

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ AT1 ANGIOTENZIN RECEPTOR MŰKÖDÉSÉBEN
SZEREPET JÁTSZÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA**

Dr. Balla András



SEMMELWEIS EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET

BUDAPEST
2023

1. BEVEZETÉS

1.1 Irodalmi háttér és a kutatás előzményei

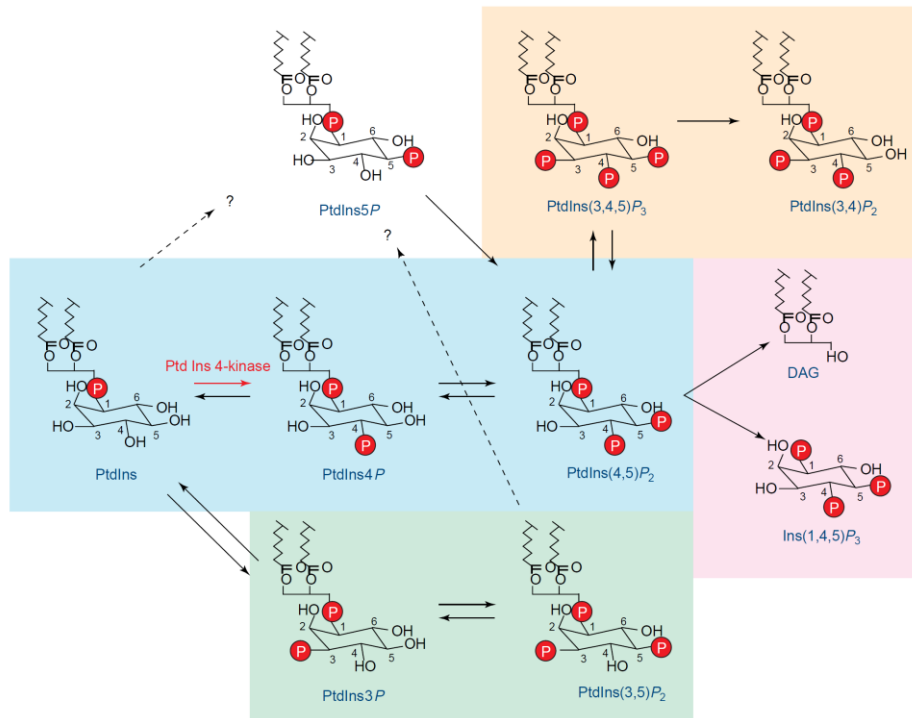
Az angiotenzin II (AngII) a hormonoknak abba a csoportjába tartozik, mely az inozitol lipidek metabolizmusának megváltoztatásán keresztül fejtik ki hatásaikat. Az MTA Doktori Értekezésben ismertetett kutatómunkámban a foszfoinozitidekkel és a szintézisükben fontos egyik enzim, a foszfatidilinozitol (PtdIns) 4-kinázzal, valamint az 1-es típusú angiotenzin receptorral (AT1-receptor) foglalkoztam. A kutatásaim során kiemelten foglalkoztam az AT1-receptor stimulusa során bekövetkező celluláris foszfoinozitid szintek változásával, valamint ezek szintéziséért felelős lipid kinázokkal, illetve a plazmamembrán PtdIns 4,5-biszfoszfát szerepének felderítésével a receptor működésében.

1.1.1 A foszfoinozitidek és a szintézisükben fontos lipid kinázok

Az inozitol tartalmú foszfolipidek hozzávetőlegesen 5-10%-a foszforilált az inozitolgyűrű egy vagy több pontján az emlős sejtekben. A foszfatidilinozitol (PtdIns) anyagszere a figyelem központjában áll a jelátvitelben játszott szerepének felismerése óta. A PtdIns 4,5-biszfoszfátot [PtdIns(4,5) P_2], a sejtet érő extracelluláris hatásokra a foszfoinozitid-specifikus foszfolipáz C (PLC) hidrolizálja és ezzel két másodlagos hírvivőt hoz létre, az inozitol 1,4,5-triszfoszfátot [Ins(1,4,5) P_3] és a diacilglicerint (DAG). A PtdIns poláris és hidrofób részből áll, a poláris részén elhelyezkedő inozitolgyűrűben öt szabad hidroxil csoport van, melyek potenciálisan mind foszforilálódhatnak (1. ábra). A foszfoinozitidek a lipid természetüknél fogva a sejtek membránjaiban helyezkednek el és igen szerteágazó szereppel bírnak. A foszfoinozitidek bioszintézisének legfontosabb első lépését a különböző foszfatidilinozitol (PtdIns) 4-kináz izoformák katalizálják. A képződött PtdIns 4-foszfátot PtdIns 4-foszfát 5-kináz tovább foszforilálja PtdIns(4,5) P_2 -vé, amely másodlagos hírvivők prekuzora. A sejteket ért egyes stimulusok során, pl. az AT1-receptor fiziológiai stimulusa után a PtdIns(4,5) P_2 koncentrációja erősen lecsökken, de hamar újraképződik, ami bioszintézisének szabályozottságára utal. Ebben fontos tényező a PtdIns 4-kináz működése, amely a PtdIns(4,5) P_2 képződéséhez vezető foszforilációs folyamatban az első elkötelező lépést katalizálja.

A PtdIns 4-kináz (EC 2.7.1.67.) a PtdIns inozitolgyűrűjét D-4 helyzetben foszforilálja az ATP γ -foszfátjával. A PtdIns 4-kináz család négy izoformát tartalmaz, melyek két csoportba oszthatók. Korai enzimológiai munkák az adozin-gátlás és a nem-ionos detergensnek iránti

érzékenység alapján három csoportba osztották a foszfatidilinozitol kinázokat. Ezen osztályozás szerint az I-es típusú foszfatidilinozitol kináz a PtdIns 3-kinázok lettek, míg az addig ismert két PtdIns 4-kináz izoformát II-es és III-as típusúnak nevezték el.

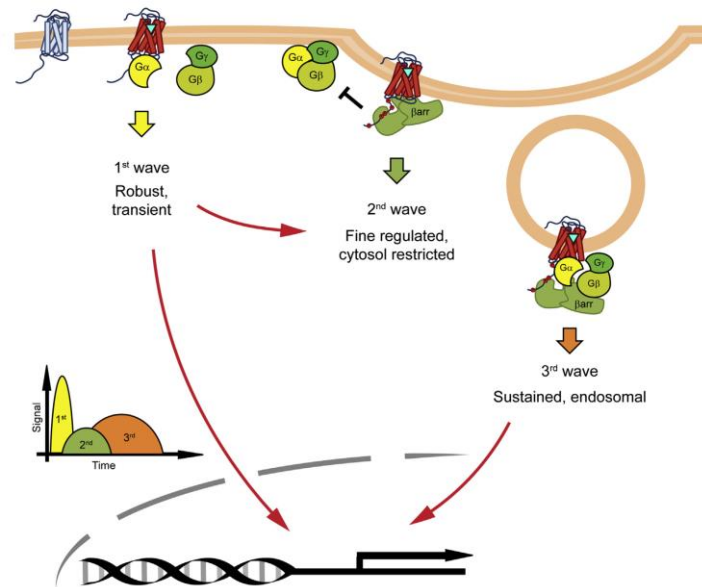


1. ábra: A foszfoinozítidek metabolizmusa. A foszfoinozidek az inozitolgyűrű különböző helyein foszforilálódhatnak. (Balla A *et al.*: Trends in Cell Biology, 2006).

1.1.2 G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR)

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) alkotják a plazmamembrán-receptorok legnagyobb csoportját, melyek az extracelluláris, illetve a külső téréből érkező jelek közvetítésében vesznek részt. Szerkezeti felépítésükre jellemző, hogy 7 transzmembrán doménnel rendelkeznek, amino-terminális végük a plazmamembrán sejten kívüli felszínén, míg karboxi-terminális végük a citoszólikus felszínen található. Ezen típusú receptorok a ligandumaik kötését követően úgynevezett heterotrimer G-fehérjéket aktiválnak, majd ennek következtében az adott receptorra jellemző sejten belüli jelpályák indulnak be, melyek kiváltják a sejtválaszt. A különböző típusú GFKR-ok eltérő heterotrimer G-fehérjét kötnek, mely alapjául szolgál a specifikus sejtválasznak, és legtöbbször a G α alegység típusa alapján csoportosítjuk receptorokat. A tézisem központjában lévő AT1 angiotenzin receptor a legfőbb hatásait a G $\alpha_{q/11}$ -hez kapcsolva fejt ki, mely a PLC β aktiválásán keresztül a plazmamembrán PtdIns(4,5)P₂ hasítását és következményes kalcium jelet vált ki. A GFKR-ok ligandum kötése következtében nemcsak sejten belüli szignalizáció, hanem egyéb szabályozási mechanizmusok

is aktiválódnak. Többek közt a GFKR-ok agonista stimulus hatására G-fehérje kapcsolt receptor kinázok (GRK) által foszforilálódnak, mely elindítja a receptorok β -arresztin kötését és deszenzitizációját. A kötődött arresztin fehérjék scaffold (váz) fehérjeként elindítják azon folyamatokat, melyek a receptor internalizációjához (sejt belsejébe helyeződés) vezetnek. Az arresztin fehérjék nemcsak a receptorok internalizációjában játszhatnak szerepet, de újabb jelátviteli mechanizmusok szervezésében is hozzájárulhatnak (2. ábra).



