in rat adrenal glomerulosa cells Biochem J, 1991. 273(Pt 2):399-404. IF: 3,749
- G. Hajnoczky, P. Varnai, Z. Hollo, S.B. Christensen, T. Balla, P. Enyedi, and A. Spat, Thapsigargin-induced increase in cytoplasmic Ca2+ concentration and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells: interaction with potassium and angiotensin-II Endocrinology, 1991. 128(5):2639-44. IF: 4,534
- 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
- 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 Ca2+ influx in myeloid cells. Role of plasma membrane potential, inositol phosphates, cytosolic free [Ca2+], and filling state of intracellular Ca2+ 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 operative Ca2+ activation of intermediate-conductance K+ channels in granulocytes fi 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 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

9. Függelék: az értekezés alapjául szolgáló öt legfontosabb eredeti közlemény másolata

(A közlemények az értekezésben tárgyalt sorrendnek megfelelően szerepelnek)

Inositol Lipid Binding and Membrane Localization of Isolated Pleckstrin Homology (PH) Domains

STUDIES ON THE PH DOMAINS OF PHOSPHOLIPASE C δ_1 AND p130*

Received for publication, October 5, 2001, and in revised form, May 17, 2002 Published, JBC Papers in Press, May 17, 2002, DOI 10.1074/jbc.M109672200

Péter Várnai[‡], Xuena Lin[§]1, Sang Bong Lee_{||}, Galina Tuymetova[‡], Tzvetanka Bondeva[‡], Andras Spät^{**‡‡}, Sue Goo Rhee_{||}, György Hajnóczky[§]1, and Tamas Balla[‡][§]

From the ‡Endocrinology and Reproduction Research Branch, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, the §Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, |Laboratory of Biochemistry, NHLBI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, and **Department of Physiology and Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, Semmelweis University Medical School, H-1444 Budapest, Hungary

The relationship between the ability of isolated pleckstrin homology (PH) domains to bind inositol lipids or soluble inositol phosphates in vitro and to localize to cellular membranes in live cells was examined by comparing the PH domains of phospholipase $C\delta_1$ (PLC δ_1) and the recently cloned PLC-like protein p130 fused to the green fluorescent protein (GFP). The prominent membrane localization of PLCo₁PH-GFP was paralleled with high affinity binding to inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) as well as to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-containing lipid vesicles or nitrocellulose membrane strips. In contrast, no membrane localization was observed with p130PH-GFP despite its InsP₃ and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding properties being comparable with those of PLC δ_1 PH-GFP. The Nterminal ligand binding domain of the type I InsP₃ receptor also failed to localize to the plasma membrane despite its 5-fold higher affinity to InsP₃ than the PH domains. By using a chimeric approach and cassette mutagenesis, the C-terminal α -helix and the short loop between the $\beta 6-\beta 7$ sheets of the PLC δ_1 PH domain, in addition to its InsP₃-binding region, were identified as critical components for membrane localization in intact cells. These data indicate that binding to the inositol phosphate head group is necessary but may not be sufficient for membrane localization of the PLC δ_1 PH-GFP fusion protein, and motifs located within the C-terminal half of the PH domain provide auxiliary contacts with additional membrane components.

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate $(PI(4,5)P_2)$,¹ a minor phospholipid component of the plasma membrane, is a key

regulator of several cellular processes. $PI(4,5)P_2$ is a precursor of important second messengers, such as the diffusible $InsP_3$, which regulates Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores, and the protein kinase C activator, diacylglycerol (1, 2). $PI(4,5)P_2$ is also phosphorylated by class I PI 3-kinases to form $PI(3,4,5)P_3$, which controls membrane recruitment and the functions of several important signaling proteins (3). PI(4,5)P₂ itself is a regulator of a great variety of target molecules, including ion channels (4, 5) and several proteins that regulate actin polymerization and the cytoskeleton (see Ref. 6), providing a link between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton (7). $PI(4,5)P_{2}$ has been implicated in several forms of membrane remodeling events, including the fusion of secretory vesicles with the plasma membrane (8), clathrin-mediated endocytosis (9-11), and membrane recovery by endocytosis during neurotransmitter release (12) (also see Ref. 13 for a review). Such diverse functions must rely upon interaction of the lipid with a large number of regulatory molecules. Most proteins that bind PI(4,5)P2 contain a sequence composed of basic residues that provide electrostatic interaction with the phosphate groups of the inositol ring (6). Recent advances revealing the three-dimensional structures of several protein motifs that bind phosphoinositides offer a deeper insight into their molecular recognition (14). One of the first protein modules capable of binding membrane PI(4,5)P2 was identified in pleckstrin, the major protein kinase C substrate in platelets (15). Pleckstrin homology (PH) domains have since been described in a large number of signaling proteins, and they show remarkable specificity in recognizing various forms of inositides. It is generally believed that at least one of the functions of PH domains is to provide proper localization of proteins via interactions with inositol phospholipids. However, some PH domains have also been shown to bind proteins (16-18), and their protein binding together with lipid binding may act in concert to regulate the localization and/or the function of those proteins. In addition to PH domains, additional motifs, such as FYVE domains (19, 20) and the PX domains (21, 22), have been shown to bind phosphoinositides, namely the lipid product of the class III PI 3-kinases.

Because recognition of inositol lipids by PH domains is based on the specific interaction of key surface residues with the phosphate groups of the inositide head group (23), it is not

^{*} This work was supported in part by Mobility Grant TeT 181/MO/01 from the United States-Hungarian Joint Fund (to P. V. and T. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[¶] Supported by National Institutes of Health Grants DK51526 and GM59419 (to G. H.).

^{‡‡} Supported by the Hungarian National Science Foundation Grant OTKA T-032270.

^{§§} To whom correspondence should be addressed: Rm. 6A35, Bldg. 49, 49 Convent Dr., National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-4510. Tel.: 301-496-2136; Fax: 301-480-8010; E-mail: tambal@box-t.nih.gov.

¹ The abbreviations used are: $PI(4,5)P_2$, phosphatidylinositol 4,5bisphosphate; Ang II, angiotensin II; AT_{1A} , type IA angiotensin II receptor; $InsP_3$, inositol 1,4,5-trisphosphate; $InsP_4$, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate; $InsP_6$, inositol hexakisphosphate, $PLC\delta_1$, phospho-

lipase C δ_1 ; PH domain, pleckstrin homology domain; GFP, green fluorescent protein; YFP, yellow fluorescent protein; PIP, phosphatidylinositolphosphate; NTA, nitrilotriacetic acid; FRET, fluorescence resonance energy transfer.

surprising that many (although not all) PH domains also bind to the soluble inositol phosphate counterpart of their lipid binding partner, a feature that is widely utilized to study their binding properties (24). It is also known that hydrophobic interactions also contribute to the membrane localization of PH domains (25). In the case of several PH domains it is not quite clear whether membrane localization via lipid binding or binding to soluble inositol phosphates is more important for their regulation. For example, the membrane localization of $PLC\delta_1$ via its PH domain and hence its activity is regulated by InsP₃ levels (26). Rapid and large InsP₃ increases can translocate a $PLC\delta_1PH$ -GFP fusion protein from the membrane to the cytosol (27, 28). Also, the PH domain of the InsP₄-binding protein, $\rm GAP1^{\rm IP4BP}$, is believed to be the target of $\rm InsP_4$ (29), but it also anchors the protein to the membrane via phosphoinositide binding (30). These data prompted us to investigate the question of whether binding to the inositol phosphate head group (such as to $InsP_3$) or to the lipid, $PI(4,5)P_2$, is sufficient to localize a PH domain to the cell membrane. While creating protein domains with high InsP₃ binding affinity, we also explored the possibility whether such molecules could be used as research tools to alter Ca²⁺ signaling by sequestering InsP₃.

Here we used the PH domains of $PLC\delta_1$ and the recently cloned PLC-like protein, p130, as well as the $InsP_3$ binding domain of the type I $InsP_3$ receptor to demonstrate that high affinity binding to $InsP_3$ or even to $PI(4,5)P_2$ is not sufficient to recruit these proteins to the plasma membrane. We also propose that regions other than those participating in recognition of the inositide head group are important for the membrane recruitment of the $PLC\delta_1$ PH domain and perhaps of other similar protein modules.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Angiotensin II (human) was purchased from Peninsula Laboratories. Ionomycin, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, InsP₃, InsP₄, and InsP₆ were obtained from Calbiochem. Phosphatidylinositol, phosphatidylserine, and phosphatidylcholine were all from Sigma. diC₈-PI(4,5)P₂ and the PIP strips were purchased from Echelon (Salt Lake City, UT). myo-[³H]Inositol (68 Ci/mmol) and [³H]InsP₃ (48 Ci/mmol) were from Amersham Biosciences. All other chemicals were of high performance liquid chromatography or analytical grade.

DNA Constructs-The PH domain of human PLC-8, (GenBank accession number U09117) (residues 1-170), its mutant R40L, as well as its truncated version (residues 1-135) has been described previously (31). The PH domain of the p130 protein (GenBank accession number D45920) (residues 95-233) was amplified from rat brain cDNA (Quickclone, CLONTECH, Palo Alto, CA) using the primers 5'-ACAGA AT-TCA CCATG GTGTC TTTCA GCAGC ATGCC ATC-3' and 5'-CAGTG GATCC ATAAA GTCAA GTGGT TGCTT ACTGC GAG-3'. After digestion with EcoRI and BamHI the product was ligated into the pEGFP-N1 plasmid (CLONTECH) digested with the same enzymes. p130PH was also cloned into the pEGFP-C1 plasmid (CLONTECH) after amplification with the following primer pairs: 5'-CTTCCTCGAGT GTCTT TCAGC AGCAT GCCA-3' and 5'-TAAGA ATTCA CATAA AGTCA AGTGG TTGCT-3' and digestion with XhoI and EcoRI. Chimeric PH domains were created by introducing an EcoRV site to $PLC\delta_1PH$ -GFP at residues 71-72 (silent) or at 111-112 (L110I) and to p130PH-GFP at residues 163-164 (A163D) or 204-205 (L204I) for swapping the Cterminal sequences (starting from either the $\beta 5$ or the $\beta 7$ strands, respectively) between the two molecules. These conservative mutations alone did not alter the cellular localization of the proteins. The short 8-amino acid loop located between the $\beta 6$ and $\beta 7$ strands of PLC δ_1 PH-GFP was substituted for the same segment in p130PH-GFP with the following primers: 5'-ctc ttc aag gac caa cgc aac act ctg gac cta gttgc-3' and 5'-gtc cag agt gtt gcg ttg gtc ctt gaa gag tat gga ga-3'. All mutations were verified with dideoxy sequencing.

The $InsP_3$ binding domain (residues 1–610) of the human type I $InsP_3$ receptor (GenBank accession number D26070) was amplified from human brain cDNA (Quickclone, CLONTECH) with the following primer pairs: 5'-GCAAC AGAGT GCCTG ACCCA GGTCA G-3' and 5'-CTTTC GCACC AGGCT GACAA ATGTG TC-3'. The PCR product was subcloned into the pGEM-Easy T/A cloning plasmid (Promega,

Madison, WI). After sequencing, two clones were identified, one containing (SII+) and the other lacking (SII-), the linker region located between the two domains involved in $InsP_3$ binding (32). By using the SII+ splice variant as template, the $InsP_3$ binding domain (residues 224-605) was amplified with nested primers containing *XhoI* and *EcoRI* restriction sites, and the PCR product was subcloned into the pEGFP-C1 vector. All constructs were sequenced with dideoxy sequencing. The integrity and expression levels of the fusion proteins were assessed by Western blot analysis from cells lysates prepared from COS-7 or NIH 3T3 cells transfected with the constructs, using a polyclonal antibody against GFP (CLONTECH).

Transfection of Cells for Confocal Microscopy—Cells were plated onto polylysine-coated 30-mm diameter circular glass coverslips at a density of 5×10^4 cells/35-mm dish and cultured for 3 days before transfection with plasmid DNAs (1 μ g/ml) using the LipofectAMINE reagent (10 μ g/ml, Invitrogen) and Opti-MEM (Invitrogen). One day after transfection, cells were washed twice with a modified Krebs-Ringer buffer (120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 0.7 mM MgSO₄, 10 mM glucose, Na-Hepes 10 mM, pH 7.4), and the coverslip was placed into a chamber that was mounted on a heated stage with the medium temperature kept at 33 °C. Cells were incubated in 1 ml of the Krebs-Ringer buffer, and stimuli were added in 0.5 ml of prewarmed buffer after removing 0.5 ml of medium from the cells. Cells were examined in an inverted microscope under a 40× oil immersion objective (Nikon) and a Bio-Rad laser confocal microscope system (MRC-1024) with the Lasersharp acquisition software (Bio-Rad).

Recombinant Proteins and InsPx Binding Assays-For bacterial expression of the GFP-fused protein domains, the coding sequences were amplified from the T/A cloning plasmids (see above) and were subcloned into the pET-23b bacterial expression vector (Novagen) using the XhoI/ EcoRI (for p130PH-GFP and PLCd₁PH-GFP) and the NcoI/EcoRI restriction sites (for the GFP-InsP₂R-(224-605) construct). The resulting plasmids were used to transform the BL-21-DE3 strain of Escherichia coli (Novagen). Bacterial cells were grown to A_{600} 0.6 at 37 $^{\circ}\mathrm{C}$ and induced with 300 μM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside at 18-20 °C for 7 h. Bacterial lysates were prepared by sonication in lysis buffer (20 mM NaCl and 20 mM Tris, pH 8.0) followed by centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was incubated with Ni^{2+} -NTA-agarose beads (Qiagen) in the presence of 5 mM imidazole for 1 h at 4 °C. The beads were washed three times with lysis buffer, and the recombinant proteins were eluted with the same buffer containing 1 M imidazole. Protein samples were concentrated and stored in phosphate-buffered saline containing 5 mM dithiothreitol and 20% glycerol at -20 °C. The concentration of recombinant proteins was assessed by quantifying the bands of Coomassie Blue-stained SDS gel containing the recombinant proteins and bovine serum albumin as a standard.

The incubation buffer of the *in vitro* InsP₃ binding assay contained 50 mM Na-Hepes, pH 7.4, 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, and 0.01 mM CaCl₂. About 0.2 μ g of soluble recombinant proteins was incubated in 50 μ l of this buffer with 0.74 kBq (0.5 nM) [³H]Ins(1,4,5)P₃ and the various unlabeled inositol phosphates or short side-chained inositol lipids for 10 min on ice. The binding reaction was terminated by adding 5 μ l of human γ -globulin (10 mg/ml) and 50 μ l of polyethylene glycol 6000 (30%) (24). Tubes were left on ice for 5 min and were centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The precipitates were dissolved in 0.1 ml of 2% SDS, and the radioactivity was counted in a liquid scintillation counter. Binding assays were also performed on proteins still bound to Ni²⁺-NTA beads, where separation of the protein-bound ligand (on the beads) from unbound ligand was achieved by adding 100 μ l of a mixture of bis(3,5,5-trimethylhexyl)-phthalate and dimethyl phthalate (density, 1.010 g/ml) and centrifugation at 15,000 × g at 4 °C for 5 min.

For binding of recombinant proteins to lipids on PIP strip membranes (33), 100 pmol of recombinant protein was incubated in 5 ml of binding buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3% bovine serum albumin (lipid-free), 2 mM sodium pyrophosphate, and 0.1% Tween 20) overnight at 4 °C, after blocking the strips with the same buffer for 90 min at room temperature. After washing, GFP was visualized by Western blotting using the polyclonal anti-GFP antibody from CLONTECH essentially as described previously (34).

Analysis of Cytosolic Ca^{2+} Responses in Individual COS-7 Cells— COS-7 cells were plated onto polylysine-coated coverslips and cultured for 3 days prior to experiments. Cells were transfected with plasmid DNAs (see above) and were loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator, fura-2, 24–48 h after transfection. Loading was achieved by incubating cells with 5 μ M fura-2/AM for 25–30 min at room temperature in a medium containing 121 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM Na-Hepes, pH 7.4, and 2% bovine serum albumin supplemented with 0.003%





FIG. 1. Cellular localization of protein modules that bind $InsP_3$ (A) and their effect on angiotensin II-stimulated InsP production (B). The PH domains of $PLC\delta_1$ or of the PLC-related protein, p130, were fused to the N terminus of enhanced GFP, whereas the $InsP_3$ binding domain of the type I InsP₃ receptor was fused to the C terminus of enhanced GFP. The resulting constructs were transfected into NIIH 3T3 cells, and the cells were examined by confocal microscopy. The same constructs, tagged with a His₆ tag at their C terminus, were also created for expression in *E. coli*, and the expressed proteins were purified on Ni²⁺-NTA columns (see "Experimental Procedures" for details). The recombinant fluorescent proteins retained their fluorescence after SDS-PAGE (without boiling) and could be analyzed in a PhosphorImager (*lanes 1–4* represent p130PH-GFP, PLC δ_1 PH-GFP, R40LPLC δ_1 PH-GFP, and GFP-IP₃R-(224–605), respectively). *B*, inositol phosphate production was assessed in [³H]inositol-labeled COS-7 cells transiently expressing the AT_{1A} angiotensin receptor and the indicated GFP proteins. Labeled cells were stimulated with angiotensin II for 30 min after a 30-min preincubation with 10 mM LiCl (37). InsP₃ and InsP₂ fractions obtained from Dowex AG 1-X8 columns were combined. Values are expressed as percent of the control response (2–3-fold), and the results are the means \pm S.E. of 4–5 experiments performed in duplicate.

pluronic acid and sulfinpyrazone (200 $\mu\rm M$). After loading, cells were washed with the same medium containing 0.25% bovine serum albumin supplemented with sulfinpyrazone but without fura-2/AM. Coverslips were then mounted on the thermostated stage (35 °C) of an Olympus

IX70 inverted microscope coupled to a high quantum efficiency cooled CCD camera driven by a customized computer program that also controlled a scanning monochromator (DeltaRAM, PTI) to select multiple excitation wavelengths (35). Fura-2 fluorescence was measured (340



FIG. 2. Inositol phosphate binding characteristics of recombinant InsP₃ binding domains fused to GFP. Proteins were expressed in *E. coli* and were purified by Ni²⁺-NTA chromatography (see Fig. 1, *panel d*). Binding assays were performed using [³H]InsP₃ in the presence of the indicated concentrations of the respective unlabeled ligand (InsP₃, *filled circles*), (InsP₄, *filled triangles*), and (InsP₆, *inverted filled triangles*) as detailed under "Experimental Procedures." The specific binding (100%) was between 3000 and 6000 cpm in these experiments. Means \pm S.E. of 4–5 experiments performed in duplicate are shown.

and 380 nm excitations) simultaneously with enhanced GFP fluorescence (490 nm excitation) using a 510-nm long pass dichroic mirror and a 520-nm long pass emission filter. Cells were stimulated with 50 μ M ATP, which evokes a Ca²⁺ signal via the endogenous P_{2y} receptor of COS-7 cells. Fluorescence signals were calculated for the total area of individual cells, and the background fluorescence obtained over cell-free regions of each image was subtracted prior to calculation of the fluorescence ratios. Recordings obtained from all transfected cells on the field were averaged for comparison in each experiment. Experiments were performed on 3–4 separate cell transfections.

Analysis of Inositol Phosphates—Inositol phosphates were analyzed from COS-7 cells transfected with cDNA encoding the rat AT_{1A} angiotensin receptor, together with selected GFP-PH domain fusion constructs as described previously (36). One day after transfection, cells were labeled with myo-[³H]inositol for 24 h. After washing with inositol free M199 and 30 min of preincubation in the presence of 10 mM LiCl, cells were stimulated with Ang II (1 μ M) for 30 min. Reactions were then terminated, and ³H-labeled inositol phosphates were extracted and separated by Dowex minicolumns as described previously (37).

Measurements of Binding to $PI(4,5)P_2$ Containing Lipid Vesicles— Phospholipid binding was performed with mixed lipid vesicles. 110 µg of $PI(4,5)P_2$ (Roche Molecular Biochemicals) and 1.4 mg of phosphatidylethanolamine (bovine liver; Avanti) were mixed and dried under a nitrogen stream followed by high vacuum, and the dried mixtures were suspended to a final total lipid concentration of 2 mM in 20 mM Hepes, pH 7.2, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.1 µg/ml bovine serum albumin by bath sonication. 5 µl of the purified GFP fusion protein (1 µg) and 5 µl of inositol 1,4,5-trisphosphate stock solution were added to 90 µl of phospholipid vesicles. As a precaution, proteins were subjected to ultracentrifugation (85,000 × g for 20 min at 4 °C) prior to the assays to remove possible protein aggregates, although protein preparations were used freshly when they had no significant aggregation. The reaction mixture was incubated at 30 °C for 10 min followed by ultracentrifugation at 85,000 rpm for 20 min at 4 °C. The 100- μ l supernatant was mixed with 30 μ l of 5× Laemmli buffer, and the pellet was resuspended in 100 μ l of incubation buffer followed by the addition of 30 μ l of 5× Laemmli buffer. After vortexing, 40 μ l of each fraction was loaded onto a 12% Tris glycine gel without boiling and separated by SDS-PAGE at 4 °C. After electrophoresis, gels were analyzed in a Storm 860 (Amersham Biosciences) PhosphorImager using blue fluorescence screening for quantitation of the GFP fusion protein band on the gel. Western blot analysis was also performed on parallel samples using the purified polyclonal antibody against GFP (CLONTECH).

FRET Measurements—To have a quantitative measure of membrane localization of the various constructs, the CFP and YFP variants of all fusion proteins have been created. These were co-transfected into COS-7 cells that were cultured in 10-cm culture dishes. One day after transfection, cells were removed from the dishes by mild trypsinization, washed, and centrifuged. Cells (about 3-5 million) were then resuspended in 2 ml of the Krebs-Ringer solution described above and placed in the thermostated cuvette holder of a fluorescence spectrophotometer used for ratiometric Ca²⁺ measurements. Recordings were made using an excitation of 425 nm and calculating a ratio from the emissions detected at 525 and 475 nm (20 nm bandwidth each). Ionomycin (10 $\mu{\rm M})$ was used to activate endogenous phospholipase C to hydrolyze the phospholipids, and the decrease in the 525:475 ratio was taken as an index of translocation of the domains from the membrane to the cytosol (see Refs. 28 and 31 for details concerning the FRET approach and ionomycin manipulation, respectively).

RESULTS

Cellular Distribution of Protein Domains Capable of Binding $Ins(1,4,5)P_3$ —The PH domain of PLC δ_1 binds PI(4,5)P₂ of the plasma membrane and has been used as a tool to visualize changes in the level of this lipid in living cells in the form of a GFP fusion protein (31, 38). However, it has also been noted that $PLC\delta_1PH$ -GFP does not bind to other intracellular membranes despite extensive biochemical and immunocytochemical (using anti-PI(4,5)P₂ antibodies) evidence that $PI(4,5)P_2$ is also present in other cellular membranes such as the Golgi and the nucleus (39-41). These observations prompted us to investigate whether additional PH domains found in related proteins could recognize $PI(4,5)P_2$ in other cellular compartments. During these efforts we isolated the PH domain (residues 95-233) of the recently described PLC-like protein, p130, which was initially described as an InsP₃-binding protein with binding features very similar to those of $PLC\delta_1$ (42). We also isolated the InsP₃-binding region of the type I InsP₃ receptor (residues 224-605) to examine whether its high affinity binding to InsP₃ also allows it to bind to membrane $PI(4,5)P_2$

As shown in Fig. 1A, neither p130PH-GFP nor GFP-IP₃R-(224-605) showed membrane localization when expressed in NIH 3T3 cells. This was in contrast to the well documented membrane localization of PLCo₁PH-GFP. Expression of the constructs in a variety of mammalian cells (COS-7, Madin-Darby canine kidney, and HEK-293) yielded no membrane localization of either of the two proteins (not shown). The lack of binding of p130PH-GFP to membrane PI(4,5)P2 in COS-7 cells was also confirmed by analysis of inositol phosphate production in response to Ang II stimulation. As documented previously, expression of $PLC\delta_1PH$ -GFP interferes with PLC activation, a property that closely correlates with the ability of the protein to bind PI(4,5)P2 of the plasma membrane (31). As shown in Fig. 1B, expression of p130PH-GFP had no inhibitory effect on the Ang II-stimulated InsP response, and if anything, it slightly enhanced the response.

InsP₃ and $PI(4,5)P_2$ Binding to Recombinant Protein Domains—To investigate the inositol lipid and inositol phosphatebinding properties of these proteins, we created the same constructs for bacterial expression. Proteins were purified on Ni²⁺ columns, and *in vitro* binding assays were performed using [³H]InsP₃ as the tracer. As shown in Fig. 2 and Table I, p130PH-GFP was able to bind InsP₃ with an affinity that was

Membrane Localization of PH Domains

TABLE I

IC_{50} values (in nM) for the displacement of $[^{3}H]$ Ins(1,4,5) P_{3} from the various GFP-tagged Ins(1,4,5) P_{3} binding domains and for the ability of
$Ins(1,4,5)P_3$ to inhibit their association with $PI(4,5)P_2$ -containing lipid vesicles
Means \pm S.E. are shown with the number of observations in parentheses ND, not determined

ficture = start are brown with the number of observations in parentities of (12), not accommod					
	$PLC\delta_1PH$ -GFP	p130PH-GFP	$GFP-IP_{3}R$ (224–605)		
[³ H]Ins(1,4,5)P ₃ binding displaced by					
$Ins(1,4,5)P_{3}$	17 ± 0.4 (8)	$22 \pm 8 (9)$	4 ± 2 (6)		
$Ins(1,3,4,5)P_{4}$	$219 \pm 60 (4)$	$308 \pm 88 (3)$	868 ± 496 (2)		
InsP ₆	528 ± 276 (4)	764 ± 422 (3)	ND		
$\text{Di}(\tilde{C_8})\text{PI}(4,5)\text{P}_2$	91 ± 24 (4)	91 ± 17 (4)	ND		
Binding to $PI(4,5)P_2$ displaced by					
$Ins(1,4,5)P_{3}$	$1000 \pm < 50 \ (6)$	$300 \pm < 15 \ (6)$	ND		





FIG. 3. Inositol lipid binding of recombinant InsP₃ binding domains fused to GFP. Proteins were expressed in *E. coli* and purified by Ni²⁺-NTA chromatography. *A*, [³H]InsP₃ binding was examined in the presence of increasing concentrations of water-soluble forms of PI(4,5)P₂ (diC_{s} -PI(4,5)P₂). *B*, binding of recombinant proteins to lipid vesicles containing PI(4,5)P₂ in the presence of increasing concentrations of InsP₃. *S* and *P* represent the soluble (unbound) and pellet-associated (bound) GFP fusion protein, respectively, analyzed by a PhosphorImager after SDS-PAGE. *Lower panel* shows the summary of six similar experiments (mean \pm S.E.).

indistinguishable from that of PLC δ_1 PH-GFP. Mutant forms of either proteins (R40L-PLC δ_1 PH-GFP and R134L-p130PH-GFP) showed no [³H]InsP₃ binding, indicating that InsP₃ binding was specific to the recombinant wild-type proteins and not to any impurities present in the preparations (not shown). The

GFP-IP₃R-(224-605) protein showed higher affinity to InsP₃ than either of the two PH domains, and its affinity was comparable with that of the intact InsP₃ receptor or with a similar binding domain produced in *E. coli* as a GST fusion protein (43). All three proteins discriminated between InsP₃ and InsP₄, but the receptor was significantly more selective in this respect. InsP₆ was almost as effective as InsP₄ in displacing [³H]InsP₃ from both p130PH-GFP and PLC δ_1 PH-GFP, indicating that the inositol phosphate binding characteristics of the two PH domains are very similar. These findings suggested that the inability of p130PH-GFP or GFP-IP₃R-(224-605) to localize to cellular membranes in intact cells is not due to their inability to recognize the inositol phosphate head group.

