

*Szakmai zárójelentés „ A foszfatidilinozitol 4-kináz PI4K230 izoformájának szerepe a központi idegrendszerben: szubcelluláris lokalizációjának és SH-csoportjainak jelentősége fiziológiás és kóros körülmények között” OTKA T 042975 kutatási témáról*

#### *Kutatási háttér és célkitűzések*

A pályázat beadása óta eltelt időszakban tovább erősödött az a felismerés, hogy a foszfoinozitidek a jelátvitelben, citoskeletális átépülésben és vezikuláris transzportban betöltött funkcióik mellett fontos szerepet játszanak a sejtmagban is, résztvéve a kromatin és szubnukleáris organellek működésének szabályozásában. A képződésükhöz vezető enzimek sejtmagba kerülése és ott történő szabályozása csak kevéssé ismert.

Vizsgálataink a foszfoinozitidek bioszintézisében meghatározó foszfatidilinozitol 4-kináz (PI4K) izoformái közül a PI4K230-ra irányultak. Emlős szervezetekben a PI4K négy izoformája különböztethető meg szerkezetük, biokémiai tulajdonságaik és sejten belüli funkcióik alapján (1. táblázat). Az izoformák megjelölésére munkánkban a relatív moltömegén alapuló nomenklaturát (Gehrmann and Heilmeyer, 1998; Heilmeyer et al., 2003) alkalmazzuk.

#### 1. táblázat. A foszfatidilinozitol 4-kináz (PI4K) izoformái

<u>Izoforma</u>	<u>egyéb név</u>	<u>sejten belüli lokalizáció</u>	<u>ismert funkció</u>
PI4K55 $\alpha$	PI4KII $\alpha$	plazmamembrán, Golgi	foszfoinozitid jelpálya
PI4K55 $\beta$	PI4KII $\beta$	plazmamembrán, endoszoma, transzport vezikulumok	foszfoinozitid jelpálya feltöltése
PI4K92	PI4KIII $\beta$	Golgi, sejtmag	vezikuláris transzport
PI4K230	PI4KIII $\alpha$	ER, vezikulumok, nukleolusz	vezikuláris transzport

A PI4K230 jellegzetessége, hogy változatos doménszerkezettel rendelkezik (Gehrmann et al., 1999; Heilmeyer et al., 2003), ezáltal többféle fehérje-fehérje, fehérje-lipid és fehérje-nukleinsav kölcsönhatásra képes. Funkciója az izoformák közül legkevésbé ismert, újabb adatok szerint szerepe van a plazmamembrán foszfatidilinozitol (4,5)P<sub>2</sub> reszintézisében is (Balla et al., 2008a).

Jelen kutatásaink célkitűzése a PI4K230 nukleáris/nukleoláris előfordulásának, továbbá nukleáris/nukleoláris transzportjának vizsgálata és funkciójának felderítése volt. Célul tűztük ki továbbá az enzim SH-csoportjainak vizsgálatát és lehetséges szerepét oxidatív károsodásokban.

#### *1. A PI4K230 nukleoláris előfordulása*

Vizsgálatainkban abból indultunk ki, hogy a központi idegrendszer neuronális sejteiben a PI4K230 feltűnően nagy koncentrációban fordul elő, ahol az ellene termelt antitesttel korábban citoplazmatikus membránokhoz asszociáltan tudtuk kimutatni (Balla et al., 2000). Később immunfluoreszcenciás vizsgálatokkal bizonyos fixálási módszereket alkalmazva a neuronális sejtek magjában is, ezen belül a nukleoluszban feltűnő

immunreaktivitást találtunk. Megfigyelésünk értékelésében bizonytalanságot okozott, hogy csak a dehidratáción alapuló etanolos, metanolos, vagy acetonos fixálás alkalmazásakor volt észlelhető a nukleoláris immunreakció, viszont a keresztkötést létesítő formaldehides (PFA) fixálás után nem. Sajátos módon a PFA maszkírozó hatása csak a nukleoláris immunreakcióra korlátozódik. A PFA-fixálás maszkírozó hatásának magyarázatára feltételeztük, hogy keresztkötést létesít a PI4K230 és vele asszociálódó makromolekulák között és így az epitóp az antitest számára felismerhetetlenné válik. Az immunreakció valódiságát a PI4K230 négy különböző szakasza elleni antitest alkalmazásával, a PFA maszkírozó hatásának a fixálást követő forró citrátos revertálásával és PI4K230-specifikus siRNS alkalmazásával igazoltuk.

