

A plazmamembrán foszfinozítidek sejtélettani szerepének vizsgálata újonnan fejlesztett bioszenzorokkal

Doktori tézisek

Dr. Tóth József

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Várnai Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Lizák Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Maléth József, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Földes Gábor, Ph.D.,
egyetemi adjunktus
Dr. Homolya László, az MTA doktora,
tudományos munkatárs

Budapest
2016

Bevezetés

A foszfoinozítid (PPI_n) név a foszfatidilinozitol (PtdIns) eltérő módon foszforilált formáit jelenti, melyek a lipidkettősréteg szerkezetű membrán citoplazmatikus rétegében helyezkednek el. Az inozitol gyűrű 3',4' vagy 5' pozícióban történő, reverzibilis foszforilációján keresztül hét különféle PPI_n szintetizálódhat. Az egyes PPI_n-ek funkciói bizonyos mértékig összekapcsolódnak, hiszen keletkezésük, egymásba való átalakulásuk a kinázok és foszfatázok által meghatározott és szigorúan szabályozott. Ez a gyors, regulált átalakulás egyúttal a sejtfunkciók széles spektrumában való részvételre teszi alkalmassá a molekulákat. Míg kezdetben csupán membránalkotó strukturális lipidekként tekintettek rájuk, a sejtbiológiai ismeretek bővülésével ma már kijelenthetjük, hogy szinte nem lehet olyan sejtélettani folyamatot találni, melyben a PPI_n-eknek ne lenne alapvető jelentőségük. Szerepet játszanak a klasszikus jelátviteli folyamatok mellett a membránok közötti közlekedés különböző formáiban, a citoszkeleton változásaiban, bizonyos nukleáris folyamatokban és a membránpermeabilitás-, valamint egyes transzportfolyamatok szabályozásában.

Az intracelluláris lipidek kutatása során számos nehézség adódhat, mely kiemelten igaz a PPI_n-ek kapcsán is. Bár a sejt minden kompartmentjében előfordulnak ezen lipidek, koncentrációjuk mégis nagyon alacsony, néha a jelenlegi módszerekkel detektálhatatlanok, ráadásul szintjük nagyon gyorsan képes változni. Az PPI_n-ek szintézisében több tucat enzim vesz részt, sokszor egyazon szintetikus lépést több is képes katalizálni, így az egyes enzimek specifikus szerepét nehéz vizsgálni. A különböző sejtalkotókban a PPI_n-ek eltérő módon foszforilált származékai vannak jelen, mintegy megjelölik azok membránját, ezáltal a fehérjék sejten belüli lokalizációjának meghatározásában alapvető a szerepük. Szintjük fiziológias vagy mesterséges megváltozása mindezen fehérjék működését befolyásolja, így a különböző folyamatok szintén nehezen vizsgálhatóak specifikusan.

Az elmúlt 3 évtizedben számos a PPI_n-ek szintjének mérésére hivatott technika került kidolgozásra. Az egyik első ilyen módszernél a sejteket metabolikusan kellett megjelölni myo-[³H]-inozittal vagy ³²P-foszfáttal, majd ezt követően lipidextrakciót végeztek és vékonyréteg kromatográfiával szeparálták a különböző lipideket. Bár az inozitol lipid kutatásnak megteremtették az alapjait ezek a kísérletek, a kivitelezésük és értékelésük számos nehézségbe ütközött, a megfelelő jel detektálásához sejtek millióira volt szükség, a kinetikai mérések rendkívül körülményesek voltak, és a PPI_n-ek intracelluláris lokalizációjáról semmilyen információval nem szolgáltak, emellett az izomereket sem tudták megkülönböztetni. Jelentős továbblépés volt a lipidek mennyiségének tömegspektroszkópos

elemzése, mely nagy érzékenységgel bír, ugyanakkor ez a technika sem képes megfelelő szubcelluláris felbontást biztosítani, illetve nem megoldott a különböző izomerek elkülönítése sem. Más kutatócsoportok fluoreszcensen jelölt lipideket fejlesztettek, melyeknek mindenképp meg van az az előnye, hogy segítségével jól nyomon lehet követni a lipidek sejten belüli elhelyezkedését, mozgását, de az endogén lipidekhez képest megváltozott hidrofobicitásuk jelentősen befolyásolja megoszlásukat. További alternatíva lehet a különböző PPIn izomerek ellen kifejlesztett antitestek alkalmazása, ugyanakkor ezek csak fixált sejteken használhatóak, így a dinamikus lipid változások nyomon követésére nem alkalmasak. Az igazi nagy áttörést a fluoreszcensen jelölt, specifikus PPIn-kötésre képes fehérjedomének (PBD) felismerése és alkalmazása hozta meg. Bár ezen technikának is vannak limitáló tényezői (pl. nehezen számszerűsíthető eredmények), segítségével az elmúlt bő évtizedben rengeteg információt sikerült nyerni a PPIn-ekről.

PhD munkám célja elsősorban az volt, hogy egy olyan molekuláris eszköztárat fejlesszünk ki, mellyel a különböző PPIn-ek szintjében beállt változásokat jó időbeli felbontással, kompartment specifikusan, könnyen kvantifikálható módon tudjuk kimutatni.

Célkitűzések

Bár számos módszer létezik a PPIIn-ek szintjének nyomon követésére, de ezek sokszor nem elég érzékenyek, pontatlanok, bonyolultak, a fiziológiához közeli koncentrációjú hormonális ingerlés hatására bekövetkező dinamikus változások kvantitatív mérése nem megoldott.

Elsődleges céljaink ezért az alábbiak voltak:

- Intramolekuláris FRET és BRET szenzorok fejlesztése, mellyel lehetővé válik a citoplazmatikus $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ megbízható nyomon követése.
- A PM $\text{PtdIns}4P$, $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ és $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -szintjének dinamikus változását specifikusan, nagy időbeli, szubcelluláris felbontással, érzékenyen detektálni képes BRET bioszenzorok létrehozása és tesztelése.

