

## ZÁRÓJELENTÉS

### **A plazmamembrán $\text{Ca}^{2+}$ ATPáz 4b izoforma apoptotikus fragmentjét reprezentáló mutáns sejten belüli lokalizációja, stabilitása, hatásai a sejtek $\text{Ca}^{2+}$ háztartására és szerepe az apoptózis folyamatában**

#### **TUDOMÁNYOS HÁTTÉR:**

A plazmamembrán típusú  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázok (PMCA) a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisában játszanak kitüntetett szerepet. A PMCA fehérjék az ATP kémiai energiáját felhasználva képesek a  $\text{Ca}^{2+}$  citoszólból extracelluláris térbe történő eltávolítására, így biztosítják a sejtek számára létfontosságú alacsony intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet.

A PMCA egyetlen polipeptidláncból felépülő, 10 transzmembrán hélixszel rendelkező, kb.130 kDa molekulatömegű integráns membránfehérje. A fehérje lényeges funkcionális egysége a citoszólban elhelyezkedő C-terminális szabályozó régió, mely beépített autoinhibítorként működik: gátolja a katalitikus domének mozgását, és ezáltal az enzim aktivitását. A PMCA fő aktivátora a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplex, amely a C-terminális régióban található kalmodulin-kötő szekvenciához kötődik, melynek hatására a fehérje felszabadul a belső gátlás alól. Ezenkívül a C-terminális régió egyes szakaszain keresztül a PMCA olyan multiprotein-komplexekhez kapcsolódhat, melyek speciális szignalizációs membrándoménekbe irányítják a fehérjét [1-4].

A PMCA fehérjéket 4 gén kódolja, melyekről alternatív "splicing" révén több mint 20 különféle izoforma keletkezhet. A PMCA izoformák C-terminális regulátor régiója nagy mértékben különbözik egymástól, ami lehetővé teszi a variánsok működésének eltérő szabályozását [5].

A PMCA fehérjék közül a PMCA4b izoforma mindenféle sejtípusban megtalálható. A PMCA4b C-terminálisán található PDZ-kötő motívumán keresztül különböző PDZ-domént tartalmazó, ún. állványfehérjékhez képes kapcsolódni. Ilyenek a membrán-asszociált-guanilát-kináz (MAGUK) család tagjai, amelyek fontos szerepet játszanak sejt-sejt kapcsolatok illetve multiprotein-komplexek kialakításában; pl. epitél sejtekben az „adherens junction”, idegsejtben a posztszinaptikus denzitás fehérjeösszetételét a MAGUK család - SAP97, PSD-95, stb - tagjai befolyásolják. Ezek a PDZ fehérjék többféle fehérje-fehérje interakciós domént tartalmaznak (PDZ,SH3,SH2). Tagjai közül többek között a PSD-95, PSD-93, SAP102 esetében igazolták, hogy kölcsönhatnak a PMCA4b fehérjével [6, 7].

#### **KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK:**

Elsőként munkacsoportunk mutatta be, hogy a PMCA4b izoformát az apoptózis folyamata során a kaszpáz-3 proteáz hasítja úgy, hogy a fehérje elveszíti teljes C-terminális regulátor régióját [8], minek következtében egy 120 kDa molekulatömegű fragment képződik. A jelen kutatási program keretein belül vizsgáltuk e szerkezeti

változás következményeit a fehérje működésére és megoszlására a sejten belül. A PMCA C-terminális PDZ-kötő régiójának elvesztése multiprotein-komplexek széteséséhez vezethet, ezért tanulmányoztuk, hogy egyes állványfehérjék milyen hatással vannak a PMCA4b megoszlására a plazmamembránban.

