

A foszfoinozítidek szerepének vizsgálata  
a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok endocitózisában

Doktori értekezés

**Dr. Tóth Dániel**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Liliom Károly, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Dr. Zelles Tibor, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Gyires Klára egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sperlágh Beáta tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Dr. Tóth Sára egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2014

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	7
2.1 A foszfoinozitidekről általában.....	8
2.2 A foszfoinozitidek anyagcseréje.....	9
2.2.1 A foszfoinozítid-kinázok .....	10
2.2.2 A foszfoinozítid-foszfátázok.....	17
2.2.3 A foszfolipáz C enzimek.....	24
2.3 A foszfoinozitidek sejtműködésben betöltött szerepe.....	29
2.3.1 Foszfoinozitidek a plazmamembránban .....	30
2.3.2 Foszfoinozitidek az intracelluláris membránokban és a sejtmagban.....	31
2.4 A receptorendocitózis folyamatának jellemzése.....	33
2.4.1 Az endocitózis típusai .....	33
2.4.2 A receptorendocitózis jelentősége .....	39
2.4.3 Endocitotikus szortírozó jelzések és adaptorfehérjék .....	40
2.5 A foszfoinozitidek kimutatására és változtatására alkalmas módszerek .....	42
2.5.1 Foszfoinozitidek kimutatása .....	42
2.5.2 Foszfoinozitidek szintjének mesterséges változtatása .....	43
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	46
4. MÓDSZEREK.....	47
4.1 Munkánk során használt anyagok.....	47
4.2 Plazmid konstrukciók.....	47
4.3 Sejtvonalak, tranziens transzfekció.....	50
4.4 A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) működési elve és mérése luminométerrel .....	51
4.5 Konfokális mikroszkópia.....	53
4.6 Statisztikai analízis.....	53

5. EREDMÉNYEK.....	54
5.1 Plazmamembrán-receptorok aktiválást követő mozgásának követése BRET módszerrel.....	54
5.1.1 Az AT <sub>1</sub> R klatrinmediált endocitózisának követése .....	54
5.1.2 Vad típusú és mutáns AT <sub>1</sub> R-ok aktiválódást követő mozgásának vizsgálata BRET módszerrel .....	58
5.1.3 További receptorok mozgásának követése BRET módszerrel .....	61
5.2 A plazmamembrán PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -szintjének akut csökkentése.....	64
5.3 A plazmamembrán PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -depléciójának hatása az AT <sub>1</sub> R endocitózisára .....	66
5.4 A PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -depléció hatása más receptorok endocitózisára .....	68
5.5 A PtdIns(4)P szerepének vizsgálata a receptorendocitózisban.....	71
5.6 A PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -depléciós rendszer továbbfejlesztése .....	73
5.7 A plazmamembrán PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -depléciója nem gátolja az AT <sub>1</sub> R klaszterekbe rendeződését.....	75
5.8 A hormonindukált PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -depléció hatásának vizsgálata.....	79
6. MEGBESZÉLÉS .....	86
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	94
8. ÖSSZEFOGLALÁS .....	95
9. SUMMARY.....	96
10. IRODALOMJEGYZÉK .....	97
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	116
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	117

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5HT <sub>2C</sub> R	2C típusú szerotoninreceptor
Akt	v-Akt egér thymoma virális onkogén
Alexa488-AngII	Alexa-Fluor-488 fluoreszcens molekulával jelölt angiotenzin II
Ang II	angiotenzin II
AP-2	adaptorprotein komplex 2
Arf1	ADP-ribozilációs faktor 1
Arf6	ADP-ribozilációs faktor 6
AT <sub>1</sub> R	1-es típusú angiotenzinreceptor
β <sub>2</sub> AR	β <sub>2</sub> adrenerg receptor
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
CCP	klatrinburkos gödör (clathrin-coated pit)
CCV	klatrinburkos vezikula (clathrin-coated vesicle)
CIE	klatrinfüggetlen endocitózis (clathrin-independent endocytosis)
CLIC	klatrintól független hordozók (clathrin-independent carriers)
CME	klatrinmediált endocitózis (clathrin-mediated endocytosis)
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil-szulfid (oldószer)
EEA1	korai endoszóma antigén 1 (early endosome antigen 1)
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermális növekedésifaktor-receptor
EPS15	EGFR útvonal szubsztrát 15 (EGFR pathway substrate 15)
ER	endoplazmás retikulum
FKBP	FK506 kötő protein (FK506 binding protein)
FRB	FKBP-rapamicin-kötő (FKBP-rapamycin-binding) domén
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
FYVE domén	Fab1/YOTB/Vac1/EEA1 fehérjékben található domén
GEEC	GPI-horgonyzott fehérjékben gazdag korai endoszómális kompartment (GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment)
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor (G protein-coupled receptor)