Az új molekuláris eszköztárral, pedig az alábbiakat terveztük vizsgálni:

- RTK és GPCR aktivációt követő PPIIn-szint változások leírása, molekuláris hátterének feltérképezése.
- A receptoraktiváció hatására létrejövő lipidszint változások szerepének meghatározása különböző sejtélettani folyamatokban [úgy mint $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel, receptor-endocitózis].

Módszerek

Plazmidkonstrukciók

A vad típusú M_3 muszkarinos acetilkolin receptort (M_3R) az S&T cDNS Resource Center-től vásároltuk. A vad típusú epidermális növekedési faktor receptort (EGFR), és az 1-es típusú angiotenzin II receptor nem-internalizálódó deléciós mutánsát ($AT_1R-\Delta 319$), valamint a lipidszint változások endocitózisra kifejtett hatásának vizsgálatához használt β_2AR -luc, Venus-Rab5 és β -arresztin2-mRFP konstrukciókat munkacsoportunk már korábban is használta kísérletei során.

A foszfoinozítid felismerő bioszenzorok elkészítése során először lecseréltük a már meglévő PLC δ 1-PH-GFP, a PPI α kötésre képtelen mutáns PLC δ 1(R40L)-PH-GFP, GFP-OSH2-2xPH és Btk-PH-GFP konstrukciókban a GFP fluoreszcens fehérjét Ceruleanra (a konfokális mikroszkópos mérésekhez) illetve szuper *Renilla* luciferázra (Luc) (a BRET mérésekhez). A GFP-SidM-P4M konstrukció Balla Tamás ajándéka volt, melynek elkészítettük tandem változatát a nagyobb lipidaffinitás eléréséhez. Ahhoz, hogy specifikusan a PM lipidjeinek változását tudjuk mérni BRET módszerrel, az energiaakceptor mVenus FP-t a PM-ba kell irányítani. Ehhez többféle PM irányítószekvenciával ellátott konstrukciót is készítettünk, melyek közül a dolgozatomban bemutatásra kerülő kísérletek során kettőt használtam fel. Egyik az egér Lck fehérje N-terminális irányítószekvenciája (L_{10}) míg a másik a humán c-Src fehérje N-terminális irányítószekvenciája (S_{15}). Ezen két szekvenciára azért esett a választás, mert több közlemény alapján az L_{10} és S_{15} az eltérő poszttranszlációs lipidmodifikációik következtében a PM eltérő mikrodoménjaiban helyezkedik el. Annak biztosítása végett, hogy az intermolekuláris szenzoraink mindkét tagja biztosan kifejeződjön a transzfektált sejtekben, a T2A szekvenciát alkalmaztuk. Az L_{10} -mVenus és S_{15} -mVenus konstrukciók C-terminális végéhez fuzionáltuk a T2A peptidszekvenciát, majd ezen konstrukciókat a Cerulean-nal vagy Luc-zal jelölt lipid kötő doménokat kódoló plazmidokba illesztettük.

Az intramolekuláris $Ins(1,4,5)P_3$ szondák alapját a munkacsoportunk által már korábban is használt mRFP- $InsP_3R$ -LBD konstrukció (a humán 1-es típusú $InsP_3$ receptor 224-605 szakaszának szekvenciája) képezte, amelybe irányított mutagenézissel (Agilent Technologies) vittük be az alábbi mutációkat: R265K, R269K, R568K, R504K és dupla R265K,269K, hogy ezáltal csökkent $Ins(1,4,5)P_3$ affinitású fehérjékhez jussunk. A szenzorok készítése során egy mVenust és Ceruleant tartalmazó FRET plazmidba a fluoreszcens fehérjék közé illesztettük be a vad típusú vagy mutáns $InsP_3R$ -LBD szekvenciákat. A FRET szenzorok Cerulean-ját

cseréltük le Luc-ra, így jutottunk el a BRET méréseknél használható szondákhoz. Az intramolekuláris Ca^{2+} szenzor elkészítéséhez a kalcium mérésekhez széleskörűen alkalmazott Cameleon D3 fúziós fehérje megfelelő szekvenciáját beillesztettük a fentebb leírt vad típusú $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ szenzorunkba az $\text{InsP}_3\text{R-LBD}$ helyére.

A lipiddepléciós rendszert alkotó fehérjekonstrukciók egy részét munkacsoportunk már korábban többször használta kutatásaihoz. A kísérleteim során használt konstrukciók lényegében a korábbi plazmidokon alapultak, de a szenzoroknál leírtakhoz hasonlóan az FRB-domént a PM-ba irányító korábbi szekvenciát az Lck és a c-Src fehérjék N-terminális aminosavaira cseréltük le. Az mRFP-FKBP-Pseudojanin, az mRFP-FKBP-Sac1dead-5ptase és mRFP-FKBP-Sac1-5ptasedead konstrukciókat Gerald R.V. Hammond bocsátotta rendelkezésünkre. Utóbbi konstrukciót felhasználva elkészítettünk egy csak Sac1 enzimet tartalmazó változatot is (elhagyva a működésképtelen 5-foszfátáz a C-terminálisról). A rendelkezésünkre álló összes enzim esetén elkészítettük a lipiddeplécióhoz szükséges mindkét fehérjét kifejező T2A virális szekvenciát tartalmazó plazmidokat is, a korábbiaknak megfelelő módon.

Sejtvonalak, tranziens transzfekció

A méréseket HEK 293T és COS-7 sejteken végeztük. A sejteket 10cm-es petricsészében tenyésztettük 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomocint (50 $\mu\text{g/ml}$) tartalmazó DMEM médiumban, egy 37°C-os, 5% CO_2 -os párás levegőt biztosító inkubátorban.