To investigate the relative affinities of these proteins to inositol lipids rather than inositol phosphates, we used three different approaches. First, a water soluble, short side-chain analogue of PI(4,5)P₂ (diC₈-PI(4,5)P₂) was used as a competitor in the [³H]InsP₃ binding assays. No difference was found between the affinities of PLC δ_1 PH-GFP and p130PH-GFP to diC₈-PI(4,5)P₂ in these experiments (Fig. 3A and Table I). Both proteins showed significantly lower affinities to the soluble lipid derivatives than to InsP3. Second, the binding of PLC₀₁PH-GFP and p130PH-GFP to lipid vesicles containing PI(4,5)P₂ was compared. Both proteins were able to bind to such vesicles in this assay; however, a larger fraction of the $PLC\delta_1PH$ -GFP was found vesicle-bound, and higher concentrations of InsP3 were needed to displace it from the vesicles than in the case of the p130PH-GFP (Fig. 3B). The R40L mutant of $PLC\delta_1PH$ -GFP showed no specific localization to lipid vesicles that would be displaced by InsP₃ (data not shown). A third approach to compare the lipid binding of these proteins was to study the binding of the recombinant proteins to lipids spotted on nitrocellulose membranes as described previously (33, 34). As shown in Fig. 4, PLC₀₁PH-GFP and p130PH-GFP showed very similar inositol-lipid binding specificity and p130PH-GFP only a slightly lower affinity to PI(4,5)P₂ based on these assays. The R40L mutant $PLC\delta_1PH\text{-}GFP$ showed no binding under the same conditions (Fig. 4).

Protein Domains That Bind $Ins(1,4,5)P_3$ Can Interfere with Agonist-induced Ca^{2+} Signaling—Whereas the *in vitro* binding data clearly showed that the proteins made in bacteria are able to bind $InsP_3$ and $PI(4,5)P_2$ *in vitro*, we also wanted to examine whether their $InsP_3$ binding is manifested in intact cells. For this, we used COS-7 cells in which the various GFP fusion proteins were expressed. Expression of a protein that binds $InsP_3$ with high enough affinity is expected to buffer $InsP_3$ increases with consequences on Ca^{2+} signaling when cells are stimulated by an agonist that stimulates phospholipase C. To test this, we used ATP to stimulate the endogenous P_{2y} receptors of COS-7 cells expressing the various constructs. As shown in Fig. 5, expression of both p130PH-GFP and GFP-IP_3R-(224– 605), but not GFP alone, had a marked effect on the ATPevoked Ca^{2+} signal in the COS-7 cells. The most prominent А

В



PLC6_PH-GFP

p130PH-GFP

FIG. 4. Binding of recombinant PLCo₁PH-GFP and p130PH-GFP to various phosphoinositides. Proteins were expressed in E. coli and purified by Ni²⁺-NTA chromatography. PIP strips were incubated with 100 pmol of the recombinant proteins overnight at 4 °C as detailed under "Experimental Procedures." After washing, GFP was visualized by Western blotting using the polyclonal anti-GFP antibody from CLONTECH essentially as described previously (34). A shows binding of the recombinant proteins to the various lipids (300 pmol/spot) and the specificity of both PH domains to $PI(4,5)P_2$. B shows binding of the recombinant proteins to decreasing amounts (in pmol/spot) of the lipids, revealing very similar affinities of PLC₀PH-GFP and p130PH-GFP to $PI(4,5)P_{2}$.



effect was an increase in the lag time (the time that is required to reach half-maximal Ca²⁺ response) from the time of ATP addition. Because expression of p130PH-GFP did not inhibit agonist-induced PLC activation (and presumably InsP₃ production, see above), the increased lag time was consistent with the buffering of InsP_3 by the expressed domains. Under these conditions, after stimulation of the P_{2v} receptors by ATP, it takes a longer time to reach the level of $InsP_3$ where the coordinated action of InsP₃ and Ca²⁺ triggers Ca²⁺ release (44). This assay was sensitive enough to detect the InsP₃ affinity difference between the constructs, because GFP-IP₃R-(224-605) had a significantly bigger effect on the lag time than p130PH-GFP (Fig. 5, lower panel).

Analysis of Cellular Distribution of Chimeric Proteins Constructed from the PH Domains of $PLC\delta_1$ and p130—Together these data indicated that although p130PH is capable of binding $InsP_3$ as well as $PI(4,5)P_2$, this binding is not sufficient to recruit the protein to the plasma membrane. Given the level of similarity between the two amino acid sequences (Fig. 6), we decided to create chimeras from the two proteins to investigate which part of the $PLC\delta_1PH$ accounts for its ability to localize to the plasma membrane. Because most of the contacts with InsP₃ in PLC δ_1 PH are found within the N-terminal part of the molecule (containing the $\beta 1-\beta 4$ sheets) (45) (see also Fig. 6), first we designed a chimera in which the N-terminal halves of the PH domains were exchanged between the two proteins. These


Transfection	Lag time (s)	Number fo cells	F _{GFP} (a.u.)
no GFP	4.4 ± 0.2	329	
GFP-N	3.1 ± 0.2	55	4770 ± 340
GFP-IP3R224-605	26.6 ± 4.3	40	2235 ± 282
p130PH-GFP	14.5 ± 2.3	47	4007 ± 383

FIG. 5. Inhibition of agonist-induced Ca^{2+} signaling by expressed $InsP_3$ -binding modules fused to GFP. COS-7 cells were transfected with the indicated GFP fusion constructs, and their cytosolic Ca^{2+} responses were analyzed by ratiometric Ca^{2+} imaging using fura2. The lag time of the Ca^{2+} response was defined as the time it took for a cell to reach half-maximum of its Ca^{2+} peak after addition of 50 μ M ATP. Upper panel shows the average Ca^{2+} signals calculated from the number of recordings obtained from transfected cells expressing either p130PH-GFP or GFP. Lower panel contains the average lag times calculated for the cells expressing the indicated fusion protein. The number of cells recorded within the individual groups and their average fluorescence are also indicated.

chimeras were then expressed in either NIH 3T3 or COS-7 cells, and their cellular distribution was observed. No plasma membrane localization was observed with the chimera containing the N-terminal $InsP_3$ -binding half of $PLC\delta_1PH$ fused to the C terminus of the p130PH-GFP (PLCδ1-(1-71)/p130-(166-233)-GFP) (Fig. 7). In contrast, the inverse chimera (p130-(95-164)/PLCo1-(71-170)-GFP) showed clear membrane localization, although this was significantly less than that of the original PLC δ_1 PH-GFP (Fig. 7). In both cases the expressed chimeras showed some intracellular "precipitates" in a number of cells, especially in those expressing high amounts of the protein. In our experience this indicates limited solubility or folding problems of the proteins. Similar phenomena were observed with other fluorescent proteins of limited solubility, for example with the PLC δ_1 PH-BFP protein, but in the latter case the membrane localization of the protein could still be observed (not shown).

These data suggested that the C-terminal half of $PLC\delta_1PH$ contains additional determinant(s) for membrane localization and also showed that the $InsP_3$ -binding region of p130PH can substitute to some extent for the corresponding part of $PLC\delta_1PH$ to support membrane localization. Therefore, addi-

tional chimeras were created in which the C-terminal helices that follow the β 7 strands were exchanged between the two PH domains. These experiments showed that a p130PH-GFP containing the C-terminal helix of $PLC\delta_1PH$ still failed to localize to the membrane. Surprisingly, the PLC δ_1 PH domain with the C-terminal helix of p130PH showed no membrane association (not shown). Because the $PLC\delta_1PH$ domain used in these experiments was 35 amino acids longer at its C terminus than p130PH, we examined whether this extra stretch of amino acids makes a difference in membrane targeting. Truncation of $PLC\delta_1PH$ to the length corresponding to that of our p130PH construct (PLC δ_1 PH-(1–135), which still contains the full PH domain), showed membrane localization comparable with that of the longer form (not shown). From these data we concluded that the C-terminal helix contributes to intra- or intermolecular interaction(s) that contribute to membrane localization. Next we created a p130PH-GFP in which the short loop between the $\beta 6$ and $\beta 7$ strands of PLC δ_1 PH was inserted in place of the corresponding region in the p130PH wild-type sequence. This loop is in a position that could come in contact with the inositide head group or some other component of the membrane (Fig. 6). As shown in Fig. 7, this protein chimera showed clearly

FIG. 6. Sequence homology between the PH domains of $PLC\delta_1$ and p130 and ribbon diagram showing the crystal structure of PLC δ_1 PH. A shows the ribbon diagram based on the crystal structure of PLCo₁PH (23) generated by Molscript (62). The two different shades of green represent the two halves of the PH domain where the chimeric constructs were joined, and the *red* indicates the regions that were also exchanged between the two proteins. B shows the homology between the two primary sequences. Green arrows show the locations of the β -sheets. Red and blue letters indicate identical residues and conservative substitutions, respectively, and the basic residues coordinating the phosphates of $InsP_3$ are highlighted with yellow.



DISCUSSION

detectable membrane localization, although it was less pronounced than that of (p130-(95–164)/PLC δ 1-(71–170)-GFP).

Localization of the chimeras to the plasma membrane was also assessed by FRET analysis. As shown previously, CFPand YFP-tagged versions of the PH domains could transfer energy when found in molecular proximity at the membrane (28). We used this approach to assess the extent of membrane localization of the various chimeras. For this, COS-7 cells expressing both the CFP- and YFP-tagged PH domains were examined in suspension using a fluorescence spectrophotometer with excitation of 425 nm and emissions recorded at 475 and 525 nm to form the 525:475 ratio. In addition to FRET taking place in the plasma membrane, the absolute value of this ratio depends on several factors, including the relative expression levels of YFP-PH and CFP-PH and FRET that occurs in compartments other than the plasma membrane (e.g. in the nucleus). Because ionomycin induces a PLC-mediated breakdown of PI(4,5)P2 in the plasma membrane and eliminates membrane localization, the amplitude of the ionomycininduced decrease in the 525:475 ratio was taken as an index of FRET due to localization of the probes to membrane $PI(4,5)P_2$ (see Ref. 28 for details). These experiments showed that all of the domains that were able to localize to the plasma membrane (but none of those unable to bind) showed the characteristic decrease in 525:475 ratio in response to PLC activation, indicating their binding to the plasma membrane $PI(4,5)P_2$ pools prior to ionomycin addition (Fig. 7). The magnitude of changes upon Ca²⁺-induced translocation showed a good correlation with the extent of PH domain localization reflected by the confocal images. It is noteworthy that the rate of re-association of the domains with the membranes during $PI(4,5)P_2$ resynthesis also mirrored the apparent affinity differences by which the various PH domains bound to the membrane.

There is increasing interest to understand the principles that govern regulation of many cellular functions by the highly compartmentalized changes in the levels of inositol phospholipids. An important aspect of this research is the characterization of structural features of the protein modules that interact with the inositide head group of inositides in the membrane. Several recent studies have analyzed the structural basis of the specific recognition of 3-phosphorylated inositides by PH domains and have pointed to the significance of the short variable loops between the $\beta 1-\beta 2$ and $\beta 3-\beta 4$ strands of such domains (46, 47). Similarly, the structural features determining the binding of FYVE domains (19, 20, 48) and PX domains to PI(3)P have been recently revealed (21, 49). To test specificity and compare relative affinities, it is convenient to analyze the binding properties of PH and other protein domains using soluble inositol phosphates and inositol lipids in vitro. However, it is equally important to test these interactions within the intact cell, because it is not possible to mimic in the test tube the exact conditions that prevail at cellular membranes.

Our interest in characterizing PH domains is originated from the need to understand and evaluate their usefulness in imaging inositide dynamics in living cells (31). The interpretation of the results of such imaging studies clearly depends on the molecular recognition properties of the protein domains. Several data suggest that various inositide binding domains interact only with a certain subset of the inositide pools (31). The restricted recognition of $PI(4,5)P_2$ by the $PLC\delta_1PH$ -GFP only within the plasma membrane prompted us to investigate other related PH domains for their $PI(4,5)P_2$ recognition properties. The PH domain of the p130 protein was one of our choices due to its similarity to $PLC\delta_1PH$. The p130 protein has been orig-



FIG. 7. Cellular localization of various chimeras constructed from the PH domains of $PLC\delta_1$ and p130. A is a schematic diagram showing the various constructs and their plasma membrane localization scores based on confocal microscopy (in NIH 3T3 cells) and FRET analysis (COS-7 cells) of transfected cells. B shows representative confocal images of NIH 3T3 cells transfected with selected constructs and the FRET recordings obtained in COS-7 cell expressing the same proteins. Hydrolysis of PI(4,5)P₂ was initiated by the addition of 10 μ M ionomycin in the presence of 1.8 mM external Ca²⁺ (labeled as high Ca²⁺) and was terminated by the addition of 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'tetraacetic acid (BAPTA). PI(4,5)P₂ hydrolysis is reflected in the redistribution of fluorescence from the membrane to the cytosol, whereas resynthesis of the lipid is paralleled by the relocalization of the fluorescent proteins to the membrane. Redistribution of the proteins due to Ca²⁺-induced hydrolysis of membrane PI(4,5)P₂ was also assessed by FRET analysis (see "Experimental Procedures" and Ref. 28 for details).

inally described as an InsP₃-binding protein that was purified on an InsP₃ affinity matrix (42). Subsequent cloning of the protein revealed that it is a PLC homologue lacking PLC enzymatic activity and showing the greatest similarity to the yeast protein PLC1, the Drosophila NorpA, and mammalian PLC δ (50). Similarly to PLC δ_1 , p130 possesses a PH domain that is responsible for the ability of the protein to bind $InsP_3$. Interestingly, despite its InsP₃ binding, the GFP-tagged p130 protein was found not to localize to membranes (51), and although wild-type p130 was reported to be associated with membranes when expressed in COS-7 cells, this association was not mediated by the PH domain (52). However, consistent with its InsP₃ binding, the ability of p130 to bind the second messenger InsP₃ has been demonstrated in intact cells because its overexpression altered both Ca²⁺ signaling and InsP₃ metabolism (51). The physiological function of this protein is still unknown, but it has been speculated that it might be important as a buffer of InsP₃ (51).

The present study clearly showed that InsP₃ binding even with high affinity, such as that of the type I InsP₃ receptor, is not sufficient to localize a protein to the membranes of intact cells through simple binding to the head group of $PI(4,5P)_2$. However, these experiments also show that even binding to the lipid PI(4,5)P₂ does not necessarily lead to membrane association. The small difference found between the $PI(4,5)P_2$ -binding properties of isolated p130PH and $PLC\delta_1PH$ in vitro does not easily explain the striking difference between the abilities of the two domains to localize to the plasma membrane. The PH domain of $PLC\delta_4$ was found to associate with cellular membranes with binding to $PI(4,5)P_2$ containing liposomes similar to that of p130PH-GFP.² Our data obtained with chimeras constructed from the PH domains of $PLC\delta_1$ and p130 showed that the regions primarily responsible for InsP3 binding (localized within the N-terminal half of the PH domain) are to some extent interchangeable between the two PH domains, consistent with their almost identical InsP3 binding affinities. It is the C-terminal half of the $PLC\delta_1$ PH domain that seems to contain additional feature(s) that are needed for membrane localization. Within this half of the molecule, we were able to identify the short loop between the $\beta 6-\beta 7$ strands of PLC δ_1 PH as a sequence that aides membrane localization. However, the surprising loss of membrane localization of the $PLC\delta_1PH$ when containing the C-terminal helix of p130 also indicates important contributions from the helical tail. Further attempts to pinpoint single amino acids that determine membrane localization failed to produce conclusive results.

It is not clear at present how the C-terminal helix could affect membrane localization. However, it has been reported that binding of $PLC\delta_1PH$ to $PI(4,5)P_2\mbox{-}containing lipid vesicles$ (but not to soluble $Ins(1,4,5)P_3$) was increased by Ca^{2+} when the C-terminally adjacent EF-hand motifs were added to the PH domain (53). This indicates a conformational change that affects lipid binding and that is initiated via the C-terminal sequences. It has also been reported that a point mutation within the PH domain of $PLC\delta_1$ greatly increased the catalytic activity of the enzyme (54), further suggesting a reciprocal communication between the various domains of the PLC δ_1 protein. It is also possible that a putative interacting protein contributes to the membrane localization of the PLC δ_1 PH domain. Further studies will be needed to clarify these questions and to identify a possible protein-binding partner. Several PH domains have been shown to bind $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G-proteins (16, 18) including several PLC isoforms and even PLC δ_1 PH itself (55, 56). In the few cases where their sites of interaction were mapped, the determinants to bind inositides and those with $\beta\gamma$ subunits did not completely overlap, the latter mostly being found toward the C-terminal end of the PH domain (56, 57). Intriguingly, a recent detailed study (58) localized some key residues important for $\beta\gamma$ binding of GRK2 to the C-terminal helix of its PH domain. Therefore, $\beta\gamma$ subunits are possible candidates to interact with PLC δ_1 PH to aid its membrane localization. However, overexpression of a construct containing the $\beta\gamma$ -binding region of β -adrenergic receptor kinase (59) to sequester $\beta\gamma$ -subunits did not significantly affect the membrane localization of PLC δ_1 PH-GFP.³

In a recent study, the p130PH-GFP fusion protein (but not the full-length p130-GFP) was found to localize to the membranes in Madin-Darby canine kidney cells (51). The p130PH domain used in those studies was fused to the C terminus of GFP as opposed to our initial construct in which it was in the N terminus of GFP. This prompted us to create the same GFP-p130PH protein that was used in the studies of Takeuchi et al. (51) and to use additional cells types, including Madin-Darby canine kidney cells, to test the distribution of the protein. None of the p130PH domain constructs showed membrane localization in our studies in any of the cells tested, and we have no explanation for the discrepancy between our findings and those of Takeuchi et al. (51). However, it is important to note that the lack of membrane localization in our experiments was observed with the same construct that showed InsP₃ as well as $PI(4,5)P_2$ binding comparable with those observed with PLCδ₁PH-GFP.

Finally, our results also demonstrate that it is possible to use isolated protein domains to manipulate the level of inositol phosphates within intact cells with clearly detectable consequences on Ca²⁺ signaling. Such an approach has been reported recently (60) and will be very useful for the analysis of InsP₃-mediated signaling and to give estimates on the free InsP₃ levels that are present in intact cells. These data also point to the importance of InsP₃ buffering inside the cells and may explain why the estimated InsP₃ concentrations (based on total mass measurements) have been found so high (even in resting cells) that they would saturate the InsP₃ receptor (61). Therefore, these novel tools to manipulate InsP₃ changes could add to our understanding on the physiology of this second messenger.

In summary, using the PH domains of PLC δ 1 and the p130 protein, as well as the InsP₃ binding domain of the type I InsP₃ receptor, we demonstrate that binding to the inositol phosphate head group of PI(4,5)P₂ by the PLC δ ₁ PH domain is necessary but may not be sufficient to localize this protein to cellular membranes. Additional regions within the C-terminal half of the PH domain, namely the loop between the β 6 and β 7 sheets and the C-terminal α -helix, are needed for this function. Exploration of the structural features that determine PH domain interaction with InsP₃, PI(4,5)P₂, and with the intact cell membrane could yield valuable information on the regulation of the PLC δ enzymes and help to facilitate the development of strategies for selective inhibition of various inositide-based regulatory processes.

REFERENCES

- 1. Berridge, M. J. (1984) Biochem. J. 220, 345-360
- 2. Nishizuka, Y. (1988) Nature 34, 661-665
- 3. Toker, A., and Cantley, L. C. (1997) Nature 387, 673-676
- Zhang, H., He, C., Yan, X., Mirshaki, T., and Logothetis, D. E. (1999) Nat. Cell Biol. 1, 183–188
- Czirjak, G., Pethö, G. L., Spät, A., and Enyedi, P. (2001) Am. J. Physiol. 281, C700-C708

- 6. Janmey, P. A., Xian, W., and Flanagan, L. A. (1999) Chem. Phys. Lipids 101, 93 - 97
- 7. Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P., and Meyer, T. (2000) Cell 100, 221-228
- 8. Hay, J. C., Fisette, P. L., Jenkins, G. H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R. A., and Martin, T. F. J. (1995) Nature 374, 173-177
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J. M., Lemmon, M. A., and Schmid, S. L. (1998) Curr. Biol. 8, 1399-1402
- 10. Ford, M. G. J., Pearse, B. M. F., Higgins, M. K., Vallis, Y., Owen, D. J., Gibson, A., Hopkins, C. R., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2001) Science 291, $1051 - \bar{1}055$
- 11. Mao, Y., Chen, J., Maynard, J. A., Zhang, B., and Quiocho, F. A. (2001) Cell 104, 433-440
- 12. Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A., and De Camilli, P. (1999) Cell 99, 179–188
- Martin, T. F. (2001) Curr. Opin. Cell Biol. 13, 493–499
 Hurley, J. H., and Meyer, T. (2001) Curr. Opin. Cell Biol. 13, 146–152
- 15. Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S., and Fesik, S. W. (1994) Nature 371, 168-170
- 16. Tsukada, S., Simon, M., Witte, O., and Katz, A. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 11256–11260
- 17. Yao, L., Suzuki, H., Ozawa, K., Deng, J., Lehel, C., Fukamachi, H., Anderson, W. B., Kawakami, Y., and Kawakami, T. (1997) J. Biol. Chem. 272, 13033-13039
- 18. Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C., and Lefkowitz, R. J. (1993) J. Biol. Chem. **268,** 8256-8260
- 19. Misra, S., and Hurley, J. H. (1999) Cell 97, 657-666
- 20. Kutateladze, T. G., Ogburn, K. D., Watson, W. T., deBeer, T., Emr, S. D., Burd, C. G., and Overduin, M. (1999) Mol. Cell 3, 805-811
- Chever, M. L., Sato, T. K., de Beer, T., Kutateladze, T. G., Emr, S. D., and Overduin, M. (2001) Nat. Cell Biol. 3, 613–618
- 22. Kanai, F., Liu, H., Field, S. J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G. E., Cantley, L. C., and Yaffe, M. B. (2001) Nat. Cell Biol. 3, 675-678
- 23. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B. (1994) Cell 79, 199-209
- Fukuda, M., Kojima, T., Kabayama, H., and Mikoshiba, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30303–30306
- 25. Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M. (2000) Biochem. J. 350, 1-18
- Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A. J., Rudge, S. A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S., and Rebecchi, M. J. (1995) *Biochemistry* 34, 16228 - 16234
- 27. Hiroshe, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., and Iino, M. (1999)
- Science 284, 1527–1530
 van Der Wal, J., Habets, R., Varnai, P., Balla, T., and Jalink, K. (2001) J. Biol. Chem. 276, 15337–15344
- Cullen, P. J., Hsuan, J. J., Truong, O., Letcher, A. J., Jackson, T. R., Dawson, A. P., and Irvine, R. F. (1995) *Nature* **376**, 527–530
- Cozier, G. E., Lockyer, P. J., Reynolds, J. S., Kupzig, S., Bottomley, J. R., Millard, T. H., Banting, G., and Cullen, P. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 28261-28268
- 31. Várnai, P., and Balla, T. (1998) J. Cell Biol. 143, 501-510
- Mikoshiba, K., Furuichi, T., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Nakade, S., Michikawa, T., Nakagawa, T., Okano, H., Kume, S., Muto, A., Aruga, J., Yamada, N., Hamanaka, Y., Fujino, I., and Kobayashi, M. (1993) Ann. N. Y. Acad. Sci. 707, 178-197

- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., and Lemmon, M. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30497–30508
 Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P.,
- and Alessi, D. R. (2000) Biochem. J. 351, 19-31
- 35. Csordas, G., Thomas, A. P., and Hajnoczky, G. (1999) EMBO J. 18, 96-108 36. Varnai, P., Rother, K. I., and Balla, T. (1999) J. Biol. Chem. 274, 10983-10989
- 37. Hunyady, L., Baukal, A. J., Balla, T., and Catt, K. J. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24798-24804
- 38. Stauffer, T. P., Ahn, S., and Meyer, T. (1998) Curr. Biol. 8, 343-346
- Divecha, N., Banfie, H., and Irvine, R. F. (1930) *Cell* **74**, 405–407
 Matsuda, M., Paterson, H. F., Rodriguez, R., Fensome, A. C., Ellis, M. V., Swann, K., and Katan, M. (2001) J. Cell Biol. 153, 599-612
- 41. Mazzotti, G., Zini, N., Rizzi, E., Rizzoli, R., Galanzi, A., Ognibene, A., Santi, S., Matteucci, A., Martelli, A. M., and Maraldi, N. M. (1995) J. Histochem.
- Cytochem. 43, 181–191
 42. Kanematsu, T., Takeya, H., Watanabe, Y., Ozaki, S., Yoshida, M., Koga, T., Iwanaga, S., and Hirata, M. (1992) J. Biol. Chem. 267, 6518–6525
 43. Yoshikawa, F., Uchiyama, T., Iwasaki, H., Tomomori-Satoh, C., Tanaka, T.,
- Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 257, 792-797
- 44. Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B. E. (1991) Nature 351, 751-754 45. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B. (1995) Cell
- 83, 1037-1046
- 46. Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G., Fournier, E., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., and Lemmon, M. A. (2000) Mol. Cell 6, 373–384
- 47. Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P., and Lambright, D. G. (2000) Mol. Cell 6, 385-394
- 48. Kutateladze, T., and Overduin, M. (2001) Science 291, 1793-1796
- 49. Hiroaki, H., Ago, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2001) Nat. Struct. Biol. 8, 526 - 530
- Kanematsu, T., Yoshimura, K., Hidaka, K., Takeuchi, H., Katan, M., and Hirata, M. (2000) Eur. J. Biochem. 267, 2731–2737
- 51. Takeuchi, H., Oike, M., Paterson, H. F., Allen, V. V., Kanematsu, T., Ito, Y., Erneux, C., Katan, M., and Hirata, M. (2000) Biochem. J. 349, 357-368
- 52. Takeuchi, H., Kanematsu, T., Misumi, Y., and Hirata, M. (1999) Chem. Phys. Lipids 98, 35-47
- Yamamoto, T., Takeuchi, H., Kanematsu, T., Allen, V., Yagisawa, H., Kikkawa, U., Watanabe, Y., Nakasima, A., Katan, M., and Hirata, M. (1999) Eur. J. Biochem. 265, 481-490
- 54. Bromann, P. A., Boetticher, E. E., and Lomasney, J. W. (1997) J. Biol. Chem. **272,** 16240–16246
- 55. Wang, T., Pentyala, S., Rebecchi, M. J., and Scarlata, S. (1999) Biochemistry 38, 1517-1524
- 56. Barr, A. J., Ali, H., Haribabu, B., Snyderman, R., and Smrcka, A. V. (2000) Biochemistry **39**, 1800–1806 57. Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S., and Lefkowitz, R. J. (1995) J. Biol.
- *Chem.* **270**, 11707–11710 58. Carman, C. V., Barak, L. S., Chen, C., Liu-Chen, L-Y., Onorato, J. J.,
- Kennedy, S. P., Caron, M. G., and Benovic, J. L. (2000) J. Biol. Chem. 275, 10443-10452
- 59. Coso, O. A., Teramoto, H., Simonds, W. F., and Gutkind, J. S. (1996) J. Biol.
- Chem. 271, 3963–3966
 60. Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Hishida, A., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (2001) J. Biol. Chem. 276, 41343–41349
- 61. Bradford, P. G., and Rubin, R. P. (1986) J. Biol. Chem. 261, 15644-15647
- 62. Kraulis, P. J. (1991) J. Appl. Crystallogr. 24, 946-950

Selective cellular effects of overexpressed pleckstrinhomology domains that recognize PtdIns $(3,4,5)P_3$ suggest their interaction with protein binding partners

Péter Várnai^{1,2}, Tzvetanka Bondeva¹, Péter Tamás³, Balázs Tóth¹, László Buday³, László Hunyady² and Tamas Balla^{1,*}

¹Endocrinology and Reproduction Research Branch, National Institutes of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary

³Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary

*Author for correspondence (e-mail: ballat@mail.nih.gov)

Accepted 2 August 2005

Journal of Cell Science 118, 4879-4888 Published by The Company of Biologists 2005 doi:10.1242/jcs.02606

Summary

Several pleckstrin-homology (PH) domains with the ability phosphatidylinositol bind (3,4,5)-trisphosphate to [PtdIns(3,4,5)P₃, PIP₃] were expressed as green fluorescent protein (GFP) fusion proteins to determine their effects on various cellular responses known to be activated by PIP₃. These proteins comprised the PH domains of Akt, ARNO, Btk or GRP1, and were found to show growth-factorstimulated and wortmannin-sensitive translocation from the cytosol to the plasma membrane in several cell types, indicating their ability to recognize PIP₃. Remarkably, although overexpressed Akt-PH-GFP and Btk-PH-GFP were quite potent in antagonizing the PIP₃-mediated activation of the Akt protein kinase, such inhibition was not observed with the other PH domains. By contrast, expression of the PH domains of GRP1 and ARNO, but not of Akt or Btk, inhibited the attachment and spreading of freshly seeded cells to culture dishes. Activation of PLC γ by epidermal growth factor (EGF) was attenuated by the PH domains of GRP1, ARNO and Akt, but was

significantly enhanced by the Btk PH domain. By following the kinetics of expression of the various GFP-fused PH domains for several days, only the PH domain of Akt showed a lipid-binding-dependent self-elimination, consistent with its interference with the anti-apoptotic Akt signaling pathway. Mutations of selective residues that do not directly participate in PIP₃ binding in the GRP1-PH and Akt-PH domain were able to reduce the dominantnegative effects of these constructs yet retain their lipid binding. These data suggest that interaction with and sequestration of PIP₃ may not be the sole mechanism by which PH domains interfere with cellular responses and that their interaction with other membrane components, most probably with proteins, allows a more specific participation in the regulation of specific signaling pathways.