GPI	glikozil-foszfadilinozitol
INPP4A és B	inozitolpolifoszfát-4-foszfátáz A és B
INPP5E	IV-es típusú foszfoinozitol-5-foszfátáz (inozitolpolifoszfát-5-foszfátáz E)
KRas CAAX	A K-Ras kis G-fehérje C-terminális plazmamembránba irányító szekvenciája
L <sub>10</sub>	az Lck kináz fehérje N-terminális plazmamembránba irányító szekvenciája
LDLR	alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein) receptor
luc	<i>Renilla</i> luciferáz
mRFP	monomer piros fluoreszcens fehérje (monomeric red fluorescent protein)
MTM	miotubularin
MTMR1-14	miotubularinnal rokon (myotubularin-related) 1-14
mTOR	emlős rapamicin-célfehérje (mammalian target of rapamycin)
OCRL1	okulocerebrorenális Lowe-szindróma 1 fehérje
PBD domén	foszfoinozitol-kötő domén (phosphoinositide-binding domain)
PH domén	pleckstrin homológia domén
PI3K	foszfoinozitol-3-kináz
PI4K	foszfadilinozitol-4-kináz
PIK	foszfadilinozitol-kináz
PIPK	foszfadilinozitol-foszfát kináz
PIS	foszfadilinozitol-szintetáz
PKC	proteinkináz C
PLC	foszfolipáz C
PLCδ1PH	a foszfolipáz Cδ1 enzim pleckstrin homológia doménje
PM	a Lyn kináz fehérje N-terminális plazmamembránba irányító szekvenciája
PtdIns	foszfadilinozitol
PtdIns(3)P	foszfadilinozitol-3-foszfát
PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	foszfadilinozitol-3,4-biszfoszfát
PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	foszfadilinozitol-3,4,5-triszfoszfát

PtdIns(3,5) $P_2$	foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát
PtdIns(4) $P$	foszfatidilinozitol-4-foszfát
PtdIns(4,5) $P_2$	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PtdIns(5) $P$	foszfatidilinozitol-5-foszfát
PTEN	foszfatáz és tenzin homológ
rapa	rapamicin
Rhod-Ang II	rodaminnal jelölt angiotenzin II
RTK	receptor-tirozinkináz
SH2/SH3 domén	Src homológia 2/3 domén
SHIP 1 és 2	SH2 domént tartalmazó inozitolpolifoszfát-foszfatáz 1 és 2
Sluc	Super <i>Renilla</i> luciferáz (mutációkkal továbbfejlesztett változat)
SNX9	szortírozó nexin 9
TfR	transzferrinreceptor
TK	timidinkináz (génjének promoterszekvenciája)
WDFY2	WD40 és FYVE domént tartalmazó fehérje 2
YFP	sárga fluoreszcens protein (yellow fluorescent protein)

## 2. BEVEZETÉS

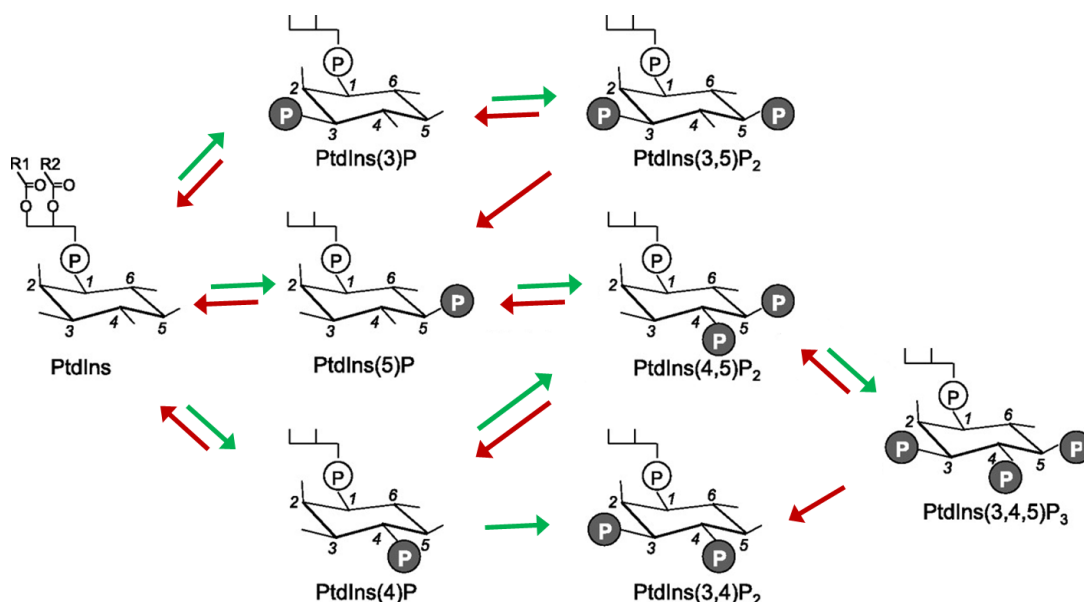
A foszfatidilinozitol (PtdIns), valamint foszforilált származékai, a foszfoinozítidek, az emlős sejtek membránjainak fontos alkotóelemei. A sejtek foszfolipid-tartalmának csupán töredékét teszik ki, mégis a legkülönbözőbb élettudományi kutatási területek érdeklődését keltették fel az utóbbi évtizedek során, és tartják fenn napjainkban is.