A PI4K230 fixálás-függő nukleoláris előfordulása nemcsak patkányagy frissen fagyasztott metszeteiben volt kimutatható, hanem az általunk vizsgált neurális és nem-neurális sejtvonalakban (SK-N-MC és B50 patkány neuroblastoma, A172 humán glioblastoma, HeLa és COS-7 sejtek) is. Primer humán neurális HCN1A sejtek differenciációja a kimutathatóságra nem volt hatással. A kezdeti tapasztalatok alapján feltételezett összefüggés a nukleoláris jelenlét és az idegsejtek differenciálódása között nem igazolódott.

#### *A PI4K230-al feltételezeten keresztkötődő ágens*

A PFA nukleoláris maszkírozó hatása frissen fagyasztott metszetek fixálás előtti kb 10 perces PBS-mosásával megelőzhető volt. Ennek magyarázata lehet a keresztkötődő ágens kimosódása, vagy enzimatis lebonthatása proteázokkal vagy nukleázokkal. Kimutattuk, hogy a PI4K230 a nukleolusban detergens-rezisztensen fordul elő, de triton-X-100 permeabilizálás utáni ribonukleáz-A kezelés az immunreakciót megszünteti. Feltételezzük, hogy ilyenkor több komponensből álló asszociátum szerkezete bomlik meg és a szabaddá váló PI4K230 kimosódik a permeabilizált sejtéből.

A felsorolt eredményeket két közleményben publikáltuk (Heilmeyer et al., 2003), (Kakuk et al., 2006) és egy összeállítás alatt álló doktori értekezés részét képezik (Kakuk Annamária: A PI4K230 foszfatidilinozitol 4-kináz mint sejtmagi / nukleoláris foszfoinozitol generátor).

#### *2. A PI4K230 nukleáris/nukleoláris transzportja*

A PI4K230 nukleoláris előfordulása felveti a nukleáris/nukleoláris transzport kérdését. Tapasztalat szerint a 40 kDa-nál nagyobb fehérjék csak transzporterek segítségével jutnak át a maghártya pórusain. A legtöbb transzportált fehérje egy vagy két rövid bázikus aminosavszekvenciából álló klasszikus nukleáris lokalizációs szignál (cNLS) szakasszal kapcsolódik a transzportot biztosító importin  $\alpha/\beta$  heterodimer transzporterhez. A cNLS az adapterként szolgáló importin  $\alpha$ -hoz kapcsolódik, míg az importin  $\beta$  biztosítja a transzlokációt. Az NLS-ek egy része nukleoláris irányító hatással is rendelkezik vagy része a nukleolusba irányító szekvenciának.

A PI4K230 nukleáris transzlokációjának vizsgálata során első kísérleteinkben permeabilizált HeLa sejteken végzett „import assay”-vel (Adam et al., 1990) kimutattuk, hogy az Sf9 sejtekben termeltetett PI4K230 bejut a permeabilizált sejtek magjába, azonban nukleoláris transzlokáció megítélésére nem volt lehetőség a nukleolusban jelenlévő jelentős immunreakciót adó endogén enzim miatt. A nukleáris transzlokációért felelős szekvenciát keresve a PI4K230 szekvenciájában egy „monopartite” (NLS1), egy „bipartite” (NLS2) klasszikus, továbbá egy nem-klasszikus NLS-t (NLS3)