Key words: PH domain, PI 3-kinase, PtdIns(3,4,5)*P*₃, PIP₃, Akt kinase, Cell adhesion, GFP

Introduction

Pleckstrin-homology (PH) domains are protein modules with a characteristic fold that have gained a great deal of interest as a result of their ability to bind phosphoinositides (Harlan et al., 1994; Lemmon et al., 1997; Lemmon, 2003). PH domains are present in a large variety of signaling molecules such as tyrosine or serine/threonine kinases, guanine nucleotide exchange factors and **GTPase-activating** proteins, phospholipases and a number of adaptor proteins (Lemmon, 2003). Some PH domains display high affinity and specificity towards specific isomers of inositol lipids, whereas others have lower affinity and show no clear preference for a particular phosphoinositide species (Yu et al., 2004). Several PH domains have been shown to be the main determinant of the recruitment of proteins to specific membrane compartments in a lipiddependent manner, leading to the idea that PH domains serve as localization signals responding to local formation of inositol phospholipids (Lemmon and Ferguson, 2000). On the basis of these ideas, several PH domains, notably those of PLC δ 1, Akt, Btk and GRP1 have been utilized successfully to monitor phosphoinositide changes in single living cells (Odorizzi et al., 2000; Balla and Varnai, 2002; Cozier et al., 2004).

Several observations suggest that PH domains might function in a more complex manner. In many proteins, such as in dynamin, the PH domain alone does not have high enough affinity to phosphoinositides to determine solely the localization of the protein, yet the protein shows clear regulation by inositol lipids (Artalejo et al., 1997; Szaszak et al., 2002; Yu et al., 2004). Moreover, using in vitro assay systems, it has been shown that the PH domains of Btk and PLCδ1 could transmit regulatory effects by the respective lipid, suggesting that PH domains might have conformational regulatory roles (Saito et al., 2001; Lomasney et al., 1996). Third, several PH domains are also capable of protein-protein interactions and in most cases the protein interaction surface does not overlap with the lipid-binding region within the PH domain (Carman et al., 2000; Lodowski et al., 2003). Also, in spite of their great success in providing invaluable spatial and temporal information on inositide dynamics, the PH-GFP fusion proteins have certain limitations, mainly that they do not always report on the entire lipid pool that they are supposed to recognize (Balla et al., 2000; Irvine, 2004).

These observations prompted us to evaluate the principles of interactions of PH domains with the plasma membrane within the intact cells. We have chosen four PH domains with known ability to interact with membrane phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate [PtdIns $(3,4,5)P_3$, PIP₃] to determine whether their overexpression would affect selected PIP₃-regulated cellular functions in a similar manner. Our data show that the PH domains have distinctive inhibitory profiles on specific PIP₃-regulated pathways indicating that, in addition to binding to inositol lipids, these small protein modules could sequester additional specific protein components of particular signaling pathways.

Materials and Methods

Materials

Recombinant human EGF and platelet-derived growth factor (PDGF) were obtained from Life Technologies. Wortmannin and LY 294002 were purchased from Calbiochem. Myo-[³H]inositol (68 Ci/mmol) was from Amersham-Pharmacia Biotech, and [³H]inositol (1,3,4,5)-tetrakisphosphate (InsP₄; 22 Ci/mmol) was from Perkin Elmer. All other chemicals were of HPLC or analytical grade.

DNA constructs

The PH domains of Btk and Akt, as wells as their mutants, have been described previously (Varnai et al., 1999; Servant et al., 2000). The human EGF receptor cDNA was subcloned from the SPER-7 plasmid, kindly provided by A. Clark and I. Pastan, NIH, Bethesda, MD, USA (Clark et al., 1986), into the pCDNA3.1(-) plasmid (Invitrogen) with XbaI and HindIII restriction enzymes. The ARNO (239-399) and GRP1 (267-399 and 245-399) PH domains were amplified from marathon-ready human brain cDNAs (Clontech). The amplified DNA encoding the GRP1 PH domain was cloned between the BglII/EcoRI sites and the ARNO PH domain between the EcoRI/BamHI sites of the pEGFP-C1 plasmid. Mutations within the PH domains were generated by the Quikclone mutagenesis kit (Stratagene). All constructs were confirmed by dideoxy sequencing. Recombinant PH domains were created by subcloning the exact same constructs used for the mammalian expression studies (including the mutants) into the pET-23b plasmids containing the 6×His residues at the C-terminus.

Akt activity measurements

COS-7 cells were seeded onto 35 mm culture dishes and transfected with HA-Akt (Bondeva et al., 1998) and the indicated plasmid DNA constructs (1 µg each) at 60% confluency using the lipofectamine 2000 reagent. 24-36 hours after transfection, cells were lysed in 1 ml lysis buffer containing 50 mM Tris/Hcl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na-pyrophosphate, 1% NP-40, 20 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol and protease inhibitors (0.1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 1 μg/ml aprotinin, 0.02 mM leupeptin, 0.02 mM pepstatin and 100 μM AEBMSF) and 1 mM DTT freshly added prior to use. Lysates were cleared by centrifugation and 200 µl was incubated with 1 µg of anti-HA monoclonal antibody (Covance) for 1-2 hours at 4°C before the addition of 15 µl protein G-sepharose prewashed in lysis buffer for an additional incubation at 30 minutes. Immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer, once with 100 mM Tris/0.5 M LiCl pH 7.5, and finally with the kinase reaction buffer without ATP. Beads were then resuspended in 50 µl kinase buffer (20 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) containing 2 μCi γ-[³²P]ATP, 10 μM ATP and 30 μ M crosstide peptide. Reactions were run for 30 minutes at 30°C and terminated by rapid centrifugation (9000 g/5 minutes) and transfer of 40 μ l reaction product to a Whatman P81 phosphocellulose paper. Filters were washed four times with 75 mM phosphoric acid and once in acetone before drying and scintillation counting. Expression levels of the various components were tested in each experiment from the lysates by western blot analysis. In later experiments, endogenous Akt activation was measured by western blotting using the phospho-Akt (Ser473) antibody (Cell Signaling) and the data were analyzed with densitometry.

Transfection of cells for confocal microscopy

Cells were plated onto 25 mm diameter circular glass cover slips at a density of 3×10^5 cells/dish and were transfected the next day with plasmid DNAs (2 µg/ml) using the Lipofectamine 2000 reagent and OPTI-MEM (Life Technologies). 24-36 hours after transfection, cells were washed twice with a modified Krebs-Ringer buffer, containing 120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 0.7 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 10 mM Na-Hepes, pH 7.4, and the coverslip was placed into a chamber that was mounted on a heated stage with the medium temperature kept at 33°C. Cells were incubated in 1 ml of the Krebs-Ringer buffer and stimuli were added in 0.5 ml prewarmed buffer after removing 0.5 ml medium from the cells. Cells were examined in an inverted microscope under a 40× oil-immersion objective (Nikon) and a BioRad laser confocal microscope system (MRC-1024) with the Lasersharp aquisition software (BioRad) or in a Zeiss LSM510 laser confocal microscope.

Cell attachment assay

COS-7 cells (2×10^6) were plated onto 10 cm culture dishes and transfected the next day using Lipofectamine 2000 (5 µg DNA /dish). After 24-36 hours, cells were removed from the plates by gentle trypsinization and divided into three aliquots. One aliquot was centrifuged and the cells were immediately lysed in Laemmli buffer. The other two aliquots were plated into 35 mm culture dishes and the cells were allowed to attach for 30 minutes. After this, the medium was removed and the cells were washed twice with 2 ml of ice-cold Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) before lysis in the same volume of Laemmli buffer that was added to the first aliquot of cells. Samples were then sonicated (but not boiled) and loaded onto a 8-16% Tris/glicine gel and separated by SDS-PAGE. Electrophoresis gels were analyzed in a Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics) using the blue fluorescent laser for quantitation of the GFP fusion protein band in the gel. The fraction of GFP signal found in the attached cells relative to the total amount of cells seeded was calculated for each construct as well as GFP alone, which served as a control.

Cell spreading on fibronectin

Glass coverslips were coated with fibronectin (20 μ g/ml) for 2 hours at 37°C, and washed twice with PBS to remove any unbound fibronectin. To block any remaining binding sites, coverslips were then incubated with 1 mg/ml fatty acid free bovine serum albumin (BSA) for 1 hour at 37°C. COS-7 cells expressing the different PH domain constructs (24 hours after transfection) were prepared for plating by trypsinization. After pelleting, cells were treated with 0.3 mg/ml soybean trypsin inhibitor in DMEM for 10 minutes at 37°C followed by incubation in 0.5% BSA in DMEM for an additional 1 hour to allow cell recovery. Cells were then plated onto the fibronectin-coated coverslips and fixed by 4% paraformaldehyde 10 minutes after plating. Fixed cells were permeabilized by 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 minutes followed by phalloidin staining (0.1 μ g/ml TRITC-phalloidin in PBS for 20 minutes). Cells overexpressing the GFP fusion proteins were identified by fluorescent microscopy without knowing the treatment regimen and were classified into three groups: unspread (adherent with no projections), partially spread (adherent with limited lamellipodia), and fully spread. The percent of fully spread cells was then calculated for each group of cells expressing the GFP fusion proteins.

Analysis of expression kinetics

To transfect COS-7 cells in 96-well plates (black with clear bottom) 1 μ g DNA in 25 μ l OPTI-MEM/well was mixed with 0.5 μ l Lipofectamine-2000 in 25 μ l OPTI-MEM/well and incubated for 30 minutes in the well. Freshly trypsinized COS-7 cells ($4.5 \times 10^4/100 \mu$ l OPTI-MEM/well) were then added to the wells and the plate was incubated in a CO₂ incubator. After 6-10 hours, 150 μ l/well DMEM containing 10% FBS was added. GFP fluorescence was measured at the indicated times using a plate reader (Ascent FL, ThermoLabsystems; or Mithras LB940, Berthold). To determine the PIP₃-dependent component of the effects of the expressed PH domains on the balance of proliferation/apoptosis, the ratios of the fluorescence of cells expressing the wild-type PH domains were calculated using the mutant forms of the same domain incapable of lipid binding as a control at each time point for each PH domain.

Analysis of inositol phosphates

Inositol phosphates were analyzed from COS-7 cells transfected with cDNA encoding the human EGF receptor, together with selected PH-GFP fusion constructs as described previously (Varnai et al., 1999). One day after transfection, cells were labeled with myo-[³H]inositol for 24 hours and after 30 minutes stimulation in the presence of 10 mM LiCl, [³H]-labeled inositol phosphates were separated by Dowex minicolumns, and measured by liquid scintillation counting as described elsewhere (Hunyady et al., 1994). The relatively small activation of PLC γ by EGF in these cells did not permit direct analysis of the 1,4,5-isomer of InsP₃ and the pooled InsP₂ samples were used as an indicator of overall PLC activity.

Protein purification and InsP₄ or PIP₃ binding

Recombinant PH-GFP proteins were produced in BL-21 cells (Invitrogen). Overnight cultures were grown to OD600: 0.6-0.9 and induced with 200 μ M isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

for 7 hours at room temperature. Proteins were purified from the bacterial lysates by Ni-NTA columns (Spin Kit, Qiagen) following the manufacturers instruction. InsP₄ binding was performed as described previously (Varnai et al., 2002), using 1.1 nCi (1 nM) [³H]InsP₄ and 200 ng proteins in the 50 μ l incubation volume. Binding to PIP₃-coated agarose beads (Echelon) was performed following the manufacturer's protocol with minor modifications. To elute the proteins bound to the beads, after centrifugation and washing, beads were incubated at room temperature for 30 minutes instead of boiling to preserve fluorescence. The amounts of bound and free proteins were assessed by phosphoimager analysis of the samples resolved by SDS PAGE.

Results

Recognition of PIP₃ by the PH domains in NIH 3T3 cells Four PH domains known to interact with PIP₃ were chosen for this study: Btk-PH, Akt-PH, GRP1-PH and ARNO-PH. Since the ARNO-PH domain has two splice variants, differing only in a single glycine in the loop between the β 1- and β 2-strands (Klarlund et al., 2000; Lietzke et al., 2000) that changes the lipid binding specificity of the domain, we also included the 3G variant (ARNO-3G) in these studies. As documented by several studies, all of these proteins show a PIP₃-dependent translocation to the plasma membrane in many cell types after agonist stimulation (Venkateswarlu et al., 1998; Oatey et al., 1999; Varnai et al., 1999; Watton and Downward, 1999). As shown in Fig. 1, clear differences are found in the distributions of these proteins in quiescent NIH 3T3 cells, namely the prominent nuclear localization of GRP1-PH and ARNO-PH, which was much less pronounced with Btk-PH and very little with Akt-PH. Also, a small extent of plasma membrane localization was observed with Akt-PH, in quiescent cells but not with the other PH domains. However, all of the chimeras showed a robust translocation to the plasma membrane after PDGF stimulation that was completely reversed by wortmannin in the case of Btk-PH, GRP1-PH and ARNO-PH, and was largely, but not completely, eliminated in the case of Akt-PH-GFP. The ARNO-PH domain variant containing three



Fig. 1. Localization and wortmannin-sensitive translocation of expressed PH-GFP chimeras that recognize PIP_3 in NIH 3T3 cells. NIH 3T3 cells were transfected with the indicated PH-GFP constructs and live cells were examined by confocal microscopy after 1 day of transfection. Note the recruitment of the PH domains (except that of the 3G variant ARNO) to the plasma membrane after PDGF stimulation, and the reversal of this by the PI 3-kinase inhibitor wortmannin.

4882 Journal of Cell Science 118 (20)

glycines showed little basal localization and a barely detectable translocation response. These data together demonstrated that the selected PH domains are able to recognize PIP_3 in the plasma membrane with sufficiently high affinity.

Inhibition of Akt activation by the overexpressed PH domains

One of the best known and most studied downstream targets of PIP₃ [and phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate, PtdIns(3,4)P₂] is the serine/threonine kinase Akt. Therefore, first we decided to study the inhibitory effects of the expressed PH domains on Akt activation in COS-7 cells. In order to investigate the Akt response of only the transfected cells, an epitope-tagged Akt (HA-Akt) was transfected together with the selected PH-GFP constructs and also with a membranetargeted form of phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ -CAAX) (Bondeva et al., 1998), to generate PIP₃. After 24 hours of transfection, Akt was immunoprecipitated from the cell lysates and its activity was determined using ³²P-ATP and crosstide as



Fig. 2. Inhibition of PIP₃-dependent Akt activation by the various PH domains. COS-7 cells were transfected with a HA-tagged full-length Akt construct with or without a construct encoding a plasmamembrane-targeted PI 3-kinase γ (PI3K γ -CAAX) and the indicated PH-GFP constructs. One day after transfection and after 6-8 hours of serum deprivation, cells were lysed and the activity of HA-Akt was measured after immunoprecipitation as detailed under Materials and Methods. Equal expression of HA-Akt, as well as the other expressed proteins, was ensured by keeping the total transfected DNA equal by complementing with the respective empty plasmid DNAs during transfection and were determined from the total cell lysates. In each experiment, the Akt activities were normalized to the level observed with PI3K γ -CAAX in the presence of GFP alone, which gave an average of tenfold increase over the basal. Mean±s.e.m. of three similar observations are shown.

substrates (Bondeva et al., 1998). As shown in Fig. 2, membrane-targeted PI3K γ strongly stimulated Akt activity and both Akt-PH and Btk-PH were able to inhibit this activation (*P*<0.05). By contrast, GRP1-PH and ARNO-PH had no effect. Mutant Btk-PH (R28C), which is unable to bind the lipid, was also without effect, indicating the need for lipid binding to exert an inhibitory effect.

Inhibition of cell attachment and spreading by the various PH domains

To test a PIP₃-regulated process that is linked to the function of the GRP1/ARNO family of GTP-binding protein exchange factors, we chose two simple assays that rely upon inside-out signaling. Cell adhesion and spreading have both been shown to be PIP₃-regulated processes in which integrins and small GTP-binding proteins have been implicated (Kinashi et al., 1995; Heraud et al., 1998; Yamboliev et al., 2001; Hawadle et al., 2002). COS-7 cells were transfected with the various GFP fusion constructs and were removed from the culture plates with Versene. Aliquots of the transfected cells were then reseeded onto small culture dishes and incubated for the indicated times (usually 30 minutes). Non-attached cells were then washed away and the attached cells were subjected to SDS page analysis along with the sample of the total amount of cells seeded, so that the fraction of transfected cells attached could be calculated after quantification of the GFP fluorescence in a Phosphorimager. This method allowed monitoring of the attachment efficiency of only the population of transfected cells. As shown in Fig. 3, the PH domains of GRP1 and ARNO were found to inhibit the attachment of cells (P < 0.05), whereas the PH domains of Akt and Btk were without effect in this assay.

To examine the effect on cell spreading, transfected cells were also seeded on fibronectin-coated cover slips and incubated for 10 minutes before fixation and staining with TRITC-phalloidin. Cells were then examined under a wide-field fluorescence microscope and scored for the presence of spreading and/or lamellopodia. These data also showed that both GRP1-PH and ARNO-PH, but not Btk-PH or Akt-PH, exerted a strong effect on cell spreading (P<0.05, Fig. 4). Interestingly, ARNO-3G was also effective in these assays, although less so than the 2G variant.

Effect of PH domain expression on PLC γ -mediated inositol phosphate production

It has been well documented that PLC γ activation is partially dependent on PIP₃ formation (Falasca et al., 1998; Bae et al., 1998). Therefore, we investigated whether the overexpressed PH domains exert an inhibitory effect on EGF-stimulated inositol phosphate production. COS-7 cells were transfected with the EGF receptor along with the various PH-GFP chimeras and were prelabeled with myo-[³H]inositol. EGF-stimulated inositol phosphate production was then tested in the presence of lithium to capture PLC γ -generated inositol phosphates. As shown in Fig. 5, about 40% of the EGF-stimulated InsP response (which was about twofold on average) was wortmannin sensitive. The EGF-induced response was also inhibited by the GRP1- and ARNO-PH domains, and to a lesser degree by the Akt-PH (*P*<0.05 in all cases). However, Btk-PH had a significant positive effect on this response that was reversed by wortmannin treatment and was dependent on PIP₃ interaction, since the R28C mutant did not show this response. This positive regulatory effect of Btk also observed in B cells (Saito et al., 2003) was pursued in another set of experiments (P.V., T. Bondeva, G. Csordas, G. Hajnoczky and T. Balla, unpublished observations) and will not be further discussed in the present study. However, these experiments showed again that the various PH domains show an inhibitory pattern that is distinctively different depending on the cellular response being examined.



Fig. 3. Inhibition of cell attachment by overexpressed PH-GFP chimeras in COS-7 cells. COS-7 cells were transfected with the indicated PH-GFP constructs for 1 day. Cells were removed by mild trypsinization and divided into three aliquots. One aliquot was centrifuged and the cells were immediately lysed in Laemmli buffer (labeled c). The other two aliquots were plated into 35mm culture dishes and the cells were allowed to attach for 30 minutes (labeled a). After this, the medium was removed and the cells were washed twice with 2 ml of ice-cold Dulbecco's PBS before lysis in the same volume of Laemmli buffer that was added to the first aliquot of cells. Samples were then sonicated (but not boiled) before separation by SDS-PAGE. Electrophoresis gels were analyzed in a Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics) using the blue fluorescent laser for quantitation of the GFP fusion protein band in the gel. The fraction of GFP signal found in the attached cells relative to the total amount of cells seeded was calculated for each construct including GFP alone, which served as a control. Representative gel samples are shown in (A), and the mean±s.e.m. from five experiments performed in duplicates are shown in (B).

Inhibition by PH domain overexpression of complex cellular responses

In subsequent experiments, we investigated the abilities of the various PH domains to influence more-complex cellular responses such as proliferation and apoptosis. These responses rely upon a number of signal transduction events and therefore are more difficult to interpret in terms of the specific



Fig. 4. Inhibition of cell spreading by overexpressed PH domain chimeras in COS-7 cells. COS-7 cells transfected with the indicated PH-GFP constructs for 24 hours were removed from the culture dishes with gentle trypsinization and re-plated onto fibronectin-coated glass cover slips as detailed under Materials and Methods. After 10 minutes, cells were fixed and stained with TRITC-phalloidin. Cells overexpressing the GFP fusion proteins were identified by fluorescent microscopy and were classified into three groups: unspread (adherent with no projections), partially spread (adherent with limited lamellipodia) and fully spread. The percentage of fully spread cells was then calculated for each group of cells expressing the GFP fusion proteins and related to the untransfected controls. When added, the PI 3-kinase inhibitor, LY 424002 (Ly) was added 10 minutes before plating on fibronectin. Mean±s.e.m. of 3-6 experiments are shown.

4884 Journal of Cell Science 118 (20)



Fig. 5. Inhibition of EGF-stimulated InsP formation by overexpressed PH domain chimeras in COS-7 cells. COS-7 cells were transfected with cDNA encoding the human EGF receptor, together with selected GFP-PH domain fusion constructs as described under Materials and Methods. One day after transfection, cells were labeled with myo-[³H]inositol for 24 hours. Cells were stimulated by EGF for 30 minutes in the presence of 10 mM LiCl, and [³H]-labeled inositol phosphates were separated by Dowex minicolumns and measured by liquid scintillation counting. The relatively small activation of PLC by EGF in these cells did not permit direct analysis of the 1,4,5-isomer of InsP₃ and the pooled InsP₃ and InsP₂ samples were used as an indicator of overall PLC activity. The InsP response of the cells was normalized to the value observed after EGF stimulation of cells expressing only GFP, which was about a twofold increase in average. The PI 3-kinase inhibitor wortmannin (wm) was added 10 minutes before EGF treatment. Mean±s.e.m. of 3-5 experiments are shown performed in duplicate (except for Akt-PH, where n=2).

biochemical event being targeted; nevertheless, they could reveal significant phenotypic changes caused by the expression of PH domains. Therefore, we studied how the expression of the fluorescent PH domain changes in time for the individual constructs. Although the expression kinetic of any given protein can vary as a result of multiple factors within the cells, a difference between the expression dynamics of wild-type mutant forms (that do not and bind phosphoinositides) of the PH domains would indicate the involvement of a PIP₃-dependent process. For example, any positive effect of the PH domain protein on apoptosis would be expected to eliminate the transfected cells more rapidly and hence rapidly decrease the population of fluorescent cells after the construct is expressed. As shown in Fig. 6, the various constructs showed significant variations in their expression patterns. When the data were expressed as fluorescence of wild-type version relative to the mutant version of the same PH domain, the only remarkable difference was observed with the Akt-PH domain, which clearly showed a lipid-bindingdependent self-elimination.

Mutagenesis of Akt-PH and GRP1-PH domains

The specific inhibitory effect of the PH domains on selected cellular responses raised the possibility that these domains might



Fig. 6. The dymanics of expression of various PH-GFP chimeras in COS-7 cells. COS-7 cells were transfected with the indicated PH-GFP constructs and the GFP fluorescence was monitored as a function of time using a fluorescence plate reader. Fluorescence values were normalized to the first reading in each group (20 hours after transfection) as shown for a representative experiment in (A). To determine the PIP₃-dependent component of the effects of the expressed PH domains on the balance of proliferation/apoptosis, the ratios of the fluorescence of cells expressing the wild-type PH domains were calculated using the mutant forms of the same domain, which are incapable of lipid binding, as a control at each time point for each PH domain (B). Mean \pm s.e.m., n=3.

interact with protein-binding partners in addition to binding PIP₃. The putative binding partners would have to interact with a surface on the PH domain that is distinct from that involved in lipid binding. It has been previously reported that Thr34 of the Akt-PH domain is phosphorylated by PKC ζ and this phosphorylation prevents Akt membrane recruitment and activation (Powell et al., 2003). This Thr residue is located on the surface of the Akt-PH domains that is not directly involved in PIP₃ binding and which corresponds to the $\beta\gamma$ -binding interface of the GRK2-PH domain (Lodowski et al., 2003). Therefore, we generated a series of Thr34 mutants with various substitutions (T34A, T34S, T34P, T34D, T34L and T34F) within

the Akt-PH-GFP construct and determined their ability to bind PIP₃, localize to membranes in intact cells, and exert inhibition on Akt activation. Of these mutants, T34A and T34S behaved as the wild-type version, whereas T34P showed no membrane localization or binding to lipids (not shown). However, T34D, T34L and T34F displayed quite interesting features. As shown in Fig. 7, these mutants all showed prominent membrane localization in stimulated COS-7 cells or in HEK 293 cells, and only T34F showed a somewhat impaired membrane recruitment (Fig. 7A). This was in good agreement with the PIP₃ binding data, which showed that binding of these mutant recombinant proteins to PIP₃ beads was only slightly impaired (Fig. 7B). However, in spite of their PIP₃ binding and membrane localization, these mutants showed no inhibition on Akt activation compared with the R25C mutant that is unable to bind the lipids and localize to the membrane (Fig. 7C). Similarly, none of the Akt-PH mutants showed self-elimination in the assay monitoring the kinetics of expression of the domains as a function of time, in fact the T34F mutant showed better expression than the R25C mutant (panel D). These data clearly suggested that membrane localization is necessary but may not be sufficient for the construct to interfere with the signaling of the endogenous Akt protein, and the latter is related to a feature of the PH domain consistent with additional interaction(s).