A PtdIns inozitolgyűrűjéhez különböző kombinációkban foszfátcsoportokat kapcsolva hét olyan foszfoinozítid molekula hozható létre, melyek megtalálhatók emlős sejtekben; ezek jellegzetes megoszlást mutatnak a sejtek különböző membránjai között. A foszfoinozítidek először sejten belüli jelátviteli molekulák forrásaként váltak ismertté, de hamar kiderült, hogy szerepük nem korlátozódik csupán erre: maguk is számos különböző sejtfunkciót képesek szabályozni. Így többek között alapvető szerepet játszanak a sejten belüli organellek szerveződésében és az ezek között zajló vezikuláris transzportfolyamatok szabályozásában, számos ioncsatorna és transzportfehérje működését befolyásolják, hatással vannak a sejtek morfológiáját meghatározó citoskeletális rendszerre is, valamint fontos regulátorai az exo- és endocitózis folyamatainak. A foszfoinozítidek jelentőségét aláhúzza az a tény is, hogy a szintézisükben és lebontásukban részt vevő enzimek közül jó néhányat hoztak már kapcsolatba humán megbetegedésekkel, köztük olyan gyakoriakkal is, mint a daganatos betegségek, az elhízás vagy a cukorbetegség.

Doktori ösztöndíjasként a foszfoinozítideknek, azon belül is elsősorban a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátnak [PtdIns(4,5) $P_2$ ] a plazmamembrán-receptorok, közelebbről a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (G protein-coupled receptors – GPCR) endocitózisában betöltött szerepét vizsgáltam. A bevezető fejezetben röviden bemutatom a foszfoinozítideket, ismertetem keletkezésük és metabolizmusuk főbb útvonalait, valamint áttekintem sejten belüli fontosabb funkcióikat. A továbbiakban vázoló az endocitózis folyamatának főbb ismérveit, külön kitérve a plazmamembrán-receptorok endocitózisának szempontjaira. Munkám fontos részét képezte a PtdIns(4,5) $P_2$  és más lipidek sejten belüli szintjének mesterséges változtatása és ennek ellenőrzése, ezért a bevezető fejezet végén áttekintem a foszfoinozítidek kimutatására, valamint sejten belüli szintjük változtatására rendelkezésünkre álló fontosabb módszereket.

## 2.1 A foszfoinozítidekről általában

A sejteket határoló plazmamembrán, illetve a sejtorganelumokat határoló intracelluláris membránok felépítésében egyaránt kiemelkedő szerepet játszanak az amfipatikus tulajdonságú glicerofoszfolipidek, melyekben a glicerín három hidroxilcsoportja közül az *sn*-1-es és *sn*-2-es pozícióban találhatóakhoz hosszú apoláris zsírsavláncok kapcsolódnak, az *sn*-3-as pozícióban lévőhöz pedig egy foszfátcsoporton keresztül különböző poláris csoportok (pl. kolin, szerin, etanolamin) kötődnek. A glicerofoszfolipidek családjába tartozik a foszfatidilinozitol (PtdIns) is, melyben a poláris fejcsoportot a *myo*-inozitol alkotja (1. ábra).



1. ábra – A PtdIns és a foszfoinozítidek szerkezete, egymásba való átalakulásuk főbb útvonalai

Az ábra bal oldalán látható a foszfatidilinozitol (PtdIns) szerkezete, melynek glicerinvázát az 1-es pozícióban (R1) leggyakrabban sztearát, a 2-es pozícióban pedig (R2) arachidonát észteresíti [1]. A számozás a *myo*-inozitolgyűrű szénatomjait jelöli, ezek közül a 3-as, 4-es és 5-ös pozícióban található hidroxilcsoportok foszforilálódhatnak, az ábrán látható foszfoinozítideket létrehozva. A nyilak az egymásba történő átalakulás jellemző foszforilációs (*zöld nyíl*) és defoszforilációs (*piros nyíl*) útjait mutatják. Az átláthatóság kedvéért a  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2 \rightarrow \text{PtdIns}(3)\text{P}$  átalakulást, bár előfordul, nem jelöltem. Rövidítések: P, foszfátcsoport; PtdIns, foszfatidilinozitol. Shisheva ábrája [2] egyszerűsítve, Balla ábrája [3] alapján a szerző által módosítva.