A BRET méréseket megelőző tranziens transzfekcióhoz a sejteket polilizinnel előkezelt (0,001%, 60 perc) 96-lyukú lemezekre helyeztük 10^5 sejt/lyuk mennyiségben, 100 μl Opti-MEM oldatban szuszpendálva. Ehhez 50 μl transzfekciós elegyet adtunk, mely 1,5 $\mu\text{l/lyuk}$ GeneCellin reagenst és 0,24-0,3 $\mu\text{g/lyuk}$ DNS-konstrukciót tartalmazott. Hat órával a transzfekciót követően sérumot és antibiotikumokat tartalmazó DMEM-et adtuk a sejtekhez (100 $\mu\text{l/lyuk}$). A kísérleteket 25 órával a transzfekciót követően kezdtük el.

Mikroszkópos mérésekhez és a Western blot analízishez a HEK 293T vagy a COS7 sejteket polilizinnel előkezelt (0,001%, 45-60 perc) 35 mm átmérőjű, 1,5-ös vastagságú üveg fedőlemezre helyeztünk $2-3 \times 10^5$ sejt/fedőlemez sűrűségben, a transzfekciót megelőző napon. A transzfekció során a sejtek médiumát Opti-MEM-re cseréltük (1 ml/fedőlemez) és ehhez adtuk hozzá 200 μl végtérfogatban a 2 μl Lipofectamine 2000-t és méréstől függően 0,5-2 μg DNS-konstrukciót tartalmazó transzfekciós elegyet. Hat órával a transzfekciót követően a

korábban leírt szérumot és antibiotikumokat tartalmazó DMEM-et adtuk a sejtekhez (1 ml/fedőlemez). A kísérleteket 24 órával a transzfekciót követően kezdtük el.

Western blot

HEK 293T sejteket 24h-val a tranziens transzfekciót követően proteáz- és foszfatázinhibitorokat tartalmazó SDS-mintapufferbe vettük fel, szonikáltuk, 5 percen át 95°C-on főztük, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Ezt követően a fehérjéket PVDF membránra vittük át. Az antitestek nem specifikus kötődésének blokkolását 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-oldatba kevert tejporral (5%) végeztük (30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubálva). Az antitesteket tejporos PBST oldatban adtuk a mintához, az elsődleges antitestek esetén 500-szoros a másodlagosaknál 5000-szeres hígításban. Az antitestek láthatóvá tételéhez kemilumineszcens Immobilion Western HRP szubsztrát reagenst (Millipore) használtunk.

Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópos méréseket HEK 293T és COS-7 sejteken végeztük. Közvetlenül a mérés előtt a fedőlemezeket, egy AttoFluor (Invitrogen) kamrába helyeztük, majd egyszeri mosást követően 800 µl módosított Krebs-Ringer pufferoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérést 35°C-on hajtottuk végre, az alkalmazott ingereket 200 µl térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. A felvételeket Zeiss LSM 710 típusú pásztázó konfokális mikroszkóppal, 63-szoros nagyítású, 1,4-es numerikus apertúrájú Plan-Apochromat immerziós olajas objektívvel, multi-track frame-scan módban, 1 µm-es optikai szeletvastagsággal készítettük. A gerjesztéshez 458 nm (cerulean FP esetén) és 514 nm (YFP ill. mVenus esetén) hullámhosszúságú argonlézert illetve 543 nm-en emittáló hélium-neon lézert használtunk. A különböző fluoreszcens fehérjék emissziójának detektálása az alábbi hullámhossz-tartományokon történt: Cerulean: 467-486 nm; YFP és mVenus: 515-573 nm; mRFP: 612-728 nm. Az elkészült képek utólagos feldolgozását Adobe Photoshop CS3 programmal végeztük.

FRET mérések kivitelezése

A FRET méréseket HEK 293T sejteken hajtottuk végre, Attofluor kamrába helyezett fedőlemezeken, módosított Krebs-Ringer oldatban. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük, egy 40-szeres nagyítású, 1,3-as numerikus apertúrájú Plan-Apochromat immerziós

olajos objektívvel felszerelt inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Axio Observer D1), a felvételeket Cascade II kamerával (Photometrics) készítettük. A megfelelő hullámhosszú (435 nm és 500 nm) gerjesztő fényt egy 75 wattos Xenon lámpához (DeltaRam) kapcsolt monokromátor biztosította. Az emittált fényt Chroma 69008bs dikroikus sugárostóval (Chroma Technology Corp.) választottuk szét, majd a detektáláshoz Cerulean esetén 470/24 nm-es, míg mVenusnál 530/30 nm-es filtereket használtunk. A képek 5 másodpercenként készültek. Az adatok gyűjtése MetaFluor programmal történt (Molecular Devices). Az eredmények további kiértékelésére a MetaMorph (Molecular Devices) szoftvert vettük igénybe.

BRET mérések kivitelezése

96-lyukú lemezre tapasztott transzfektált sejtek médiumát 25h-val a tranziens transzfekciót követően lecseréltük 50 µl módosított Krebs-Ringer pufferra, majd fél órát 37°C-on inkubáltuk a sejteket. A méréseket Mithras LB 940 szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel (Berthold Technologies) 37°C-on végeztük. A mérés kezdetén a sejtpermeabilis luciferáz szubsztrátot, cöclenterazin *h*-t adtunk a sejtekhez (40 µl, végkoncentrációja 5 µM). A donor és akceptor intenzitások méréséhez 485 nm-es illetve 530 nm-es emissziós filtereket alkalmaztunk, egy hullámhossz 0,5 másodpercig volt detektálva pontonként. A kísérletekhez használt vegyületeket szintén a módosított Krebs-Ringer pufferba keverve, 10 µl térfogatban adtuk a sejtekhez.