2. ábra. A GFKR-ok jelátviteli sémája. Agonista kötésére létrejövő receptor aktiváció komplex jelátviteli mechanizmusokat és sejtválaszokat indíthat el G-fehérje-függő, illetve β -arresztin mediált módon is (Tóth AD, Turu G, Hunyady L, Balla A.: Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2018).

Az elmúlt években nyilvánvalóvá vált, hogy a más-más receptorkonformációkhoz köthető, eltérő jelátviteli utak és receptorszabályozási útvonalak szelektív, útvonal-specifikus ligandumok által befolyásolhatók. Lehetséges, például a receptor internalizációját szelektíven, G-fehérje-aktiválás nélkül elindítani, így a receptor működését leállítani. Ennek ellenkezője is megvalósítható: szelektív ligandum alkalmazásával internalizáció és deszenzitizáció nélkül G-fehérje aktiválást létrehozni, így kisszámú sejtfelszíni receptorral is nagy sejtválaszt lehet elérni.

1.1.3 Az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT1-receptor)

Az angiotenzin II (AngII) egy oktapeptid hormon, amely a renin-angiotenzin rendszer fő effektor hormonja. Az AngII központi szerepet játszik a vérkeringés és a só-vízháztartás szabályozásában. Az AngII a célsejtek felszínén található specifikus GFKR-hoz, az AT1-receptorhoz (AT1R) kötődik. Az aktiválódást követő jelátviteli folyamatok egyrészt azonnali

válaszokat hoznak létre (pl. aldoszteron szekréció, vazokonstrikció, szomjúságérzet), másrészt hosszabb távon sejtproliferációs, differenciálódási és apoptotikus folyamatokat szabályoznak. Az AT1R agonista kötésre bekövetkező aktivációja $G_{q/11}$ -fehérjén keresztül intracelluláris Ca^{2+} -jel kialakulásához és PKC aktiválásához vezet, illetve képes mitogén aktivált protein kináz (MAP kináz, MAPK) kaszkádok aktiválására is. Az AT1-receptor MAPK-kaszkád DAG/PKC úton történő aktiválásával is eredményez növekedési faktor-szerű hatásokat, ám ezen útvonal önmagában valószínűleg nem lenne elég az AngII által hosszútávon kiváltott proliferációt, hipertrofiát és migrációt okozó sejtválaszaihoz. Ezen jelenségek hátterében döntő szerepet játszik az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor (EGFR) transzaktivációja, mely során egy mátrix-metalloproteáz (MMP) a pro-Hb-EGF (pro-heparin kötő epidermális növekedési faktor) fehérjét aktív, szolubilis Hb-EGF-fé hasítja, mely az EGFR-hez kötődve MAPK-ok aktiválódását okozza a sejtekben.

A vaszkuláris simaizomsejtekben (VSMC), amely az AngII egyik legfőbb célsejtje, a receptor stimulus legismertebb rövid távú hatása a simaizomsejtek összehúzódása, és ezen keresztül az artériás vérnyomás emelkedése. A hosszú távú hatások különböző génexpressziós változásokon keresztül nyilvánulnak meg, melyek az AngII káros hatásaiért is felelősek. Ezek közül a legjelentősebb a különböző szív- és érrendszeri betegségek, például a magas vérnyomás, az érfal remodelling, az érlemezésedés, a szív hipertrofia, a szívizom fibrózis és a szívelégtelenség kialakulása. A renin-angiotenzin rendszer működésének befolyásolásával, az angiotenzin konvertáló enzim gátlókkal és az AT1-receptort blokkoló vegyületekkel kedvező eredményeket értek el a magas vérnyomás és más keringési betegségek kezelésében.

Az aktivált AT1R kapcsolódik a β -arresztin fehérjékkel, melyek jelátviteli folyamatok szervezésében (pl. MAP kináz kaszkád második hullámának aktiválása) is részt vesznek. Az aktivált AT1R szorosan kötődik a β -arresztin molekulához és kapcsolódásuk a receptor internalizációja közben is megmarad. Napjainkra elfogadott, hogy a β -arresztin fehérjék felelősek az AT1R G-fehérje független jelátviteli mechanizmusaiért. Úgy tekinthetünk ezen β -arresztin közvetített mechanizmusokra, mint a jelátviteli események második hullámára (2. ábra).

Az AT1R jelátvitel-szelektív aktivációja során a különböző ligandumok eltérő aktív konformációban stabilizálhatják a receptort, mely így eltérő mértékben képes aktiválni a különböző jelátviteli útvonalakat. Számos jelátvitel-szelektív AngII analóg AT1R agonista ismert, melyek által aktivált AT1R nem képes G-fehérjét kötni, azonban β -arresztin-kötése, ezáltal pedig a G-fehérje-független jelátvitele továbbra is megmarad, mely klinikailag igen előnyös hatáskombinációt eredményezhet.

1.2 Célkitűzések

1. A PtdIns 4-kinázok különböző izoformáinak tanulmányozása biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel abból a célból, hogy jobban megismerjük működésüket és a sejtekben betöltött szerepüket.
2. Az AT1-receptor jelátvitelében alapvető hormon-szenzitív foszfoinozitidek szintéziséért felelős PtdIns 4-kináz izoforma azonosítása.
3. Kis G-fehérje aktiválódás vizsgálata az AT1-receptor stimuláció hatására, illetve az ehhez szükséges molekuláris biológiai és metodikai háttér létrehozása.
4. Az AT1-receptor deszenzitizációjának és mozgásának tanulmányozása agonista stimulus hatására.
5. A plazmamembrán PtdIns(4,5) P_2 és a foszfatidilinozitol 4-kinázok szerepének vizsgálata az AT1R internalizációjában.
6. Az AngII által indukált génexpressziós változások vizsgálata, valamint a változásokért felelős jelátviteli útvonal feltérképezése vaszkuláris simaizomsejtekben.

2. A KÍSÉRLETEK RÖVID LEÍRÁSA, MÓDSZEREK

2.1. PtdIns 4-kináz aktivitás mérése

A PtdIns 4-kináz aktivitás mérése során a [γ - 32 P]ATP-ből a PtdIns-ba beépülő radioaktív foszfát mennyiségét határoztuk meg. A képződő PtdIns 4-foszfát savas közegben történő kloroform-metanolos extrakcióval választható el a be nem épült ATP-től és a foszfoproteinektől. A PtdIns-be beépült radioaktív foszfát mennyiségét folyadékszintillációs spektrométerrel mértük. A terméket néhány kísérleti felállásban vékonyréteg kromatográfiával azonosítottuk.

2.2 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és western blot kísérletek

Különböző fehérjék méret szerinti elválasztásához SDS-poliakrilamid gélelektroforézist használtunk. Western blot kísérletek esetén az elválasztott fehérjéket polivinilidén-fluorid membránokra átblottoltuk. A különböző primer antitestek tulajdonságaitól függően az inkubálás körülményei, időtartam, hígítások eltérhettek egymástól. Az antitesteket felerősített kemilumineszcencia módszerrel tettük láthatóvá.

2.3 Bioszenzorok és egyéb DNS konstruktok létrehozása

Az AT1R és a különböző PtdIns 4-kinázok funkcióinak vizsgálata céljából fúziós és mutáns fehérjéket állítottunk elő standard molekuláris biológiai módszerekkel. A létrehozott konstrukciókat, illetve a mutagenézist tartalmazó cDNS-eket restriktációs emésztéssel azonosítottuk, majd a szekvenciákat DNS-szekvenálással ellenőriztük.

2.4 Sejtkultúra

Kísérleteinkhez általában kétféle humán embrionális vesesejtet (HEK293, illetve HEK293T) vagy COS7 (majomvese sejtvonala) alkalmaztunk. A génexpressziós vizsgálatinkhoz patkányból származó vaszkuláris simaizom sejttenyészeteket használtunk.

2.5 Rekombináns fehérjék előállítása

Számos kérdés megválaszolásához szükség volt fehérjék (pl. különböző PtdIns 4-kináz izoformák, illetve különböző mutáns fehérjék) rekombináns fehérjeként való előállítása is. Ehhez *E. Coli* baktériumokat (BL21-es törzs) transzformáltunk a fehérjéket kódoló pET23b expressziós konstrukttal. A tisztított fehérjék tisztaságát SDS poliakrilamid gélben ellenőriztük, illetve mennyiségüket fehérje koncentrációméréssel állapítottuk meg.

2.6 Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz ZEISS LSM410, LSM510, illetve egy LSM710 pásztázó lézer konfokális rendszert használtunk. A konfokális felvételek elemzését ZEN, illetve MetaMorph szoftverek segítségével végeztük el.

2.8 Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer módszer

A BRET (biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer) módszer két fehérje vagy fehérjerészlet közötti molekuláris közelség mérését teszi lehetővé nagy érzékenységgel, mivel a mérés során nincs szükség excitáló fény használatára. A BRET méréseket a *Renilla* luciferáz szubsztrátjának, a coelenterazin *h*-nak (5 μ M) hozzáadását követően kezdtük meg. A vizsgálataink során homogén sejtszuspenzió osztásával létrehozott kísérleti mintákon végzünk önkontrollos kísérleteket.