A PtdIns foszforilált származékait nevezzük foszfoinozítideknek. Az inozitolgyűrű öt szabad hidroxilcsoportjából emlős sejtekben háromhoz (a 3-as, 4-es és 5-ös pozícióban találhatóakhoz) kapcsolódhat foszfátcsoport, ezek különböző kombinációban történő foszforilációjával az 1. ábrán látható hét foszfoinozitid molekula hozható létre. Ezek a mono-, bisz- és triszfoszfátok különböző feltételek mellett és jelentősen eltérő mennyiségben fordulnak elő az emlős sejtek membránjaiban,



azoknak jellemzően a citoplazma felé tekintő oldalán. Az egyes foszfoinozitidek jellegzetes eloszlást mutatnak a plazmamembránban és a különböző intracelluláris membránokban, és ezzel tulajdonképpen a membránok azonosító szignáljaként szolgálnak számos fehérje számára [3, 4].

A PtdIns arányát a sejtek foszfolipid-tartalmának körülbelül 10-20%-ára becsülik, és jelentős változatosságot mutat sejt- vagy szövettípustól függően [3, 5]. A foszfoinozitidek aránya ennél jóval kisebb: a két leggyakoribb forma, a foszfatidilinozitol-4-foszfát [PtdIns(4)P] és a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] egyenként legfeljebb 1%-át adják az összes foszfolipidnek [6], és a PtdIns-hoz viszonyított mennyiségük is csupán 2-5% körül mozog. A többi foszfoinozitid mennyisége pedig még a már említett két formának is csak töredéke [3].

Érdekes módon a PtdIns-ban és származékaiban a glicerinváz *sn*-2-es pozíciójában a hidroxilcsoportot jelentős részben arachidonsav észteresíti (R2-es csoport az *1. ábrán*). A számos hormon és jelzőmolekula (pl. prosztaglandinok és leukotriének) előanyagként szolgáló arachidonilcsoport bedúsulását valószínűleg a szintetizáló enzimek lipidpreferenciája okozza [1].

## 2.2 A foszfoinozitidek anyagcseréje

Ahogy egyre többet tudunk meg a foszfoinozitidek sejten belüli szerepéről, az is egyre inkább világossá válik, hogy mely tulajdonságaik alapján tehetek szert fontos szabályozó funkcióikra. Ezek között mindenképpen elsők között említendő, hogy gyorsan és jól szabályozható módon képesek átalakulni egymásba. És hogy ezt a természet ki is használja, azt jól mutatja az ilyen átalakulási reakciókat katalizáló enzimek nagy száma: a foszfoinozitideket egymásba átalakító közel 20 ismert reakciót (melyeket az *1. ábra* nyilai mutatnak) jelenlegi ismereteink szerint emlős sejtekben 47 különböző gén által kódolt 19 kináz és 28 foszfatáz katalizálja [7]. Ezenkívül a foszfolipáz C (PLC) enzim 13 különböző izoformája is képes hidrolizálni bizonyos foszfoinozitideket, ennek a reakciónak többek között a jelátvitelben jut kiemelkedő szerep [8]. Az enzimek magas száma arra utal, hogy a foszfoinozitidek szintje térben és időben is szigorúan szabályozott. E szabályozás kifinomultságát jól szemlélteti az a megfigyelés, hogy az azonos biokémiai reakciót katalizáló különböző enzimizomformák sok esetben nem képesek helyettesíteni egymást, és lokalizációjuk is jól kimutathatóan

különbözik [3, 7]. Ez megteremti a lehetőségét annak, hogy ugyanaz a foszfoinozítid-molekula különböző helyeken egymástól függetlenül tudjon akár teljesen eltérő folyamatokat szabályozni.

Ahogy az *1. ábrán* is látható, a foszfoinozítidek szintézisének kiindulópontja a PtdIns. A PtdIns szintézisét a foszfatidilinozitol-szintetáz (PIS) enzim végzi (a CDP-diacilglicerin molekulához kapcsolja hozzá a *myo*-inozítolt), és a reakció elsősorban az endoplazmás retikulumban (ER) zajlik. Újabb adatok szerint azonban a PIS enzim emellett egy az ER-ből származó, mobilis membránkompartimentben is aktív, amely feltehetően a PtdIns-nak a sejt többi membránjába való eljutását biztosítja [9], ahol szubsztrátként szolgálhat a különböző foszfoinozítidek szintéziséhez.

A foszfoinozítideket létrehozó és egymásba átalakító kináz és foszfatáz enzimek osztályozását nehezíti, hogy többféle szempont szerint is csoportosíthatók. Az enzimeket korábban inkább szubsztrátspecificitásuk alapján sorolták be (pl. foszfatidilinozitol kinázok és foszfatidilinozitol-foszfát kinázok), és csak később vált általánossá az inozitolgyűrű érintett pozíciója szerinti osztályozás (3-, 4- és 5-kinázok, illetve -foszfatázok). Az irodalomban leginkább elfogadott csoportosítás, melyet én is követni fogok az enzimek bemutatásánál, szintén vegyesen veszi figyelembe a fent említett két szempontot.