A BRET hányadosot úgy kaptuk meg, hogy az 530 nm-en mért intenzitást elosztottuk a 485 nm-en mért értékkel. Intramolekuláris BRET-szenzorok esetén az I/I_0 érték reciprokát számoltuk, és ezeket ábráztuk a görbéken. A reciprok érték képzésére az eredmények értelmezhetőségének megkönnyítése céljából volt szükség, hogy így az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szint emelkedése egyben BRET-jel növekedésnek adódjon. Mivel az intermolekuláris szenzorok használatakor, az abszolút hányados nagymértékben függ a szenzorok expressziójának szintjétől, esetükben máshogy végeztük a jel normalizálását. Minden esetben 100%-nak tekintettük a kiindulási állapotot, 0%-nak pedig azt a BRET hányados értéket vettük, mely olyan sejtekben mérhető, melyek kizárólag a citoplazmatikus szuper *Renilla* luciferázt expresszálják.

Fehérje mennyiségi meghatározás SDS- gélelektroforézissel

A BRET mérések követően a 96-lyukú lemezen letapasztott sejtekre proteáz- és foszfatázgátlót tartalmazó SDS-mintapuffert tettünk, majd egy éjszakán át $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a mintát. Másnap a sejteket felkapartuk, szonikáltuk, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével szeparáltuk a fehérjéket. A fluoreszcens fehérjék detektálása Amersham Typhoon Phosphor Imager (Molecular Dynamics) eszközzel történt. A gerjesztés egy 532 nm-es lézerrel, a detektálás pedig egy 610 nm-es BP filter felhasználásával történt.

Statisztikai analízis

Az adatok elemzéséhez és az ábrák készítéséhez a Sigmaplot 10.0 programot használtuk (Systat Software). A statisztikai számításokhoz a SigmaStat 3.5 (Systat Software) programot vettük igénybe. Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ szenzorok karakterizálása során, a csökkenő-fázis féléletidejének (τ) meghatározásához, minden egyes kísérletnél görbeillesztés történt egy 3 változós exponenciális függvény alapján ($y=y_0+ae^{-bx}$). Az így kapott τ -értékeket leátlagoltuk, majd az átlagokat kétmintás t-próbának vetettük alá. Az intermolekuláris lipidszenzorok karakterizálására végzett gátlószeres vizsgálatok eredményeinek statisztikai elemzésekor egyutas varianciaanalízist (ANOVA), majd Bonferroni t-tesztet hajtottunk végre. A különböző lipiddepléciós kezelések $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jelre kifejtett hatásának vizsgálatokor, illetve az internalizációs mérések statisztikai kiértékelésekor kétutas ANOVA analízist, majd Holm-Sidak post hoc tesztet végeztünk.

Eredmények

Egysejtes és sejtpopulációs méréseknél egyaránt alkalmazható intramolekuláris Ins(1,4,5) P_3 szenzor fejlesztése

Az intakt 1-es típusú Ins(1,4,5) P_3 receptorban (Ins P_3 R) N-terminálisan elhelyezkedő 223 aminosav csökkenti annak ligandaffinitását. Ezeket elhagyva, a 224-605 pozíciójú aminosavakból felépülő ligand kötő domént (LBD) használtuk fel szenzorainkhoz. FRET mérésekhez N-terminálisan Cerulean-t, C-terminálisan pedig Venust kapcsoltunk az Ins P_3 R-LBD-hez, míg a BRET-mérésre alkalmas szenzoroknál N-terminálisan luciferázt, míg C-terminálisan cp173-Venust.

A szondánk továbbfejlesztéséhez olyan mutációkat terveztünk bevinni az Ins P_3 R-LBD-be, melynek révén egy alacsonyabb K_d -értékű szenzorhoz jutunk. A mutáns LBD-ek létrehozásakor kiválasztottunk 4 arginin aminosavat: az R265, R269, R504 és R568 pozícióban találhatóakat, és ezeket lizinre cseréltük. A teszteléshez *in vitro* kötési vizsgálatot végeztünk [3 H]-Ins(1,4,5) P_3 felhasználásával. Az R504K és az R265,269K dupla mutáns nagyon gyengén kötötte az Ins(1,4,5) P_3 -ot, míg az R265K, R269K és R568K mutáns domének a vártak megfelelően a vad típusú LBD-nél (224-605) gyengébben, de a szupresszor doménnel is rendelkező intakt LBD-nél (1-605) nagyobb affinitással kötötték ligandjukat. A kapott eredmények alapján a vad típusú szenzorhoz hasonlóan elkészítettük az R265K mutációt hordozó szondát is.

Intermolekuláris PPIIn-szenzorok tervezése

Míg a bemutatott Ins(1,4,5) P_3 szonda intramolekuláris mérést tett lehetővé, a PPIIn-ek detektálásához intermolekuláris szenzorokat készítettünk. A különböző PPIIn-ek specifikus felismerését a széles körben alkalmazott LBD-ek révén értük el. A PtdIns4 P mérésekhez két különböző, az irodalomban használt PtdIns4 P -kötő domént tartalmazó szenzort is elkészítettünk, melyek közül az egyik az OSH2 fehérje PH-doménjét tartalmazta, míg a másik a SidM fehérje P4M doménjét. Hogy növeljük ezen szenzorok lipidaffinitását, mindkét szenzor esetén tandem építettük be a doméneket. A PtdIns(4,5) P_2 méréséhez a PLC δ 1, míg a PtdIns(3,4,5) P_3 detektálásához a Btk PH-doménjét használtuk. A felsorolt LBD-ekhez kapcsoltuk a luciferáz enzimet, illetve készítettünk olyan verziókat is, melyekben Ceruleant kötöttünk hozzájuk, így lehetővé téve a szenzorok mikroszkópos felhasználását. Ahhoz, hogy az energiatranszfer mérések során kapott jel PM-specificitását biztosítsuk, az energiaakceptor

Venus FP-t rövid PM irányító szekvenciával láttuk el. Kétféle irányító szekvenciát is használtunk, egyrészt az Lck fehérje első 10- (L_{10}), másrészt a c-Src első 15 aminosavát.