2.9 RNS izolálás sejttenyészetből, cDNS készítés és qPCR

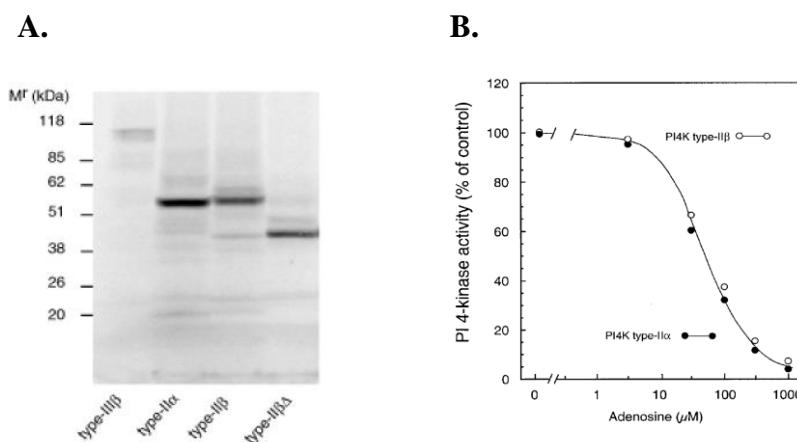
Az RNS preparálását megelőzően a megfelelő kísérletekben a stimulust a médium eltávolításával szüntettük meg, majd a teljes RNS mennyiséget izoláltuk a sejtekből. Az AngII-indukált génexpressziós változások meghatározásához kvantitatív PCR-t használtunk, a keresett gének expresszióját a *Gapdh* referencia gén expressziójához viszonyítottuk.

3. A TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

3.1 PtdIns 4-kináz izoformák azonosítása és jellemzése

3.1.1 A II-es típusú PtdIns 4-kinázok vizsgálata

Munkánk során a PtdIns 4-kinázok különböző izoformáit kívántuk tanulmányozni, hogy jobban megismerjük működésüket és a sejtekben betöltött szerepüket. Kutatómunkám során sikerült elsőként klónozni a II-es típusú PtdIns 4-kináz β izoformáját (újabb nomenklátúra szerint PI4K2B). Kimutattuk, hogy ezen izoforma enzimaktivitása kisebb, mint a II α -é, és mindkettő csak PtdIns-t képes szubsztrátként használni (3. ábra).



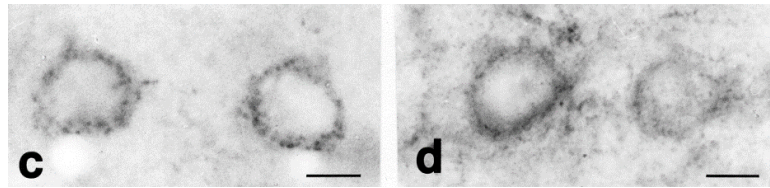
3. ábra. Egy új PtdIns 4-kináz (PI4K) izoforma klónozása és alapvető tulajdonságainak meghatározása. (A) PI 4-kinázok *in vitro* transzlációja. A PtdIns4KIII β , a PtdIns4KII α , a PtdIns4KII β , illetve a PtdIns4KII β egy variánsának cDNS-ét tartalmazó expressziós vektorjainak felhasználásával vizsgáltuk az izoformák expresszióját. (B) Expresszált PI 4-kináz izoformák tulajdonságainak jellemzése során kimutattuk, hogy a II-es típusú formák adozin érzékenysége nagyon hasonló (Balla A, *et al.*: J Biol Chem. 2002).

Demonstráltuk, hogy mindkét II-es típusú PtdIns 4-kináz főleg az intracelluláris membránokban lokalizálódik és csak kis mennyiség található a plazmamembránon. Kimutattuk, hogy az AngII stimulus hatására a II-es típusú PtdIns 4-kináz lokalizációja nem változik meg számottevően és hogy ugyanabban a kompartmentben található, amelyikben az endocitózisra került AT1-receptor.

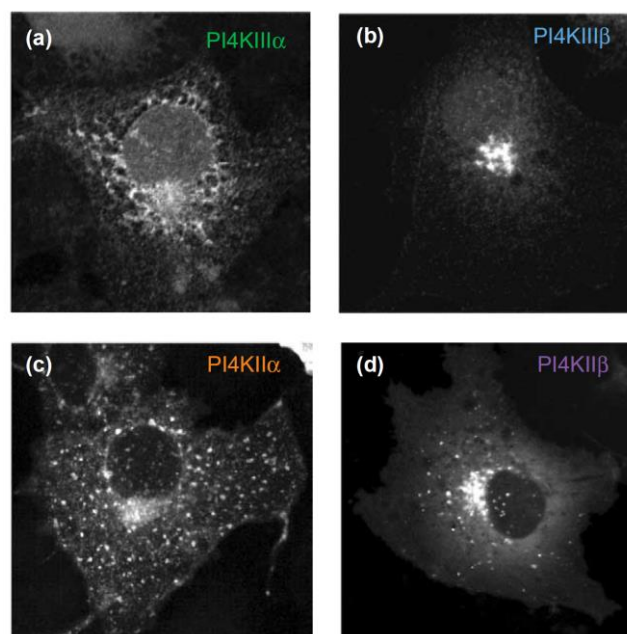
3.1.2 A III-as típusú PtdIns 4-kinázok vizsgálata

A korai foszfatidilinozitol kináz kutatások arra irányultak, hogy vizsgálják, milyen szerepe van ezen enzimeknek az agonista-szenzitív, plazmamembránban található PtdIns(4,5) P_2 -pool fenntartásában és ezáltal a DAG és Ins(1,4,5) P_3 képződésében. Előzetes munkák alapján annyit lehetett tudni, hogy ezen foszfinozitidek képzéséért valamelyik III-as típusú PtdIns 4-kinázok izoforma felelhet. Csalódást keltő eredmény volt, hogy sem az endogén (4. ábra), sem a sejtekben expresszálatott III-as típusú PtdIns 4-kinázok nem mutattak

számottevő plazmamembrán lokalizációt (5. ábra), ezért másféle megközelítéssel próbáltuk a kérdést megközelíteni.

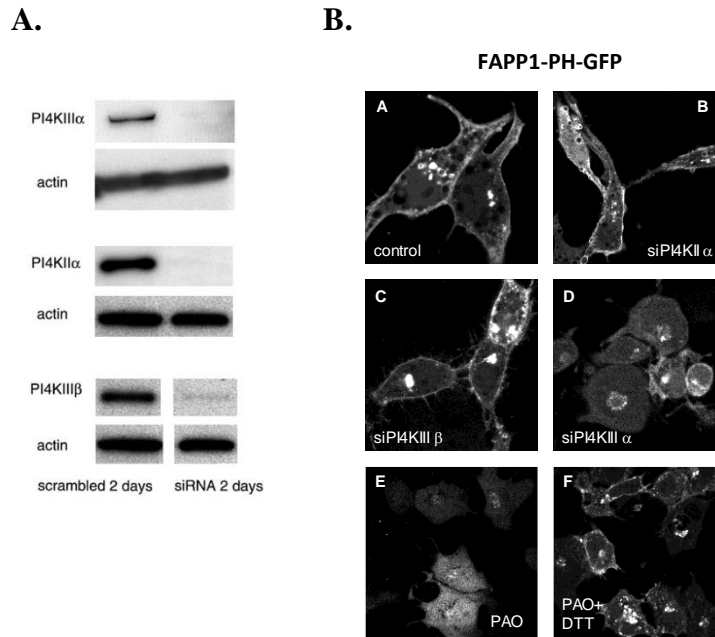


4. ábra. A *PtdIns4KIIIα* és a *PtdIns4KIIIβ* immunlokalizációjának összehasonlítása patkány agyban. Fénymikroszkópos felvételek patkányok agykéreg lamina IV. rétegéből anti-*PtdIns4KIIIα* (c) és *IIIβ* (d) immunreakcióról. (10 μm). (Balla A, *et al.*: Exp. Brain Res. 2000).



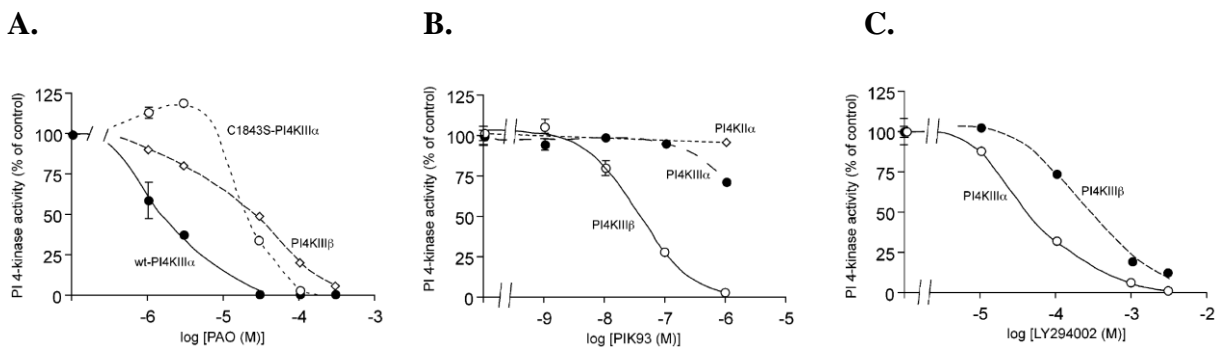
5. ábra. A különböző *PtdIns 4-kináz (PI4K)* izoformák elhelyezkedése a sejtekben. (a-d) COS7 sejtek különböző *PtdIns4-kináz* expressziós vektorokkal transzfektáltak, majd 24 óra múlva detektáltuk az expresszálandó izoformák elhelyezkedését konfokális mikroszkóppal (Balla A *et al.*: Trends in Cell Biology, 2006).