### **2.2.1 A foszfoinozítid-kinázok**

A csoportosítás fent említett nehézségei a foszfoinozítid-kinázok esetében láthatók leginkább, ugyanis az ide tartozó három enzimesaládból kettőt (foszfatidilinozitol-4-kinázok és foszfoinozítid-3-kinázok) a foszforiláció helye határozza meg, míg a harmadik csoport, a foszfatidilinozitol-foszfát kinázok esetében a hasonló szubsztrát (pontosabban az azonos mértékben, egyszeresen foszforilált foszfoinozítid szubsztrát) a közös pont. A foszfoinozítid-kináz enzimeket az *1. táblázat* foglalja össze.

#### *2.2.1.1 A foszfatidilinozitol-4-kinázok*

A foszfoinozítidek közül először a PtdIns(4)*P* és PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> váltak ismertté, így szintézisükben is foszfatidilinozitol-kinázokat (PIK) és foszfatidilinozitol-foszfát kinázokat (PIPK) feltételeztek, melyek közül az előbbi hozza létre a PtdIns(4)*P*-ot, az

utóbbi pedig ezt alakítja tovább PtdIns(4,5) $P_2$ -tá, az 5-ös pozíciót foszforilálva [10]. Különböző szövetekből kromatográfiás tisztítással három jól elkülöníthető, PIK aktivitással rendelkező frakciót tudtak kimutatni. Ezek közül az egyikről (az I-es típusról) azonban később kiderült, hogy a 3-as pozícióban foszforilálja a PtdIns-t, így ez az enzim átkerült a 3-kinázok közé, és ezzel a foszfatidilinozitol-4-kinázok (PI4K) családjában csak II-es és III-as típusok maradtak [7].

#### 1. táblázat – Emlős foszfoinozítid-kinázok

Sasaki és mtsai táblázata [7] alapján. A szögletes zárójelben látható reakciók alárendelt vagy ismeretlen jelentőségűek. A táblázatban csak a katalitikus alegységek szerepelnek, az esetleges regulátor alegységek nem.

Család	Protein	Gén jele	Katalizált reakció
<b>Foszfatidilinozitol-4-kinázok (PI4K-ok)</b>			
<b>II-es típusú PI4K-ok</b>	PI4KII $\alpha$	<i>PI4K2A</i>	} PtdIns $\rightarrow$ PtdIns(4) $P$
	PI4KII $\beta$	<i>PI4K2B</i>	
<b>III-as típusú PI4K-ok</b>	PI4KIII $\alpha$	<i>PIK4CA</i>	
	PI4KIII $\beta$	<i>PIK4CB</i>	
<b>Foszfatidilinozitol-foszfát kinázok (PIPK-ok)</b>			
<b>I-es típusú PIPK-ok</b>	PIPKI $\alpha$	<i>PIP5K1A</i>	} PtdIns(4) $P \rightarrow$ PtdIns(4,5) $P_2$
	PIPKI $\beta$	<i>PIP5K1B</i>	
	PIPKI $\gamma$	<i>PIP5K1C</i>	
<b>II-es típusú PIPK-ok</b>	PIPKII $\alpha$	<i>PIP4K2A</i>	} PtdIns(5) $P \rightarrow$ PtdIns(4,5) $P_2$
	PIPKII $\beta$	<i>PIP4K2B</i>	
	PIPKII $\gamma$	<i>PIP4K2C</i>	
<b>III-as típusú PIPK</b>	PIPKIII	<i>PIP5K3</i>	PtdIns(3) $P \rightarrow$ PtdIns(3,5) $P_2$ , [PtdIns $\rightarrow$ PtdIns(5) $P$ ]
<b>Foszfoinozítid-3-kinázok (PI3K-ok)</b>			
<b>IA osztályú PI3K-ok</b>	p110 $\alpha$	<i>PIK3CA</i>	} PtdIns(4,5) $P_2 \rightarrow$ PtdIns(3,4,5) $P_3$ , [PtdIns $\rightarrow$ PtdIns3 $P$ , PtdIns(4) $P \rightarrow$ PtdIns(3,4) $P_2$ ]
	p110 $\beta$	<i>PIK3CB</i>	
	p110 $\delta$	<i>PIK3CD</i>	
<b>IB osztályú PI3K</b>	p110 $\gamma$	<i>PIK3CG</i>	
<b>II-es osztályú PI3K-ok</b>	PI3KC2 $\alpha$	<i>PIK3C2A</i>	PtdIns $\rightarrow$ PtdIns3 $P$ , PtdIns(4) $P \rightarrow$ PtdIns(3,4) $P_2$
	PI3KC2 $\beta$	<i>PIK3C2B</i>	} PtdIns $\rightarrow$ PtdIns3 $P$ , [PtdIns(4) $P \rightarrow$ PtdIns(3,4) $P_2$ ]
	PI3KC2 $\gamma$	<i>PIK3C2G</i>	
<b>III-as osztályú PI3K</b>	Vps34	<i>PIK3C3</i>	PtdIns $\rightarrow$ PtdIns3 $P$