## **KUTATÁSI EREDMÉNYEK:**

**1. Vad típusú PMCA4b-t és a PMCA4b apoptotikus fragmentjének megfelelő csonkolt mutáns expresszálo sejt vonalak előállítása.** Az apoptotikus fragment tulajdonságainak vizsgálatára olyan PMCA4b csonkolt mutáns konstrukciót készítettünk, melynek C-terminálisáról 125 aminosav hiányzik (PMCA4b-ct125), így az ebből átíródó mutáns fehérje a PMCA4b 120 kDa molekulatömegű apoptotikus fragmentjének felel meg. A vad típusú illetve mutáns konstrukciót tartalmazó DNS fragmentet SPsLdS retrovirális vektorba helyeztük, mellyel Phoenix-Ampho pakolósejteket transzfektáltunk. A pakolósejtek révén előállított vírusfelülűszóval MDCK (Madin-Darby Canine kidney) sejteket fertőztünk. A transzdukción követően a sejteket Geneticinnel szelektáltuk, majd a PMCA4b variánsokat stabilan expresszálo sejt vonalakat hoztunk létre. Western blot technikával kimutattuk, hogy a PMCA4b és a PMCA4b-ct125 fehérjék expressziós szintje a szelekciót megelőző kezdeti érték 5-10-szeresére nőtt [9].

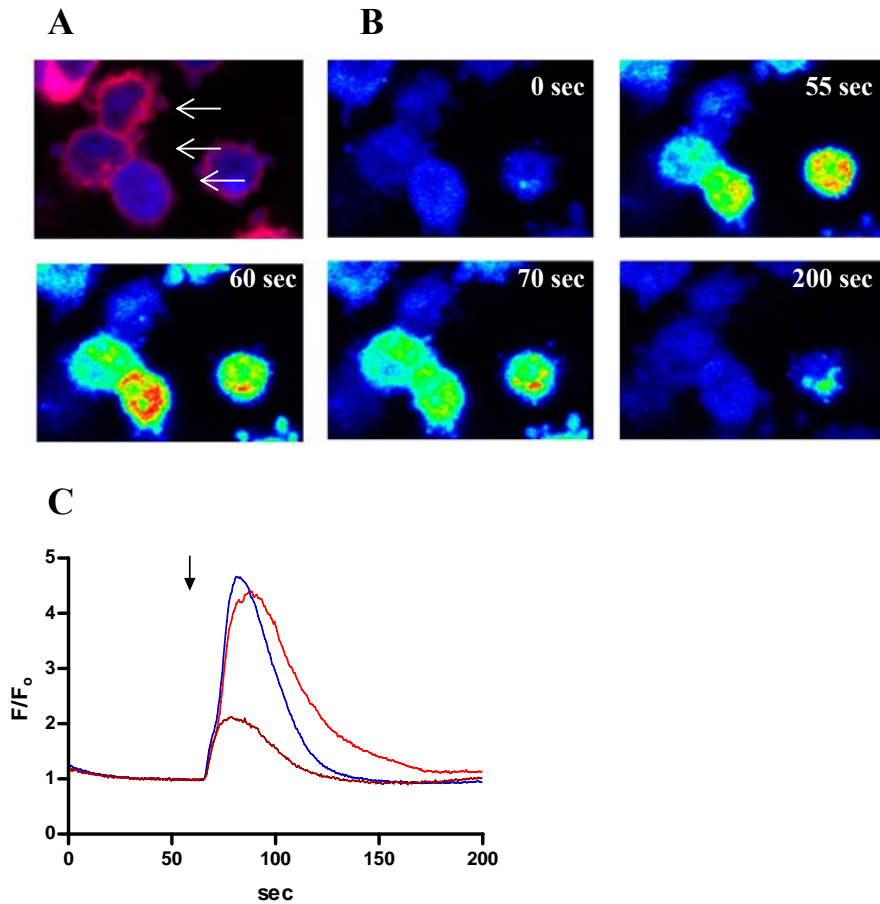
**2. A vad típusú PMCA4b és mutáns PMCA4b-ct125 fehérjék jellemzése.** A fehérjék aktivitását a megfelelő konstrukciót stabilan expresszálo MDCK sejt vonalából készült membránvezikulák aktív  $Ca^{2+}$  felvételével határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a PMCA4b és a PMCA4b-ct125 fehérjék aktivitása az expressziós szintnek megfelelő mértékű. Kimutattuk továbbá, hogy míg a vad típusú fehérje aktivitása kalmodulinnal jelentősen fokozható, a mutáns fehérje kalmodulin nélkül is magas aktivitással rendelkezik, aktivitása kalmodulinnal nem szabályozható. Mivel a PMCA fehérjék fiziológiás működésének alapfeltételét képezik a megfelelő targeting folyamatok, ezért konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a fehérjék sejten belüli lokalizációját. Bizonyítottuk, hogy a PMCA4b-ct125 mutáns a vad típusú fehérjéhez hasonlóan az MDCK sejtek bazolaterális membránjában helyezkedik el. *Összefoglalva, eredményeink azt bizonyítják, hogy a PMCA4b apoptotikus fragmentje konstitutíven aktív – továbbiakban „szuper” aktív, valamint hogy a C-terminális régió eltávolítása nem befolyásolja alapvetően a fehérje lokalizációját polarizált MDCK sejtekben [9].*