valószínűsítettünk. Ezek szerepét a nukleáris/nukleoláris transzportban importinokhoz való asszociációval, digitoninnal permeabilizált HeLa sejteken végzett „import assay”-vel és molekuláris modellezéssel vizsgáltuk. Dot-blot kísérletekben az NLS1 és NLS2 kötődött az expresszált, tisztított importin- $\alpha$ 1/ $\beta$  és  $\alpha$ 3/ $\beta$  komplexekhez, viszont az importin  $\alpha$ 5/ $\beta$  heterodimerhez nem. A feltételezett NLS3 egyik importinnal sem mutatott asszociációt. Fentieket molekuláris modellezés is alátámasztotta. Import assay során a kérdéses (esetenként kémiai szintetizált) aminosavszekvenciát fluoreszkáló festékkel jelölt bovin szérum albuminhoz (BSA) kapcsoltuk és vizsgáltuk, hogy bejuttatja-e azt a permeabilizált plazmamembránú, de ép maghártyájú sejt magjába transzport faktorok és „energiaregeneráló rendszer” (GTP+ATP+kreatin-foszfát+ kreatin-foszfokináz) jelenlétében. A magban/nukleolusban való megjelenést konfokális mikroszkóppal ellenőriztük. Eredményeink szerint az NLS1 a hozzákapcsolt fluoreszcensen jelölt BSA-t a sejtmagba (azon belül a nukleoplazmába) irányította az importinokkal való asszociációnak megfelelően. A BSA-hoz kapcsolt NLS2 meglepő módon nem okozott magi transzlokációt, viszont a kb 20 kDa-os, méreténél fogva a maghártyán passzivan átjutó, fluoreszcensen jelölt tripszin inhibitorhoz kapcsolva megjelent a nukleolusban és az NLS1-hez kötött BSA-t is a nukleolusba irányította. Ezek alapján az NLS1 a nukleáris transzlokációért lehet felelős, az NLS2 pedig a nukleoláris irányításban játszik szerepet. További megfigyelésünk szerint a PI4K230 NLS2-t tartalmazó, 58 kDa-os szakasza NLS1 nélkül is bejut a permeabilizált sejt nukleolusába. A transzlokáció ebben az esetben is importin  $\alpha$ 1/ $\beta$  és  $\alpha$ 3/ $\beta$  komplexekkel mediáltan történik, amit az asszociációs kísérletek is megerősítenek. Molekuláris modellezéssel is alátámasztott eredményeink valószínűsítik a PI4K230 nukleáris/nukleoláris transzportjának mechanizmusát. Publikációk: Kakuk és mtsai, 2008, (pozitív bírálatot átdolgozásra visszaküldve), Kakuk Annamária: doktori disszertáció (A PI4K230 foszfatidilinozitol 4-kináz mint sejtmagi / nukleoláris foszfoinozid generátor; összeállítás alatt) .

### *3. A PI4K230 szerepe a nukleolusban*

A PI4K230 HeLa sejteken végzett vizsgálatok szerint fibrillarinnal és nucleolinnal kolokalizálva, elsősorban a nukleolus „fibrilláris centrumát” (FC) körülvevő „dense fibrillar component” (DFC) részében fordul elő. Ennek alapján funkciója a pre-rRNS feldolgozásának korai szakaszához, illetve a a DFC szerkezetének stabilizálásához kapcsolódhat. Immuncitokémiai vizsgálatokkal megjelenése különböző, a nukleolus szerkezetét befolyásoló ágensek hatására az alábbi változásokat mutatta:

1. A DNS-függő RNS polimeráz-I-et specifikusan gátló kis koncentrációjú aktinomycin D hatására a nukleolus kompartmentjeinek jellemző változásai mellett (Puvion-Dutilleul et al., 1992) a PI4K230 nukleoláris jelölődése kompaktabbá vált, az immunreakciót mutató terület átmérője HeLa sejtekben elsősorban a fibrillarinnal és részben a nucleolinnal kolokalizálva szignifikánsan csökkent. Ez a jelenség a PI4K230 DFC-hez kapcsolódó funkcióját támasztja alá.

2. Az RNS polimeráz-II-t specifikusan gátló kis koncentrációjú amanitin hatására a PI4K230 pozitív régió szabálytalan méretű részekre esett szét de a sejtmagon belül maradt. Ennek alapján a citoplazmában szintetizálódó fehérjék is szükségesek a PI4K230 nukleoláris szerkezetbe történő integrálódásához.

3. A DRB (dikloro-ribofuranozil-benzimidazol) ATP analóg, amely a kazein-kináz II gátlásán keresztül (a nucleolin és nucleophosmin foszforilációjának blokkolásával) és

ezen túlmenően is többféle reverzibilis sejtmagi károsodást okoz: az rDNS jellegzetes nyakláncszerű feldarabolódását váltja ki annak a sejtmagba történő betüremkedésével amelyekhez DFC komponensek is asszociálódnak, miközben a „granular component” (GC), illetve annak markere a nucleophosmin a nucleolusban elkülönülten marad (Louvret et al., 2005). DRB hatására a nukleoláris PI4K230 pozitivitás elsősorban a fibrillarinnal való kolokalizációját megtartva fragmentálódott, és a sejtmagon belül szóródott szét.