Similar experiments were designed with the GRP1-PH domain. Here, two mutants were generated at residues located on the same surface probed with the Akt-PH domain, away from the lipid-binding site. The two mutants, I307E and K340L, were chosen because of their size and side chain orientation. As shown in Fig. 8, these mutations failed to affect the binding of the domain to PIP₃ beads (Fig. 8B); however, they did impair the abilities of the constructs to localize to the membranes of HEK 293 cells, although still showed localization in peroxyvanadate-stimulated COS-7 cells (Fig. 8A). Because of their somewhat impaired cellular localization, the InsP₄-binding affinity of these constructs was also determined (Fig. 8C). These data showed no significant difference between the domains confirming that their PIP₃/InsP₄ affinities are not affected by the mutations. Importantly, neither mutant showed the inhibitory effect on cell spreading that was observed with the wildtype GRP1-PH domain, and their effect was less or equal to the R284C mutant unable to bind PIP₃ or localize to the membrane. These data also indicated that the dominant-negative effect of the GRP1-PH domain requires interactions other than with the lipid PIP₃.



Fig. 7. The effects of Akt-PH-GFP mutations on PIP₃ binding, cellular localization and inhibition of cellular responses. (A) COS-7 (upper) and HEK 293 cells (lower) were transfected with the indicated mutant Akt-PH-GFP construct and examined by confocal microscopy without stimulation (HEK 293 cells) or after stimulation with peroxyvanadate (30 µM peroxide, 100 µM ortho-vanadate) for 5-10 minutes (COS-7 cells). (B) Binding of recombinant Akt-PH-GFP mutants to PIP₃ conjugated to agarose beads (sn, unbound fraction in the supernatant; pellet, bound fraction associated with the beads); bars represent the % bound fraction determined by Phosphorimager analysis from three separate experiments (±s.e.m.), one of which is shown as a representative. (C) Inhibition of endogenous Akt activation by Akt-PH-GFP mutants expressed in COS-7 cells. After 24 hours of transfection, cells were stimulated by EGF (100 ng/ml) for 5 minutes. Total cell lysates were analysed by SDS PAGE followed by western blotting using an anti-phospho-Akt antibody and densitometric analysis. In (B) and (C), the R25C mutant, unable to bind the lipid, is indicated by darker columns. (D) Expression kinetics of the various Akt-PH-GFP mutants in COS-7 cells as described in Fig. 6. Fluorescence values were related to those of the non-binding R25C mutant at each time points (mean \pm s.e.m., n=3). (E) The position of the mutated residue (Thr34) within the Akt-PH domain relative to the PIP₃ binding site in the crystal structure of Akt-PH (1H10).

4886 Journal of Cell Science 118 (20)

Discussion

There is hardly a cellular process that is not regulated by phosphoinositides, and PI 3-kinases have been shown to affect a great variety of cellular responses. This notion has generated enormous interest in the downstream effectors of the 3phosphorylated lipid product, PIP₃, leading to the identification of numerous proteins that possess PH domains with specific PIP₃ recognition properties (Klarlund et al., 1997; Welch et al., 2002). Although many of these PH domains bind PIP₃ with high enough affinity that is sufficient to recruit them to the plasma membrane upon activation of PI 3-kinases, a number of observations suggest that they also interact with protein components. For example, the Btk- and GRK2-PH domains were shown to bind $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins (Tsukada et al., 1994; Carman et al., 2000), and Btk-PH also binds the C1 domain of PKC (Yao et al., 1994), whereas its PH/Tec-homology (TH) domain binds the mouse PIP 5-kinase



type-I β (Saito et al., 2003). Similarly, the Akt-PH was reported to interact with the myosin II isoform (Tanaka et al., 1999), although it is not clear whether this protein interaction contributes to the physiological regulation of the Akt protein kinase. Several other PH domains show relatively low specificity in their inositol lipid binding in vitro, yet appear to be regulated more specifically by the lipids within the cell (Yu et al., 2004). Therefore, an increasing body of evidence indicates that PH domains might serve as more complex molecular modules with both lipid and protein recognition.

The present experiments were designed to investigate whether PH domains that recognize the same phosphoinositide species, namely PIP₃, exert similar inhibitory effect on distinct cellular processes known to be regulated by this critically important phosphoinositide. We reasoned that if PH domains solely interacted with the membrane lipids, their inhibitory potencies should follow an identical rank order determined by

their relative lipid affinities regardless of the PIP₃dependent regulatory pathway examined. Our data clearly demonstrate that, of the selected PH domains with PIP₃ recognition, some can quite specifically inhibit one PIP₃regulated process without significantly affecting another. For example, expression of the GRP1-PH domain was effective at inhibiting cell adhesion and spreading, but had no effect on Akt activation, whereas the Akt-PH domain behaved the opposite way, i.e. showing a strong inhibitory effect on Akt activation but no effect on the cell spreading process. These findings cannot be simply explained by sequestration of the lipids by the PH domains. In fact, inhibition by lipid sequestration may not be as easily achieved since production of the lipid can simply make up for the PH-domain-bound fraction in any given PIP₃mediated process. However, if PH domains also bind to protein partners that are important for a specific downstream signaling process, sequestration of this protein will not be easily compensated for, thereby explaining the

Fig. 8. The effects of GRP1-PH–GFP mutations on PIP₃ or $InsP_4$ binding, cellular localization and inhibition of cellular spreading in COS-7 cells. (A) COS-7 (upper) and HEK 293 cells (lower) were transfected with the indicated mutant GRP1-PH-GFP construct and examined by confocal microscopy without stimulation (HEK 293 cells) or after stimulation with peroxyvanadate (30 µM peroxide, 100 µM ortho-vanadate) for 5-10 minutes (COS-7 cells). (B) Binding of recombinant GRP1-PH-GFP mutants to PIP3 conjugated to agarose beads (sn, unbound fraction in the supernatant; pellet, bound fraction associated with the beads); bars represent the % bound fraction determined by Phosphorimager analysis from two separate experiments (mean±range), one of which is shown as a representative. (C) Binding of InsP₄ to GRP1-PH-GFP mutants. Recombinant proteins were incubated with $[^{3}H]$ InsP₄ in the presence of increasing concentration of unlabeled InsP₄ for 10 minutes. Protein-bound radioactivity was determined as described under Materials and Methods and expressed as % B₀ (means \pm s.e.m., n=3). (D) Inhibition of cell spreading by the various GRP1-PH-GFP constructs as described in Fig. 4. (mean \pm s.e.m., n=3). In (B) and (D), the R284C mutant, unable to bind the lipid, is indicated by darker columns. (E) The position of the mutated residues (I307 and K340) within the GRP1-PH domain relative to the PIP₃ binding site in the crystal structure of GRP1-PH (1FHX).

selective inhibition of a particular pathway by the overexpressed PH domain.

Thus, mutations generated on a surface within the Akt-PH and GRP1-PH domains that is not directly involved in lipid binding can abrogate the inhibitory effects of the constructs without affecting lipid binding. This finding is also consistent with interaction of the domains with additional binding partners, most probably with other proteins. Also, a putative protein interaction with the PH domain might indirectly affect the membrane localization of the construct. This was seen more prominently with the GRP1-PH domain, which showed impaired membrane localization in spite of an unchanged lipidbinding affinity, whereas the selected Akt-PH domain mutants still localized to the membrane. It is worth pointing out that C2 ceramide has been reported to eliminate the binding of both Akt-PH-GFP and GRP1-PH-GFP after PDGF stimulation (Stratford et al., 2001), an affect attributed to the PKCζmediated phosphorylation of T34 in the case of the Akt-PH domain (Powell et al., 2003). In the present study, the T34D substitution failed to mimic the phosphorylation effect on membrane localization, but this could be due to the much larger charge of the phosphate residue in this position.

It is important to note that the selectivity of the PH domains was not absolute, for example, the Btk-PH also inhibited Akt activation and all but Btk-PH was able to inhibit EGF-induced InsP₃ formation. Whether this reflects a similarity between the domains in regard to the protein interacting partner, or the multiple components through which InsP₃ generation can be affected in the latter case, remains to be elucidated. It is also important to emphasize that, in the case of responses regulated by more complex regulatory networks, such as the growth of the transfected cells, multiple effects could determine the final outcome. For example, although Btk-PH inhibited Akt activation similarly to that of Akt-PH, the two domains affected the EGF-mediated InsP3 response differently, Akt-PH having an inhibitory effect, and Btk-PH having a strong stimulatory effect. As a result, only Akt-PH caused a selective elimination of the cells in which it was expressed; by contrast, in the case of Btk, the two opposing effects seem to have balanced one another and hence, Btk-PH had no prominent effect on cell elimination.

These findings have important implications regarding inositol lipid regulation of effectors containing PH domains. It is conceivable that, upon lipid binding, the PH domain undergoes a conformational change that will affect its interaction with a protein-binding partner. This partner could be either another regulatory protein or another domain within the same protein forming an intramolecular interaction. A conformational change upon binding of InsP₄ to the Akt-PH has been described recently (Milburn et al., 2003) but not many other studies are available in which this question has been examined at the structural level. By contrast, there are several examples of PH domains regulating the functions of proteins; this has been observed even in vitro, where PIP₃-mediated membrane recruitment cannot be responsible for the observed effects of the lipid. For example, Btk kinase activity in vitro was found to be stimulated by PIP₃ (Saito et al., 2001). Recently, the PH domain of the ELMO protein (which, together with Dock180, functions as a bipartite Rac guaninenucleotide exchange factor) was shown to be essential for the binding and regulation of the Rac-Dock180 complex independent of membrane targeting (Lu et al., 2004). Similarly,

in several guanine nucleotide exchange factors with tandem Dbl-homology (DH) and PH domains, the PH domain may cooperate with the DH domain in promoting nucleotide exchange (Rossman et al., 2002; Soisson et al., 1998; Worthylake et al., 2004), although this may not be regulated by inositides in vitro (Snyder et al., 2001). Conversely, the inositol lipid binding of the nucleotide exchange factor Trio was found to be influenced by the binding of RhoG (Skowronek et al., 2004), providing additional support to the idea that the lipid and protein binding of PH domains might regulate one another.

In summary, the present studies demonstrate that overexpression of isolated PH domains can act as inhibitors of PIP₃-regulated cellular pathways and show a degree of specificity that was unexpected given their inositol lipid recognition properties. Selected mutations that do not affect their lipid recognition are able to prevent the inhibitory effects, suggesting that PH domains might also interact with proteins. PH domains, therefore, could serve as molecular switches regulated by phosphoinositides. This type of regulation could explain the parallel and specific control of multiple effectors by the membrane phospholipids. More studies will be needed to validate this concept and to identify the protein regulatory partners that participate in the process.

This research was supported in part by the Intramural Research Program of the National Institute of Child Health and Human Development of the National Institutes of Health. P.V. and L.H. were supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA T-034606, T-046445 and M-045341, M-036310), the Medical Research Council (ETT 528/2003) and the Collaborative Research Initiative Grant from the Wellcome Trust (069416/Z/02/Z). L.B. and A.P. were supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA T-46130) and the Howard Hughes Medical Institute. This research was supported in part by an appointment to the Senior Fellowship Program (P.V.) at the NIH. This program is administered by the Oak Ridge Institute for Science and Education through an interagency agreement between the U.S. Department of Energy and the National Institutes of Health.

References

- Artalejo, C. R., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. and Palfrey, H. C. (1997). Specific role for the PH domain of dynamin-1 in the regulation of rapid exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* 16, 1565-1574.
- Bae, Y. S., Cantley, L. G., Chen, C.-S., Kim, S.-R., Kwon, K.-S. and Rhee, S. G. (1998). Activation of phosphoplipase C-γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J. Biol. Chem. 273, 4465-4469.
- Balla, T. and Varnai, P. (2002). Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. Sci STKE 125, 1-16.
- Balla, T., Bondeva, T. and Varnai, P. (2000). How accurately can we image inositol lipids in live cells? *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 238-241.
- **Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R. and Wymann, M. P.** (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kγ to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* **282**, 293-296.
- Carman, C. V., Barak, L. S., Chen, C., Liu-Chen, L.-Y., Onorato, J. J., Kennedy, S. P., Caron, M. G. and Benovic, J. L. (2000). Mutational analysis of $G\beta\gamma$ and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 10443-10452.
- Clark, A. J., Beguinot, L., Ishii, S., Ma, D. P., Roe, B. A., Merlino, G. T. and Pastan, I. (1986). Synthesis of epidermal growth factor (EGF) receptor in vitro using SP6 RNA polymerase-transcribed template mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 867, 244-251.
- Cozier, G. E., Carlton, J., Bouyoucef, D. and Cullen, P. J. (2004). Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 282, 49-88.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A. and

4888 Journal of Cell Science 118 (20)

Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C γ by PI 3-kinaseinduced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* **17**, 414-422.

- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. and Fesik, S. W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.
- Hawadle, M. A., Folarin, N., Martin, R. and Jackson, T. R. (2002). Cytohesins and centaurins control subcellular trafficking of macromolecular signaling complexes: regulation by phosphoinositides and ADP-ribosylation factors. *Biol. Res.* 35, 247-265.
- Heraud, J. M., Racaud-Sultan, C., Gironcel, D., Albiges-Rizo, C., Giacomini, T., Roques, S., Martel, V., Breton-Douillon, M., Perret, B. and Chap, H. (1998). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidylinositol 4',5'-bisphosphate are both required for ADPdependent platelet spreading. J. Biol. Chem. 273, 17817-17823.
- Hunyady, L., Baukal, A. J., Balla, T. and Catt, K. J. (1994). Independence of type 1 angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. J. Biol. Chem. 269, 24798-24804.
- Irvine, R. (2004). Inositol Lipids: To PHix or Not to PHix? Curr. Biol. 14, R308-R310.
- Kinashi, T., Escobedo, J. A., Williams, L. T., Takatsu, K. and Springer, T. A. (1995). Receptor tyrosine kinase stimulates cell-matrix adhesion by phosphatidylinositol 3 kinase and phospholipase C-gamma 1 pathways. *Blood* 86, 2086-2090.
- Klarlund, J. K., Guilherme, A., Holik, J. J., Virbasius, J. V., Chawla, A. and Czech, M. P. (1997). Signaling by phosphoinositide-3,4,5trisphosphate through proteins containing plekstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-1930.
- Klarlund, J. K., Tsiaras, W., Holik, J. J., Chawla, A. and Czech, M. P. (2000). Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. J. Biol. Chem. 275, 32816-32821.
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4, 201-213.
- Lemmon, M. A. and Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* 350, 1-18.
- Lemmon, M. A., Falasca, M., Ferguson, K. M. and Schlessinger, J. (1997). Regulatory recruitment of signalling molecules to the cell membrane by plekstrin-homology domains. *Trends Cell Biol.* 7, 237-242.
- Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P. and Lambright, D. G. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* 6, 385-394.
- Lodowski, D. T., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J. and Tesmer, J. J. (2003). Keeping G proteins at bay: a complex between G proteincoupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* 300, 1256-1262.
- Lomasney, J. W., Cheng, H. F., Wang, L. P., Kuan, Y., Liu, S., Fesik, S. W. and King, K. (1996). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding to the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 enhances enzyme activity. J. Biol. Chem. 271, 25316-25326.
- Lu, M., Kinchen, J. M., Rossman, K. L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Haney, L. B., Klingele, D., Sondek, J. et al. (2004). PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 756-762.
- Milburn, C. C., Deak, M., Kelly, S. M., Price, N. C., Alessi, D. R. and Van Aalten, D. M. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem. J.* 375, 531-538.
- Oatey, P. B., Venkateswarlu, K., Williams, A. G., Fletcher, L. M., Foulstone, E., Cullen, P. J. and Tavare, J. M. (1999). Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in insulinand PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 344, 511-518.
- Odorizzi, G., Babst, M. and Emr, S. D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 25, 229-235.
- Powell, D. J., Hajduch, E., Kular, G. and Hundal, H. S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCζ-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7794-7808.
- Rossman, K. L., Worthylake, D. K., Snyder, J. T., Siderowski, D. P.,

Campbell, S. L. and Sondek, J. (2002). A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *EMBO J.* **21**, 1315-1326.

- Saito, K., Scharenberg, A. M. and Kinet, J. P. (2001). Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. J. Biol. Chem. 276, 16201-16206.
- Saito, K., Tolias, K. F., Saci, A., Koon, H. B., Humphries, L. A., Scharenberg, A., Rawlings, D. J., Kinet, J. P. and Carpenter, C. L. (2003). BTK regulates PtdIns-4,5-P₂ synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* **19**, 669-678.
- Servant, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W. and Bourne, H. R. (2000). Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287, 1037-1040.
- Skowronek, K. R., Guo, F., Zheng, Y. and Nassar, N. (2004). The C-terminal basic tail of RhoG assists the guanine nucleotide exchange factor Trio in binding to phospholipids. J. Biol. Chem. 279, 37895-37907.
- Snyder, J. T., Rossman, K. L., Baumesister, M. A., Pruitt, W. M., Siderowski, D. P., Der, C. J., Lemmon, M. A. and Sondek, J. (2001). Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. J. Biol. Chem. 276, 45865-45868.
- Soisson, S. M., Nimnual, A. S., Uly, M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human son of sevenless protein. *Cell* **95**, 259-268.
- Stratford, S., DeWald, D. B. and Summers, S. A. (2001). Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem. J.* 354, 359-368.
- Szaszak, M., Gaborik, Z., Turu, G., McPherson, P. S., Clark, A. J., Catt, K. J. and Hunyady, L. (2002). Role of the proline-rich domain of dynamin-2 and its interactions with Src homology 3 domains during endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. J. Biol. Chem. 277, 21650-21656.
- Tanaka, M., Konishi, H., Touhara, K., Sakane, F., Hirata, M., Ono, Y. and Kikkawa, U. (1999). Identification of myosin II as a binding protein to the PH domain of protein kinase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 169-174.
- **Tsukada, S., Simon, M., Witte, O. and Katz, A.** (1994). Binding of the βγ subunits of heterotrimeric G-proteins to the PH domain of Bruton's tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11256-11260.
- Varnai, P., Rother, K. I. and Balla, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinasedependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. J. Biol. Chem. 274, 10983-10989.
- Varnai, P., Lin, X., Lee, S. B., Tuymetova, G., Bondeva, T., Spat, A., Rhee, S. G., Hajnoczky, G. and Balla, T. (2002). 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. 277, 27412-27422.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P. B., Tavare, J. M. and Cullen, P. J. (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr. Biol.* 8, 463-466.
- Watton, J. and Downward, J. (1999). Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr. Biol.* 9, 433-436.
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T. and Stephens, L. R. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* 108, 809-821.
- Worthylake, D. K., Rossman, K. L. and Sondek, J. (2004). Crystal structure of the DH/PH fragment of Dbs without bound GTPase. *Structure* 12, 1079-1086.
- Yamboliev, I. A., Chen, J. and Gerthoffer, W. T. (2001). PI 3-kinases and Src kinases regulate spreading and migration of cultured VSMCs. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 281, C709-C718.
- Yao, L., Kawakami, Y. and Kawakami, T. (1994). The pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9175-9179.
- Yu, J. W., Mendrola, J. M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D. B., Murray, D., Emr, S. D. and Lemmon, M. A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by S. cerevisiae pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* **13**, 677-688.

Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP₃R) ligand-binding domain releases Ca²⁺ via endogenous IP₃R channels

Péter Várnai*, András Balla[†], László Hunyady*, and Tamas Balla^{†‡}

[†]Endocrinology and Reproduction Research Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; and *Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary

Edited by Clara Franzini-Armstrong, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, and approved April 7, 2005 (received for review October 11, 2004)

Virtually all functions of a cell are influenced by cytoplasmic [Ca²⁺] increases. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) channels, located in the endoplasmic reticulum (ER), release Ca²⁺ in response to binding of the second messenger, IP₃. IP₃Rs thus are part of the information chain interpreting external signals and transforming them into cytoplasmic Ca²⁺ transients. IP₃Rs function as tetramers, each unit comprising an N-terminal ligand-binding domain (LBD) and a C-terminal channel domain linked by a long regulatory region. It is not yet understood how the binding of IP₃ to the LBD regulates the gating properties of the channel. Here, we use the expression of IP₃ binding protein domains tethered to the surface of the endoplasmic reticulum (ER) to show that the all-helical domain of the IP₃R LBD is capable of depleting the ER Ca²⁺ pools by opening the endogenous IP₃Rs, even without IP₃ binding. This effect requires the domain to be within 50 Å of the ER membrane and is impaired by the presence of the N-terminal inhibitory segment on the LBD. These findings raise the possibility that the helical domain of the LBD functions as an effector module possibly interacting with the channel domain, thereby being part of the gating mechanisms by which the IP₃-induced conformational change within the LBD regulates Ca²⁺ release.

Ca²⁺ channel | endoplasmic reticulum | red fluorescent protein

he intracellular second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) is generated upon stimulation of cell-surface receptors linked to phospholipase C (PLC) activation (1). IP₃ rapidly binds to an intracellular receptor and releases Ca²⁺ from intracellular Ca²⁺ stores; hence, both IP₃ and its receptor (IP₃R) are key components of the signal transduction mechanism that links cell-surface receptors to calcium-regulated intracellular responses (2). All three isoforms of the IP₃R (types I, II, and III) function as intracellular Ca²⁺ channels that work as homotetramers or heterotetramers (3). Each receptor subunit has a channel portion containing six transmembrane helices and a pore domain located between TM5 and TM6, close to the C terminus of the protein (4-6). The ligand-binding domain (LBD) of the receptor is located at the N terminus (7) and is separated from the channel domain by a long intervening regulatory region facing the cytoplasm (3, 7). IP₃ binding leads to rapid activation of the channel, but Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, similar to that characteristic of the related ryanodine receptors (RyRs), has also been recognized as an important regulatory feature of IP_3Rs (8). Because of this complex, and often subtype-specific, regulation of IP₃ channels, cells can display complex Ca²⁺ wave patterns and oscillations after agonist stimulation, the shape and frequency of which can have unique importance in the selective regulation of downstream effectors (9-11).

Despite intense studies, little is known about the manner in which the binding of IP₃ to the N-terminal LBD affects the channel gating properties of the molecule. Upon IP₃ binding, the LBD undergoes a significant conformational change as evidenced by the IP₃- induced alteration of its migration on a size-exclusion column (7) and by its suitability as a FRET-based sensor of IP₃ binding (12). As shown recently, the C-terminal channel domain, isolated from the rest of the receptor, is constitutively active, and the presence of the regulatory domain is required to maintain the suppression of channel activity (13, 14). Moreover, elegant cross-linking experiments have shown that the N-terminal domain of the receptor is in juxtaposition with the C-terminal channel domain (15). These data together raised the possibility that the proximity of the LBD to the channel domain may be an important aspect of IP₃R regulation after binding of IP₃. The present study was designed to investigate whether the LBD of the IP₃R acts as a tethered regulatory module that regulates the channel activity via IP₃-induced conformational changes. For this purpose, we used a molecular approach by which the isolated LBD of type I IP₃R or its components was tethered to the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum (ER), and the effects of their expression on Ca2+ signaling was compared with those of the same constructs expressed in the cytoplasm. These experiments revealed that the all-helical domain of the LBD is capable of opening the IP₃R and suggest that the IP₃-induced conformational change may involve the unmasking of this domain for interaction with other portions of the molecule, possibly with the channel domain.

Materials and Methods

DNA Constructs. The construction of rat p130PH and the LBD of human type 1 IP₃R (224-605) fused to the C-terminal of GFP have been described (16). The same constructs were also created fused to monomeric red fluorescent protein (mRFP) by exchanging the GFP coding sequence with that of mRFP (17). Mutant forms of the constructs (p130PH R134L and IP₃R-224-605 K508A were generated by using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). For ER tethering, the C-terminal ER localization sequence (MVYIGIAIFLFVGLFMK) of the yeast UBC6 protein (X73234, residues 233–250) was fused to the C termini of the constructs through a short linker (NSRV). The long rigid helical linker built between the ER localization sequence and the LBD contained 9x(EAAAR) residues and was synthesized as doublestranded DNA with EcoRI restriction sites at both ends (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). The ER lumen-targeted protein coded by the pEF/Myc/ER/GFP vector (Invitrogen) was used to visualize the ER. The design, production, and purification of recombinant proteins, as well as the IP₃ binding assays performed on them, have been described (16).

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; IP₃R, IP₃ receptor; LBD, ligand-binding domain; RyR, ryanodine receptor; ER, endoplasmic reticulum; mRFP, monomeric red fluorescent protein; PH, pleckstrin homology; Tg, thapsigargin; TKO triple knockout.

[‡]To whom correspondence should be addressed at: National Institutes of Health, Building 49, Room 6A35, 49 Convent Drive, Bethesda, MD 20892-4510. E-mail: tambal@box-t. nih.gov.

^{© 2005} by The National Academy of Sciences of the USA

Cytoplasmic Ca²⁺ Measurements. COS-7 cells were cultured on glass coverslips (3 \times 10⁵ cells per 35-mm dish) and transfected with the various constructs (2 μ g per dish) by using Lipofectamine 2000 for 24 h as described in ref. 16. For calcium measurements, cells were loaded with Fura-2/AM (2 µM, 45 min; Molecular Probes). DT40 cells [wild-type or triple knockout (TKO)] were transfected with plasmid DNA (15 μ g) by using electroporation [10⁷ cells per 0.5 ml of OPTI-MEM (Invitrogen) 290 V, 28 ms] with a BTX (San Diego) T 820 electroporator. One day after transfection, cells were transferred to glass coverslips precoated with Cell-Tak (Collaborative BioMedical Products, Bedford, MA) and loaded with Fura-2/AM (2 μ M, 30 min). Single-cell calcium measurements were performed at room temperature in a modified Krebs-Ringer buffer containing 120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 0.7 mM MgSO₄, 10 mM glucose, and 10 mM Na-Hepes at pH 7.4. An Olympus (Melville, NY) IX70 inverted microscope equipped with a Lambda DG-4 (Sutter Instruments, Novato, CA) illuminator and an ORCA-ER (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) or MicroMAX:1024BFT (Princeton Instruments, Trenton, NJ) digital camera and the appropriate filter sets were used for Ca²⁺ analysis. Data acquisition and processing were performed by using METAFLUOR software (Universal Imaging, Downington, PA). Calcium measurement in populations of DT40 cells (10⁶ cells per ml) was performed in a fluorescence spectrophotometer (DeltaScan, PTI, Lawrenceville, NJ) after loading with Fura-2/AM (2 μ M, 45 min). The localization of the ER-tethered constructs was determined by confocal microscopy as detailed elsewhere (16).