**3. A PMCA4b fehérje eltérő módon viselkedik az apoptózis illetve az oxidatív stressz folyamataiban.** Az apoptózist kiváltó különböző kezelések hatására (staurosporin, anti-FAS antitest,  $TNF\alpha$ , anoikis) a PMCA fehérjét a kaszpáz-3 hasítja, és a kiváltó októl függetlenül - mitokondriális út vagy halálreceptoron keresztül - a jellegzetes 120 kDa-os fragment képződik. Megállapítottuk, hogy a PMCA4b apoptotikus fragmentje megtartja

eredeti plazmamembrán lokalizációját, ezáltal feltételezhetően aktívan vesz részt a sejtek  $Ca^{2+}$  szintjének szabályozásában az apoptózis folyamata során [10]. Ezzel szemben arzenit ( $As_2O_3$ ) kezeléssel kiváltott *oxidatív stressz hatására a fehérje nem fragmentálódik, viszont a kezelést követő 5-6 órán belül jelentős mértékű internalizáció figyelhető meg (közlésre előkészítve)*. Ezzel összhangban hippokampális neuronokban citotoxikus mennyiségű glutamát kezelés szintén a PMCA4b fehérje internalizációját okozta. Kimutattuk, hogy a glutamát kezelés hatására megnövekedett  $Ca^{2+}$  eltávolítása a sejtekből - feltehetően a PMCA internalizáció következtében - időben elnyújtott folyamat. *Az internalizáció miatt hosszabb ideig fenntartott magas  $Ca^{2+}$  szint a sejtek nekrotikus pusztulásához vezethet, amely számos neurodegeneratív betegség alapját képezi [11]*.

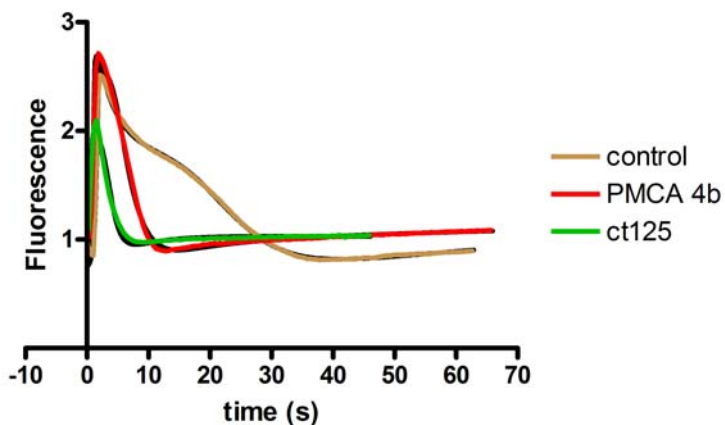
**4. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció szabályozása az apoptózis során.** A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az apoptotikus sejtek mennyire képesek a citoszolikus  $Ca^{2+}$  koncentráció szabályozására. Kísérleteinkben EGFP-vel jelölt PMCA4b és PMCA4b-ct125 plazmiddal tranziensen transzfektált HeLa sejteket használtunk. Az apoptózis indukciót követő különböző időpontokban a sejteket X-Rhod-1 (Abs/Em = 580/602 nm)  $Ca^{2+}$  indikátorral töltöttük majd a sejtekhez ionomicint adtunk. Kísérleteink azt mutatták, hogy az anti-FAS antitest által kiváltott apoptózist követően a sejtek nagy százalékában az ionomicinnel kiváltott  $Ca^{2+}$  sokk után a nyugvó  $Ca^{2+}$  szint helyreáll. Nagy problémát jelentett azonban, hogy az anti-FAS antitesttel kezelt morfológiailag lekerekedett és a tenyésztő edény aljáról levált apoptotikus sejtek nagy része a töltés és mosogatások során jelentősen sérült és elveszett.