Az intermolekuláris BRET mérések kivitelezése úgy optimális, ha a sejtek a szenzorok mindkét tagját közel állandó arányban expresszálják. Ennek elérésére egy olyan plazmidot hoztunk létre, mely az energiatranszferhez szükséges mindkét molekulát külön-külön kódolja, a kettő között pedig a T2A szekvencia található meg. Ennek translációja során egy molekuláris hasadás lép fel, de a fehérjeszintézis folytatódik, így mindkét fehérje megszintetizálódik, még hozzá ekvimoláris mennyiségben. A hasadás létrejöttének ellenőrzésére Western blot analízist végeztünk anti-GFP ellenanyag felhasználásával. Azt kaptuk, hogy a sejtekben külön-külön kimutathatóak a szenzoraink tagjai, és csak nagyon kis hányaduk expresszálódott vágatlan formában.

A szenzorok intracelluláris elhelyezkedésének megállapításához plazmidjaikat COS-7 sejtekbe transzfektáltuk, majd konfokális mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. A PLC δ 1-PH és az OSH2-2xPH egyértelmű PM elhelyezkedést mutatott nyugvó sejtekben, míg a SidM-2xP4M a PM mellett a PtdIns4P-ban szintén gazdag Golgiban is megtalálható volt. Mivel nyugvó sejtekben a PtdIns(3,4,5) P_3 szintje alacsony, ezért a Btk-PH citoplazmatikusan helyezkedett el. A vártak megfelelően mind az L_{10} -, mind az S_{15} fehérjék a PM-ba lokalizálódtak.

A szenzorok BRET méréses teszteléséhez HEK 293T sejteket transzfektáltunk különböző dózisu (0,03-0,12 μ g/lyuk) L_{10} -Venus-T2A-PLC δ 1-PH-Luc, illetve az R40L mutáns, PtdIns(4,5) P_2 -ot nem kötő PLC δ 1-PH domént tartalmazó plazmiddal. A PtdIns(4,5) P_2 teljes degradációjához egyrészt gátoltuk a lipid szintézisét PI4K inhibitor 10 μ M Wm-nal, a lebontását pedig egyidejűleg 10 μ M ionomycin hozzáadásával idéztük elő. A két szer együttes hatásának eredőjeként egy nagymértékű BRET-jel csökkenést tapasztaltunk. Az így kapott BRET hányados, expressziós szinttől függetlenül ugyanazon értékre állt be, mely közel megegyező volt a lipidet nem kötő mutáns szenzorral mérhető jelekkel, ami jelzi a szenzor nagyfokú érzékenységét még alacsony lipid koncentráció esetén is.

A vad típusú és mutáns Ins(1,4,5) P_3 szenzorok dinamikus tartományának és reverzibilitásának összehasonlítása

Az Ins(1,4,5) P_3 szenzoraink affinitásának meghatározását követően összehasonlítottuk a vad típusú és az alacsony affinitású mutáns szenzor esetén kapott Ins(1,4,5) P_3 -indukálta jeleket. Ehhez HEK 293T sejteket transzfektáltunk a szondáink cDNS-ével és az 1-es típusú angiotenzin II receptor nem-internalizálódó mutánsával (AT $_1$ R- Δ 319). Az Ang II 10^{-12} – 10^{-7}

M koncentrációtartományban növekvő BRET-jelet hozott létre mindkettő szenzor esetén.. Míg a maximális válaszuk megegyezett, megfigyelhető volt egy kinetikai különbség a két szenzor összehasonlításakor, a vad típusúhoz képest egy enyhe jobbrtolódás figyelhető meg az R265K mutációt hordozó szenzor dózis-hatás görbéjén.

A két szenzor reverzibilitásának vizsgálatához vad típusú M₃R-t tranziensen kifejező HEK 293T sejteket 10 μM karbakollal (Cch) ingereltünk, mely a Gq-útvonal aktiválása révén növeli a citoplazma Ins(1,4,5)P₃- és Ca²⁺-szintjét. Ezen válaszok gyorsan megszüntethetőek, ha a receptor kompetitív antagonistáját, atropint (10 μM) adunk a sejteknek. A jelek emelkedő fázisa szinte teljesen megegyezett a vad típusú és a mutáns szenzorok esetén., viszont, az alacsony affinitású szenzor off-válasza szignifikánsan gyorsabb volt ($\tau = 23,0 \pm 2,3$ másodperc), mint a vad típusúé ($\tau = 44,9 \pm 7,5$ másodperc) (átlag \pm sztenderd hiba, n=5; p=0,024). Az Ins(1,4,5)P₃ méréssel párhuzamosan nyomon követtük a citoplazmatikus Ca²⁺-koncentrációban bekövetkező változásokat is egy alacsony affinitású Ca²⁺-szenzornak, a Cameleon D3-nak a BRET-verziójával. Azt kaptuk, hogy a Ca²⁺-jel a mutáns Ins(1,4,5)P₃-szenzorral kapott jellel megegyező kinetikával cseng le atropin adását követően. Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy a további Ins(1,4,5)P₃-mérésekhez az R265K mutációt hordozó szenzort használjuk.