A PI4K enzimek mindkét típusából két-két izoforma ( $\alpha$  és  $\beta$ ) létezik (*I. táblázat*). Az elsőként izolált és klónozott III-as típusú PI4K-ok (PI4KIII $\alpha$  és PI4KIII $\beta$ ) jelentős hasonlóságot mutatnak a később tárgyalandó foszfinozítid-3-kinázokkal (PI3K). Doménszerkezetük hasonló: erősen konzervált a C-terminálisan elhelyezkedő katalitikus doménjük, tartalmaznak lipidkinázokra jellemző (LKU) domént, és a PI3K-okhoz hasonlóan gátolhatók wortmanninnal [3].

A PI4KIII $\alpha$  fontos szerepet játszik a plazmamembrán hormonszenzitív foszfinozítid-készletének szintézisében (melyet bizonyos hormonhatásokra a PLC enzimek bontanak) [11, 12], annak ellenére, hogy elsősorban intracelluláris membránokban (ER, Golgi) helyezkedik el, bár újabb adatok szerint bizonyos körülmények között a plazmamembránban is megtalálható [13]. Érdekes módon azonban a PI4KIII $\alpha$  enzim akut farmakológias gátlása, bár a plazmamembrán PtdIns(4)*P*-szintjét jelentősen csökkenti, a nyugalmi PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub>-szintet nem befolyásolja, az csak erős PLC aktivitás mellett csökken érdemlegesen [12]. A PI4KIII $\beta$  enzim elsősorban a Golgi-rendszerbe lokalizál, és az onnan induló vezikuláris transzportfolyamatokat szabályozza. Több GTP-áz aktivitású fehérjével is kimutatták a kapcsolatát (Arf1, Rab11), melyek szintén a Golgi felől a plazmamembránba irányuló transzportban szerepelnek [7]. Egyes RNS vírusok (pl. a hepatitis C vírus) felhasználják a III-as típusú PI4K-okat saját replikációs folyamataikhoz, így az enzimek gátlása terápiás jelentőségű lehet ilyen vírusfertőzéseknél [14], bár a legújabb állatkísérletes adatok arra utalnak, hogy a PI4KIII $\alpha$  farmakológias gátlása nem biztonságos [12]. Mindkét III-as típusú enzim megtalálható a sejtmagban is, de ennek biológiai jelentősége egyelőre bizonytalan [3].

A kisebb méretű II-es típusú enzimek (PI4KII $\alpha$  és PI4KII $\beta$ ) nagyfokú homológiát mutatnak egymással, csupán N-terminális végeiken különböznek érdemben. Kináz doménjük jelentősen eltérő szerkezetű a III-as típusú enzimekéhez képest, és utóbbiakkal ellentétben nem érzékenyek wortmanninra [7]. Jellegzetességük még, hogy kináz doménjük ciszteinben gazdag részeket tartalmaz, melyek képesek palmitoilálódni, és ezzel erősítik a fehérjék membránhoz való kötődését. Mindkét enzim elsősorban ER- és Golgi-lokalizációt mutat, illetve endoszomális vezikulákban is kimutathatók, ahol számos, a vezikuláris transzportban szereplő adaptorfehérjével kerülnek kapcsolatba [3]. A  $\beta$  izoforma bizonyos stimulusok hatására a plazmamembránba is áthelyeződhet [7].

### 2.2.1.2 A foszfatidilinozitol-foszfát kinázok

A foszfatidilinozitol-foszfát kinázok (PIPK) a már egyszeresen foszforilált inozitideket képesek egy másik pozícióban tovább foszforilálni. Eredetileg úgy gondolták, hogy ez minden esetben a PtdIns(4)P 5-ös pozícióban történő foszforilációját jelenti, de ma már tudjuk, hogy a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintézise több úton is végbemehet (*1. ábra*), és így a PIPK-ok családjába tartoznak 4- és 5-kináz aktivitású enzimek egyaránt (*1. táblázat*). Felfedezésük után az enzimeket biokémiai és immunológiai tulajdonságaik alapján sorolták két csoportba. Csak később derült ki, hogy ezek eltérő reakciókat katalizálnak: az I-es csoportba tartozó fehérjék az eredeti elképzelésnek megfelelően a PtdIns(4)P → PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> átalakulást katalizálják, a II-es csoportot azonban PtdIns(5)P-4-kinázok alkotják. Mindkét csoportban 3-3 izoformát (α, β, és γ) találunk, egyes enzimek esetében egy altípuson belül különböző splice-variánsokat is el lehet különíteni. A III-as csoportba egyetlen molekula tartozik, mely a PtdIns(3)P-ot képes foszforilálni az 5-ös pozícióban [3].