Mn²⁺ Quench Experiments. COS-7 cells cultured on glass coverslips were loaded with Fura-2/AM (5 μ M, 120 min) at room temperature. Cells were permeabilized with 15 μ g/ml digitonin for 10 min in an intracellular medium [10 mM NaCl, 120 mM KCl, 2.2 mM MgCl₂, 1 mM KHPO₄, 20 mM Hepes (pH 7.2), and Ca²⁺ depleted by Chelex 100 (Bio-Rad) treatment] supplemented with 2 mM ATP, 10 mM phosphocreatine, and 20 units/ml creatine phosphokinase. Single-cell fluorescence measurements were performed at room temperature in the above microscope system by using 360 nm as the excitation wavelength.

Results and Discussion

Cytoplasmic Expression of IP₃ Binding Domains Alters Agonist-Induced Ca^{2+} Signaling. The N-terminal IP₃ binding region (224–605) of the type I IP₃R or the pleckstrin homology (PH) domain of the phospholipase C (PLC)-like p130 protein (18) was fused to the mRFP for expression in COS-7 cells. The latter was used as a control, because it also binds IP₃, although with somewhat lower affinity, but bears no structural homology to the IP₃R LBD (16). Fusion of these domains to fluorescent proteins allowed monitoring of both the expression levels and the localization of the proteins simultaneously with cytoplasmic Ca²⁺ measurements with Fura-2. As shown in Fig. 1A, consistent with earlier studies (18, 19), cytoplasmic expression of either the ligand-binding segment of IP₃R (224-605) (IP₃R LBD) or p130PH caused a dose-dependent delay in the onset and the peak of the cytoplasmic Ca^{2+} increase in response to stimulation of the endogenous P2y purinergic receptors by ATP. When the Ca²⁺ peak delays were plotted against the fluorescence intensities for each individual cell expressing one of the two IP₃-binding proteins, the different IP₃ affinities of the two domains were clearly reflected in their efficacies in delaying the Ca^{2+} responses (Fig. 1*B*). The delayed and less "synchronized" Ca²⁺ increases appeared as a blunted Ca²⁺ response in the averaged Ca²⁺ traces, which also show that mutant forms of either domain (R134L of p130PH or K508A of IP₃R LBD) that did not bind IP₃ had no significant effect on the Ca^{2+} responses (Fig. 1 B and C). These data were all consistent with the ability of these domains to bind IP₃ within



Fig. 1. Inhibition of agonist-induced Ca²⁺ signaling by overexpressed IP₃binding domains. (A) COS-7 cells were transfected with IP₃R LBD (224-605) fused to the C terminus of mRFP. After 24 h, cells were loaded with Fura-2 and stimulated by 50 μ M ATP at time 0. The cytoplasmic [Ca²⁺] responses of the individual cells from a visual field containing cells expressing various levels of IP₃R LBD are shown (Upper) as assessed by mRFP fluorescence (shown Lower Left). The kinetics of the [Ca²⁺] responses of the individual cells (color-coded red, blue, green, and pink to reflect increasing expression levels) are shown Lower Right. cyto, Cytoplasmic. (B) The peak of the cytoplasmic [Ca²⁺] response is delayed as a function of the expression level of the indicated IP₃ binding domain. Cells without a measurable [Ca²⁺] response within 4 min are plotted at the top (no resp). Blue dots indicate cells expressing mutant constructs incapable of IP₃ binding. Note the difference between the potencies of the IP_3R LBD and p130PH proteins (slopes of the fitted data, 18.3×10^{-3} and 7.7 \times 10⁻³; r^2 = 0.467 and r^2 = 0.261, respectively; P < 0.001 in both cases) reflecting the difference in their IP₃ affinities (16). (C) Summary of Ca^{2+} responses after averaging the individual responses shown in B and using the same color-coding. The Ca²⁺ response of untransfected cells is shown by the black traces.

its physiological concentration range and buffer IP₃ increases with the expected consequences on Ca^{2+} signaling.

ER-Tethered IP₃R LBD Impairs Ca²⁺ Signaling by Depleting the ER Ca²⁺ Stores Independent of IP₃ Binding. Next, the same domains were tethered to the outer surface of the ER by the addition of a short hydrophobic C-terminal ER-targeting sequence from the yeast UBC6 protein (20) (Fig. 24). Expression of the p130PH-ER construct exerted effects on Ca²⁺ signaling that were very to similar to those of its cytosolic version and required the construct to bind IP₃ (Fig. 2B *Right*). In contrast, although the IP₃R LBD-ER construct also exerted a strong inhibition on the



Fig. 2. Expression of ER-tethered IP₃ binding domains and their effects on Ca^{2+} signaling. (*A*) Colocalization of mRFP p130PH tethered to the surface of the ER with a luminally ER-targeted GFP. (*B*) Averaged Ca^{2+} responses of cells expressing similar levels of the ER-tethered domains (red traces) or their mutant forms (blue traces) and the untransfected cells (black traces). Note that in the case of the IP₃R LBD-ER (*Left*), the [Ca²⁺] response is greatly affected even when the mutant form is expressed, whereas, in the case of the p130PH-ER protein (*Right*), only the wild-type with IP₃ binding exerts an effect. (*C*) Although there is no delay in the peak [Ca²⁺] response with the mutant IP₃R LBD-ER, the amplitude of the response is reduced in the case of both the wild-type (red dots) and the mutant (blue dots) IP₃R LBD-ER protein as a function of expression level, whereas the mutant p130PH-ER (green triangles) is without effect.

ATP-induced Ca²⁺ increase, its mutant form was as effective as the wild-type to inhibit the Ca²⁺ signal, except that, in the case of the mutant, the smaller Ca2+ response was not associated with a delay (Fig. 2B Left). The amount of Ca^{2+} released by the agonist was progressively decreased by increasing the expression of either the wild-type or the K508A mutant of the IP₃R LBD ER but not of the mutant p130PH-ER construct (Fig. 2C) (note that the fluorescence intensity range is narrower with the ER-tethered constructs). This finding raised the possibility that the ER Ca²⁺ pools are depleted in the cells expressing these constructs. To determine the extent of store depletion, the ability of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibitor thapsigargin (Tg) to empty the IP₃-sensitive Ca²⁺ stores (21) was examined. As shown in Fig. 3A, the cytoplasmic Ca^{2+} increase evoked by Tg was greatly diminished in cells expressing the ER-targeted IP₃R LBD. Importantly, again, the mutant form of IP₃R LBD ER, unable to bind IP₃, was as effective as the wild-type form in emptying the ER Ca^{2+} stores (Fig. 3A Left). Neither the wild-type nor the mutant IP₃R LBD affected the Tg-induced Ca²⁺ response when expressed in the cytosol (Fig. 3*A Center*), and the ER-targeted p130PH was also without effect (Fig. 3*A Right*). Similar results were obtained when the Ca²⁺ stores were emptied in Ca²⁺-free medium either with the Ca²⁺ ionophore, ionomycin, or Tg (Fig. 3*B Center* and *Right*, respectively). The Ca²⁺ response to the IP₃-sensitizing agent, thimerosal, was also largely diminished by the ER-targeted IP₃R LBD (Fig. 3*B Left*).

If the Ca^{2+} stores are depleted, cells should display an increased Ca²⁺ influx due to the activation of the store-operated Ca^{2+} entry pathway (22). Therefore, the response of cells to the extracellular addition of Ca2+ after a short Ca2+-free incubation was examined. As shown in Fig. 3C, cells expressing the ERtethered IP₃R LBD construct, but not its cytosolic form or the p130PH-ER construct, showed enhanced Ca²⁺ increase after Ca^{2+} addition, consistent with the activated Ca^{2+} entry pathway secondary to depleted Ca^{2+} stores. This enhanced Ca^{2+} entry was similar to, although more transient than, that observed in normal cells after depleting the Ca^{2+} stores with Tg (Fig. 3B) *Right*). The effects of an activated capacitative Ca^{2+} entry pathway were also reflected in the elevated basal Ca²⁺ levels in the cells expressing the ER-tethered IP₃R LBD in the presence of Ca^{2+} (Figs. 2B Left and 3A Left) and its decrease in the absence of external Ca^{2+} (Fig. 3B Center and Right). This Ca^{2+} elevation, however, was relatively moderate compared with that observed after an acute emptying of the Ca²⁺ stores, which probably reflects the activation of compensatory mechanism(s) to protect the cells from flooding with Ca²⁺ as has been observed when Ca²⁺ stores were emptied by the expression of leaky IP₃R channels (14).

To assess the conductivity of the IP₃R more directly, we used the Mn²⁺-quench method in single permeabilized COS-7 cells (23). In this method the cells are loaded with Fura-2 under conditions that favor the loading of the probe into the organelles, and, after permeabilizing and washing out the cytosolic component of Fura-2, the addition of Mn^{2+} quenches the luminal fluorescence partially by entering through IP₃Rs (24). As shown in Fig. 3D, the addition of Mn^{2+} to permeabilized COS-7 cells caused a gradual decrease in the Fura-2 fluorescence (measured by exciting at the Ca²⁺ insensitive wavelength of 360 nm) that was similar in naive cells and in the cells expressing the p130PH-ER construct. In both cases this basal rate of quenching was rapidly increased upon addition of 3 μ M IP₃ to the cells. In contrast, the rate of initial Mn²⁺ quench was significantly larger, and there was no effect of IP3 in the cells expressing the IP3R LBD K508A ER (or the wild-type form; data not shown). These data were also consistent with the open state of the IP₃R in the COS-7 cells expressing the ER-targeted IP₃R LBD.

ER-Tethered IP₃R LBD Depletes the ER Ca²⁺ Stores via Endogenous IP₃ Receptors. To determine further whether the tethered construct exerted its effect via opening of the endogenous IP₃Rs, we performed experiments on DT40 cells in which all three forms of the IP₃R had been eliminated by homologous recombination (25). As shown in Fig. 4A, wild-type cells showed a cytoplasmic Ca²⁺ response to B cell receptor stimulation that acts via phospholipase C γ (PLC γ) and IP₃, whereas the TKO cells failed to respond to the same stimulation with a Ca^{2+} increase. Both wild-type and TKO cells showed a large Ca²⁺ increase to Tg but only a very small increase after the addition of caffeine (5-10 mM), the latter response being somewhat bigger in TKO cells (Fig. 4A). The Ca^{2+} response of transfected cells was studied in individual cells. Transfection of wild-type DT40 cells with the IP₃R LBD-ER construct has proven to be extremely toxic, with most cells undergoing apoptosis and only a very small fraction of



Fig. 3. Effect of ER-tethered IP₃ binding domains on the Ca²⁺ content of the intracellular Ca²⁺ pools. (*A*) Fura-2-loaded COS-7 cells transfected with the cytosolic (-cyto) or ER-tethered (-ER) forms of the indicated IP₃ binding domains (red) or their IP₃ binding deficient mutant forms (blue) were stimulated with 200 nM Tg and subsequently with 50 μ M ATP. The average Ca²⁺ responses of cells expressing these constructs compared with those of untransfected cells (black) in the same fields are shown. (*Left*) Note that only the ER-tethered IP₃R LBD ER affects the amount of Ca²⁺ released by Tg and that IP₃ binding is not required for this effect. (*B*) Effects of expression of the ER-tethered IP₃R LBD on the response of cells to the IP₃-sensitizing agent, thimerosal (*Left*), or to a small concentration (100 nM) of ionomycin (*Center*) or Tg (*Right*) in the absence of external Ca²⁺. The lack of response in cells expressing wild-type or mutant IP₃R LBD ER indicates that the Ca²⁺ pools are empty. Readdition of Ca²⁺ induces a large cytoplasmic [Ca²⁺] increase reflecting the activation of the capacitative Ca²⁺ entry pathways. (*C*) Cells expressing the indicated constructs were incubated in Ca²⁺-free medium (no added Ca²⁺ with 100 μ M EGTA) for 8 min before readdition of 2.2 mM Ca²⁺ to IP₃R LBD (K508A) (blue) was greatly increased, but cells expressing the cytosolic form of the IP₃R LBD (K508A) (red) or the ER-targeted p130PH (green) did not show increased Ca²⁺ entry. (*D*) Addition of Mn²⁺ to permeabilized cells quenched organelles associated Fura-2 fluorescence at a significantly higher rate in cells expressing the ER-targeted IP₃R LBD than in control cells or in cells expressing the p130PH-ER construct. The former cells, unlike the latter, showed no further increase in response to IP₃, indicating the open state of the IP₃Rs.

transfected cells showing sufficient Fura-2 loading.[§] As observed in COS-7 cells, the Tg-induced Ca²⁺-response was greatly impaired in these transfected cells (Fig. 4*B Left*). In contrast, many more of the TKO cells showed reasonable expression of the same construct, and the Tg-induced Ca²⁺ release in the transfected cells did not differ from that of their nontransfected counterparts (Fig. 4*B Right*). These data indicated that the IP₃R LBD-ER construct exerted its effect in the presence of endogenous IP₃Rs.

The All-Helical Fragment of the IP_3R LBD is Sufficient to Open the IP_3R Channels. The recent solving of the crystal structure of the type I IP_3R LBD has revealed that it consists of an N-terminal

 β -domain forming a β -trefoil fold, hinged to an all-helical C-terminal domain containing three armadillo-repeat-like structures (26) (Fig. 5A). To determine whether these subdomains could still exert an effect, they were expressed separately and targeted to the outer surface of the ER. As shown in Fig. 5B, the ER-targeted N-terminal fragment containing only the β -sheets (224-423) had no effect on the Tg or ATP responses, whereas the effect of the C-terminal all-helical domain (427-605) was indistinguishable from that of the full-length LBD. Neither of these fragments had any effect when expressed in the cytosol, consistent with their inability to bind IP₃ (data not shown). Next, the IP₃R LBD was extended to include the N-terminal inhibitory sequences [IP₃R (1-605)]. The IP₃ binding affinity of this protein was significantly decreased (Fig. 5C), as noted by earlier reports (27). To determine the ability of this extended construct to impair agonist-induced Ca²⁺ signaling, its K508A mutant form

[§]Our explanation for the toxicity of the IP₃R LBD-ER construct in the wild-type cells is that its Ca²⁺-releasing ability in the wild-type cells initiates an apoptotic program, whereas this effect is not manifested in the TKO cells because of the lack of IP₃Rs. However, the validity of this assumption was not pursued further in the present work.



Fig. 4. Effect of ER-tethered IP₃ binding domains on the Ca²⁺ content of the intracellular Ca²⁺ pools in DT40 cells. Cytoplasmic Ca²⁺ responses of wild-type and TKO DT40 cells (lacking all three IP₃R isoforms) were studied in suspension (*A*) or as individual cells attached to glass coverslips (*B*). (*A*) Wild-type, but not TKO, cells showed a [Ca²⁺] increase in response to B cell receptor stimulation (lgM), and both cells showed a large [Ca²⁺] response to Tg, but only a very moderate [Ca²⁺] rise after caffeine (10 mM) treatment. The scale was chosen to accommodate the small caffeine responses, and, therefore, the Tg responses that reached a plateau at around a ratio of 6.5 in the cell suspension have been truncated. Wild-type and TKO DT40 cells were transfected with the wild-type (red) or mutant (blue) form of the IP₃R LBD ER by electroporation, and the individual cytoplasmic Ca²⁺ responses of transfected or untransfected (black) cells were measured after Tg treatment. (*B Right*) Note the lack of effect of the constructs in the TKO cells.

was used to prevent its IP₃-induced conformational change. As show in Fig. 5*C*, the potency of this N-terminally extended construct to empty the intracellular stores was significantly smaller than that of the shorter original construct when expressed at a similar level. Next we examined whether increasing the distance between the ER surface and the IP₃R LBD would affect the ability of the domain to exert its effect on the Ca²⁺ pools. As shown in Fig. 5*D*, including a rigid helical linker with nine turns almost completely abolished the Ca²⁺-releasing effect of the construct despite its prominent ER localization, suggesting that the domain has to be within 50–60 Å (and probably even closer) to the ER surface to be active.



Fia. 5. The all-helical domain, but not the β -domain, of the IP₃R LBD is sufficient to empty the intracellular Ca2+ stores when tethered close to the surface of the ER. (A) The structure of the IP₃R LBD showing the β -domain (brown) and the all-helical armadillo-repeat-like domain (green) and schematic representation of the constructs used in these experiments. (B) Averaged Ca²⁺ responses of cells expressing the ER-tethered forms of the two isolated domains separately. Note the inhibitory effect of the all-helical domain, but not the β -domain, on Ca²⁺ release by ATP (Upper) or Tg (Lower). Also, the lack of delay in the peak [Ca²⁺] responses to ATP was consistent with the lack of IP3 binding of the separated domains. (C) Effects of N-terminal extension of the IP₃R LBD (1-605) on the [³H]IP₃ binding affinity of the recombinant proteins (Left), and effects of the expression of the K508A mutant of the N-terminally extended construct on the cytoplasmic [Ca2+] responses of COS-7 cells stimulated with ATP (Right). For comparison, the effects of the two constructs on the Ca2+ responses (±SEM) were calculated from cells that fell in the same range of expression (between 2,000 and 8,000 fluorescence arbitrary units) with an average of 4,222 (n = 116) and 4,516 (n =80) for the 224-605 and 1-605 constructs, respectively. Note that the Nterminally extended LBD ER exerted a significantly smaller effect. (D) Extension of the distance of the IP₃R LBD from the ER surface by a rigid helical linker 9x(EAAAR) rendered the domain inactive in depleting the Ca²⁺ pools despite its ER localization (Left) and retained ability to interfere with the ATP-induced Ca²⁺ signal through IP₃ binding.

Together, these experiments demonstrated the ability of the all-helical region of the IP₃R LBD to increase the activity of the IP₃Rs when brought into its proximity by tethering to the surface of the ER. Without this tethering, even at the highest level of expression, no such effect could be observed, and even increasing its distance from the ER surface rendered the domain inactive. This effect did not require IP₃ binding and was greatly reduced by the

addition of the N-terminal 1-223 sequence to the LBD. The small N-terminal fragment (1-223) has been shown to inhibit IP₃ binding (27), probably because of an interaction with the LBD and stabilization of its unliganded conformation. Our data also show that in this latter conformation the LBD is less capable of inducing release of Ca²⁺ from the ER. Together with reports demonstrating the proximity and physical interaction of the LBD with the IP₃R channel domain (15), the present observations may have implications for the possible gating mechanism of the IP_3R by its LBD (28). The truncated receptor containing only the transmembrane segments, i.e., the channel domain, was reported to be constitutively active, and deletion studies led to the conclusion that the channel is kept closed by the regulatory region that lies between the channel and the LBD (14). Current views suggest that IP₃ binding initiates a conformational change within the LBD that relieves the inhibitory effect of a yet unidentified segment of the regulatory region on the C-terminal tail of the protein that is considered to be the "gatekeeper" of the channel domain (28, 29). Our data suggest that unmasking of the all-helical segment of the LBD by IP₃ (probably with the concerted action of Ca^{2+}) could be part of the activation process.

We cannot rule out the possibility that expression of the LBD exerts its effect without direct interaction with the IP₃R itself, through interference with other proteins that regulate the endogenous IP₃Rs. Binding of most of the known IP₃R interacting partners have been localized to regions other than the LBD, but two proteins have been shown to interact with the LBD. One of them, IRBIT (IP₃R binding protein released by IP₃), binds to the LBD, but its binding is abolished by the K508A mutation (30). In our experiments, the K508A mutant was as potent as the wild-type in emptying the Ca²⁺ stores, making it unlikely that IRBIT sequestration would be responsible for the observed effects. The other protein(s) [calcium binding protein (CaBP)/caldendrin] belong to the family of small Ca²⁺-binding proteins and have been shown to confer Ca²⁺ regulation to the receptor even without increases in IP₃ (31). Because these CaBPs are small soluble proteins, their binding to the expressed LBD would be expected to be similar whether the LBD is expressed in the cytosol or targeted to various distances from the ER surface. The strong steric requirements for the effect of LBD on channel opening makes it quite unlikely that the current observations would be the consequence of CaBP sequestration from the endogenous IP₃Rs and points to an interaction that needs

1. Berridge, M. J. & Irvine, R. F. (1984) Nature 312, 315-321.

- 2. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. (2002) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11–21.
- 3. Mikoshiba, K. (1993) Trends Pharmacol. Sci. 14, 86-89.
- Galvan, D. L., Borrego-Diaz, E., Perez, P. J. & Mignery, G. A. (1999) J. Biol. Chem. 274, 29483–29492.
- Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M. & Mikoshiba, K. (1991) J. Biol. Chem. 266, 1109–1116.
- 6. Patel, S., Joseph, S. K. & Thomas, A. P. (1999) Cell Calcium 25, 247-264.
- 7. Mignery, G. A. & Sudhof, T. C. (1990) EMBO J. 9, 3893-3898.
- 8. Taylor, C. W. & Laude, A. J. (2002) Cell Calcium 32, 321-334.
- 9. Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B. & Thomas, A. P. (1995) Cell 82, 415–424.
- Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G. & Tsien, R. Y. (1998) Nature 392, 936–941.
- 11. Lewis, R. S. (2003) Biochem. Soc. Trans. 31, Pt. 5, 925-929.
- Tanimura, A., Nezu, A., Morita, T., Turner, R. J. & Tojyo, Y. (2004) J. Biol. Chem. 279, 38095–38098.
- Ramos-Franco, J., Galvan, D., Mignery, G. A. & Fill, M. (1999) J. Gen. Physiol. 114, 243–250.
- Nakayama, T., Hattori, M., Uchida, K., Nakamura, T., Tateishi, Y., Bannai, H., Iwai, M., Michikawa, T., Inoue, T. & Mikoshiba, K. (2004) *Biochem. J.* 377, 299–307.
- 15. Boehning, D. & Joseph, S. K. (2000) EMBO J. 19, 5450-5459.
- Varnai, P., Lin, X., Lee, S. B., Tuymetova, G., Bondeva, T., Spat, A., Rhee, S. G., Hajnoczky, G. & Balla, T. (2002) J. Biol. Chem. 277, 27412–27422.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7877–7882.

to be very close to the surface of the ER, such as the channel domain itself.

The minimally active domain identified in the present study is the all-helical part of the LBD, which largely overlaps with the sequence identified in the Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) database (www.ncbi.nlm.nih.gov/ Structure/lexington/lexington.cgi) as the RIH domain (pfam01365) (RyR and IP₃R homology). Interestingly, two such domains are present in each subunit of the IP₃Rs and the RyRs, but only the IP₃Rs contain a suitable trefoil domain adjacent to their first RIH domain that supports IP₃ binding. The presence of two RIH domains in both the RyRs and IP₃Rs suggests that the observations presented in this study might be relevant to both of these closely related channel families, and our preliminary studies indicate that the RyR1 receptor RIH domain is also capable of emptying the Ca^{2+} stores when targeted to the ER. Although TKO DT40 cells have been reported to possess RyRs (32), their small caffeine response in this study indicates that they are not abundant in these cells. Therefore, the present studies could not conclusively answer the question of whether the IP_3R LBD could interact with RyRs. More studies will be needed to clarify these questions and to identify the exact mechanism by which the LBD may regulate the IP₃R channel domain. Nevertheless, the current experiments provide an experimental approach for further studies to better understand the gating mechanisms of this important Ca²⁺ channel family.

We thank Dr. Tomohiro Kurosaki (Department of Molecular Genetics, Institute for Liver Research, Kansai Medical University, Moriguchi, Japan) for the DT40 cells, Dr. Roger Y. Tsien (Department of Pharmacology and Department of Chemistry and Biochemistry, University of California at San Diego, La Jolla) for the mRFP, Dr. Suresh Joseph (Department of Pathology, Thomas Jefferson University, Philadelphia) for the anti-IP₃R antibody and the myc-tagged IP₃R construct, Dr. Gyorgy Hajnoczky for advice concerning the Mn²⁺-quench experiments, and Judit Bakacsiné-Rácz for invaluable technical assistance. Part of the microscopy imaging (Zeiss 510) was performed at the Microscopy and Imaging Core (National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health) with the kind assistance of Drs. Vincent Schram and James T. Russell. P.V. and L.H. were supported by Hungarian Scientific Research Fund Grants OTKA T-034606 and OTKA T-046445, Medical Research Council Grant ETT 528/2003, and Hungarian National Committee for Technological Development Grants 02489/2000 and OTKA M036995.

- Takeuchi, H., Oike, M., Paterson, H. F., Allen, V. V., Kanematsu, T., Ito, Y., Erneux, C., Katan, M. & Hirata, M. (2000) *Biochem. J.* 349, 357–368.
- Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Hishida, A., Furuichi, T. & Mikoshiba, K. (2001) J. Biol. Chem. 277, 8106–8113.
- Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacino, J. S. & Weissman, A. M. (1997) J. Biol. Chem. 272, 1970–1975.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. & Dawson, A. P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2466–2470.
- 22. Putney, J. W., Jr. (1991) Adv. Pharmacol. 22, 251-269.
- 23. Hajnoczky, G. & Thomas, A. P. (1994) J. Biol. Chem. 269, 10280-10287.
- 24. Hajnoczky, G. & Thomas, A. P. (1994) Nature 370, 474-477.
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. & Kurosaki, T. (1997) EMBO J. 16, 3078–3088.
- Bosanac, I., Alattia, J. R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., Tong, K. I., Yoshikawa, F., Furiuchi, T., Iwai, M., *et al.* (2002) *Nature* 420, 696–700.
- Yoshikawa, F., Iwasaki, H., Michikawa, T., Furiuchi, T. & Mikoshiba, K. (1999) J. Biol. Chem. 274, 328–334.
- 28. Taylor, C. W., daFonseca, P. C. & Morris, E. P. (2004) *Trends Biochem. Sci.* 29, 210–219.
- Uchida, K., Miyauchi, H., Furiuchi, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K. (2003) J. Biol. Chem. 278, 16551–16560.
- Ando, H., Mizutani, A., Matsu-ura, T. & Mikoshiba, K. (2003) J. Biol. Chem. 278, 10602–10612.
- Yang, J., McBride, S., Mak, D. O., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F. & Foskett, J. K. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7711–7716.
- Kiselyov, K., Shin, D. M., Shcheynikov, N., Kurosaki, T. & Muallem, S. (2001) Biochem. J. 360, 17–22.

Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells

Peter Varnai,^{1,2} Baskaran Thyagarajan,³ Tibor Rohacs,³ and Tamas Balla¹

¹Endocrinology and Reproduction Research Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892 ²Department of Physiology, Semmelweis University, School of Medicine, H-1085 Budapest, Hungary

³Department of Pharmacology and Physiology, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103

R apamycin (rapa)-induced heterodimerization of the FRB domain of the mammalian target of rapa and FKBP12 was used to translocate a phosphoinositide 5-phosphatase (5-ptase) enzyme to the plasma membrane (PM) to evoke rapid changes in phosphatidylinositol 4,5bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) levels. Rapa-induced PM recruitment of a truncated type IV 5-ptase containing only the 5-ptase domain fused to FKBP12 rapidly decreased PM PtdIns(4,5)P₂ as monitored by the PLC δ 1PH-GFP fusion construct. This decrease was paralleled by rapid termination of the ATP-induced Ca²⁺ signal and the prompt

Introduction

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns $(4,5)P_2$) is the major phosphoinositide species in mammalian cells and has been associated with numerous molecular events critical for cellular signaling. PtdIns $(4,5)P_2$ is hydrolyzed by PLC enzymes to generate diacylglycerol and inositol 1,4,5-triphosphate, two pivotal second messengers (Berridge, 1993), and it is also converted by class I phosphoinositol 3-kinases to $PtdIns(3,4,5)P_3$ (Toker and Cantley, 1997). PtdIns $(4,5)P_2$ directly interacts with several ion channels, transporters (Fuster et al., 2004; Suh and Hille, 2005), and actin binding proteins (Hilpela et al., 2004) and regulates enzymes such as PLC and PLD (Liscovitch et al., 1994; Lomasney et al., 1996). Several molecules within the receptor internalization machinery also contain inositide binding domains, but the exact lipid species that regulates them in the cell has not been firmly established (Itoh et al., 2001). It is a major challenge to understand how a single type of molecule is

transferrin uptake and inhibition of epidermal growth factor internalization. None of these changes were observed upon rapa-induced translocation of an mRFP-FKBP12 fusion protein that was used as a control. These data demonstrate that rapid inducible depletion of PM PtdIns(4,5) P_2 is a powerful tool to study the multiple regulatory roles of this phospholipid and to study differential sensitivities of various processes to PtdIns(4,5) P_2 depletion.

inactivation of menthol-activated transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels. Depletion of PM

PtdIns $(4,5)P_2$ was associated with a complete blockade of

able to regulate so many processes simultaneously and perhaps independently within the plasma membrane (PM).