Ezért fordult érdeklődésünk a genetikailag kódolt  $Ca^{2+}$  szenzorok felé. A genetikusan kódolt rendszerek esetében ugyanis nincs szükség a kísérletek előtt a sejtek festékkel történő feltöltésére, és segítségükkel valamennyi hosszabbtávú celluláris hatás folyamatosan követhető. Az általunk kiválasztott konstrukciót (GCaMP2) kutatási célra már megkaptuk Junichi Nakai (RIKEN Brain Science Institute, Saitama, JAPAN) csoportjától [12], majd tranziensen több sejtvonalban is expresszáltuk. Mind az irodalmi adatok [13], mind saját előkísérleteink alapján a rendszer magas fluoreszcencia intenzitással, nagy stabilitással, kitűnő jel/zaj aránnyal, másodperces feloldással működve képes a citoplazmikus kalcium szint monitorozására, mind receptor-függő, mind apoptotikus változások követésére. Ezekben a kísérletekben a PMCA molekulát mCherry fluoreszcens fehérjével (Abs/Em = 587/610) jelöltük. Ily módon a GFP alapú  $Ca^{2+}$  szenzor mellett az mCherry-PMCA jel sejten belüli megoszlása konfokális mikroszkóp segítségével egyidőben követhető. Az *I.A.* ábrán látható, hogy 6 órás anti-FAS antitesttel történő kezelés hatására a sejtek lekerekednek és jellegzetes apoptotikus hólyagok jelennek meg. A *B/C* panelek az ionomicinnel kiváltott átmeneti  $Ca^{2+}$  jelet mutatják a GCaMP2 és mCherry-PMCA4b fehérjéket együtt kifejező sejtekben. *Kísérleteink azt bizonyítják, hogy a sejtek az apoptózis indukciót követően több órán keresztül képesek a citoszolikus  $Ca^{2+}$  szint szabályozására, amelyben a PMCA feltehetően fontos szerepet játszik (Pásztly et al. közlésre előkészítve)*.



**1. ábra:** Az apoptotikus sejtek hosszú ideig képesek a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  szint szabályozására. HeLa sejteket GCaMP2, valamint mcherry-PMCA4b konstrukciókkal transzfektáltuk, majd  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-FAS ellenanyaggal ( $+1 \mu\text{g/ml}$  ActinomycinD) apoptózist indukáltunk. A 6 órás kezelést követően  $500 \text{ nM}$  ionomycinnel váltottunk ki a sejtekben  $\text{Ca}^{2+}$  szignált. **A**, GCaMP2 (kék) és mCherry-PMCA4b (piros) koexpressziója. **B**,  $\text{Ca}^{2+}$  szignál apoptotikus sejtekben. A felvételek az egyes ábrákon feltüntetett időpontokban készültek. Az ionomycin hozzáadása a mérés kezdete után  $50$  másodperccel történt. **C**, Az A panelen fehér nyíllal jelzett sejtekben lezajló  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok görbéi. A fekete nyíl az ionomycin hozzáadását jelöli.

**5. A „szuper aktív” PMCA hatása a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  anyagcseréjére.** Tanulmányoztuk, hogyan befolyásolja a regulációjától megfosztott „szuper aktív” mutáns bevitele a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  anyagcseréjét. Az intracelluláris kalcium szint meghatározásához vad típusú PMCA4b és PMCA4b-ct125 mutáns fehérjéket stabilan expresszáló MDCK sejteket GCaMP2 fehérjét kódoló plazmiddal transziensen transzfektáltunk. A transzfekciót követő második napon a  $\text{Ca}^{2+}$  jelet purinerg receptorokon keresztül ATP-vel váltottunk ki.



**2. ábra:**  $100 \mu\text{M}$  ATP-vel kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  szignál MDCK sejtekben. Kontrol, PMCA4b és PMCA4b-ct125 mutánst stabilan kifejező MDCK sejtekben a  $100 \mu\text{M}$  ATP-vel kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  jelet transziensen expresszált GCaMP2 indikátor segítségével követtük. Az adatok minden esetben  $20$ - $30$  sejt átlagát mutatják. A színes görbék a mérési pontokat kötik össze ( $0.4 \text{ mp/pont}$ ). A modell alapján illesztett görbét az ábrán fekete vonallal jelöltük. A modellhez felhasznált sebességi állandók megtalálhatóak: [14-16].