Bár mind az I-es, mind a II-es típusú PIPK-ok PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-ot képeznek, a plazmamembránban található PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintéziséért az I-es csoport enzimeit (PIPKIα, PIPKIβ és a hat splice-variánssal rendelkező PIPKIγ) felelősek. Ezen izoformák széles körben előfordulnak különböző szövetekben, de expressziós mintázatuk mégis viszonylag egyedi; és lokalizációjuk, valamint szabályozásuk arra enged következtetni, hogy a sejten belül funkcionálisan elkülönülő PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-készletek létrehozásáért felelősek [15, 16]. Az I-es típusú PIPK-ok megtalálhatók a plazmamembránban és számos intracelluláris membránban is, ahol a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> lokális szintézisének keresztül szerepet játszanak többek között az aktin citoskeleton változásaiban, az endo- és exocitózis folyamataiban, és a sejt vándorlásban is [16]. Az enzimek lokalizációjának fontos része a katalitikus domén szubsztráthoz [PtdIns(4)P] való kötődése is, de az irányítást további tényezők, elsősorban fehérje-fehérje kölcsönhatások teszik specifikussá [3, 16]. A lokalizációt segítő interakciós partnerek között találunk különböző adaptorfehérjéket, illetve kis G-fehérjéket is. A PIPKIγ egyik variánsa (90 kDa) például megtalálható a fokális adhézciókban, ahová egy citoskeletoni adaptorfehérje, a talin segítségével irányítódik [16]. Ezt a kapcsolatot (és az enzim katalitikus aktivitását is) erősíti az enzimfehérje egyik tirozin-oldalláncának foszforilációja, mintegy molekuláris kapcsolóként szabályozva a lokalizációt és a

funkciót [16]. Ugyancsak a PIPKI $\gamma$  egyik variánsa az AP-2 endocitotikus adaptorfehérjéhez és a klatrinhoz is képes kötődni, és ezzel biztosítja a klatrinburkos gödrök (clathrin-coated pit – CCP) és vezikulák kialakulásához szükséges lokális PtdIns(4,5) $P_2$ -szintézist [17]. A kis G-fehérjék közül a különböző membrántranszport-folyamatokat szabályozó Arf6 (ADP-ribozilációs faktor 6) kapcsolatát mindhárom PIPKI izoformával kimutatták, illetve a Rac fehérjéknek tulajdonítanak szerepet a PIPKI $\alpha$  és  $\beta$  plazmamembránhoz történő irányításában [3].

A II-es típusú PIPK-okról az I-es csoporthoz képest keveset tudunk. Ezek tehát 4-kináz enzimek, melyek a PtdIns(5) $P$ -ot alakítják PtdIns(4,5) $P_2$ -tá, de funkciójuk inkább a PtdIns(5) $P$  szintjének szabályozásában lehet, mintsem a PtdIns(4,5) $P_2$  szintézisében [7]. A 3 izoforma (PIPKI $\alpha$ , PIPKI $\beta$  és PIPKI $\gamma$ ) közül csak az  $\alpha$  altípus mutat érdemleges enzimaktivitást *in vitro*, a másik két formának inkább a katalitikusan aktív  $\alpha$  protein megfelelő lokalizációjában tulajdonítanak jelentőséget, az enzimek ugyanis dimer formában működnek [3]. A  $\beta$  altípus jellemzően a citoplazmában és a sejtmagban, míg a  $\gamma$  izoforma – mely eleve csak a vese bizonyos sejtjeiben fejeződik ki – intracelluláris vezikulákban található meg. A PIPKI $\alpha$ -t kimutatták a plazmamembránban is, ilyenkor az I-es típusú PIPK enzimekkel való interakciója segíti elő a lokalizációját [7]. A PIPKI $\beta$  genetikai hiánya egerekben inzulinhiperszenzitivitáshoz vehet az Akt (*v*-Akt egér thymoma virális onkogén) jelpálya fokozott aktivitásán keresztül [18], ami – más, a PtdIns(5) $P$  szintjét befolyásoló kísérletekkel együtt – arra utal, hogy a PtdIns(5) $P$  fontos regulátora lehet a PI3K-ok által aktivált bizonyos jelátviteli utaknak [7].