Part of the problem in studying the multiple functions of PtdIns(4,5) P_2 is that it is difficult to manipulate phosphoinositide levels within the cells. For example, most data on channel regulation rely upon the addition of phospholipids to excised patches and the use of inhibitors such as high concentrations of wortmannin to inhibit PtdIns(4,5) P_2 formation (Suh and Hille, 2002; Rohacs et al., 2005). Several attempts have been made to alter the level of PtdIns(4,5) P_2 in intact cells by expressing either phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase or 5-phosphatase (5-ptase) enzymes (Ono et al., 2004; Chen et al., 2006). However, prolonged changes in PtdIns(4,5) P_2 levels initiate several trafficking and signaling events that will alter the disposition of the cells by the time the effects are analyzed (Brown et al., 2001). This makes it difficult to draw firm conclusions regarding direct effect of the lipid on any single process.

To overcome this problem, we developed a strategy to promptly regulate membrane PtdIns(4,5) P_2 levels by a druginducible membrane targeting of a type IV 5-ptase enzyme (Kisseleva et al., 2000; Kong et al., 2000) based on the heterodimerization of the FRB (fragment of mammalian target of rapamycin [mTOR] that binds FKBP12) and FKBP12 (FK506 Downloaded from www.jcb.org on November 7, 2006

Correspondence to Tamas Balla: ballat@mail.nih.gov

Abbreviations used in this paper: [Ca²⁺]; cytoplasmic Ca²⁺; HEK, human embryonic kidney; mRFP, monomeric red fluorescent protein; mTOR, mammalian target of rapamycin; PM, plasma membrane; PtdIns[4,5]P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; 5-ptase, phosphoinositide 5-phosphatase; rapa, rapamycin; Tf, transferrin; Tg, thapsigargin; TRPM8, transient receptor potential melastatin 8.



Figure 1. **Rapa-induced translocation of the type IV 5-ptase domain to the PM.** (A) Outline of the constructs used in the present study. The asterisk shows the C641A mutation that eliminates membrane localization of the 5-ptase. (B) Heterodimerization of the PM-targeted FRB fragment of mTOR with the cytosolic 5-ptase fused to FKBP12 upon rapa addition causes PM recruitment of the enzyme and rapid dephosphorylation of Ptdlns(4,5)P₂.

binding protein 12; Muthuswamy et al., 1999). In this approach, the phosphatase is fused to the FKBP12 protein, and upon addition of rapamycin (rapa; or an analogue that does not interact with endogenous mTOR protein) the enzyme rapidly translocates to the membrane where its binding partner, the FRB domain, is targeted. This method has been successfully used to manipulate small GTP binding proteins at the PM (Inoue et al., 2005) and to study the effects of β -arrestin membrane recruitment (Terrillon and Bouvier, 2004). In the present study we show the use of this approach to manipulations affect selected processes that are regulated by this phosphoinositide species.

Results and discussion

Targeting of type IV 5-ptase alters PM PtdIns(4,5)P₂ levels

Fig. 1 shows the concept and the constructs used for rapainduced targeting of the type IV 5-ptase to the PM. For membrane targeting of the FRB domain of mTOR, the palmitoylation sequence of the human GAP43 protein was used (Tanimura et al., 2004). To follow their localization, the FRB protein was also tagged with either CFP or monomeric red fluorescent protein (mRFP). The 5-ptase (either full-length or only the 5-ptase domain) was mutated (C641A) to eliminate its C-terminal lipid modification and membrane targeting and was fused to FKBP12



Figure 2. Changes in PtdIns(4,5)P2 levels after rapa-induced membrane targeting of the 5-ptase. (A) COS-7 cells were transfected with the PLC δ 1PH-GFP plasmid to monitor $PtdIns(4,5)P_2$ in the PM along with the membranetargeted FRB-CFP (CFP channel is not shown) and the mRFP-FKBP-5-ptase domain constructs. Addition of 100 nM rapa induces translocation of the 5-ptase to the membrane, causing a complete loss of PLC&1PH-GFP localization. Even partial localization of the enzyme (at 30 s) is sufficient to eliminate PtdIns $(4,5)P_2$. (B) FRET analysis of the PLC δ 1PH domain translocation in cell suspensions. COS-7 cells were transfected with the CFP- and YFP-tagged forms of the PLC&1PH domains together with the membranetargeted FRB and the FKBP-5-ptase both tagged with mRFP. Cells were trypsinized and analyzed in suspension in a spectrofluorometer as described in Materials and methods. Addition of rapa at the indicated concentrations induces PtdIns(4,5)P2 depletion resulting in a decreased membrane localization of the PH domain reflected in the decreased FRET signal. 10 μ M ionomycin (iono) was used to completely eliminate PtdIns(4,5)P2 (Várnai and Balla, 1998). (C) Similar experiment as in B except that the FKBP construct did not contain the phosphatase (FKBP only; black trace) or contained the full-length 5-ptase (5-ptase-FL; red trace). Representative data are shown from two identical observations.

and also tagged with mRFP (Fig. 1). A mutant form of FRB (T2098L of mTOR) that can be heterodimerized with FKBP with a rapa analogue (AP21967; rapalogue) that does not bind to endogenous mTOR has been recommended. However, because of its easier availability and faster action, we mostly used rapa and the wild-type FRB protein in the present studies. Nevertheless, the mutant FRB and the rapalogue have also been tested and their use is recommended for applications where rapa itself could affect the process being investigated.

To monitor the effects of the 5-ptase on PtdIns(4,5) P_2 levels in the PM, these constructs were transfected together with the PLC δ 1PH-GFP construct in COS-7 cells. Expression of either 5-ptase constructs in the cytosol at a broad range of expression levels caused no apparent change in the localization of the PLC δ 1PH-GFP, probably because the cytosolic phosphatase is inefficient to hydrolyze the lipid in the membrane and because cells can make adjustments to maintain their PtdIns(4,5) P_2 levels.

However, a small number of cells expressing high levels of the truncated 5-ptase domain showed no PLCô1PH-GFP localization, indicating that high concentrations of the truncated enzyme could decrease lipid levels even without membrane targeting. 100 nM rapa caused rapid translocation of the fusion protein containing the 5-ptase domain to the PM causing a prompt and complete loss of PLCo1PH-GFP localization in most cells (Fig. 2 A). Using the full-length phosphatase, however, caused only incomplete translocation of the PLCo1PH-GFP reporter to the cytosol in some of the cells, and many cells showed no detectable change in PLCo1PH-GFP localization in spite of efficient enzyme recruitment to the membrane (unpublished data). This important finding is consistent with the notion that a full-length enzyme contains regulatory regions that keep the enzyme activity under control. No changes were observed in PLCo1PH-GFP distribution upon rapa-induced translocation of the mRFP-FKBP fusion protein that did not contain the 5-ptase. FRET measurements between the CFP- and YFPtagged PLCô1PH domain (van Der Wal et al., 2001) used either in single cells (not shown) or in a population of COS-7 cells (Fig. 2 B) have clearly demonstrated the lipid changes evoked by this approach.

Decreasing PM PtdIns(4,5)P₂ levels rapidly terminates Ca²⁺ influx during ATP stimulation

Next, we examined the effects of $PtdIns(4,5)P_2$ depletion on Ca^{2+} signaling evoked via the endogenous P_{2Y} receptors in COS-7 cells. Cells were transfected with the PM-targeted FRB-CFP (or -mRFP) together with either the full-length or truncated 5-ptase mRFP-FKBP fusion construct for 1 d. The expression as well as the movements of the 5-ptase were monitored in the red channel simultaneously with single-cell cytoplasmic Ca²⁺ $([Ca^{2+}]_i)$ measurements with fura-2. Addition of 50 μ M ATP evoked a Ca²⁺ signal in many cells expressing the 5-ptase in the cytosol, but several cells expressing a high level of the phosphatase showed impaired response to ATP. Fig. 3 shows averaged Ca²⁺ recordings from single cells where the truncated 5-ptase domain was expressed and the cells showed a response to ATP. Here, administration of rapa promptly terminated the plateau phase of $[Ca^{2+}]_i$ increase with kinetics similar to those of the PtdIns $(4,5)P_2$ decrease. Notably, these cells failed to respond to a subsequent stimulation with another Ca²⁺-mobilizing agonist, lysophosphatidic acid.

Translocation of the full-length 5-ptase with 100 nM rapa also caused a rapid inhibition of the ATP-induced Ca²⁺ signal. However, these cells still showed a transient [Ca²⁺]_i response to lysophosphatidic acid, indicating that maintenance of the Ca²⁺ signal is more sensitive to small depletion of the PtdIns(4,5)P₂ levels than the initial response of Ca²⁺ mobilization (Fig. 3 C). Because activation of P_{2Y} receptors leads to InsP₃ production and Ca²⁺ release form ER stores, hence activating capacitative Ca²⁺ influx, we wanted to determine whether capacitative Ca²⁺ influx itself requires PtdIns(4,5)P₂ in the membrane (Broad et al., 2001). To do this, the effect of lipid depletion on thapsigargin (Tg)-induced Ca²⁺ response was examined. Tg depletes Ca²⁺ stores by inhibition of the sarcoplasmic and ER Ca²⁺



Figure 3. [Ca²⁺]; changes in single COS-7 cells after stimulation of the endogenous P2Y receptors with ATP or inhibition of the sarcoplasmic and ER Ca²⁺ ATPase with Tg. Cells were transfected with the membranetargeted FRB-CFP plasmid together with the mRFP-FKBP fused to the isolated 5-ptase domain (A and D) or the full-length 5-ptase (C) or not containing the 5-ptase (B). Cells were loaded with fura-2/AM and examined at room temperature. Only cells that showed a response to ATP (50 µM) were included in the analysis in A–C. The effects of the constructs on the Ca^{2+} responses were calculated from cells that fell in the same range of FKBP construct expression (red traces) with a mean fluorescence of (in arbitrary units \pm SEM) 1705 \pm 150 (n = 44), 1827 \pm 295 (n = 18), 1827 \pm 217 (n = 22), and 2117 \pm 276 (n = 44) for A, B, C, and D, respectively. The black traces are from untransfected cells in the same field (n = 120, 68, 120, and 38 for A, B, C, and D, respectively). Note the lack of effect of rapa on the 200 nM Tg-induced Ca²⁺ elevation (D) in contrast to the strong effect on the ATP-induced Ca^{2+} plateau (A). Error bars (<5%) have been omitted for better clarity. These data were reproduced at least in three different cell preparations.

ATPase that keeps Ca^{2+} stores filled and therefore activates Ca^{2+} influx without the need for InsP₃. Fig. 3 D shows that the sustained $[Ca^{2+}]_i$ increase after Tg treatment was not affected by the same manipulations of PtdIns(4,5)P₂ levels that eliminated the ATP-induced sustained Ca^{2+} elevations. This finding suggests that PtdIns(4,5)P₂ depletion interferes with the sustained generation of InsP₃ rather than with the capacitative Ca^{2+} influx mechanism itself. A more detailed analysis of the relationship between these mechanisms is currently under way.

Several controls were used to rule out that the observed effects are caused by rapa itself or by the transfected constructs and/or their translocation to the membrane. First, the response of cells in the same field of view not expressing the phosphatase were monitored and found to show no change in response to rapa. Second, the Ca²⁺ response of cells expressing both the targeting construct and mRFP-FKBP12 without the 5-ptase also showed no change in response to rapa addition (Fig. 3 B).

Decreasing PM Ptdlns(4,5) P_2 levels affects the activity of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels

TRPM8 is one of the Ca²⁺ conductive channels that has been shown to require PtdIns(4,5) P_2 for its activity (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005). Therefore, we chose these channels to study their PtdIns(4,5) P_2 dependence by monitoring either



Figure 4. Electrophysiological recordings in HEK293 cells and [Ca²⁺] changes in single COS-7 cells expressing TRPM8 channels. Cells were also transfected with the membrane-targeted FRB-CFP plasmid and either the mRFP-FKBP-fused isolated 5-ptase domain or mRFP-FKBP only. (A) Current recording measured in the whole-cell configuration, using the ramp protocol described in Materials and methods. The currents at +100 (top curves) and -100 mV (bottom curves) are shown. The averaged responses to rapa from 14 and 4 recordings for 5-ptase and FKBP-only expressing cells, respectively, measured at +100 mV are shown in the bottom histogram. (B) Averaged [Ca²⁺], responses from cells expressing the mRFP-FKBP-5-ptase domain (left, red) or mRFP-FKBP only (left, black) domain (means ± SEM from 79 and 76 cells, respectively). Representative single-cell [Ca²⁺] responses from cells expressing the mRFP-FKBP-5-ptase domain are shown at the right (means \pm SEM from 79 and 76 cells, respectively). Elimination of PtdIns $(4,5)P_2$ rapidly inhibits the whole cell current and reduces the Ca^{2+} signal stimulated by 500 μ M menthol

their activity in patch-clamp recordings using the whole-cell configuration or by following the [Ca²⁺]_i signal evoked via their activation by menthol. Fig. 4 A shows that human embryonic kidney 293 (HEK293) cells expressing TRPM8 channels respond to menthol stimulation with a large increase in an outwardly rectifying current. TRPM8 channel activation by menthol is also reflected in the rapid and sustained $[Ca^{2+}]_i$ elevation observed in transfected COS-7 (Fig. 4 B) or HEK293 cells (not depicted). In cells also expressing the truncated FKBP12-5-ptase construct together with the PM-targeted FRB domain, addition of 100 nM rapa caused a prompt decrease in the menthol-induced current (Fig. 4 A). A rapid drop in $[Ca^{2+}]_i$ was also observed in COS-7 cells (Fig. 4 B) and HEK293 cells (not depicted). None of these changes were observed when rapa was added to cells expressing the PM-targeted FRB and the FKBP12 construct without the phosphatase (Fig. 4, A and B). These results clearly showed that TRPM8 channels require PtdIns $(4.5)P_2$ for their activity and can report on rapid changes in the level of this lipid in intact cells. Interestingly, in spite of the apparently complete inhibition of the menthol-induced membrane conductance, $[Ca^{2+}]_i$ did not return to baseline after rapa addition. This remaining $[Ca^{2+}]_i$ elevation observed in both cell types could be explained by a stimulated store-operated Ca^{2+} entry pathway if functional TRPM8 channels in the ER release ER Ca^{2+} in response to menthol, as suggested by a recent study (Thebault et al., 2005). This and other possibilities will require further analysis, as do questions on the role of the lipid in determining the menthol sensitivity and gating behavior of these channels.

PM PtdIns(4,5)P2 is needed

for receptor internalization

We next examined how PtdIns $(4,5)P_2$ depletion affects internalization of the transferrin (Tf) and EGF receptors. It is generally believed that $PtdIns(4,5)P_2$ regulates the recruitment of numerous proteins to the PM that are required for receptor endocytosis (Wenk and De Camilli, 2004). To follow endocytosis, we used fluorescent analogues of Tf and EGF and incubated the cells with or without $PtdIns(4,5)P_2$ depletion. We also determined the uptake of the fluorescent analogues in cells in which rapa induced the translocation of an mRFP-FKBP12 construct without the phosphatase. As shown in Fig. 5, both Tf and EGF appeared in intracellular vesicular compartments in all cells regardless of their transfection with the constructs. This compartment corresponds to early and recycling endosomes in the case of Tf and to the multivesicular body/late endosomal compartment in the case of EGF (van Dam et al., 2002; Minogue et al., 2006). Elimination of PtdIns $(4,5)P_2$ with rapa addition completely prevented the uptake of either fluorescent cargo into the cells. These effects were not observed in rapa-treated cells that expressed the same constructs without the 5-ptase domain. A more quantitative assessment of this process was obtained by FACS analysis in the case of Tf. Here, the mean green fluorescent intensity of the cells (a measure of internalized Tf) in the population of cells expressing the red (5-ptase) construct showed the changes observed in the confocal pictures (Fig. 5 B). These data suggested that Tf receptors will not internalize when $PtdIns(4,5)P_2$ is not available in the PM.

Collectively, these data clearly demonstrate that changes in membrane PtdIns $(4,5)P_2$ levels by themselves without the generation of second messengers can have multiple consequences on a wide range of cellular processes. In a similar manner, modulation of phosphoinositides in defined membrane compartments can be achieved by recruiting other enzymes (phosphatases and kinases) to the PM or to other cellular membrane compartments to analyze the role of $PtdIns(4,5)P_2$ or other inositol lipids in specific cellular processes. Although this approach has considerable potential, caution and the use of appropriate controls are essential to avoid possible artifacts. Numerous cellular processes are based on FKBP12 interactions, and overexpression of an FKBP12 construct could alter their properties. Similarly, rapa is an inhibitor of mTOR that can exert several effects on its own. This problem is alleviated with the use of the rapalogue that does not bind to the endogenous protein. Lastly, the targeting of the FRB by itself can have its own effects on selected cellular functions. However, if these possibilities are kept in mind



Figure 5. Internalization of Alexa 488–Tf or Alexa 488–EGF in COS-7 cells transfected with the membrane-targeted FRB and the indicated FKBP constructs. Where indicated, fluorescent ligand was added after 3-min pretreatment with 100 nM rapa. Confocal pictures were taken at 10 min after the addition of the ligand (Alexa 488–Tf in A and B and Alexa 488–EGF in C) and after removing and washing of the unbound protein. Note that the lack of internalization of Tf in cells expressing the 5-ptase domain was evident only after rapa addition (arrows). (B) FACS analysis of COS-7 cells expressing the membrane-targeted FRB-CFP plasmid and the indicated FKBP fusion protein after 5- or 10-min uptake of Alexa 488–Tf after treatment with solvent or rapa. Cells showing mRFP expression in the red channel were selected and their mean green signal intensities were calculated. Means \pm SEM of three experiments.

this technique can permit further exploration of the complex regulatory features of phosphoinositides.

Materials and methods

Materials

AP21967 was obtained from Ariad Pharmaceuticals. Rapa and Tg were purchased from Calbiochem. Alexa 488–Tf and Alexa 488–EGF were obtained from Invitrogen. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were of highest analytical grade.

DNA constructs

The PLC&1PH-GFP construct and its color variants have been previously described (Várnai and Balla, 1998; van Der Wal et al., 2001). For PM tethering, the N-terminal localization sequence (MLCCMRRTKQVEKNDDDQKI) of the human GAP43 (residues 1–20) was fused to the N terminus of the FRB domain of human mTOR1 (residues 2019–2114 amplified from a human EST available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession no. 5495577) through a short linker. To visualize the fusion protein, the construct was tagged with CFP or mRFP (mRFP provided by R.Y. Tsien, University of California, San Diego, San Diego, CA). The T2098L mutant version of FRB was generated by exchanging the FRB portion from the plasmid obtained from the Argent heterodimerization kit (Ariad Pharmaceuticals). Three constructs were designed that contained FKBP12 (amplified from a human EST available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession no. 3504715). All of them contained mRFP fused to the N terminus of FKBP12. The human type IV 5-ptase enzyme (available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession no. NM_019892; provided by P.W. Majerus, Washington University, St. Louis, MO) was then fused to the C terminus of the FKBP12 either as the full-length protein or only its 5-ptase domain (residues 214–644). In both cases, the C641A mutation was introduced to destroy the C-terminal CAAX domain. A construct containing a stop codon at the end of the FKBP12 was also created (FKBP only).

Confocal analysis of single cells and $[Ca^{2+}]_i$ measurements

COS-7 cells were cultured on glass coverslips (3×10^5 cells/35-mm dish) and transfected with the various constructs (2 µg of total DNA/dish) using Lipofectamine 2000 for 24 h as described elsewhere (Varnai et al., 2005). For Ca²⁺ measurements, cells were loaded with 3 µM fura-2/AM (45 min, room temperature). Ca²⁺ measurements were performed at room temperature in a modified Krebs-Ringer buffer containing 120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 0.7 mM MgSO₄, 10 mM glucose, and 10 mM Na-Hepes, pH 7.4. An inverted microscope (IX70; Olympus) equipped with an illuminator (Lambda-DG4; Sutter Instrument Co.) and a digital camera (MicroMAX-1024BFT; Roper Scientific) and the appropriate filter sets were used for Ca²⁺ analysis. Data acquisition and processing was performed by the MetaFluor software (Molecular Devices). Confocal analysis was performed in the same solution at 35°C using a confocal microscope (LSM 510-META; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.).

Patch-clamp recordings

Patch-clamp experiments were performed on HEK293 cells after 2 d of transfection with the respective DNA constructs. Recordings were made using an amplifier (Axopatch 200B; Axon Instruments, Inc.) in an extracellular solution containing 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, and 10 mM glucose, pH 7.4. The pipette solution contained 135 mM K gluconate, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, and 2 mM ATP (Na)₂, pH 7.2. To assess TRPM8 channel activity, voltage ramps were applied from -100 to +100 mV every second. The current values measured at the +100 and -100 mV potential are shown in the recordings. Menthol was used at a concentration of 500 μ M and rapa at 100 nM.

Cell suspension FRET measurements

COS-7 cells were cultured in 10-cm dishes (3 \times 10⁶ cells) and transfected with equal amounts of PLC δ 1PH-CFP and -YFP, as well as the mRFP version of the appropriate FRB and FKBP constructs (10 μg of total DNA/dish) using Lipofectamine 2000 for 24 h. Cells were then trypsinized, centrifuged, and resuspended in the same modified Krebs-Ringer solution used in the Ca²⁺ experiments. Measurements were performed at 35°C using a Deltascan fluorometer (PTI Technologies, Inc.) with excitation of 425 nm. To monitor the FRET signal, the ratio of the 525- and 475-nm emission was calculated.

FACS measurements

COS-7 cells were cultured in 10-cm dishes (3 \times 10⁶ cells) and transfected with equal amounts of the appropriate FRB and FKBP constructs (10 μ g of total DNA/dish) using Lipofectamine 2000 for 24 h. Cells were then trypsinized, centrifuged, and resuspended in the same solution that was used in the Ca²⁺ experiments (10⁶ cells/ml). After treating the cells with rapa (3 min) and then with fluorescent transferrin (5 min) they were fixed with 2% PFA. FACS measurements were performed using a FACScan instrument (Becton Dickinson). To monitor the internalization in the transfected cell populations, the red channel was set to analyze the transfected.

We are grateful to Dr. Roger Y. Tsien for the mRFP and to Dr. Philip W. Majerus for the human type IV 5-ptase clone. The confocal imaging was performed at the Microscopy & Imaging Core of the National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH), with the kind assistance of Drs. Vincent Schram and James T. Russell. The invaluable help of Dr. Jon Marsh with the FACS analysis is greatly appreciated.

The research of T. Balla and P. Varnai was supported by the Intramural Research Program of the NICHD of the NIH and by an appointment of P. Varnai to the Senior Fellowship Program at the NIH. This latter program is administered by the Oak Ridge Institute for Science and Education through an interagency agreement between the U.S. Department of Energy and the NIH. T. Rohacs was supported by grants from the American Heart Association, the Sinsheimer Foundation, and the University of Medicine and Dentistry of New Jersey Foundation.

Submitted: 24 July 2006 Accepted: 5 October 2006

Note added in proof. While this paper was under review, Suh et al. (Suh, B.C., T. Inoue, T. Meyer, and B. Hille. 2006. *Science*. 10.1126/ science.1131163) described a similar approach to chemically manipulate PtdIns $(4,5)P_2$ levels and KCNQ potassium channels.

References

- Berridge, M.J. 1993. Cell signalling: a tale of two messengers. *Nature*. 365:388–389.
- Broad, L.M., F.J. Braun, J.P. Lievremont, G.S. Bird, T. Kurosaki, and J.W. Putney Jr. 2001. Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. J. Biol. Chem. 276:15945–15952.
- Brown, F.D., A.L. Rozelle, H.L. Yin, T. Balla, and J.G. Donaldson. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. J. Cell Biol. 154:1007–1017.
- Chen, X., E.M. Talley, N. Patel, A. Gomis, W.E. McIntire, B. Dong, F. Viana, J.C. Garrison, and D.A. Bayliss. 2006. Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103:3422–3427.
- Fuster, D., O.W. Moe, and D.W. Hilgemann. 2004. Lipid- and mechanosensitivities of sodium/hydrogen exchangers analyzed by electrical methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:10482–10487.
- Hilpela, P., M.K. Vartiainen, and P. Lappalainen. 2004. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 282:117–163.
- Inoue, T., W.D. Heo, J.S. Grimley, T.J. Wandless, and T. Meyer. 2005. An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat. Methods*. 2:415–418.
- Itoh, T., S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama, and T. Takenawa. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*. 291:1047–1051.
- Kisseleva, M.V., M.P. Wilson, and P.W. Majerus. 2000. The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. J. Biol. Chem. 275:20110–20116.
- Kong, A.M., C.J. Speed, C.J. O'Malley, M.J. Layton, T. Meehan, K.L. Loveland, S. Cheema, L.M. Ooms, and C.A. Mitchell. 2000. Cloning and characterization of a 72-kDa inositol-polyphosphate 5-phosphatase localized to the Golgi network. J. Biol. Chem. 275:24052–24064.
- Liscovitch, M., V. Chalifa, P. Pertile, C.S. Chen, and L.C. Cantley. 1994. Novel function of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. J. Biol. Chem. 269:21403–21406.
- Liu, B., and F. Qin. 2005. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25:1674–1681.

- Lomasney, J.W., H.F. Cheng, L.P. Wang, Y. Kuan, S. Liu, S.W. Fesik, and K. King. 1996. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding to the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 enhances enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 271:25316–25326.
- Minogue, S., M.G. Waugh, M.A. De Matteis, D.J. Stephens, F. Berditchevski, and J.J. Hsuan. 2006. Phosphatidylinositol 4-kinase is required for endosomal trafficking and degradation of the EGF receptor. J. Cell Sci. 119:571–581.
- Muthuswamy, S.K., M. Gilman, and J.S. Brugge. 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homoand heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 19:6845–6857.
- Ono, A., S.D. Ablan, S.J. Lockett, K. Nagashima, and E.O. Freed. 2004. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:14889–14894.
- Rohacs, T., C.M. Lopes, I. Michailidis, and D.E. Logothetis. 2005. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8:626–634.
- Suh, B.C., and B. Hille. 2002. Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron*. 35:507–520.
- Suh, B.C., and B. Hille. 2005. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Curr. Opin. Neurobiol. 15:370–378.
- Tanimura, A., A. Nezu, T. Morita, R.J. Turner, and Y. Tojyo. 2004. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5trisphosphate in single living cells. J. Biol. Chem. 279:38095–38098.
- Terrillon, S., and M. Bouvier. 2004. Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J.* 23:3950–3961.
- Thebault, S., L. Lemonnier, G. Bidaux, M. Flourakis, A. Bavencoffe, D. Gordienko, M. Roudbaraki, P. Delcourt, Y. Panchin, Y. Shuba, et al. 2005. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280:39423–39435.
- Toker, A., and L.C. Cantley. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 387:673–676.
- van Dam, E.M., T. Ten Broeke, K. Jansen, P. Spijkers, and W. Stoorvogel. 2002. Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. J. Biol. Chem. 277:48876–48883.
- van Der Wal, J., R. Habets, P. Varnai, T. Balla, and K. Jalink. 2001. Monitoring phospholipase C activation kinetics in live cells by FRET. J. Biol. Chem. 276:15337–15344.
- Várnai, P., and T. Balla. 1998. 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. 143:501–510.
- Varnai, P., A. Balla, L. Hunyady, and T. Balla. 2005. Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases Ca2+ via endogenous IP3R channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:7859–7864.
- Wenk, M.R., and P. De Camilli. 2004. Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:8262–8269.