A munkáink során sikerült a sejtmembrán *PtdIns(4)P* szintjének változtatására alkalmas rendszer kidolgozni és jellemezni. Az OSBP, illetve a FAPP1 fehérjék *PtdIns(4)P* specifikus PH doménjeinek felhasználásával, valamint különböző gátlószerekkel és géncsendesítőes módszerekkel igazoltuk, hogy a plazmamembrán *PtdIns(4)P* szintéziséért a *PtdIns 4-kináz IIIα* formája felel (6. ábra).



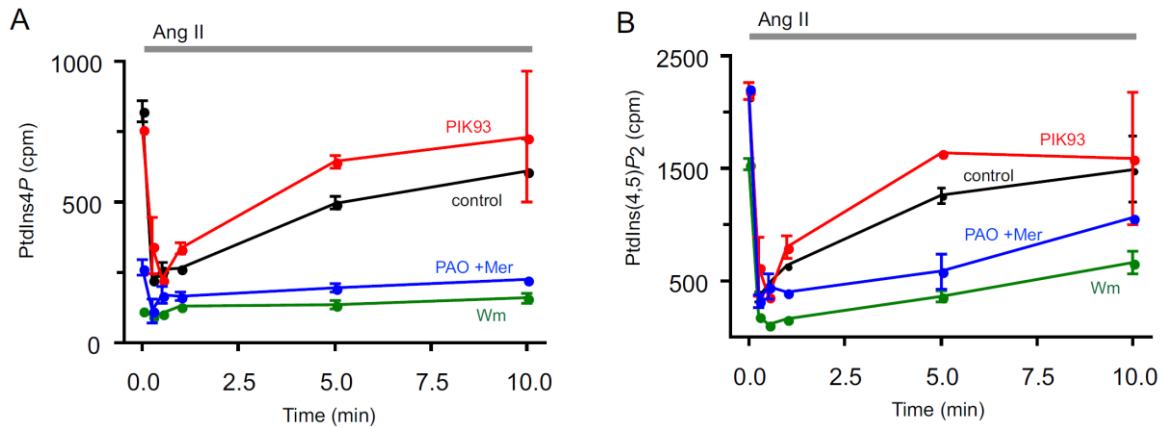
6. ábra. A plazmamembrán *PtdIns(4)P* szintéziséért a *PtdIns* 4-kináz III α izoformája felel. (A) A különböző *PtdIns*4K (PI4K) izoformák lecsendesítése siRNS technikával történt, a specificitást és a hatékonyságot western-blot módszerrel igazoltuk. (B) COS7 sejtekben *PtdIns(4)P*-t felismerő FAPP1-PH-GFP szondát expresszáltattunk, majd ionomycinnel (iono) indukált Ca^{2+} -jel generálása után a sonda transzlokációját vizsgáltuk. A *PtdIns* 4-kináz III α genetikai lecsendesítése („D”), illetve 10 μ M fenil-arzén(III)-oxid (PAO), mely csak a *PtdIns* 4-kináz III α izoformát gátolja plazmamembrán *PtdIns(4)P*-reszínézisét meggátolta (Balla A *et al.*: Mol Biol Cell. 2005).

További kísérleteinkben különböző kináz mutánsok (pl. wortmannin inszenzitív III-as típusú *PtdIns* 4-kinázok) létrehozásával, valamint gátlószeres- és enzimológiai vizsgálatok eredményeképp sikerült olyan körülményeket létrehoznunk, amelyek segítségével a *PtdIns* 4-kináz III α és a *PtdIns* 4-kináz III β működését szelektíven gátolhattuk kísérleteinkben (7. ábra).



7. ábra. A *PtdIns* 4-kinázok eltérő gátlószere érzékenysége. A különböző *PtdIns* 4-kináz izoformákat *E. Coli* baktériumokban (BL21-es törzs) termeltettük, majd nagy tisztaságban izoláltuk az enzimeket. Vizsgáltuk a *PtdIns* 4-kinázok (A) PAO (B) PIK93 és (C) LY294002 szenzitivitását enzim aktivitásmérésekben (Balla A *et al.*: Biochemistry. 2008).

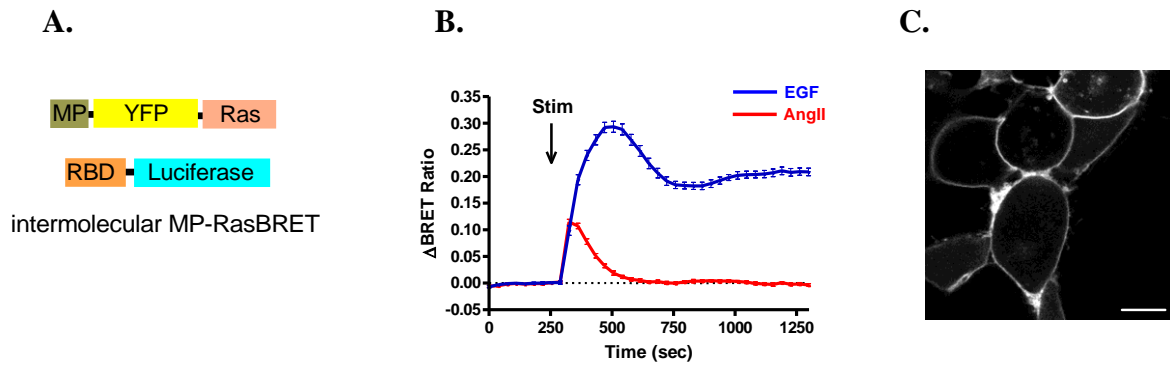
Előzetes munkáink során létrehozott eszköztár segítségével sikerült tisztáznunk, hogy az AT1-receptor jelátvitelében kitüntetett, ún. hormon-szenzitív PtdIns(4,5) P_2 képzéséért a PtdIns 4-kináz III α felelős (8. ábra). A gátlószeres kísérleteinket a PtdIns 4-kinázok expressziójának siRNS-sel történő, specifikus csökkentésével végzett kísérleteinkben is megerősítettük.



8. ábra. PtdIns 4-kináz inhibitorok hatása az AT1-receptor stimulációjára bekövetkező foszfoinozítid szintekre. AT1-receptort stabilan expresszáló HEK293 sejtekhez a megjelölt időben történő 100 nM AngII stimulus előtt 3 órával radioaktívan jelölt foszfáttal kezeltük. A hormon stimulus után a sejtek foszfoinozítidjeit vékonyréteg kromatográfiával azonosítottuk. (A) PtdIns(4) P és (B) PtdIns(4,5) P_2 mennyiségét PhosphorImager segítségével kvantifikáltuk és látható, hogy mindkét foszfoinozítid reszintézisét jelentősen lecsökkentette a csak PtdIns 4-kináz III α gátlását okozó PAO koncentráció, ellenben a PtdIns 4-kináz III β -re specifikus PIK93 gátlószer nem csökkentette ezen foszfoinozítidok reszintézisét (Balla A *et al.*: Mol Biol Cell. 2008).

3.2 Kis G-fehérje aktiválódás vizsgálata az AT1-receptor stimuláció hatására

Az AT1R a heterotrimer G-fehérjéken kívül kis G-fehérjék (pl. Ras) aktiválásán keresztül is szabályoz egyes sejtfunciókat, mint pl. a génexpressziót, aktin citoskeletont, vezikuláris transzportot és a mikrotubulus szerveződést. Ezen folyamatok pontosabb megértése alapvető a kardiovaszkuláris remodelling, endothel diszfunkció és egyéb patológiás történések vizsgálatában. Olyan bioszenzorokat hoztunk létre, melyek segítségével BRET módszerrel élő sejtekben lehet nyomon követni e jelátviteli mechanizmust. A szondák felhasználásával megvizsgáltuk a kis G-fehérje aktiválódást a sejtek különböző kompartmentjeiben növekedési faktorok és hormonok hatására élő sejtekben. A BRET szondáinkkal végzett mérések alapján a plazmamembránra targetált RasBRET szondák agonista stimulusra BRET-jel emelkedést mutatnak (9. ábra). A sejtek belsejébe targetált szondák esetében a transz-Golgi-hoz, az endoplazmatikus retikulumhoz, illetve a mitokondrium külső membránjához targetált konstrukt mutatott Ras aktiválódást. Különböző AT1R konstruktok koexpressziójával (vad típus és internalizációra képtelen mutáns) megállapítottuk, hogy Golgin és endoplazmatikus retikulumon kapott aktiválódás a plazmamembránnal áll kapcsolatban, míg a mitokondriumok esetében az internalizált receptorok okozzák a kis G-fehérje aktiválódást.



9. ábra. Az intermolekuláris MP-RasBRET a plazmamembránban detektálja a Ras aktiválódását. (A) Az intermolekuláris RasBRET szonda két különálló polipeptid láncból áll. (B) BRET-jelek változása stimulus (50 ng/ml EGF vagy 100 nM AngII) hatására HEK293 sejtekben. (C) Az MP-targetáló szekvencia a plazmamembránba irányítja a BRET szondát, amelyet konfokális mikroszkóppal ellenőriztünk (Balla A *et al.*: J Biol Chem. 2011).