A PPIIn-szenzorok lipidszelektivitásának vizsgálata

A két PtdIns4P szenzor összehasonlításához első körben a munkacsoportunk által többször használt rapamycin-indukálta heterodimerizáció elvén működő lipiddeplációs rendszert hívtuk segítségül, melynek révén lehetőség nyílik szelektíven befolyásolni a PPIIn-ek szintjét. HEK 293T sejteket transzfektáltunk egyrészt a lipiddeplációs rendszer tagjaival, másrészt az OSH2-2xPH és SidM-2xP4M, illetve kontrollként a PLCδ1-PH doméneket tartalmazó BRET szenzorokkal. A szelektív PPIIn bontást úgy értük el, hogy a PtdIns4P 4-es pozíciójú foszfátcsoportját hasítani képes Sac1 enzimet, vagy a PtdIns(4,5)P₂ 5-ös pozíciójú foszfátjának bontását végző 5-foszfátázt (5ptase) juttatuk a sejtekbe, ill. a kísérleteket elvégeztük úgy is, hogy mindkét konstrukciót kifejezték a sejtek. A PtdIns(4,5)P₂-szint és így a PLCδ1-PH BRET szenzor által mutatott jel azokban a sejtekben csökkent gyorsan, amelyek expresszálták az 5ptase enzimet, de a Sac1 enzim önmagában nem okozott jelváltozást. A SidM-2xP4M bioszenzort kifejező sejtekben a Sac1 aktiváció hatására egy jelentős BRET-jel csökkenés következett be, míg ha csak az 5ptase-t irányítottuk a PM-hoz, akkor egy kismértékű növekedést figyeltünk meg, mely összhangban áll azzal, hogy az 5ptase a PtdIns(4,5)P₂ –ot PtdIns4P-tá bontja. Az OSH2-2xPH szondákkal azt kaptuk, hogy önállóan

sem a Sac1, sem az 5ptase nem okozott BRET-jel változást, hanem kizárólag a két enzim együttes aktiválása eredményezte azt. A Ceruleannel és Venusszal jelölt szenzorokkal konfokális mikroszkópos méréseket végezve a BRET eljárásnál tapasztaltakkal teljesen megegyező eredményeket kaptunk.

Következő lépésként megnéztük, hogy miként befolyásolja a vizsgált BRET szenzorainkat, ha különböző PI4K inhibitorokkal kezeljük az őket expresszáló HEK 293T sejteket. Amennyiben a III-as típusú PI4K-okat gátló széles szubsztrátspecifitású 10 μ M Wm, vagy 100 μ M LY294002 (LY) vegyülettel inkubáltuk a sejteket, a SidM-2xP4M szenzor egy szignifikáns jelcsökkenést mutatott a kontrollhoz képest, ugyanakkor az OSH2-2xPH és a PLC δ 1-PH szondák által mért nBRET hányados nem változott számottevően. Amennyiben egy szűk szubsztrátspecifitású PI4KA-t gátló vegyületet, 10 nM A1-et adtunk a sejteknek, akkor szintén egy szignifikáns jelcsökkenést figyelhettünk meg a SidM-2xP4M szenzorral, de a PI4KB gátló 250 nM PIK-93 nem okozott érdemi változást, és egyik vegyület sem befolyásolta az OSH2-2xPH és a PLC δ 1-PH doméneket tartalmazó szenzorok által mért jelet. Összeségében ezek alapján azt a konklúziót vontuk le, hogy a SidM-2xP4M doménnel rendelkező szenzor megbízhatóan képes nyomon követni a PM PtdIns4P szintjében beállt változásokat, és az OSH2-2xPH ilyen célból történő felhasználását mindenféleképpen fenntartásokkal kell kezelni.

A PM-on belüli, PtdIns(4,5) P_2 -ban gazdag területek vizsgálata

A PM szekezete heterogén, ezért felmerült bennünk annak lehetősége, hogy nem mindegy a PM-on belül pontosan hova, mely mikrokompartmentbe irányítjuk szenzorunk akceptor tagját. Ennek összehasonlítottuk az Lck első 10 aminosavát (L_{10}), mely a PM rendezett, illetve a c-Src első 15 aminosavát (S_{15}), mely a PM rendezetlen régióba juttatja a fehérjét. Ebből kiindulva a PLC δ 1-PH domént tartalmazó szenzornak elkészítettük két változatát is, melyekben a Venust eltérő mikrokompartmentekbe irányítottuk. A vizsgálatokhoz HEK 293T sejteket transzfektáltunk a PtdIns(4,5) P_2 szenzorokkal, illetve vad típusú vagy nem internalizálódó (Δ 319) AT $_1$ R-ral, majd a sejteket 100 nM Ang II-vel ingereltük. A szenzorok között sem kinetikai sem pedig amplitúdóbeli különbség nem volt kimutatható egyik receptor esetén sem. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy okoz-e mérhető funkcionális eltérést [az Ins(1,4,5) P_3 -jelet követve], ha ugyanazon szenzort használjuk, de eltérő PM mikrodoménben váltunk ki akut PtdIns(4,5) P_2 -depléciót. Utóbbi eléréséhez a már korábban bemutatott heterodimerizációs rendszerünket hívtuk segítségül, melyből a szenzorokhoz hasonló módon szintén két verziót hoztunk létre. Ebben az esetben is azt láttuk,

hogy az akut PtdIns(4,5) P_2 -szint csökkenés függetlenül attól, hogy az 5ptase enzimet az L₁₀-FRB konstrukcióval a rendezett vagy az S₁₅-FRB révén a rendezetlen PM régiókba juttatjuk, ugyanolyan mértékben gátolta az Ins(1,4,5) P_3 -jelet. Következő lépésként összehasonlítottuk, hogy mi történik akkor, ha a különböző mikrodoménekben váltjuk ki a PtdIns(4,5) P_2 depléciót, és az L₁₀-es vagy az S₁₅-ös PtdIns(4,5) P_2 szenzorunkkal detektáljuk a jelváltozásokat illetve további kontrollként megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a szignál, ha nem egy PM marker és a PLC δ 1-PH között mérünk energiáttranszfert, hanem két LBD között, melyek egyike luciferázzal, míg a másik Venuszal van megjelölve, de ekkor sem volt különbség a szenzorok között. Összességében azt a konklúziót vontuk le, hogy a mi mérési körülményeink között nem számít, hogy az energiaakceptort hova irányítjuk a PM-on belül, struktúráisan elkülönülő PPIIn készleteket nem tudtunk kimutatni.