4. A sejtciklust különböző stádiumokban megállító ágensek (apigenin, MG132, roscovitin, olomoucín) hatására a PI4K230 a DFC-ben kolokalizálódó enzimekkel együtt korai (4-6 óra utáni) feldarabolódást mutatott, majd teljesen dezintegrálódott a nukleoplazmában.

5. HeLa és B50 sejttenyészet konfluenssé válásával a sejtek nagy részében eltűnt a prominens nukleoláris PI4K230 jelölődés.

Mindezek a PI4K230 sejtproliferációban való részvételére és az azzal járó riboszóma biogenezisben játszott szerepre utalnak. Egyrészt a PI4P bioszintézisével közreműködhet a DFC-ben kimutatható PI(4,5)P<sub>2</sub> (Osborne et al., 2001) képződésében; ezzel a PI(4,5)P<sub>2</sub>-kötő doméneket tartalmazó fehérjék (PDZ család fehérjéi, aktin-citoszkeletont módosító fehérjék) DFC-be gyűjtésében. Másrészt a többféle kölcsönhatásra alkalmas doménszerkezetével közvetlenül is hozhat létre fehérjékkel, lipidekkel és nukleinsavakkal asszociátumokat. A roscovitin hatására bekövetkező korai dezintegrációja alapján feltételezzük, hogy alkalmas lehet a ciklin-dependens kináz gátlók (Wojciechowski et al., 2003) és más nukleoláris dezintegrálódást kiváltó antitumor ágensek hatásának tesztelésére.

Fenti munkáról közlemény összeállítása folyamatban van (Friedländer et al.: Functional changes in the nucleolar appearance of PI4K230, an isoform of phosphatidylinositol 4-kinase).

#### *4. A foszforiláció szerepe a PI4K230 működésében és szubcelluláris lokalizációjában*

A fehérjék foszforilációja számos esetben befolyásolja nukleáris transzportjukat. A PI4K230 potenciális foszforilációs szabályozását különféle olyan proteinkinázokkal vizsgáltuk, melyek felismerési szekvenciáit az enzim tartalmazza (Gehrmann et al., 1999) – ezek a PKA, PKC izoenzimek, PKD, CDK5, Kazeinkináz II, Erk. Közülük in vitro csak a cAMP-függő proteinkináz (PKA) volt hatékony. Foszforiláció hatására azonban az enzimaktivitás nem változott meg (Heilmeyer et al., 2003). A PKA aktiválása vagy gátlása, és sejtporózus proteinfoszfátáz gátlókkal történő kezelés a PI4K230 szubcelluláris lokalizációjában sem okozott immunfluoreszcenciás vizsgálatokkal kimutatható változást COS-7, HCN1A és HeLa sejttenyészetekben

#### *5. A PI4K230 SH-csoportjainak funkcionális jelentősége*

Eredményeink szerint a PI4K230 enzimaktivitásához szükséges SH-csoportok két kategóriája különböztethető meg. A maleimidek méretüktől függő inaktíváló hatást fejtenek ki, amely a PI4K230-ban és a cAMP-függő proteinkinázban (PKA) nagyfokú hasonlóságot mutat; feltehetően az ATP-kötőhelyhez térben közeli Cys módosításával sztérikusan gátolva az ATP kötését és újabb adatokat szolgáltatva a két enzim katalitikus doménjének szerkezeti rokonságára. A C-X-C aminosav szekvenciákkal specifikusan reagáló fenil arzén (III)-oxid (PAO) viszont a PI4K230-at  $\mu$ M-os koncentrációkban, tiolok jelenlétében is inaktíválja, de a PKA-ra nem fejt ki gátló hatást. Érdekes

megfigyelésünk, hogy a mellékvese kromaffin sejtjeiben *in vivo* szekréció gátlást okozó kb 20  $\mu$ M PAO *in vitro* nem a targetként feltételezett PI4K55 (Wiedemann et al., 1996), hanem a PI4K230 aktivitását gátolja (Heilmeyer et al., 2003). A PAO-val a PI4K230-ban specifikusan reagáló Cys-oldalláncok azonosítására együttműködést terveztünk dr. Balla Tamás laboratóriumával (NIH, Bethesda, Maryland). Ehhez Kakuk Annamária 2004-ben Eötvös ösztöndíjat pályázott, azonban a pályázat sikertelensége miatt a közös munka elmaradt és a PAO-reaktiv ciszteinek azonosítása részvételünk nélkül történt meg (Balla et al., 2008b).