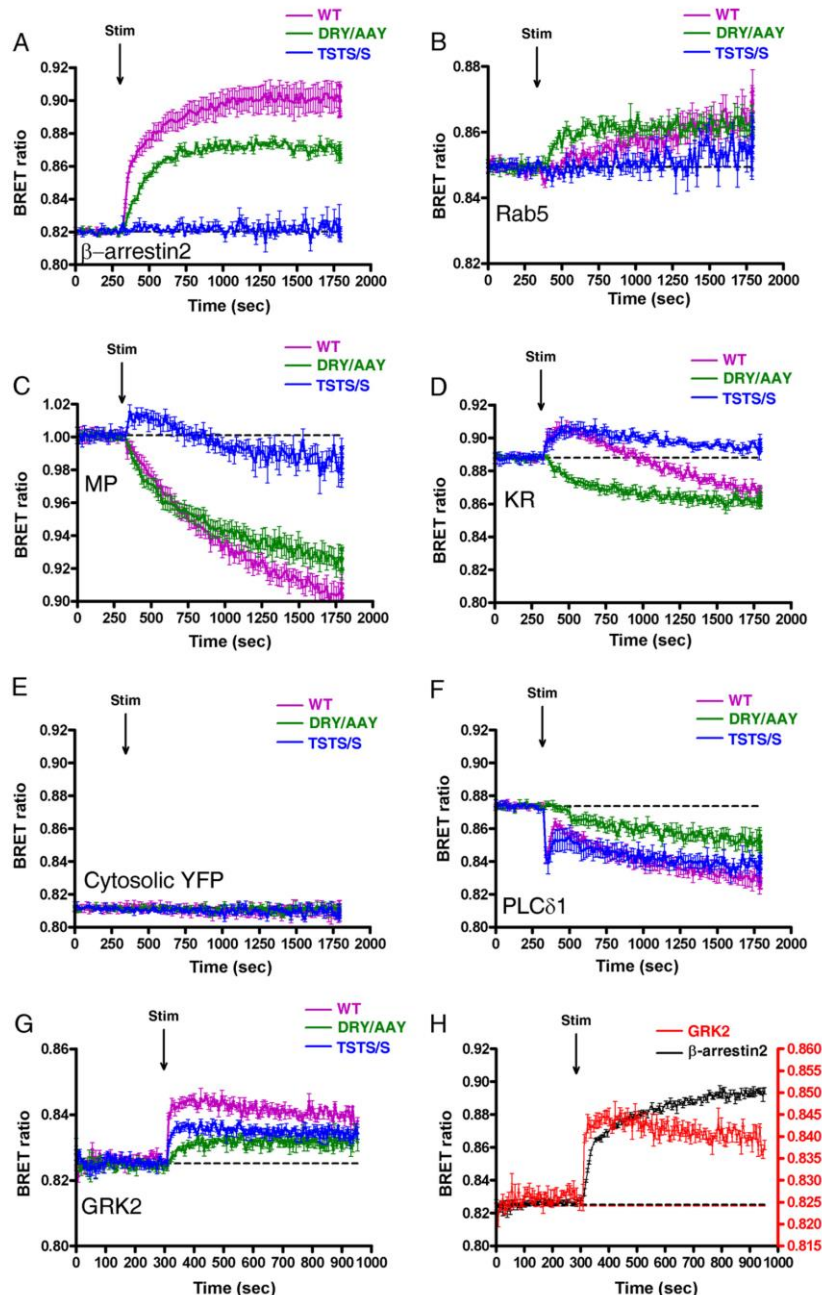
3.3 Receptor deszenzitizáció kimutatása

Az AT1-receptor aktiválódását követően rövid idővel elindulnak a deszenzitizációs mechanizmusok is. Ahhoz, hogy az agonista indukált AT1-receptor interakcióját más fehérjékkel jellemezzük a receptort *Renilla* luciferázzal, míg az interakciós fehérjét YFP-vel jelöltük, majd a fúziós fehérjéket HEK293 sejtekben fejeztük ki és intermolekuláris BRET méréseket végeztünk. Az AT1-receptor stimulálása után bekövetkező deszenzitizációja másodperceken-perceken belül megtörténik, és ezt a GRK-ok által végzett foszforiláció okozza, majd a β -arresztinek a foszforilált receptort szétkapcsolják a G fehérjétől és beindítják az endocitózist (10. ábra, A és B panel). BRET mérés időbeni felbontása azt is lehetővé teszi, hogy kimutassuk a különböző folyamatok sorrendiségét és sikeresen demonstráltuk, hogy az AT1-receptor agonista indukált GRK kötése megelőzi a β -arresztin kötését a receptorhoz (10. ábra, H panel).

3.4 Az AT1-receptor lokalizációjának megváltozása agonista hatására

Megvizsgáltuk, hogy vajon az AT1R aktiválódása során megváltoztatja-e a receptor lokalizációját a plazmamembrán különböző mikrodoménjeiben, mielőtt receptor-mediált endocitózis következtében internalizációra kerül. Az AT1-receptor-luciferáz és a különböző lipid "tutajok" megjelölésére használt konstruktok segítségével BRET mérésekkel követtük a receptor eloszlásának változását hormon-stimulus hatására. Eredményeink szerint a mirisztoil és palmitoil (MyrPalmYFP) csoporttal kihorganyzott fehérjék nyugvó sejtekben jelentős BRET interakciót mutattak az AT1-receptorral, mely AngII hatására csökkent, ami arra utal, hogy a receptor AngII hatására a koleszterol- és szfingolipid-gazdag lipid mikrodoménékből más kompartmentekbe helyeződik át. Ezt az áthelyeződést igazoltuk olyan plazmamembrán

bioszenzor segítségével (KR-YFP), mely a plazma membrán rendezetlen mikrodoménjében helyezkedik el, mivel a KR-YFP és AT1-R-luciferáz jelentősen emelkedett BRET interakciót mutatnak AngII hatására a receptor internalizációja előtti időpontokban. További kísérleteinkben az AT1-R konzervált AAY szekvenciájának DRY mutációjával kimutattuk, hogy ezen mozgás a különböző plazmamembrán mikrodomének között G-fehérjétől nem független folyamat HEK293 sejtekben (10. ábra, C és D panel).



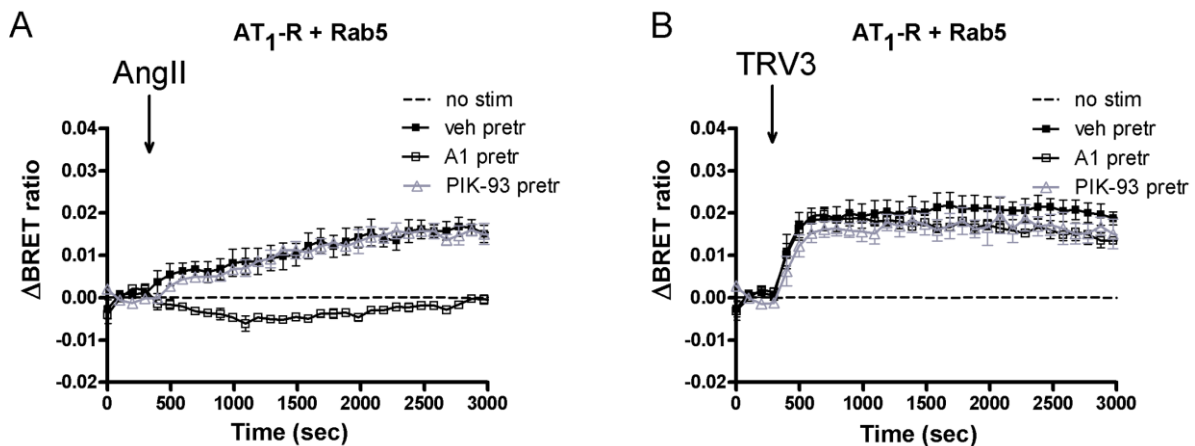
10. ábra. BRET-jel változása az AT1-receptor és YFP-vel jelölt fehérjék között AngII stimuláció után. HEK293 sejteket transzfektáltunk vad típusú (WT) vagy a jelzett mutáns AT1R-Rluc, illetve YFP-fúziós fehérjék plazmidjaival. A jelzett időpontban 100 nM AngII vagy vehikulum (szaggatott vonal) hozzáadásával stimuláltuk a sejteket. A BRET görbék legalább három független kísérlet eredményei. Átlag \pm SEM értékeket ábrázoltunk (Balla A *et al.*: J Biol Chem. 2012).

3.5 Az AT₁-receptor internalizációjának vizsgálata

Kimutattuk, hogy AngII ingerlés hatására a vad típusú AT₁R-hoz képest gyorsabban jelent meg a G-fehérje kötésére képtelen DRY/AAV jelátvitel-szelektív mutáns AT₁R a Rab5-tartalmú korai endoszómákban. β -arresztin jelátvitelre szelektív AngII analóg, úgymint SI-AngII, SII-AngII, TRV120023, vagy TRV120027 ligandumok hatására is az AT₁R gyorsabb korai endoszómákban való megjelenését tapasztaltuk összevetve az AngII ingerléssel. Konfokális mikroszkópiával is bizonyítottuk, hogy a jelátvitel-szelektíven aktivált AT₁R korai internalizációja felgyorsult.