Az EGF és M₃ receptorok aktivációját követő PPIIn-változások nyomon követése

Miután megtörtént szenzoraink karakterizálása megvizsgáltuk, hogy különböző PM receptorok aktiválódása során milyen dinamikus változások következnek be a PPIIn-ek szintjében. Kísérleteinkhez egyrészt egy RTK családba tartozó EGFR-t választottuk, mely mind a PI3K útvonalat, mind a PLC γ -t aktiválja, másrészt a GPCR-ok közé sorolható M₃R receptort, mely a PLC β aktiválása révén hat PPIIn homeosztázisra. A kísérletekhez a receptorokat és a bioszenzorokat tranziensen transzfektáltuk HEK 293T sejtekbe. Az EGFR 100 ng/ml EGF agonistával történő ingerlése, a vártan megfelelően emelte a PM PtdIns(3,4,5) P_3 szintjét, valamint kismértékű Ins(1,4,5) P_3 -szint növekedést is létrehozott. Mivel mind a PI3K mind a PLC enzim szubsztrátja a PtdIns(4,5) P_2 , ezért nem volt meglepő, hogy ezen lipid mennyisége az előzőekkel párhuzamosan csökkent. Eglepődve tapasztaltuk ugyanakkor, hogy a PM PtdIns4P a várttal ellentétben nem csökkent, hanem kismértékben ugyan, de nőtt.

Hasonló kísérleteket végeztünk M₃R-t tranziensen expresszáló sejteken is. Amennyiben 10⁻⁴ M Cch-lal ingereltük ezen sejteket, egy gyors és jelentős Ins(1,4,5) P_3 emelkedést kaptunk, mely együtt járt a PM PtdIns(4,5) P_2 és PtdIns4P szintjének nagymértékű csökkenésével. Amennyiben alacsonyabb 10⁻⁷ M Cch dózist alkalmaztunk akkor az EGFR stimulációval megegyező nagyságú Ins(1,4,5) P_3 -jel emelkedést és PtdIns(4,5) P_2 -szint csökkenést kaptunk, és a receptor aktivációja ebben az esetben is PtdIns4P növekedést eredményezett. A változásokat megvizsgáltuk konfokális mikroszkóppal is. Míg a 10⁻⁴ M Cch alkalmazásakor egyértelműen látszott a LBD-k transzlokációja, addig alacsonyabb 10⁻⁷ M

Cch adásakor a fehérjék mozgását nem lehetett megítélni. Látható tehát, hogy a kifejlesztett BRET szenzorok jelentős segítséget tudnak nyújtani a dinamikus PPI_n-szint változások vizsgálatához.

A receptor ingerlést követő PtdIns4P-szint emelkedés enzimátikus hátterének vizsgálata

Hogy megvizsgáljuk mely PI4K enzim felelős ezért a növekedésért, EGFR-t ill. M₃R-t tranziensen kifejező sejteket PI4K inhibitorokkal kezeltünk elő, majd 100 ng/ml EGF-ral ill. 10⁻⁷ M Cch-lal aktiváltuk a receptorokat. 10 perc előkezelés alacsony koncentrációjú Wm-nal (100 nM), mely a PI3K-okat már gátolja, de a PI4K-okat még nem, illetve a PI4KB gátló PIK-93-mal (250 nM) nem befolyásolta a kiváltott PtdIns4P emelkedést. Ezzel szemben, ha PI4KA specifikus inhibitor A1-et (10 nM) vagy a PI4- és PI3K-okat egyaránt gátolni képes 10 μM Wm-t adtunk a sejteknek, akkor egyrészt egy nagymértékű bazális PtdIns4P-szint csökkenést kaptunk, másrészt elmaradt a korábban látott BRET-jel emelkedés is. Ezen eredmények arra utalnak, a hormon által indukált PtdIns4P növekedés hátterében a PI4KA enzim áll.

Következő lépésként azt szeretnénk volna kideríteni, hogy milyen jelátvitellel jön létre ez az aktiváció. A PtdIns4P-szint emelkedés létrehozásában a PLC-PKC útvonal vált a fő gyanúsítottá, mely mind a RTK-ok, mind a GPCR-ok stimulációja során aktiválódik. 10 perc előkezelés 2 μM biszindolilmaleimid I (BIM) pan-PKC inhibitorral nem befolyásolta a PM nyugalmi PtdIns4P tartalmát, de az EGF és Cch indukálta PtdIns4P emelkedést teljes mértékben megakadályozta, a hormonális ingerre egy csökkenést kaptunk, mely megfelel a lipid felhasználódásának a PtdIns(4,5)P₂ pótlására. Ha nem receptoringerlés révén aktiváltuk a PKC-t, hanem 100 nM forbol-mirisztát-acetát (PMA) direkt aktivátorral, akkor is PtdIns4P emelkedést figyelhettünk meg, ami arra utal, hogy a PKC-nek egyértelmű szerepe van a RTK aktiváció során megfigyelhető PM PtdIns4P-szint növekedésben.

A PtdIns4P reszintézis szerepe a receptorok jelátvitelében

Kíváncsiak voltunk, hogy a PtdIns4P és PtdIns(4,5)P₂ milyen szerepet töltenek be az EGFR és M₃R szignáltranszdukciójában, elősorban az Ins(1,4,5)P₃-jel fenntartásában. EGF (100 ng/ml) vagy Cch ingerlést követően (10⁻⁷ M és 10⁻⁴ M) monitoroztuk az Ins(1,4,5)P₃-szinteket, majd szelektív PtdIns4P- vagy PtdIns(4,5)P₂-depléciót hoztunk létre a rapamycin-indukálta heterodimerizációs rendszerünk segítségével (Sac1 ill. 5ptase révén), vagy 10 nM A1 adásával gátoltuk a PI4KA enzimet. A vártan megfelelően a PtdIns(4,5)P₂ szintjének

mesterséges lecsökkentése szinte teljes mértékben megszünteti az agonista indukálta $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jelet, mindkét receptor esetében. Amennyiben Sac1 enzimmal hozunk létre $\text{PtdIns}4P$ -depléciót, akkor az csak kis mértékben képes csökkenteni az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ szintjét, ugyanakkor a $\text{PtdIns}4P$ reszintézis gátlásának eredményeként az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ termelődés jelentősen mérséklődött. Ez összhangban áll egy korábbi közleménnyel, melyben leírják, hogy a PM $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ tartalma fenntartható csökkent $\text{PtdIns}4P$ -szint esetén mindaddig, amíg a PI4KA képes $\text{PtdIns}4P$ -t szintetizálni a PM-ban.