Visualization and Manipulation of Plasma Membrane-Endoplasmic Reticulum Contact Sites Indicates the Presence of Additional Molecular Components within the STIM1-Orai1 Complex^{*S*}

Received for publication, May 25, 2007, and in revised form, July 6, 2007 Published, JBC Papers in Press, August 7, 2007, DOI 10.1074/jbc.M704339200

Péter Várnai^{‡§1}, Balázs Tóth[‡], Dániel J. Tóth[§], László Hunyady[§], and Tamas Balla^{‡2}

From the [‡]Section on Molecular Signal Transduction, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-4510 and the [§]Department of Physiology, Semmelweis University, School of Medicine, Budapest, Hungary, H-1086

STIM1, a recently identified endoplasmic reticulum (ER) protein, rapidly translocates to a plasma membrane-adjacent ER compartment upon depletion of the ER Ca²⁺ stores. Here we use a novel means, namely a chemically inducible bridge formation between the plasma and ER membranes, to highlight the plasma membrane-adjacent ER compartment and show that this is the site where STIM1 and its Ca²⁺ channel partner, Orai1, form a productive interaction upon store depletion. By changing the length of the linkers connecting the plasma and ER membranes, we show that Orai1 requires a larger space than STIM1 between the two membranes. This finding suggests that Orai1 is part of a larger macromolecular cluster with an estimated 11-14-nm protrusion to the cytoplasm, whereas the cytoplasmic domain of STIM1 fits in a space calculated to be less than 6 nm. We finally show that agonist-induced translocation of STIM1 is rapidly reversible and only partially affects STIM1 in the juxtanuclear ER compartment. These studies are the first to detect juxtaposed areas between the ER and the plasma membrane in live cells, revealing novel details of STIM1-Orai1 interactions.

The Journal of Biological Chemistry

ibc

It has long been known that Ca^{2+} -mobilizing agonists activate a Ca^{2+} entry pathway subsequent to their mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by a mechanism that has eluded identification until most recently. In 1986, Putney (1) had postulated that enhanced Ca^{2+} entry is a consequence of the depletion of the intracellular Ca^{2+} stores, introducing the term capacitative Ca^{2+} entry or store-operated Ca^{2+} entry pathway

(SOCE).³ Most recent developments began to shed light on the molecular details underlying the SOCE phenomenon. Screening with libraries of RNA interference, two groups have identified proteins, previously known as stromal-interacting molecule (STIM) 1 and -2 (2, 3), as essential components of SOCE (4-6). STIM1 and STIM2 are ER-resident proteins that contain a single membrane-spanning domain and an EF hand motif in the luminal side of the ER that serves as a Ca^{2+} sensor. Remarkably, STIM1 shows rapid translocation to a plasma membrane (PM)-adjacent region of the ER upon depletion of the ER luminal Ca^{2+} (4, 5, 7), but it does not have the structural hallmarks of an ion channel. In parallel studies, another protein necessary for SOCE and with a channel-like structure has been identified and named Orai1 (8) or CRACM1 (9). Although overexpression of STIM1 alone is a poor enhancer of SOCE, together with Orai1, it dramatically enhances store-operated Ca²⁺ entry consistent with the hypothesis that STIM and Orai form a functional complex, (10, 11). Finally, three groups have recently provided strong evidence that Orai1 indeed is the molecular entity forming the channel pore through which Ca²⁺ enters the cells upon store depletion (12-14). These studies have laid the groundwork for the molecular definition of the capacitative Ca^{2+} entry process.

Several questions have been raised concerning the movements of STIM1 within the ER and between the ER and the PM upon store depletion. Since STIM1 can be glycosylated and is also found in the PM, it was of great importance to determine whether the rapid appearance of STIM1 in the form of numerous puncta at the PM upon store depletion represents a translocation of the protein within the ER from the reticulo-tubular to a membrane-adjacent region or whether it also involves the incorporation of the molecule into the PM. Some studies suggested that ER depletion increases the amount of STIM1 in the PM (5) and that the increased Ca²⁺ entry could be blocked by STIM1 antibodies acting from the outside of the cells (7). In

^{*} This work was supported in part by the Intramural Research Program of the National Institute of Child Health and Human Development of the National Institutes of Health (to B. T., P. V., and T. B.) and by an appointment of PV to the Senior Fellowship Program at the NIH. This latter program is administered by the Oak Ridge Institute for Science and Education through an interagency agreement between the U.S. Department of Energy and the National Institutes of Health. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

This article was selected as a Paper of the Week.

^(S) The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains three supplemental figures and three movies.

¹ A Bolyai Fellow of the Hungarian Academy of Science. Supported by the Hungarian Scientific Research fund (Grant OTKA NF-68563) and the Medical Research Council (Grant ETT 440/2006).

² To whom correspondence should be addressed: National Institutes of Health, Bldg. 49, Rm. 6A35, 49 Convent Dr., Bethesda, MD 20892-4510. Tel.: 301-496-2136; Fax: 301-480-8010; E-mail: ballat@mail.nih.gov.

³ The abbreviations used are: SOCE, store-operated Ca²⁺ entry pathway; ER, endoplasmic reticulum; PM, plasma membrane; FRB, fragment of mTOR that binds FKBP12; mTOR, mammalian target of rapamycin; Ptdlns(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; InsP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; STIM, stromal interaction molecule; Tg, thapsigargin; YFP, yellow fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein; mRFP, monomeric red fluorescent protein; CFP, cyan fluorescent protein; TIRF, total internal reflection fluorescence microscope; TK, thymidine kinase; FKBP, FK506-binding protein.

contrast, other studies found no evidence that significant amounts of STIM1 would be incorporated into the PM upon store depletion (10, 15, 16). Elegant recent experiments have concluded that STIM1 translocation is a rapid process that slightly precedes and correlates with the increased Ca^{2+} influx upon store depletion and that there is a sub-PM pool of the ER to which the majority of STIM1 translocates (17). This, however, does not rule out that STIM1 in the PM plays additional roles related to some forms of Ca^{2+} entry process (18) or that it can cluster at the PM after store depletion (19).

The functional importance of the fraction of ER positioned closely to the PM has been recognized long before the STIM1-Orai1 movements were described. Co-purification of the InsP₃ receptor located in the ER with PM has been described more than 20 years ago (20, 21), and the importance of the PM-associated fraction of the ER in phospholipid synthesis and transfer in both metazoan cells and yeast have been well documented (22, 23). The newly recognized significance of this compartment in Ca²⁺ signaling and its suspected role in phosphatidylinositol (PtdIns) synthesis and transfer to the PM prompted us to find new means to visualize and possibly functionally modulate this ER compartment. To this end, in the present study, we describe a novel chemically inducible heterodimerization approach to detect points of proximity between the ER and the PM and apply this technique to study the relationship between this compartment and the movements of the STIM1 and Orai1 proteins during Ca^{2+} depletion of the ER. Highlighting of this ER compartment in COS-7 cells allowed us to show that this is the region where STIM1 and Orai1 form a rapidly reversible complex upon Ca²⁺ store depletion. Manipulation of the distance between the PM and the ER permitted determination of the spatial requirements of both STIM1 and Orai1, unexpectedly revealing that Orai1 requires a significantly larger gap than STIM1 between the PM and ER, a difference not justified by the sizes of their respective predicted cytoplasmic sequences. This suggests that Orai1 is part of a large macromolecular complex with a sizeable (11-14-nm) protrusion into the cytoplasm.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Rapamycin and thapsigargin were purchased from Calbiochem. Apyrase and ATP were obtained from Sigma. All other chemicals were of the highest analytical grade.

DNA Constructs—YFP- and mRFP-STIM1 plasmids were made by inserting the fluorescent proteins after the signal sequence, starting at residue 23 with a linker (KLGAGAGAGAILNS) placed between the C terminus of the fluorescent protein and the rest of the human STIM1 sequence (obtained as an expressed sequence tag clone: CS0DI067YJ06 from Invitrogen). The whole cDNA of this construct was inserted within the NheI and the KpnI restriction sites of the pEGFP-C1 (Clontech) vector.

The human Orail was obtained as an expressed sequence tag clone (id: 3914595, Open Biosystems) and was tagged with CFP, YFP, or mRFP at its C terminus with a linker (AGAN-SGAGAGAGAILSRGAAAGAAGPVAT) inserted between Orail and the fluorescent protein based on the pEGFP-N1 vector in which the starting Met of GFP was changed to Leu. The cytomegalovirus promoter in some of the STIM1 and Orail constructs was replaced by the thymidine kinase (TK) promoter amplified from the pRL-TK vector of Promega (nucleotides 7–1029) using the VspI and NheI restriction sites.

For PM targeting, the N-terminal palmitoylation/myristoylation signal of the Lyn protein (MGCIKSKGKDSAGA) was used (24), and it was fused to the N terminus of the human FKBP12 protein either through a short linker (DPTRSANSGAGAGAGAILSR) or through a longer helical linker (DPTRSANS(EAAAR)₉NSGAGAGAGAILSR). This fusion protein was tagged with CFP or mRFP using the pEGFP-N1 plasmid backbone.

For targeting of the FRB protein to the cytoplasmic surface of the ER, the C-terminal localization sequence (residues 521– 587) of the human SacI phosphatase (obtained as an expressed sequence tag clone: 3049075 from Open Biosystems) was added to the C terminus of the FRB fragment with a linker of GSGAGAGAGAILNSRV between the two proteins. This sequence was placed behind CFP, mRFP, or GFP using the pEGFP-C1 plasmid backbone. A construct in which a longer helical linker of GSGAGAGAGAILNS(EAAAR)₉NSRV was inserted between the FRB and the ER targeting sequence was also created.

The plasmids designed for the rapamycin-induced PM recruitment of the type-IV 5-phosphatase domain have been described elsewhere (25). All constructs have been sequenced.

Confocal Analysis, Cytoplasmic Ca^{2+} , and TIRF Measurements of Single Cells-COS-7 cells were cultured on glass coverslips (3 \times 10⁵ cells/35-mm dish) and transfected with the indicated constructs (2 µg of DNA total/dish) using Lipofectamine 2000 for 24 h as described previously (25). Confocal measurements were performed at 35 °C in a modified Krebs-Ringer buffer containing (in mM) 120 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 CaCl₂, 0.7 MgSO₄, 10 glucose, 10 sodium Hepes, pH 7.4, using a Zeiss LSM 510-META scanning confocal microscope and a $\times 63/1.4$ objective. Data were acquired with the multitrack mode with scanning in frame mode using the 405, 488, and 543 nm laser excitation of CFP, YFP (or GFP), and mRFP, respectively. The three channels were recorded with the following emission filters (CFP, 420-490 when together with GFP or 420-505 when together with YFP; GFP or YFP, 505-545, mRFP, 560LP). Postacquisition picture analysis was performed using the Photo-Shop (Adobe) software to expand to the full dynamic range, but only linear changes were allowed.

TIRF analysis was performed at room temperature (24 °C) in an Olympus through the lens TIRF microscope system equipped with a Hammamatsu EM-CCD camera and a PlanApo ×60/1.45 objective. Excitation with 488 or 568 nm lasers was used for the YFP or Fluo4 and mRFP, respectively, and scans were performed at every 10 s. For data acquisition the Openlab Software (Improvision) was used, and the pictures were exported as TIFF files for processing with the Metamorph software (Molecular Devices). Quantitation of the membrane intensities was determined after defining the regions of individual cells and thresholding. Due to the large variations of the intensities of individual cells because of the different footprint size and translocation responses, these responses were normalized, taking their maximal thapsigargin (Tg)-induced translo-

ibc



FIGURE 1. **Agonist-induced changes in STIM1 distribution in COS-7 cells.** COS-7 cells were transfected with a luminally YFP-tagged STIM1 construct driven by the thymidine kinase promoter (TK-YFP-STIM1). After 24 h, live cells were examined in a confocal microscope (*A* and *C*) or were analyzed by TIRF microscopy (*B*). The addition of ATP (50 μ M) causes a partial clustering of STIM1 at the subplasmalemmal ER when compared with the full response to Tg (200 nM) (see also supplemental Movie 1). This translocation response is rapidly reversible when extracellular ATP is hydrolyzed by the addition of potato apyrase (5 units/ml), although the reversal is not complete. The subsequent addition of Tg fully translocates STIM1 to the same membrane-adjacent regions. In the TIRF analysis, we show the means \pm S.E. from n = 8 cells where the responses of the individual cells were normalized to the maximum intensity after Tg treatment (see "Experimental Procedures" for more details). *Bars* shown are 10 μ m.

cation as 100%. These recordings were then averaged, and their S.E. was calculated and plotted against time.

For calcium measurements, cells were loaded with fura2/AM or (Fluo4/AM in the TIRF analysis) (3 μ M, 45 min, room temperature). Calcium measurements with Fura2 were also performed at room temperature in the same solution supplemented with 200 μ M sulfin-pyrazone. An Olympus IX70 inverted microscope equipped with a Lamda-DG4 illuminator and a MicroMAX-1024BFT digital camera and the appropriate filter sets was used. The MetaFluor (Molecular Devices) software was used for data acquisition.

RESULTS

Characterization of STIM1 Movements in COS-7 Cells— COS-7 cells can provide a better spatial resolution of the ER-PM compartment, yet they have not been used in the published literature for STIM studies. When using these cells, we noted that overexpression of STIM1 has grossly altered the ER architecture and produced large sheets of ER contacting the PM (supplemental Fig. 1). This important observation may have significant relevance to the role of STIM1 in shaping the ER and, therefore, is currently under further investigation. In the meantime, to make STIM1 studies possible in COS-7 cells, we generated STIM constructs designed for low expression levels. For this purpose, we replaced the cytomegalovirus promoter in the STIM1 (and in some other constructs) with the herpes simplex virus TK promoter. Expression of this construct yielded moderate expression levels with features of STIM1 distribution observed in other cells. Unless otherwise noted, all STIM1 constructs referred to in this study are driven by the TK promoter.

The movements of STIM1 were followed in live cells after the expression of a YFP-STIM1 (or mRFP-STIM1) fusion construct containing the fluorescent protein in the luminal side of the ER between the signal sequence and the EF hand essentially as described in Ref. 4. As shown in Fig. 1A (and supplemental Movie 1), STIM1 appears mostly in the tubular ER and in the nuclear envelope as observed by previous studies. Activation of endogenously expressed Ca²⁺-mobilizing P2Y receptors of the cells with ATP caused the rapid appear-

ance of distinct STIM1 puncta in the periphery of the cells, but the localization of STIM1 in the nuclear envelope was only partially affected in most cells. However, the addition of Tg, the sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase blocker, led to the disappearance of STIM1 from the deeper ER structures with a simultaneous enhancement of the peripheral puncta (Fig. 1 and supplemental Movie 1). These data suggested that the depletion of the ER Ca^{2+} is not uniform after agonist stimulation and that it affects the peripheral ER pools before reaching the juxtanuclear compartments. However, the difference in response to ATP and Tg may just reflect the fact that activation of endogenous P2Y receptors generates a relatively low level of InsP₃ in COS-7 cells, thus limiting the Ca^{2+} -mobilizing action of this messenger.

To determine the reversibility of the STIM1 translocation process, two approaches were used. First, the agonist action of



ATP was terminated by the addition of the enzyme apyrase, an ecto-ATPase that rapidly degrades extracellular ATP. Second, the agonist-induced response was terminated by the rapid removal of the PM pool of PtdIns(4,5)P₂ by the use of our recently developed chemically induced translocation of the type-IV phosphoinositide 5-phosphatase enzyme to this compartment (25). The process of STIM1 translocation was followed by TIRF analysis where the translocation of STIM1 to the membrane compartment attached to the coverslips can be monitored and quantified (16, 17). As shown in Fig. 1B, the addition of apyrase to cells in which STIM1 had been translocated to the peripheral puncta by ATP application rapidly reversed the process, and STIM1 quickly relocated into the tubular ER compartment. The subsequent addition of Tg to such cells still could evoke a massive translocation of STIM1.

Similar results were obtained when the agonist effect was terminated by eliminating $PtdIns(4,5)P_2$ by the rapamycin-induced PM recruitment of the 5-phosphatase (25). Here the localization response of YFP-STIM1 was simultaneously monitored with the recruitment of the mRFP-FKBP-5-phosphatase by TIRF analysis. ATP-induced localization of STIM1 was rapidly reversed as the 5-phosphatase was recruited to the membrane after rapamycin addition, but Tg was still able to evoke STIM1 translocation even without PtdIns(4,5)P₂ in the PM (Fig. 2A). The relocalization of STIM1 clearly required the refilling of the Ca²⁺ stores as neither apyrase (not shown) nor the termination of InsP₃ generation by the membrane-translocated 5-phosphatase failed to remove STIM1 from the cell periphery unless Ca^{2+} was present in the medium (Fig. 2*B*). These data clearly demonstrated the usefulness of COS-7 cells for these studies and that STIM1 not only translocates to the peripheral ER compartments quickly upon store depletion but that this process is readily reversible upon refilling of the intracellular Ca²⁺ stores.

The Journal of Biological Chemistry

bc

The Effects of Tg on Ca^{2+} Influx and STIM1 Translocation Can Be Significantly Delayed, Showing Considerable Variations between Individual Cells-Next we examined the effect of simultaneous expression of Orai1 and STIM1 on the Ca²⁺ response of COS-7 cells stimulated either by ATP or by Tg. It has been shown recently that simultaneous expression of these two proteins causes a large capacitative Ca²⁺ influx response upon store depletion in other cell types (10, 11). Here we compared the Ca²⁺ responses to application of an agonist or Tg. The addition of Tg alone led to a relatively rapid and small increase in $[Ca^{2+}]_{i}$, reflecting the rapid Ca^{2+} release from the ER, followed by a significantly delayed large Ca²⁺ increase indicating the opening of the capacitative Ca^{2+} entry pathway (Fig. 3A, blue traces). This delay showed large cell-to-cell variations but was not observed if Tg was added after the agonist, ATP (Fig. 3B). The addition of ATP to cells expressing both STIM1 and Orai1 evoked an immediate, large Ca²⁺ response that exceeded the increases observed in control cells and showed a significantly enhanced plateau phase. These Ca²⁺ responses showed two kinds of patterns; in cells that showed moderately enhanced Ca²⁺ peaks and a steady sustained Ca²⁺ plateau, the subsequent Tg-induced increase was also moderately enhanced (Fig. 3B, red traces). In contrast, many cells



FIGURE 2. Refilling of the ER Ca²⁺ stores rapidly redistributes STIM1 from the subplasmalemmal ER compartment. COS-7 cells were transfected with TK-YFP-STIM1 as well as the PM-targeted FRB-CFP and mRFP-FKBP-5-phosphatase domain construct described in Ref. 25. This system allows the rapid rapamycin (rapa)-inducible recruitment of the cytosolic type-IV phosphoinositide 5-phosphatase enzyme (5-ptase) to eliminate PtdIns(4,5)P₂ and terminate the production of InsP₃ during ATP stimulation (25). A, analysis of the membrane-adjacent appearance of YFP-STIM1 (upper trace) and the 5-phosphatase (lower trace) recorded simultaneously by TIRF microscopy. ATP (50 μ M) causes the recruitment of STIM1 to the membrane-adjacent ER, but it rapidly moves back to the deeper ER compartments upon termination of the response by the rapamycin-induced membrane recruitment of the 5-phosphatase. Tg can still evoke a response despite the $PtdIns(4,5)P_2$ depletion. B, the same protocol was performed as in panel A, except that the cells were incubated in Ca²⁺ free medium (containing 100 μ M EGTA) prior to ATP addition. Under these conditions, ATP evokes a similar translocation of STIM1, but the termination of the InsP₃ production by the rapamycin-induced recruitment of the 5-phosphatase is not associated with its redistribution unless Ca²⁺ (2 mм) is added back so that the ER pools can be refilled. (Means \pm S.E. of n = 11and n = 10 for A and B, respectively.)

showed large oscillatory Ca²⁺ waves, and in these cells, the subsequent Tg response was also greatly enhanced (Fig. 3B, blue traces).

To determine whether STIM1 translocation also shows a comparable delay after Tg treatment, cells expressing STIM1



The Journal of Biological Chemistry

ibc



FIGURE 3. Cytoplasmic Ca²⁺ responses of COS-7 cells transfected with TK-YFP-STIM1 and untagged Orai1. COS-7 cells were transfected with TK-YFP-STIM1 and an untagged Orai1 construct. After 24 h, cells were loaded with 3 μ M Fura2/AM for 45 min at room temperature. Cells were then washed twice, and their single cell Ca²⁺ responses were monitored and their YFP signal was also determined, indicating the expression of the proteins (see "Experimental Procedures" for further details). A, [Ca²⁺], responses of the individual YFP-STIM1-expressing cells (blue traces) to 200 nM Tg are plotted against the averaged responses of non-transfected cells (n = 28) recorded in the same field (*black trace*). Note the large variations in the onset of the huge Ca^{2+} influx response relative to the relatively uniform onset of Ca^{2+} release. *B*, $[Ca^{2+}]$, responses of cells stimulated with ATP (50 μm). The ATP responses of cells expressing YFP-STIM1 fell into two relatively well distinguishable groups. Some cells showed an increased peak and a sustained and elevated steady plateau increase of [Ca²⁺], after ATP stimulation, and these had a moderate Ca²⁺ response to a subsequent Tg challenge (red traces). In contrast, many cells displayed large oscillatory Ca²⁺ waves, and these also showed a large response to subsequent Tg stimulation (blue traces). These differences probably reflect the different extent of STIM1-Orai1 expression. The black trace shows the averaged responses of non-transfected cells (n = 20) recorded in the same field.

were examined by TIRF analysis. As shown in Fig. 4*A*, STIM1 translocation in response to Tg showed similar cell-to-cell variations and was significantly delayed when compared with the rapid effects of ATP (shown in Figs. 1 and 2). When the Fluo4 (to monitor Ca²⁺) and TIRF analysis were done simultaneously, there was a good correlation between the delays of the two responses (Fig. 4*B*). These results suggested that the Tg-induced store depletion has to reach a certain level before it results in the movement of STIM1 to the cell periphery to activate Ca²⁺ influx, and the variability of the delay is probably due to the different ER Ca²⁺ leak activity of the individual cells.

Visualization of the ER Compartment Making Contacts with the Plasma-Membrane-After establishing the COS-7 cell system as a model, we wanted to determine whether there are pre-existing ER compartments beneath the PM that would be preferential sites of STIM1 translocation. To visualize such a compartment, we used a chemically inducible molecular bridge formation strategy. The FRB fragment of the mTOR protein was targeted to the cytoplasmic surface of ER in the form of a CFP fusion protein, whereas the FKBP-12 protein fused to mRFP was targeted to the inner surface of the PM as described under "Experimental Procedures." The addition of rapamycin causes heterodimerization of the FKBP and FRB modules (24), and we reasoned that a molecular bridge can only be formed at sites where the ER membrane and the PM are at close proximity since both of these proteins are retained in their respective membranes. It was also expected that once such a contact zone had been established, it would be extended as more molecules are recruited to this region. Fig. 5A shows that the two respective constructs show a characteristic PM and ER localization when co-expressed in COS-7 cells. After the addition of rapamycin, both constructs rapidly started to concentrate in small flat areas at the cell surface where they showed tight co-localization. This process could be detected as early as 15-30 s after rapamycin addition. The conjoining areas developed into a relatively stable steady state within 5 min, after which the structures were stable and showed only very slow expansion (see also supplemental Movie 2).

These results indicated that the FRB and FKBP fusion proteins with high lateral mobility within the PM and ER membranes became trapped within their respective membranes at the areas of juxtaposition upon heterodimerization. Although this process also extends the area beyond the initial contact points, it will still pinpoint the sites where the two membranes had been at their closest proximity. To determine the extent to which the ER itself is reorganized during the development of these membrane contacts, several markers that visualize the ER were used. These included the type-I InsP₃ receptor in the form of a YFP fusion protein, a GFP construct targeted to the ERlumen, and the GFP-fused C-terminal targeting signal of the inositide phosphatase, SacI. In all of these cases, we could observe the flattening of a fraction of the peripheral tubular ER compartment at the sites of FRB-FKBP interaction. Fig. 5B shows an example with the GFP-ER(SacI) protein. However, this manipulation hardly affected the deeper juxtanuclear ER compartments (Fig. 5B), indicating that only the peripheral portion of the ER is subject to the changes induced by the rapamycin-induced PM attachment.



The Journal of Biological Chemistry

jbc

FIGURE 4. STIM1 recruitment to the subplasmalemmal ER shows variable delays after thapsigargin treatment. COS-7 cells were co-transfected with TK-mRFP-STIM1 and untagged Orai1 constructs for 1 day, and in some cases, loaded with the Ca²⁺ probe Fluo4/AM (3 μ M) for 45 min. After washes, TIRF recordings were made using a detection of STIM1 in the red channel, and when applicable, a simultaneous monitoring of Fluo4 fluorescence in the green channel. A, the appearance of STIM1 close to the PM shows a delay with large variations (compare these responses with those observed after ATP in Fig. 3). B, simultaneous Ca²⁺ recordings from selected cells show that the initial Ca²⁺ release does not differ between cells, but the secondary Ca²⁺ rise due to Ca²⁺ influx through the Orai1 channels shows variations and correlates with the STIM1 translocation process. Note that the relative magnitude of the initial rise of Ca²⁺ (due to release) appears bigger in these recordings when compared with those obtained with Fura-2 due to the higher Ca²⁺ affinity of Fluo4 and that the Ca²⁺ changes appear transient, but this is due to the photobleaching of the probe as it is not used in a ratiometric mode. The continuous lines, the dotted lines, and the dashed lines identify corresponding calcium and translocation responses of individual cells.