3.6 A PtdIns 4-kinázok és a PtdIns(4,5)P₂ szerepének vizsgálata a receptor működésében

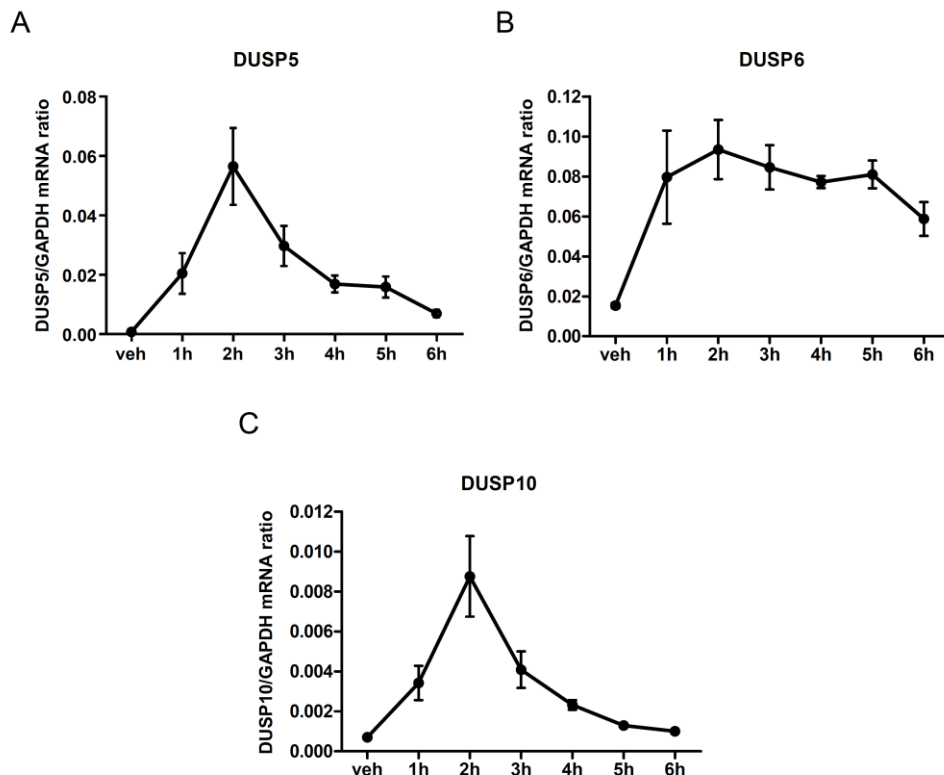
Demonstráltuk, hogy a plazmamembránban található PtdIns(4,5)P₂ foszfoinozítid esszenciális szereppel bír az AT₁-receptor endocitózisának szabályozásában. Igazoltuk, hogy a β -arresztin jelátvitelre szelektív ligandumjaink (SI-AngI, SII-AngII, TRV120023 és TRV120027), valóban nem hoznak létre G-fehérje aktivációt és így PtdIns(4,5)P₂ bontást. A PtdIns4KIII α izoforma gátlásával (A1 szelektív inhibitorral) teljesen megszűnt az AT₁R korai endoszómákban való megjelenése AngII, AngIV hatására, azonban TRV3 ingerlésnél nem tapasztaltunk változást. Ezzel ellentétben a PtdIns4KIII β gátlása a PIK93 inhibitorral nem okozott változást a receptor internalizációs viselkedésében (11. ábra).



11. ábra. PtdIns 4-kináz gátlószereinek hatása AT₁-receptor internalizációjára. Különböző agonisták által aktivált AT₁R internalizációját BRET mérésben követtük nyomon HEK293 sejteken. A mérés előtt a sejteket 10 percig előkezeltük médiummal („veh pretr”), PtdIns4KIII α specifikus gátlószerként 10 nM A1-el vagy a PtdIns4KIII β izoformát specifikusan gátló PIK-93-al, 250 nM-os koncentrációban. A jelzett időpontokban vehikulumot (A és B panelek, szaggatott vonal), 100 nM AngII-t (A panel) vagy 1 μ M TRV3-at (B panel) adtunk a sejtekhez. Az ábrákon három független kísérlet, triplikátumokban mért eredményei láthatók, átlag \pm SEM érték formátumban (Szakadátí G, Tóth AD, Oláh I, Erdélyi LS, Balla T, Várnai P, Hunyady L, [Balla A.](#): Mol Pharmacol. 2015).

3.7 Az AT1R génexpresszóra kifejtett hatásának vizsgálata

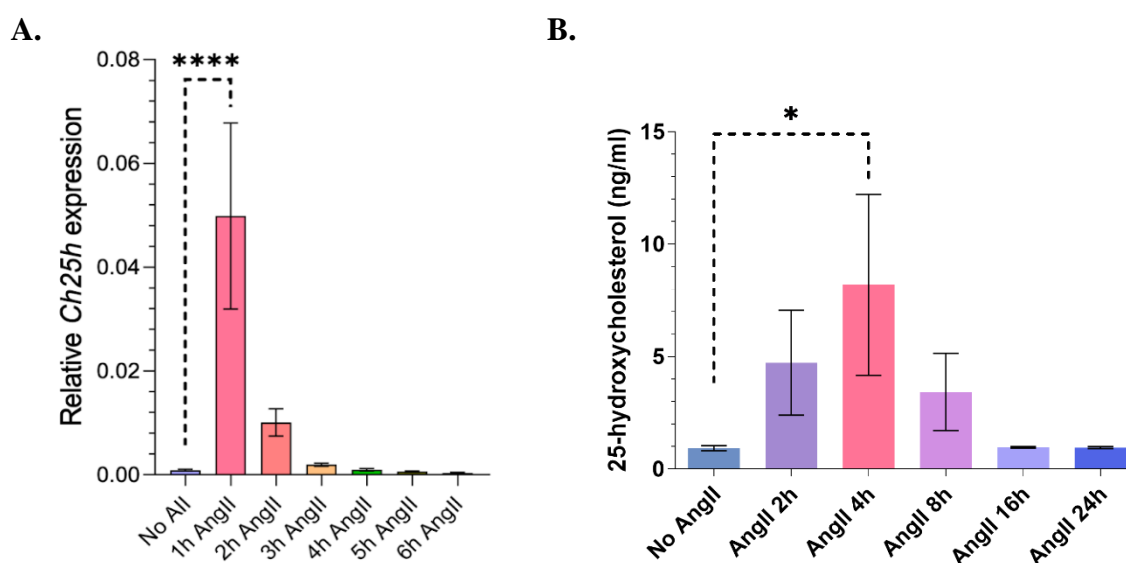
Az AT1-receptor aktiválása számos jelátviteli utat indít el az AngII fiziológias célsejtjeiben, amelyek különféle rövid- és hosszú távú biológiai hatásokat eredményeznek. A kutatócsoportunk Affymetrix gén-chip módszer alkalmazásával vizsgálta az AngII hatására létrejövő génexpressziós változásokat vaszkuláris simaizomsejtekben (VSMC). A mérések során megállapítottuk, hogy a sejteken végzett 2 órás Ang II stimuláció hatására körülbelül 100 gén expressziójában állt be változás. Részletesebben három DUSP (kettős specifikitású foszfatáz) izoforma expressziós változásait vizsgáltuk, és meghatároztuk a változások időkinetikáját (12. ábra), illetve megvizsgáltuk a változásokhoz vezető jelátviteli útvonalakat is érfal simaizomsejtekben.



12. ábra. Az AngII által okozott DUSP génexpressziós változások időkinetikája. Primer vaszkuláris simaizomsejteket 100 nM AngII-vel stimuláltuk különböző időpontokig. (A) DUSP5, (B) DUSP6 és (C) DUSP10 mRNS szintjeit qPCR kísérletekben határoztuk meg. A függőleges tengelyeken a GAPDH referenciagénhez viszonyított génexpresszió fokozódás mértéke látható. Az ábrákon 5-6 független kísérlet eredményei láthatók (Gém JB, Kovács KB, Szalai L, Szakadati G, Porkoláb E, Szalai B, Turu G, Tóth AD, Szekeres M, Hunyady L, Balla A.: Cells. 2021).

Megvizsgáltunk egy másik, az AngII hatására jelentős génexpresszió fokozódást mutató fehérje, a koleszterin-25-hidroxiláz (CH25H) szerepét érfal simaizomsejtekben. Az oxiszterolok, mint például a CH25H enzim terméke, a 25-hidroxi-koleszterin (25-HC),

elősegíthetik kardiovaszkuláris elváltozások kialakulását. A 25-HC) a lipid metabolizmus és az immunválaszok szabályozásában vesz részt, mindemellett károsíthatja a vaszkuláris simaizomsejteket is. Azonban nem volt ismert kapcsolat a 25-HC termelődése, és az AngII sejtelettani hatásai között VSMC-ben, ezért célunk volt az AngII CH25H expresszióra gyakorolt hatásának feltárása. Megállapítottuk, hogy a koleszterin 25-hidroxiláz mRNA expressziója az AngII stimulus után 1 órával a legmagasabb, illetve kimutattuk, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek az angiotenzin II hatására 25-hidroxi-koleszterint termelnek, mely a sejtekből kijutva az atherosclerosis kialakulásában szerepet játszó gyulladási folyamatokat segítheti elő (13. ábra).



13. ábra. Az AngII stimulus hatása Ch25h kifejeződésére VSMC sejtekben. (A) Primer vaszkuláris simaizomsejteket 100 nM AngII-vel stimuláltuk és a Ch25h gényexpresszió változását mértük qPCR módszerrel. A Ch25h mRNA szinteket a GAPDH referenciagénhez viszonyítva ábrázoltuk. Átlag ± SEM, n =5 független kísérlet. Többszörös lineáris regresszió, ****: p < 0.0001. (B) A simaizomsejteket 1 µM AngII-vel stimuláltuk, a sejtek felülúszóját begyűjtöttük, majd LC-MS/MS mérésel meghatároztuk a minták 25-HC tartalmát és koncentrációját. Átlag ± SEM, n =3 független kísérlet. Többszörös lineáris regresszió, * p<0,05 (Kovács KB, Szalai L, Szabó P, Gém JB, Barsi S, Szalai B, Perey-Simon B, Turu G, Tóth AD, Várnai P, Hunyady L, Balla A.: Int J Mol Sci, 2023).