A $\text{PtdIns}4P$ reszintézis szerepe a receptorok internalizációjában

Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy az 5ptase konstrukcióval kiváltott $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -depléció a GPCR-ok ingerlést követő endocitózisát gátolja, de ha Sac1 -gyel a PM $\text{PtdIns}4P$ szintjét csökkentjük akutan, akkor annak nincs ilyen hatása. Tovább kívántam vizsgálni a folyamatot, elsősorban annak megítélésére, hogy az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel fenntartásához hasonlóan, szükséges-e a $G\alpha_q$ kapcsolt receptorok ingerlése során bekövetkező de novo $\text{PtdIns}4P$ szintézis az internalizációhoz. Ehhez HEK 293T sejteket transzfektáltunk $\beta_2\text{AR}$ -luc-zal illetve egy a Rab5 Venusszal jelölt változatával, melyek közötti BRET-jel növekedés a receptor endocitózisára utal. Emellett a kísérletek kivitelezéséhez még további két konstrukció kifejeződésére volt szükség, egyrészt, hogy az internalizáció mértékét megnöveljük a β -arresztin2-mRFP-t, másrészt, hogy jelentős $\text{PLC}\beta$ aktivációt tudjunk kiváltani, a vad típusú $M_3\text{R}$ -t transzfektáltuk a sejtekbe.

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy csak masszív PLC aktiváció (10^{-4} M Cch) és így jelentős mértékű $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -depléció gátolja érdemben a $\beta_2\text{AR}$ $1\ \mu\text{M}$ isoprenalinnal kiváltott internalizációját. Ha a mérést megelőzően 10 percig $10\ \text{nM}$ A1 előkezelésnek vetettük alá a sejteket, akkor már 10^{-7} M Cch ingerlés is csökkentette a $\beta_2\text{AR}$ endocitózisát. Az A1 előkezelés önmagában sem az internalizációt, sem a $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -szintet nem csökkentette. Amennyiben Cch-lal ingereltük a sejteket, a PI4KA gátolt sejtekben már 10^{-7} M Cch használata esetén is jelentősen csökkent a $\beta_2\text{AR}$ endocitózisának mértéke, viszont a lipid depléciójának mértékét az előkezelés nem befolyásolta érdemben. Két-utas ANOVA analízist majd Holm-Sidak post hoc tesztet végezve azt kaptuk, hogy a Cch ingerlés az alkalmazott koncentrációtól függetlenül szignifikánsan nagyobb gátló hatást fejtett ki a $\beta_2\text{AR}$ internalizációjára amennyiben a sejteket A1 előkezelésnek vetettük alá, a lipiddepléció mértékében ugyanakkor nincs kimutatható szignifikáns különbség az A1 előkezelt és a kontroll sejtek között. Ez arra utalhat, hogy PM-on belül funkcionálisan elkülönülő PPI-n készletek vannak jelen.

Következtetések

Eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- Létrehoztunk egy olyan szenzort, mellyel mind az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel növekedését, mind a csökkenését detektálni tudjuk élő sejtekben. Kimutattuk, hogy az 1-es típusú $\text{Ins}P3R$ LBD-jában elhelyezkedő, az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -kötésben részt vevő argininek lizinre történő cserélése a ligandaffinitás csökkenésével jár.
- Kialakítottunk egy olyan rendszert, amellyel élő sejtekben, nagy érzékenységgel és időbeli felbontással képesek vagyunk nyomon követni a PM $\text{PtdIns}4P$, $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ és $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ szintjének változását. Megállapítottuk, hogy a SidM-2xP4M domén alkalmasabb a PM $\text{PtdIns}4P$ szintjének vizsgálatára, mint a széles körben használt OSH2-2xPH. Kísérleteink során nem találtunk különbséget a PM rendezett és rendezetlen struktúráinak inozitol lipid összetételében.
- EGFR és M_3R stimulációkor egyaránt azt találtuk, hogy a PM $\text{PtdIns}4P$ szintje nő, mely folyamatban központi szerepe van a PI4KA és PKC enzimeknek.
- Megállapítottuk, hogy az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel és a receptorendocitózis fenntartásához szükség van arra, hogy a $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ fogyásával párhuzamosan aktiválódjon a PI4KA enzim, ugyanakkor a folyamatok a mesterséges $\text{PtdIns}4P$ -szint csökkenésre alig érzékenyek. Ez a jelenség arra utalhat, hogy a PM-ban funkcionálisan elkülönülő PPI_n készletek vannak jelen.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Toth JT, Gulyas G, Toth DJ, Balla A, Hammond G, Hunyady L, Balla T, Varnai P. (2016) BRET-monitoring of the dynamics 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):177-187. **IF**: 5.162

Gulyas G & **Toth JT***, Toth DJ, Kurucz I, Hunyady L, Balla T, Varnai P. (2015) Measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate in living cells using an improved set of resonance energy transfer-based biosensors. *PLoS ONE* 10(5):e0125601. **IF**: 3.234
(*megosztott elsőszerezős közlemény)

Egyéb közlemény:

Toth DJ, **Toth JT**, 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