The Site of STIM1 Translocation Corresponds to the PM-ER Contact Sites—Next we examined whether STIM1 translocation to the peripheral ER sites upon store depletion corresponds to the sites that can be established by chemical crossbridging. COS-7 cells were co-transfected with the YFP-fused form of STIM1 in addition to the PM-targeted mRFP-FKBP and the ER-targeted CFP-FRB fusion proteins (in some cases, both constructs were tagged with CFP). Such cells were then treated with Tg to translocate STIM1 into the peripheral ER



FIGURE 5. Visualization of PM-ER contact regions by chemical crossbridging of subplasmalemmal ER with the PM. A, COS-7 cells were transfected with a PM-targeted FKBP-mRFP construct and a CFP-FRB construct targeted to the cytoplasmic face of the ER. These constructs show their respective membrane localization (panels a and b). Due to the recording close to the cell surface, the ER architecture is somewhat fuzzy (panel b). The addition of rapamycin (rapa, 100 nm) results in the concentration of both proteins in small patchy areas where they show tight co-localization (panels d-i, see also supplemental Movie 2). B, cells were transfected with the PM-targeted FKBP-mRFP and CFP-FRB-ER constructs plus a GFP construct targeted to the ER by the same targeting sequence as in panel A but without FRB. This latter construct is not expected to participate in the cross-bridging and is used to monitor the overall changes in ER morphology during the cross-bridging process. The CFP channel is not shown for clarity. Although the tubular ER network is largely preserved after rapamycin addition, there are flattened ER areas (panel e) that correspond to the patchy regions formed by the ER and PM contacts (panel d). Bars shown are 10 μ m.

and form the subplasmalemmal puncta (Fig. 6A). Tg treatment did not alter the localization of either the PM (Fig. 6A, panel a) or the ER-targeted (not shown) fusion proteins. The addition of rapamycin to Tg-treated cells rapidly established the PM-ER contact patches, and importantly, these were always initiated from the sites of STIM1 localization (Fig. 6A, panels d-i). These results suggested that the appearance and expansion of these membrane contacts upon chemical cross-bridging indeed originate from the contact points between the ER and the PM and that STIM1 defines this compartment in a store-depleted state.



FIGURE 6. PM-ER contact regions correlate with the location of STIM1 in thapsigargin-treated cells. A, COS-7 cells were transfected with the PM-targeted FKBP-mRFP and CFP-FRB-ER constructs together with TK-YFP-STIM1. Cells were treated with Tg (200 nm) until STIM1 appeared in the juxtamembrane ER compartment (panel b). At this point, the PM-FKBP-mRFP is found at the PM (panel a), whereas the CFP-FRB-ER protein is in the ER (not shown in the figure). The addition of rapamycin (100 nm) results in the rapid formation of ER-PM junctions (indicated by the PM-FKBP-mRFP signal shown in panel d), and these develop at sites that correspond to the localization of STIM1 (panels e-i). Remarkably, during this process, the YFP-STIM1 reorganizes into small puncta that are always located at the periphery but attached to the cross-bridged ER-PM areas (panels q-i) but occasionally were trapped within those (two examples are indicated in panels g and i by the arrows). In this latter case, their negative imprint is clearly visible in the red channel (panel g). B, cells were transfected with the same three constructs as in panel A, but here rapamycin was added first before Tg. The addition of rapamycin leads to the development of ER-PM junctions (panel a), and STIM1 is also located in these flattened ER areas (panel b). The addition of Tg results in the movement of STIM1 from these areas to their periphery, where it forms intense puncta attached to the areas of PM-ER junctions (panels e and h) (see also supplemental Movie 2). Bars shown are 10 μ m.

A remarkable finding of these experiments was that the STIM1 puncta were almost always pushed to the periphery of the PM-ER junctional zones. Only in a few cases were there STIM1

puncta trapped within theses contact zones (Fig. 6*A*, *panel i*, *arrows*). These data raised the possibility that STIM1 might be part of a larger molecular complex that is excluded from the narrow gap between the PM and ER membranes as enforced by the chemical cross-bridge.

STIM1 Forms Clusters within the Subplasmalemmal ER Compartment upon Store Depletion-To further investigate the movements of STIM1 during ER Ca²⁺ depletion in relationship to the rapamycin-induced PM-ER junctions, similar experiments were performed as described above, but the order of addition was reversed. First, the PM-ER contacts were established by the addition of rapamycin followed by Ca²⁺ depletion by Tg. In quiescent cells, the three proteins (the YFP-fused form of STIM1, the PM-targeted mRFP(or CFP)-FKBP, and the ERtargeted CFP-FRB) showed their characteristic localization. The addition of rapamycin caused the formation of the PM-ER contact sites, and STIM1 (found in the ER close to the periphery) was also present in this flattened ER compartment (Fig. 6B). These changes were consistent with the rapamycin-induced recruitment and juxtapositioning of the peripheral tubular ER in which STIM1 is already localized. When Tg was added to such cells to deplete the ER Ca²⁺ stores, a striking movement of STIM1 from the patchy areas into discrete puncta anchored to the perimeter of the patches occurred (Fig. 6B and supplemental Movie 3). Similar changes were observed when ATP was used instead of Tg (supplemental Fig. 2). This very prominent ATP-induced clustering was rapidly reversible upon termination of the response by apyrase addition (supplemental Fig. 2). This clustering together with the moving of STIM1 out to the periphery of the PM-ER junctions strongly suggested that although the cytosolic segment of the STIM1 molecule fits within the tight space formed by the cross-bridged PM-ER junctions in control cells, upon store depletion, STIM1 interacts with a protein that is larger than the space between the chemically cross-bridged membranes, and this interaction occurs in discrete contact sites.

Orail in the PM Becomes Part of the STIM1 Clusters upon Store Depletion-Next we investigated the distribution of Orai1 during these manipulations. For this, Orai1 was tagged at its C terminus with YFP, CFP, or mRFP with different linkers between the two proteins. Expression of these fusion proteins showed mostly PM localization (Fig. 7A), but in a small percentage of cells, they were also seen in the Golgi and even in tubular ER structures, probably reflecting the different stages as the protein made its way to the PM (not shown). The Orai1 protein fused to the fluorophores with a short linker was found to be active based on Ca²⁺ measurements and elicited large Ca²⁺ influx responses in the cells when expressed together with TK-YFP-STIM1 (Fig. 7B). In cells co-expressing YFP-STIM1 and Orai1-mRFP (or -CFP), the two constructs showed their respective localizations, Orai1 in the PM and STIM1 in the ER (Fig. 7C). However, in some cells, STIM1 was already localized to membrane-adjacent ER areas, and Orai1 was also enriched in the same locations of the PM (not shown). The addition of Tg (together with ATP to speed up the ER Ca^{2+} depletion process) caused the rapid concentration of PM Orai1 in the same areas where the STIM1 puncta appeared (Fig. 7C). Importantly, in cells transfected with Orai1-mRFP (or -CFP or -YFP) with-



FIGURE 7. Orai1 localizes to the PM and forms clusters with STIM1 after depletion of the ER Ca²⁺ pools. A, Orai1-mRFP localizes to the PM when expressed in COS-7 cells. B, Orai1 tagged with the fluorophores is functionally intact as shown by the Ca²⁺ traces. Red traces show responses of individual cells expressing TK-YFP-STIM1 and Orai1-mRFP in this example when compared with the averaged untransfected cells in the same dish (black trace). C, COS-7 cells were transfected with TK-YFP-STIM1 and Orai1 tagged at its C terminus with CFP with a short linker placed in between (see "Experimental Procedures" for details). The two proteins show ER and PM localization, respectively (panel a and b). The addition of Tg (together with ATP to speed up the effects of Tg) causes the movement of STIM1 to the subplasmalemmal ER, and Orai1 in the PM is also drawn to these areas, showing close co-localization of the two proteins. D, depletion of the ER Ca² pools in cells expressing fluorescent Orai1 without STIM1 induces hardly detectable clustering of Orai1, probably due to the low level of endogenous STIM1 in these cells. Such clustering is somewhat better observed in cells that express low levels of Orai1, as shown in this case with a TK-driven Orai1-YFP construct. Bars shown are 10 μ m.

out STIM1, Orai clustering in the PM after Tg treatment was hardly detectable and only in a small fraction of cells (Fig. 7*D*) and, therefore, could be easily overlooked in good agreement with a recent report (16). This response was somewhat better detected when Orai1-YFP was expressed when compared with Orai1-mRFP.

To determine the localization of Orai1 in cells where the PM-ER junctions are enforced with chemical cross-linking, cells were transfected with the ER-targeted-FRB and the PM-targeted FKBP together with Orai1-YFP. The addition of rapamycin to such cells induced the formation of PM-ER junctions,

and strikingly, the Orai1 protein was excluded from these areas (Fig. 8*A*). This finding suggested that the Orai1 protein is part of a molecular complex with a cytoplasmic portion that is too large to fit within the space available when the PM and ER are tightly conjoined by the FKBP-FRB complex (estimated to be \sim 4–6 nm, see Fig. 10). The addition of ATP/Tg to such cells induced some Orai1-YFP clustered at areas that touched the hollow patches corresponding to the area of tight PM-ER connections (Fig. 8*B*).

To examine the movements of both STIM1 and Orai1 simultaneously and to determine their relative positions to the PM-ER junctions, the ER-targeted FRB and the PM-targeted FKBP (both tagged with CFP in this case) were expressed together with TK-YFP-STIM1 and Orai1-mRFP. The addition of rapamycin to such cells induced the formation of the PM-ER junctions with the peripheral STIM1 localized in them, but Orai1 was prominently excluded from these areas (shown only after the Tg addition in Fig. 8C). Application of Tg induced the movement of both of these proteins into prominent clusters always at the periphery of the membrane patches where they showed almost perfect co-localization (Fig. 8C). This involved the movement of STIM1 out of the membrane patches as described above. These data suggested that the two proteins formed a complex at the border of the PM-ER zones. For this to happen, STIM1 retained in the ER had to move to the periphery of the PM-ER zones to meet Orai1 of the PM that was excluded from these areas.

Size Estimates of the Orail Complex-To determine the minimal size of the gap between the two membranes that would accommodate the Orai1 complex, the constructs used for chemical cross-bridging were modified. A long helical linker constructed with a (EAAAR)₉ sequence was placed between the localization signals and the FKBP (or FRB) molecule (see Fig. 10). First, we expressed either one of the partners containing the extended linker with the original "short" binding partner (which would extend the intermembrane space to ~ 9 nm). The formation of rapamycin-induced ER-PM junctions in this case still excluded Orai1-YFP (or -mRFP) from the junctions (not shown). However, when the extended versions of both the PMtargeted and the ER-targeted constructs were used (allowing a calculated intermembrane space up to \sim 14 nm), Orai1-YFP (or -mRFP) was no more forced out from the rapamycin-induced PM-ER junctions (Fig. 9A). When the localization of mRFP-STIM1 and Orai1-YFP was simultaneously followed in such cells after establishing ER-PM contact zones, STIM1 was found within these zones, whereas Orai1 showed its characteristic even PM localization (Fig. 9B, upper row). The addition of ATP/Tg rapidly induced the movement of Orai1 into the same contact zones within the PM, indicating its interaction with STIM1 (Fig. 9B, lower row). The co-localization of STIM1 and Orai1 at these PM-ER sites is clearly observed even upon prolonged incubations, and unlike in the case of the short linkers, it did not yield clusters at the periphery of the contact zones but rather an even co-localization with them (Fig. 9C). These data suggested that the molecular complex containing Orai1 can be accommodated into a space that has to be larger than \sim 9 but smaller than $\sim \! 14$ nm, and in such contact zones, Orai1 can form a complex with STIM1.

ibc



FIGURE 8. **Orai1 is excluded from the rapamycin (***rapa***)-induced cross-bridged PM-ER junctions.** *A*, COS-7 cells were transfected with the indicated constructs for 24 h. The addition of rapamycin induces the PM-ER junctions (shown in *panel a*), and Orai1-YFP is absent from these junctions (*panel b*). *B*, at higher magnifications, it is noticeable that ATP/Tg treatment causes clustering of Orai1 in the periphery of the hollow regions in some of the cells (*panel d*). The *lower panel* shows an enlarged area demonstrating the reciprocal localization of the PM-ER junctions and Orai1 and the position of the Orai1 puncta at the periphery of the junctions in ATP/Tg-treated cells. *C*, COS-7 cells were transfected with the indicated four constructs for 24 h. Cells were treated with rapamycin for 3 min to develop the PM-ER junctions and subsequently stimulated with Tg to generate clusters that contain Orai1 and STIM1. Note the co-localization of Orai1-mRFP and YFP-STIM1 in the periphery of the rapamycin-induced PM-ER junctions that exclude Orai1. *Bars* shown are 10 μ m.

DISCUSSION

The Journal of Biological Chemistry

ibc

The present study was designed to investigate the features of the ER compartment that is closely apposed to the PM. Although the functional significance of such an ER compartment has been postulated before, its importance became highlighted by the recent discovery of the STIM1 protein and its association with the PM-localized Orai1 Ca²⁺ channel in response to depletion of the ER Ca²⁺ stores (4–12). To localize and visualize this compartment of the ER, we developed a new approach based on the rapamycin-induced dimerization of the FRB fragment of mTOR and FKBP-12 (26). By targeting the FKBP and FRB proteins to the cytoplasmic surface of the PM and ER, respectively, rapamycin-induced binding of the two proteins can take place, but only where the two membranes are within a certain distance. One can assume that the PM-ER contact sites are very dynamic in intact cells, only providing cells with transient juxtapositions that are formed and depart rapidly. However, by adding the dimerizer, these contact zones are stabilized, and the two membranes are tightly held together with little gap between them, mimicking the process that takes place when the Orai1 and STIM1 proteins form a complex during ER Ca2+ store depletion. By altering the length of the linkers, the size of the gap between the two membranes can be changed, and we observed that the shortest linkers yielded larger ER-PM areas relatively quickly, developing after dimerization. However, when using the longer linkers, the ER-PM areas were more reminiscent of those developing with STIM1 after pool depletion (i.e. they did not expand to large sizes quickly). Interestingly, the formation of the artificial contacts (whether with the short or long linkers) had no obvious functional consequence for the capacitative Ca^{2+} influx pathway, as we did not observe a cytosolic Ca²⁺ increase after cross-bridging or any obvious difference between the lag times or magnitudes of the Tg-induced cytoplasmic Ca²⁺ signals in such cells when compared with controls (supplemental Fig. 3). This was surprising as these contact sites do contain a fraction of the expressed STIM1 protein. In this context, it is important to emphasize that STIM1 can appear in the ER compartment that is juxtaposed to the PM without being active, i.e. leading to the open-

ing of the Orai1 channel. This patchy distribution that can be almost indistinguishable from the STIM1 clusters evoked by store depletion is observed in quiescent cells expressing slightly higher levels of STIM1 (see supplemental Fig. 1) or in cells where the peripheral ER is brought to the PM with the chemical cross-bridging. None of these situations yielded increased Orai1 activity (as judged by cytosolic Ca^{2+} increases), suggesting that without the conformational change imposed by store depletion and probably the consequential oligomerization (27), simple juxtaposition of STIM1 with the PM is not sufficient to induce Ca^{2+} influx.

This new approach has revealed several novel details of the STIM1-Orai1 interaction process at the PM-ER junctions. First, the artificially generated contact sites tightly coincided with those generated by store depletion regardless of whether


FIGURE 9. Orai1 is not excluded from rapamycin (rapa)-induced cross-bridged PM-ER junctions when the space is extended between the two membranes. A, COS-7 cells were transfected with the indicated constructs where a long helical linker (LL) was inserted between the targeting signals and the dimerization domains so that the two membranes are kept at a larger distance after chemical cross-bridging with rapamycin. The juxtapositioned areas are shown in the CFP channel in panel a, and Orai1-YFP is now not excluded from these areas (compare with Fig. 8A). B, when cells were also expressing mRFP-STIM1, it is localized in the ER areas that are cross-bridged to the PM (panel b), but Orai1 is evenly distributed within the PM (panel c). The addition of ATP/Tg to empty the ER Ca²⁺ pools induces no striking change in STIM1 distribution (unlike in Fig. 6B or supplemental Movie 3), but Orai1-YFP rapidly moves into the same areas in the PM (panel g), indicating its interaction with STIM1 within the same area where the two membranes are held together with the rapamycin-induced cross-bridging. C, the co-localization of all of these constructs can be better seen after a longer time of incubation when the areas of the conjoined membranes are larger. These results show that the Orai1 complex is not excluded from and can freely move into the conjoined areas if the two membranes are kept at a distance calculated to be 12–14 nm. Bars shown are 10 µm.

they were formed before or after store depletion. The tightest artificial PM-ER junctions also flatten the peripheral portion of the ER and contain a significant fraction of the expressed STIM1 protein, but surprisingly, exclude the expressed Orai1 protein. This suggests that the gap between the membranes in this case is narrower than the natural contacts formed by STIM1-Orai1 interaction. This feature, however, allowed the monitoring of the reversible interaction of the STIM1 and

tions, STIM1 is the limiting factor. In contrast, STIM1 expression alone only marginally enhances Ca²⁺ influx upon store depletion (28, 29), suggesting that now the amount of Orai1 is limited. However, the ER morphology is extremely sensitive to STIM1 overexpression, causing juxtapositioning of large ER sheets with the PM (see supplemental Fig. 1). This may be indicative of STIM1 interacting with an abundant protein in the PM that cannot be Orai1 as this morphological change is not asso-

STIM1 Clustering

Orai1 proteins regulated by store depletion in the plane of the membrane and clearly showed again that a simple juxtaposition of these proteins is not sufficient for their interaction. This interaction requires depletion of ER Ca²⁺ stores, causing prominent clustering of the two proteins but only at the perimeter of tight PM-ER junctions. The fact that these contacts were formed in discrete puncta suggests the existence of preferential sites where this interaction takes place; otherwise, these proteins would be expected to assemble evenly around the contact zones. The finding that STIM1 must travel to the periphery of the PM-ER junctions to form puncta even when Orai1 is not expressed indicates that endogenous Orai1 is also excluded from these junctions and that exclusion of the fluorescently tagged Orai1 protein is not simply caused by the added fluorescent protein tag.

It is noteworthy that STIM1 was not excluded from even the tightest contact zones; in fact, it seemed to move freely within them. This discrepancy between the space requirements of Orai1 and STIM1 is not easily explained by the length of their putative cytoplasmic portions. Therefore, we assume that Orai1 is associated with a larger protein complex. The existence of additional molecular participants in the capacitative entry process is also indicated by several observations. First, the stoichiometry between these components has important bearings on the process. Expression of Orai1 alone is inhibitory rather than stimulatory on the Ca²⁺ entry process, suggesting that it sequesters a component important for the SOCE. However, together with STIM1, it causes large Ca^{2+} influx, indicating that under these condi-

The Journal of Biological Chemistry

ibc

STIM1 Clustering

The Journal of Biological Chemistry



FIGURE 10. Schematic representation of the spatial arrangement and the calculations concerning the space requirements of Orai1 and STIM1. *A*, rapamycin-induced dimerization of the FRB and FKBP12 (FKBP) modules tagged with the indicated fluorophores and targeted to the ER and PM, respectively, causes the two membranes to be clamped together. The narrow space still allows STIM1 to be localized and move within this membrane area. Orai1, on the other hand is excluded from this space, and upon store depletion, STIM1 has to move to the periphery of these areas, where it can interact with Orai1. *B*, introduction of longer linkers allows a space between the cross-bridged membranes that allows the free movements and the interaction of STIM1 and Orai1. This finding suggests that Orai1 interacts with a protein complex that bulges significantly to the cytoplasm. This putative protein(s) can be a membrane protein as well as a soluble protein and may mediate the interaction between STIM1 and Orai1.

ciated with large Ca²⁺ increases after store depletion. The finding that overexpressed STIM1 is forced to the periphery of the cross-bridged PM-ER junctions after store depletion even without Orai1 expression (*i.e.* with limited Orai1 available) is also consistent with the idea that the putative large protein is in higher abundance in the PM.

Recent cross-linking experiments have also indicated that Orai1 is recovered in a large molecular weight complex regardless of store depletion and that STIM1 is not part of this complex under any of the various detergent conditions used in that study (30). Immunoprecipitation of STIM1 with Orai1 is also controversial, being found independent of store depletion (12), increased after store depletion (14), or not demonstrable (30), perhaps indicating an indirect interaction and its dependence on the stoichiometry and state of putative additional components.

Titration of the length of the linkers to accommodate the Orai1 protein in the rapamycin-induced ER-PM junction allowed rough estimates of the size of the complex, indicating that it has to be larger than 8-9 nm but smaller than 12-14 nm (Fig. 10). This is in good agreement with recent electron microscopic analysis of the gaps within the naturally occurring ER-PM contacts formed by store depletion (10-25 nm with an average of 17 nm) (17).

While characterizing the movements of Orai1 and STIM1 and the resulting Ca²⁺ responses in the larger COS-7 cells, we made several important observations. First, a rapid reversal of the STIM1 translocation process to the juxtamembrane ER was found when the agonist effect was terminated. Although it has been known that the capacitative Ca²⁺ entry pathway rapidly shuts down upon refilling of the ER Ca²⁺ pools, it was not clear whether this was due to a change in the conductivity of the Orai1 channel still complexed with STIM1 or the dissociation of the STIM1-Orai complex and relocalization of STIM1 away from the PM. Although the current results do not rule out that the termination

process involves Orai1 channel closure before the relocalization of STIM1, they certainly show that the two processes follow very similar time scales.

The rapid change of STIM1 localization upon store depletion could simply be caused by the association of the STIM1 protein with Orai1 at the PM in the Ca^{2+} depleted state. However, the

rapid return of STIM1 to the deeper ER also suggests that STIM1 associates with a yet to be identified ER-resident protein in the Ca^{2+} replete state. The PM recruitment process is very reminiscent of the movement of the ER-localized FRB protein to the PM contact points after the addition of the dimerizer to interact with the PM-targeted FKBP (especially with the longer linkers in place), but this latter process cannot be rapidly reversed with our current methods.

Another notable finding of the present study was the clear dissociation of the translocation of STIM1 and activation of the Ca²⁺ influx pathway from the initial Ca²⁺ release after Tg addition. The delay was caused at the level of STIM1 translocation as the translocation and Ca²⁺ rise showed good correlation in agreement with findings of a recent report (15). This delay showed big cell-to-cell variations, raising the possibility that cells are different in their leak currents, taking more time to achieve the same decrease in the intralumenal Ca²⁺ concentration in some cells. Alternatively, cells are different in the Ca²⁺ threshold, at which point STIM1 changes conformation. A similar delay in SOCE relative to Ca²⁺ release in Tg-treated rat basophilic leukemia cells has already been described, and it was attributed to the release of Ca²⁺ first from an ER store related to protein synthesis but irrelevant to STIM1 movements (31). This could also be the case in the COS-7 cells. However, the finding that agonist addition, leading to InsP₃ formation, eliminates this delay shows that once ER depletion is rapidly achieved, the time difference between these events becomes minimal. The difference between the STIM1 response to agonists and Tg was also displayed in experiments showing that agonist affected only the peripheral ER pool of STIM1, whereas Tg also mobilized STIM1 from the deeper juxtanuclear compartments. Similar findings were recently reported in human pancreatic acinar duct cells with a low concentration of Tg (32). A more prominent difference was the appearance of large oscillatory Ca²⁺ responses to ATP stimulation observed in some cells overexpressing Orai1 and STIM1 that was not observed with Tg. Because these large Ca²⁺ changes are due to Ca²⁺ influx, we assume that the Orai1 channel might undergo some rapid feedback regulation by Ca²⁺ or a Ca²⁺-induced depolarization of cells. Although these observations need to be followed up with more detailed studies on the channels, it is worth noting that recent studies showed roles of STIM1 and Orai1 in agonist-stimulated oscillatory Ca²⁺ responses (33).

In summary, the present studies show that juxtamembrane compartments of the ER can be visualized in living cells and that such sites are formed and get stabilized by STIM1 and Orai1 when the luminal ER Ca²⁺ concentration is decreased. The formation of such contacts *per se* does not appreciably affect Ca²⁺ signaling. Using a chemically controlled juxtapositioning of the ER and PM membranes with variable size gaps, we demonstrate that Orai1 requires a larger space (11–14 nm) than STIM1 (4–6 nm) between the two membranes. This finding suggests that Orai1 is part of a larger molecular complex. Our data also highlight important spatial and kinetic differences between the effects of Tg and agonists in the process of activating Ca²⁺ entry. Acknowledgments—We are grateful to Dr. Roger Y. Tsien for the monomeric red fluorescent protein and to Dr Philip W. Majerus for the human type-IV phosphoinositide 5-phosphatase clone. The confocal imaging was performed at the Microscopy and Imaging Core of the NICHD, National Institutes of Health with the kind assistance of Drs. Vincent Schram and James T. Russell.

REFERENCES

- 1. Putney, J. W., Jr. (1986) Cell Calcium 7, 1-12
- Williams, R. T., Manji, S. S., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J. P., Senior, P. V., Kazenwadel, J. S., Shandala, T., Saint, R., Smith, P. J., and Dziadek, M. A. (2001) *Biochem. J.* 357, 673–685
- Williams, R. T., Senior, P. V., Van Stekelenburg, L., Layton, J. E., Smith, P. J., and Dziadek, M. A. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1596, 131–137
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., and Meyer, T. (2005) *Curr. Biol.* 15, 1235–1241
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2005) *Nature* 437, 902–905
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., and Stauderman, K. A. (2005) *J. Cell Biol.* 169, 435–445
- Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Xu, W., Dziadek, M. A., and Gill, D. L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4040 – 4045
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) *Nature* 441, 179–185
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J. P. (2006) *Nat. Cell Biol.* 8, 771–773
- Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., and Putney, J. W., Jr. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 24979 –24990
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., and Gill, D. L. (2006) J. Biol. Chem. 281, 20661–20665
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P., and Penner, R. (2006) *Curr. Biol.* 16, 2073–2079
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P. G. (2006) *Nature* 443, 230–233
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M. D. (2006) *Nature* 443, 226–229
- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., and Lewis, R. S. (2006) J. Cell Biol. 174, 815–825
- Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L., and Xu, T. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 969–976
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., and Lewis, R. S. (2006) J. Cell Biol. 174, 803–813
- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2007) J. Physiol. (Lond.) 579, 703–715
- Hauser, C. T., and Tsien, R. Y. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 3693–3697
- Guillemette, G., Balla, T., Baukal, A. J., and Catt, K. J. (1988) J. Biol. Chem. 263, 4541–4548
- Rossier, M. F., Bird, G. S. J., and Putney, J. W., Jr. (1991) *Biochem. J.* 274, 643–650
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S. D., Zellnig, G., Perktold, A., and Daum, G. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 2351–2361
- 23. Holthuis, J. C., and Levine, T. P. (2005) Nat Rev Mol. Cell. Biol. 6, 209-220
- Inoue, T., Heo, W. D., Grimley, J. S., Wandless, T. J., and Meyer, T. (2005) Nat. Meth. 2, 415–418
- 25. Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., and Balla, T. (2006) J. Cell Biol. 175, 377–382
- Muthuswamy, S. K., Gilman, M., and Brugge, J. S. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 6845–6857
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 9301–9306
- 28. Smyth, J. T., Dehaven, W. I., Jones, B. F., Mercer, J. C., Trebak, M.,

STIM1 Clustering

Vazquez, G., and Putney, J. W., Jr. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1147-1160

- Soboloff, J., Spassova, M. A., Dziadek, M. A., and Gill, D. L. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1161–1168
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., and Rao, A. (2007) J. Biol. Chem. 282, 16232–16243
- 31. Huang, Y., and Putney, J. W., Jr. (1998) J. Biol. Chem. 273, 19554-19559
- Ong, H. L., Liu, X., Tsaneva-Atanasova, K., Singh, B. B., Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Russell, J. T., Hegde, R. S., Sherman, A., and Ambudkar, I. S. (2007) *J. Biol. Chem.*
- Wedel, B., Boyles, R. R., Putney, J. W., and Bird, G. S. (2007) J. Physiol. (Lond.) 579, 679-689

ibc