3.8 Az eredmények gyakorlati jelentősége

A téziseimben olyan kísérleteket mutattam be, melyekben számos módszer felhasználásával követni tudtuk az AT1-receptor stimulusát követő aktiválódást, különböző regulációs lépéseket, foszfoinozitidek szintjében bekövetkező változásokat, illetve receptor-mediált endocitózist élő HEK293 sejtekben, illetve a receptor stimulusára bekövetkező hosszú

távú hatásokat érfal simaizomsejtekben. Példáinkban az AT1-receptor sejtválaszait demonstráltuk, de egyéb plazmamembránban elhelyezkedő receptor vizsgálata is ugyanilyen módon megvalósítható. A különböző bioszenzorok, illetve a molekuláris közelséget érzékenyen kimutató BRET módszer alkalmas a GFKR-ok aktivációjának, jelátviteli mechanizmusainak, endocitózisának, illetve különböző vegyületek ezen sejtválaszokra történő farmakológiai hatásának tanulmányozására élő sejtekben. Az eredmények gyakorlati hasznosítása szempontjából az is lényeges, hogy a jelátviteli folyamatok nyomon követésére kifejlesztett rezonancia energiáttranszferen alapuló módszerek továbbfejleszhetőek nagy számú vegyület hatásának „high-throughput” vizsgálatára. Klinikai szempontból is releváns génexpressziós kísérleti adataink segíthetnek megérteni az AngII által kiváltott hosszú távú, káros hatások patomechanizmusait és felfedhetik az AT1-receptor működésének új aspektusait. Eredményeink hozzájárulhatnak a magasvérnyomás és más keringési betegségek terápiájában fontos célpontot jelentő AT1R működésének jobb megértéséhez. Tekintettel a renin-angiotenzin rendszer gátlásának terápiás jelentőségére az elvégzett munka eredményei támpontul szolgálnak az AT1R blokkolók és az angiotenzin konvertáló enzim gátlók hatásainak és mellékhatásainak jobb megértéséhez. A munkáink eredményeképp több összefoglaló közleményt közzeltünk, melyekben az eredményeink gyakorlati vonatkozásait, illetve a klinikummal való kapcsolatát is igyekeztünk feltárni.

4. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Kimutattuk, hogy a II-es típusú PtdIns 4-kinázok az endoszómákkal asszociálódnak és megklónoztuk a II-es típusú PtdIns 4-kinázok egyik izofomáját (PtdIns4KII β).
2. Bebizonyítottuk, hogy a PtdIns4KIII α enzim szerepet játszik a plazmamembrán a PtdIns(4)*P* szintézisében.
3. Kimutattuk, hogy a PtdIns4KIII α enzim felelős a plazmamembránban az AngII hormonszenzitív PtdIns(4)*P* és PtdIns(4,5)*P*₂ pool képződéséért és fenntartásáért.
4. BRET módszer felhasználásával feltérképeztük az AT1-receptor stimulusát követő aktiválódást, regulációs lépéseket, illetve receptor-mediált endocitózist élő HEK293 sejtekben. Kimutattuk, hogy az angiotenzin receptor megoszlása az aktivációt követően a plazmamembrán különböző mikrodoménjei között megváltozik az internalizációt megelőzően. Adataink alapján ez a mozgás a receptor G-fehérje aktivációjának az eredménye.

5. Kimutattuk az AT1-receptor szelektív aktiválásának következményeit különböző ligandumokkal. Jellemeztük az eltéréseket a receptor β -arresztin2 kötésében, a kalcium jel generálásban és internalizációs képességében a receptor G-fehérje független aktiválódását követően.
6. A kis G-fehérje aktiválódás mérésére létrehozott BRET bioszenzorok alkalmasak növekedési faktorok, hormonok (pl. AngII) szignalizációjának vizsgálatára, illetve különböző vegyületek ezen szignalizációs jelpályákra történő farmakológiai hatásának tesztelésére élő sejtekben, valamint a szondák targetálásával különböző intracelluláris kompartmentekben demonstráltuk kis G-fehérje jelpályák működését. Jellemeztük a Ras kis G-fehérje aktiválódást az AT1R stimulusát követően, illetve kimutattuk, hogy HEK293 sejtekben ez a folyamat nem az EGF-receptor transzaktiváció következménye.
7. Kimutattuk, hogy az AT1-receptor internalizációja lényegesen korábbi időpontban megtörténik, ha a receptor stimulálása G-fehérje független módon történik. Eredményeink alapján a jelátvitel-szelektív agonisták által okozott gyors korai internalizáció nem az eltérő endocitotikus útvonalakon keresztül jön létre, valamint sem az eltérő β -arresztin kötés erősség, sem pedig a Ca^{2+} jel hiánya nem játszik szerepet a folyamatban.
8. Vizsgáltuk a plazmamembrán $PtdIns(4,5)P_2$ szerepét az AT1R teljes agonista és funkcionálisan szelektív agonista indukált internalizációjában. A G-fehérje aktiváció következtében létrejövő $PtdIns(4,5)P_2$ bontás, majd pedig reszintézis meghatározó az AngII által kiváltott lassabb internalizációban.
9. Bebizonyítottuk, hogy a $PtdIns$ 4-kináz III α esszenciális szereppel bír az AT1-receptor endocitózisának szabályozásában.
10. Kimutattuk, hogy az AngII-stimulus hatására számos DUSP izoforma expressziója megemelkedik érfal simaizomsejtekben és bizonyítottuk, hogy ezen változások döntően nem EGF-receptor transzaktiváción keresztül történnek érfal simaizomsejtekben.
11. Kimutattuk, hogy a koleszterin 25-hidroxiláz enzim expressziója jelentősen fokozódik vaszkuláris simaizomsejtekben az angiotenzin II hatására, illetve a stimulus hatására a sejtek 25-hidroxikoleszterint termelnek, mely az atherosclerosis kialakulásában szerepet játszó gyulladáshoz vezető folyamatokat segítheti elő.

5. KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK ÉS TUDOMÁNYMETRIA

a) A doktori értekezés alapjául szolgáló saját eredeti közlemények

1. **Balla, A.**, Vereb, G., Gulkan, H., Gehrman, T., Gergely, P., Heilmeyer, L. M. G., & Antal, M. (2000). Immunohistochemical localisation of two phosphatidylinositol 4-kinase isoforms, P14K230 and P14K92, in the central nervous system of rats. *Experimental Brain Research*, 134, 279-88. **IF: 2,137**
2. **Balla, A.**, Tuymetova, G., Barshishat, M., Geiszt, M., & Balla, T. (2002). Characterization of type II phosphatidylinositol 4-kinase isoforms reveals association of the enzymes with endosomal vesicular compartments. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 20041-50. **IF: 6,696**
3. **Balla, A.**, Tuymetova, G., Tsiomenko, A., Varnai, P., & Balla, T. (2005). 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. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 1282-95. **IF: 6,52**
4. **Balla, A.**, Kim, Y. J., Varnai, P., Szentpetery, Z., Knight, Z., Shokat, K. M., & Balla, T. (2008). Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol Biol Cell*, 19, 711-21. **IF: 5,558**
5. **Balla, A.**, Tuymetova, G., Toth, B., Szentpetery, Z., Zhao, X., Knight, Z. A., Shokat, K., Steinbach, P. J., & Balla, T. (2008). Design of drug-resistant alleles of type-III phosphatidylinositol 4-kinases using mutagenesis and molecular modeling. *Biochemistry*, 47, 1599-607. **IF: 3,379**
6. **Balla, A.**, Erdelyi, L. S., Soltesz-Katona, E., Balla, T., Varnai, P., & Hunyady, L. (2011). Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and endoplasmic reticulum using bioluminescence resonance energy transfer-based biosensors. *J Biol Chem*, 286, 5319-27. **IF: 4,773**
7. **Balla, A.**, Toth, D. J., Soltesz-Katona, E., Szakadati, G., Erdelyi, L. S., Varnai, P., & Hunyady, L. (2012). Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *J Biol Chem*, 287, 9090-9. **IF: 4,651**
8. Szakadati, G., Toth, A. D., Olah, I., Erdelyi, L. S., Balla, T., Varnai, P., Hunyady, L., & **Balla, A.** (2015). Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation. *Mol Pharmacol*, 87, 972-81. **IF: 3,931**
9. Gém, J. B., Kovács, K. B., Szalai, L., Szakadati, G., Porkoláb, E., Szalai, B., Turu, G., Tóth, A.D., Szekeres, M., Hunyady, L., & **Balla A.** (2021). Characterization of type 1 angiotensin II receptor activation induced dual-specificity MAPK phosphatase gene expression changes in rat vascular smooth muscle cells. *Cells* 10 : 12 Paper: 3538, 22. **IF: 7,666**
10. Kovács KB, Szalai L, Szabó P, Gém JB, Barsi S, Szalai B, Perey-Simon B, Turu G, Tóth AD, Várnai P, Hunyady L, & **Balla A.** (2023) An Unexpected Enzyme in Vascular Smooth Muscle Cells: Angiotensin II Upregulates Cholesterol-25-Hydroxylase Gene Expression. *Int J Mol Sci.* 24(4):3968. doi: 10.3390. **IF: 6.208** (2021)

b) az értekezéshez kapcsolódó összefoglaló közlemények

11. **Balla, A.**, & Balla, T. (2006). Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol*, 16, 351-61. **IF: 12,429**
12. Toth, A. D., Turu, G., Hunyady, L., & **Balla, A.** (2018). Novel mechanisms of G-protein-coupled receptors functions: AT1 angiotensin receptor acts as a signaling hub and focal point of receptor cross-talk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 32, 69-82. **IF: 3,808**

c) az értekezésben nem tárgyalt közlemények

13. Gehrman, T., Gulkan, H., Suer, S., Herberg, F. W., **Balla, A.**, Vereb, G., Mayr, G. W., & Heilmeyer, L. M. G. (1999). Functional expression and characterisation of a new human phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1437, 341-56. **IF: 2,59**