A 2. ábra a konfokális mikroszkóppal detektált kalcium jel időbeli lefutását mutatja. Az alacsony endogén PMCA4b-t kifejező kontroll sejtekben stimulus hatására jelentős intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációnövekedést figyeltünk meg, amely időben lassan, elnyújtva tért vissza a nyugvó szintre. A vad típusú PMCA4b-t nagyobb mennyiségben kifejező (kb. 10-15x) sejtekben a  $Ca^{2+}$  jel amplitúdója nem változik a kontrollhoz képest, viszont rövidebb idő alatt cseng le. A „szuper aktív” PMCA4b-ct125 mutáns kifejező sejtekben egy szignifikánsan alacsonyabb amplitúdójú és igen gyorsan lecsengő  $Ca^{2+}$  jelet figyeltünk meg. A 2. ábra azt is demonstrálja, hogy a kísérleti pontok kiválóan illeszkednek a [17] közleményében leírt modellhez, amely figyelembe veszi a különböző csatornák, valamint a PMCA fehérjék *in vitro* meghatározott kinetikai paramétereit. *Eredményeink azt mutatják, hogy a PMCA fehérjék aktiválódási folyamataiban bekövetkező változások (a C-terminális régió módosulatai alternatív splice révén vagy proteolitikus emésztés hatására) jelentősen módosíthatják  $Ca^{2+}$  jel dinamikáját (eredmények közlésre előkészítve).*

**6. Fehérje-fehérje kölcsönhatások szerepe a PMCA4b eloszlására a plazmamembránban.** A „szuper” aktív PMCA4b fehérjéről hiányzó szakasz fontos eleme a fehérje C-terminálisán található PDZ-kötő szekvencia [7, 18, 19]. Ezért a továbbiakban tanulmányoztuk e motívum szerepét a PMCA4b plazmamembrán lokalizációjában. Feltételeztük, hogy a vizsgált sejtek PDZ fehérje készlete nem elegendő, hogy a tranzienst transzfekciót követően képződő nagyobb mennyiségű PMCA fehérjéhez kötődve befolyásolja annak viselkedését. Ezért a PDZ-kötő szekvencia szerepét úgy tanulmányoztuk, hogy különféle sejtekben a PMCA4b fehérjével együtt fejeztük ki a MAGUK fehérjecsalád egyik ismert tagját, a három tandem PDZ domént tartalmazó PSD-95 (post-synaptic density-95) állványfehérjét. Bár irodalmi adatok bizonyítják, hogy a PSD-95 kötődik a PMCA4b molekulához annak PDZ-kötő motívumán keresztül, ennek a kölcsönhatásnak a PMCA szubcelluláris lokalizációjára kifejtett hatása még nem ismert. Ezért megvizsgáltuk, hogy az együttes expresszió befolyásolja-e a PMCA4b sejten belüli mozgását illetve lokalizációját. *Eredményeink azt mutatták, hogy a PSD-95 állványfehérje 1. elősegíti a PMCA4b megjelenését a plazmamembránban; 2. hatására a PMCA4b molekula szigetszerű csoportokba rendeződik; 3. a PSD-95 részlegesen immobilizálja a PMCA4b molekulákat a sejt felszínén; és 4. az ép aktin háló jelentős szerepet játszik a PMCA4b szigetszerű elrendeződésének stabilizálásában [20]. Vizsgálataink szerint tehát a PDZ kölcsönhatások nagymértékben befolyásolhatják a PMCA4b speciális membrán kompartmentbe történő szerveződését, és ezáltal feltehetően a PMCA  $Ca^{2+}$  jelátvitelben betöltött szerepét is.*

## ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a PMCA4b fehérjét - függetlenül az apoptózist kiváltó októl – a kaspáz-3 proteáz hasítja és egy 120 kDa molekulatömegű fragment képződik. A fehérje közben elveszíti C-terminális regulátor régióját, és „szuper aktív” válik. Feltételezhetően a „szuper aktív” PMCA fragment hatékony

védelme alatt, az apoptotikus sejtek hosszú ideig képesek a citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$  szint szabályozására. Oxidatív stresszt kiváltó szerek hatására a PMCA fehérje nem fragmentálódik, viszont ebben az esetben jelentős mértékű internalizáció és a citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$  szint hosszan tartó megemelkedése figyelhető meg. A C-terminális régió meghatározónak bizonyult a PMCA4b plazmamembránban történő eloszlásának szempontjából is. Kimutattuk, hogy a PSD-95 állványfehérje a PMCA C-terminálisán található PDZ-kötő motívumon keresztül elősegíti a PMCA kijutását a plazmamembránba, és itt a képződő fehérje-komplex szigetszerű csoportokba rendeződik. Kísérleteink arra utalnak, hogy különféle PDZ kölcsönhatások nagymértékben befolyásolhatják a PMCA4b speciális membrán kompartmentbe történő szerveződését, ezáltal a PMCA  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelben betöltött szerepét. További kutatásaink során szeretnénk feltárni, hogy a variábilis C-terminális régió egyes motívumai milyen szerepet játszanak a PMCA fehérjék dinamikus megoszlásában, a lokális és globális  $\text{Ca}^{2+}$  jel szabályozásában, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációváltozások által modulált jelátviteli folyamatokban. Vizsgálataink elősegíthetik a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis felborulására visszavezethető egyes malignus elváltozások illetve degeneratív betegségek közötti összefüggések jobb megismerését.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Wang, K.K., A. Villalobo, and B.D. Roufogalis, *The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter*. Trends Cell Biol, 1992. 2(2): p. 46-52.
2. Penniston, J.T. and A. Enyedi, *Modulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump*. J Membr Biol, 1998. 165(2): p. 101-9.
3. Strehler, E.E., et al., *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1099: p. 226-36.
4. Brini, M. and E. Carafoli, *Calcium pumps in health and disease*. Physiol Rev, 2009. 89(4): p. 1341-78.
5. Strehler, E.E. and D.A. Zacharias, *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps*. Physiol Rev, 2001. 81(1): p. 21-50.
6. Kim, E., et al., *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains*. J Biol Chem, 1998. 273(3): p. 1591-5.
7. DeMarco, S.J. and E.E. Strehler, *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins*. J Biol Chem, 2001. 276(24): p. 21594-600.
8. Paszty, K., et al., *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2002. 277(9): p. 6822-9.
9. Paszty, K., et al., *The caspase-3 cleavage product of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4b is activated and appropriately targeted*. Biochem J, 2005. 391(Pt 3): p. 687-92.
10. Paszty, K., et al., *Cleavage of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase during apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1099: p. 440-50.
11. Pottorf, W.J., 2nd, et al., *Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump activity in rat hippocampal neurons*. J Neurochem, 2006. 98(5): p. 1646-56.
12. Mao, T., et al., *Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators*. PLoS One, 2008. 3(3): p. e1796.
13. Kotlikoff, M.I., *Genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology*. J Physiol, 2007. 578(Pt 1): p. 55-67.

14. Caride, A.J., et al., *The plasma membrane calcium pump displays memory of past calcium spikes. Differences between isoforms 2b and 4b.* J Biol Chem, 2001. 276(43): p. 39797-804.
15. Dode, L., et al., *Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses.* J Biol Chem, 2003. 278(48): p. 47877-89.
16. Penheiter, A.R., et al., *A model for the activation of plasma membrane calcium pump isoform 4b by calmodulin.* Biochemistry, 2003. 42(41): p. 12115-24.
17. Caride, A.J., et al., *The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump isoform 4a differs from isoform 4b in the mechanism of calmodulin binding and activation kinetics: implications for Ca<sup>2+</sup> signaling.* J Biol Chem, 2007. 282(35): p. 25640-8.
18. Goellner, G.M., S.J. DeMarco, and E.E. Strehler, *Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase b-splice variants.* Ann N Y Acad Sci, 2003. 986: p. 461-71.
19. Kruger, W.A., G.R. Monteith, and P. Poronnik, *The plasma membrane Ca(2+)-ATPase: regulation by PSD-95/Dlg/Zo-1 scaffolds.* Int J Biochem Cell Biol.
20. Padanyi, R., et al., *PSD-95 mediates membrane clustering of the human plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump isoform 4b.* Biochim Biophys Acta, 2009. 1793(6): p. 1023-32.