Az enzimaktivitáshoz szükséges SH-csoportok reaktivitása alapján feltételeztük, hogy azok a PI4K230-ban gazdag neuronális sejtek oxidatív károsodásában is szerepet játszhatnak. Ezt a feltételezést azonban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és peroxinitrit kezeléssel nem tudtuk igazolni.

#### *Hivatkozások*

*A pályázathoz kapcsolódó saját közlemények:*

**Heilmeyer, L. M., Jr., Vereb, G., Jr., Vereb, G., Kakuk, A. and Szivak, I.** (2003). Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases. *IUBMB Life* **55**, 59-65.

**Kakuk, A., Friedlander, E., Vereb, G., Jr., Kasa, A., Balla, A., Balla, T., Heilmeyer, L. M., Jr., Gergely, P. and Vereb, G.** (2006). Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells. *Cytometry A* **69**, 1174-83.

**Kakuk A., Friedländer E, Vereb G. jr., Tóth G., Bagossi P., Gergely P. and Vereb G.** (2008). Nuclear and nucleolar localization signals and their targeting function in phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230. *Exp. Cell. Res.* revised version to be submitted (MS. No.: ECR-08-21)

**Friedländer E., Vereb G. jr., Gergely P., Vereb G.,**: Functional changes in the nucleolar appearance of PI4K230, an isoform of phosphatidylinositol 4-kinase (in prep).

Mivel a kutatási témához tartozó publikációink egy része még közlés ill. összeállítás alatt áll, kérem a közlemények kiegészítő értékelését egy későbbi időpontban

#### *Egyéb hivatkozások:*

**Adam, S. A., Marr, R. S. and Gerace, L.** (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* **111**, 807-16.

**Balla, A., Kim, Y. J., Varnai, P., Szentpetery, Z., Knight, Z., Shokat, K. M. and Balla, T.** (2008a). Maintenance of Hormone-sensitive Phosphoinositide Pools in the Plasma Membrane Requires Phosphatidylinositol 4-Kinase III{ $\alpha$ }. *Mol Biol Cell* **19**, 711-721.

**Balla, A., Tuymetova, G., Toth, B., Szentpetery, Z., Zhao, X., Knight, Z. A., Shokat, K., Steinbach, P. J. and Balla, T.** (2008b). Design of Drug-Resistant Alleles of Type-III Phosphatidylinositol 4-Kinases Using Mutagenesis and Molecular Modeling. *Biochemistry* **47**, 1599-1607.

**Balla, A., Vereb, G., Gulkan, H., Gehrman, T., Gergely, P., Heilmeyer, L. M., Jr. and Antal, M.** (2000). Immunohistochemical localisation of two phosphatidylinositol 4-kinase isoforms, PI4K230 and PI4K92, in the central nervous system of rats. *Exp Brain Res* **134**, 279-88.

**Gehrman, T., Gulkan, H., Suer, S., Herberg, F. W., Balla, A., Vereb, G., Mayr, G. W. and Heilmeyer, L. M., Jr.** (1999). Functional expression and characterisation of a new human phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230. *Biochim Biophys Acta* **1437**, 341-56.

**Gehrman, T. and Heilmeyer, L. M., Jr.** (1998). Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J Biochem* **253**, 357-70.

**Louvet, E., Junera, H. R., Le Panse, S. and Hernandez-Verdun, D.** (2005). Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp Cell Res* **304**, 457-70.

**Osborne, S. L., Thomas, C. L., Gschmeissner, S. and Schiavo, G.** (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci* **114**, 2501-11.

**Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Pichard, E., Bachellerie, J. P. and Puvion, E.** (1992). Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur J Cell Biol* **58**, 149-62.

**Wiedemann, C., Schafer, T. and Burger, M. M.** (1996). Chromaffin granule-associated phosphatidylinositol 4-kinase activity is required for stimulated secretion. *Embo J* **15**, 2094-101.

**Wojciechowski, J., Horky, M., Gueorguieva, M. and Wesierska-Gadek, J.** (2003). Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* **106**, 486-95.