14. Pelyvas, I. F., Toth, Z. G., Vereb, G., **Balla, A.**, Kovacs, E., Gorzsas, A., Sztaricskai, F., & Gergely, P. (2001). Synthesis of new cyclitol compounds that influence the activity of phosphatidylinositol 4-kinase isoform, PI4K230. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 627-32. **IF: 4,139**
15. Vereb, G., **Balla, A.**, Gergely, P., Wymann, M. P., Gulkan, H., Suer, S., & Heilmeyer, L. M. G. (2001). The ATP-binding site of brain phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 as revealed by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 249-59. **IF: 3,258**
16. Zhao, X., Varnai, P., Tuymetova, G., **Balla, A.**, Toth, Z E ; Oker-Blom, C., Roder, J., Jeromin, A., & Balla, T. (2001). 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43): p. 40183-40189. **IF: 7,258**
17. **Balla, A.**, Toth, B., Timar, G., Bak, J., & Krajcsi, P. (2001) Molecular targets for pharmacological cytoprotection. *Biochem Pharmacol*, 61(7): p. 769-77. **IF: 3,34**
18. Bondeva, T., **Balla, A.**, Varnai, P., & Balla, T. (2002). Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Mol Biol Cell*, 13, 2323-33. **IF: 7,599**
19. Denes, L., Jednakovits, A., Hargitai, J., Penzes, Z., **Balla, A.**, Talosi, L., Krajcsi, P., & Csermely, P. (2002) Pharmacologically activated migration of aortic endothelial cells is mediated through p38 SAPK. *British Journal of Pharmacology*, 136(4): p. 597-603. **IF: 3,45**
20. Lee, S. B., Varnai, P., **Balla, A.**, Jalink, K., Rhee, S. G., & Balla, T. (2004) The pleckstrin homology domain of phosphoinositide-specific phospholipase C delta(4) is not a critical determinant of the membrane localization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23): p. 24362-24371. **IF: 6,355**
21. Lin, X ; Varnai, P ; Csordas, G ; **Balla, A** ; Nagai, T ; Miyawaki, A ; Balla, T ; & Hajnoczky, G. (2005) Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13): p. 12820-12832. **IF: 5,854**
22. Varnai, P ; **Balla, A** ; Hunyady, L ; & Balla, T. (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 U S A*, 102(22): p. 7859-64. **IF: 10,231**
23. Kakuk, A., Friedlander, E., Vereb, G., Jr., Kasa, A., **Balla, A.**, Balla, T., Heilmeyer, L. M., Jr., Gergely, P., & Vereb, G. (2006). Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells. *Cytometry A*, 69, 1174-83. **IF: 3,293**
24. Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., **Balla, A.**, Toth, B., Balla, T., Weiss, W. A., Williams, R. L., & Shokat, K. M. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 alpha in insulin signaling. *Cell*, 125, 733-47. **IF: 29,194**
25. Toth, B., **Balla, A.**, Ma, H., Knight, Z. A., Shokat, K. M., & Balla, T. (2006). Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem*, 281, 36369-77. **IF: 5,808**
26. Knight, Z. A., Feldman, M. E., **Balla, A.**, Balla, T., & Shokat, K. M. (2007). A membrane capture assay for lipid kinase activity. *Nat Protoc*, 2, 2459-66. **IF: 1,671**
27. Lukacs, V., Thyagarajan, B., Varnai, P., **Balla, A.**, Balla, T., & Rohacs, T. (2007) Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci*, 27(26): p. 7070-80. **IF: 7,49**
28. Szentpetery, Z., **Balla, A.**, Kim, Y. J., Lemmon, M. A., & Balla, T. (2009). Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC Cell Biology*, 10:67. **IF: 2,654**
29. Szekeres, M., Nadasy, G. L., Turu, G., Soltesz-Katona, E., Toth, Z. E., **Balla, A.**, Catt, K. J., & Hunyady, L. (2012). Angiotensin II Induces Vascular Endocannabinoid Release, Which Attenuates Its Vasoconstrictor Effect via CB1 Cannabinoid Receptors. *J Biol Chem*, 287, 31540-50. **IF: 4,651**
30. Toth, D. J., Toth, J. T., Gulyas, G., **Balla, A.**, Balla, T., Hunyady, L., & Varnai, P. (2012). Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*, 125, 2185-97. **IF: 5,877**
31. Erdelyi, L. S., **Balla, A.**, Patocs, A., Toth, M., Varnai, P., & Hunyady, L. (2014) Altered agonist sensitivity of a mutant v2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Endocrinol*, 28(5): p. 634-43. **IF: 4,022**

32. Erdélyi, L. S., Mann, W. A., Morris-Rosendahl, D. J., Groß, U., Nagel, M., Várnai, P., **Balla, A.**, & Hunyady, L. (2015) Mutation in the V2 vasopressin receptor gene, AVPR2, causes nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis. *Kidney Int*, 88(5): p. 1070-8. **IF: 8,564**
33. Tóth, J. T., Gulyás, G., Tóth, D. J., **Balla, A.**, Hammond, G. R.V., Hunyady, L., Balla, T., & Várnai, P. (2016) BRET-monitoring of the dynamic changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta*, 1861(3): p. 177-87. **IF: 5,162**
34. Gulyas, G., Radvanszki, G., Matuska, R., **Balla, A.**, Hunyady, L., Balla, T., & Varnai, P. (2017) Plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate and 4,5-bisphosphate determine the distribution and function of K-Ras4B but not H-Ras proteins. *J Biol Chem*, 292(46): p. 18862-18877. **IF: 4,01**
35. Toth, A. D., Prokop, S., Gyombolai, P., Varnai, P., **Balla, A.**, Gurevich, V. V., Hunyady, L., & Turu, G. (2018). Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by beta-arrestins. *J Biol Chem*, 293, 876-92. **IF: 4,106**
36. Turu, G., **Balla, A.**, & Hunyady, L. (2019). The Role of beta-Arrestin Proteins in Organization of Signaling and Regulation of the AT1 Angiotensin Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 519. **IF: 3,644**
37. Turu, G., Soltész-Katona, E., Tóth, A.D., Juhász, C., Cserző, M., Misák, Á., **Balla, A.**, Caron, M.G., Hunyady, L. (2021). Biased Coupling to β -Arrestin of Two Common Variants of the CB2 Cannabinoid Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 12:714561. **IF: 6,055**
38. Tóth, A.D., Garger, D., Prokop, S., Soltész-Katona, E., Várnai, P., **Balla, A.**, Turu, G., Hunyady, L. (2021). A general method for quantifying ligand binding to unmodified receptors using *Gaussia luciferase*. *J Biol Chem*. 296:100366. **IF: 5,485**
39. Szalai, L., Sziráki, A., Erdélyi, L. S., Kovács, K. B., Tóth, M., Tóth, A. D., Turu, G., Bonnet, D., Mouillac, B., Hunyady, L., & **Balla, A.** (2022). Functional rescue of a nephrogenic diabetes insipidus causing mutation in the V2 vasopressin receptor by specific antagonist and agonist pharmacochaperones. *Front. Pharmacol.* 13:811836. doi: 10.3389/fphar.2022.811836. **IF: 5,988**
40. Erdélyi, L. S., Hunyady, L., & **Balla, A.** (2023). V2 vasopressin receptor mutations: future personalized therapy based on individual molecular biology. *Front. Endocrinol.* Volume 14:1173601. doi.org/10.3389/fendo.2023.1173601. **IF: 6,055**

Magyar nyelvű közlemények jegyzéke

1. Balla, András; Erdélyi, László Sándor; Hunyady, László: „G-fehérjéhez kapcsolt receptorok aktivációs modelljeinek elemzése. *Magyar Tudomány* 173.évf. k.sz. 68-74 (2012)
2. Hunyady, László; Erdélyi, László Sándor; Balla, András: A V2 vazopresszinreceptor betegségét okozó mutációi. *Magyar Belorvosi Archivum* 69 : 2-3 pp. 69-75. (2016)

Könyvek, könyvfejezetek jegyzéke

1. *Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes* (Springer 2019; Editors: Peter Igaz and Attila Patócs): „Nephrogenic Diabetes Insipidus” c. fejezet
2. *Ezerarcú fehérjék* (Simmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió 2018; Szerkesztők: Buday László, Nyitray László, Perczel András): „G-fehérjéhez kapcsolt receptorok működésének tanulmányozása biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer módszerrel” c. fejezet

Idegen nyelvű közlemények tudományometriai adatai (2023.05.24. MTMT adatok alapján)

Tudományos folyóiratcikkek száma: 40
 Összesített impakt faktor: 229
 Összes idézettség: 3034
 Független idézettség: 2600
 Hirsch index: 25