A III-as típusú PIPK családnak egyetlen tagja van: a PtdIns(3) $P$ -ot PtdIns(3,5) $P_2$ -tá alakító PIKfyve nevű enzim. A PIKfyve katalitikus doménje homológ a II-es típusú PIPK-okéval, ám ez a fehérje a többi PIPK-nál jóval nagyobb, és N-terminális szakaszán egy PtdIns(3) $P$ -t kötő FYVE (Fab1/YOTB/Vac1/EEA1) domént tartalmaz, melyről nevét is kapta [7]. A PIKfyve szubcelluláris lokalizációja nem tisztázott, de az általa képzett PtdIns(3,5) $P_2$  a multivezikuláris endoszómákra jellemző, és az enzim hiányának vagy gátlásának az endoszomális kompartment megnagyobbodása, és bizonyos intracelluláris membrántranszport-folyamatok károsodása lesz a következménye [3]. Érdekes módon a PIKfyve normál működéséhez szükséges, hogy hármast alkotson az ArPIKfyve nevű adaptorfehérjével,

illetve azon keresztül az ellenkező irányú reakciót [PtdIns(3,5) $P_2$   $\rightarrow$  PtdIns(3) $P$ ] katalizáló Sac3 enzimmal [19]. E két utóbbi fehérje valamelyikének mutációja vagy hiánya alacsony PtdIns(3,5) $P_2$ -szintet, és a PIKfyve hiányához hasonló fenotípust eredményez [3]. A PIKfyve képes a PtdIns-t is foszforilálni *in vitro* (1. táblázat), de kérdéses, hogy a PtdIns(5) $P$  így keletkezik-e a sejtekben, vagy a PtdIns(3,5) $P_2$ -ből egy 3-foszfátáz segítségével. Mindenesetre a PIKfyve szerepet játszik a folyamatban, és ezzel például a sejt vándorlást is befolyásolja [20].

### 2.2.1.3 A foszfoinozítid-3-kinázok

Túlzás nélkül állítható, hogy a PtdIns(3,4,5) $P_3$  felfedezése 1989-ben (Traynor-Kaplan és mtsai által, [21]) új fejezetet nyitott a sejtbiológiában: a foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) jelpálya ma már könyvtárnyi irodalommal rendelkező fejezetét, melynek főszereplői közé tartoznak a névadó PI3K enzimesalád tagjai. Az ide tartozó enzimek mind az inozitolgyűrű 3-as pozícióját képesek foszforilálni, de szubsztrátspecifitásuk és egyéb tulajdonságaik alapján 3 osztályba sorolhatók, ahogy az 1. táblázat is mutatja.

A PI3K-ok I-es osztálya a PtdIns-kinázok csoportjából lett átsorolva, miután világossá vált, hogy tagjai a 3-as pozíciót foszforilálják, és később arra is fény derült, hogy bár *in vitro* képezhetnek PtdIns(3) $P$ -ot is, de *in vivo* elsődlegesen a PtdIns(4,5) $P_2$   $\rightarrow$  PtdIns(3,4,5) $P_3$  átalakulást katalizálják [3]. Az I-es típusú PI3K-ok egy 110 kDa-os katalitikus és egy regulátor alegység heterodimereként működnek: az előbbiből 4 különböző izoformát (p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , és  $\delta$ ), míg az utóbbiakból a splice-variánsokkal együtt 8-at ismerünk [7, 22]. Bár mind a négy katalitikus alegység tartalmaz Ras-kötő domént, és aktiválódik Ras kötés hatására, de azt, hogy milyen további hatások képesek aktiválni az enzimet, a regulátor alegység határozza meg. Ez alapján a p110 $\gamma$  izoforma elkülönül a többitől, mert a saját regulátor alegységei (p101 és p84/87) G-fehérjéhez kapcsolt receptorok felől, a G-fehérje  $\beta\gamma$  alegységein keresztül is aktiválhatják, míg a p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  és p110 $\delta$  izoformák elsősorban receptor-tirozinkinázokon (RTK) keresztül aktiválódnak [22]. Ezt a különbséget tükrözi a p110 $\gamma$  külön alosztályba (IB) sorolása (1. táblázat).

Az I-es osztályba tartozó PI3K-ok hatására tehát PtdIns(3,4,5) $P_3$  képződik a plazmamembránban, amely a hozzá kötődő fehérjéken keresztül számos jelátviteli folyamatot indít el, és ezzel alapvetően befolyásolja például a szervezet anyagcsere-

folyamatait, a sejtek túlélését, migrációját, differenciálódását. Ennek fényében nem meglepő, hogy a két általánosan, a legtöbb sejtben kifejeződő izoforma, a p110 $\alpha$  és p110 $\beta$  közül bármelyiknek a genetikai hiánya egérben embrionális korban letális [23], bár érdekes módon a p110 $\beta$  esetében egy katalitikusan inaktív forma expressziója képes megmenteni az állatokat, és csak felnőttkorban okoz tüneteket [24]. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy a PI3K-oknak lehetnek az enzimaktivitásuktól független funkcióik is, amit a p110 $\beta$  esetében az embrionális fejlődés mellett például a klatrinmediált endocitózisban is kimutattak [24]. A p110 $\beta$  fontos regulátora a csontlebontásnak is, ahogy azt intézetünk munkatársai nemrégiben bemutatták [25]. A p110 $\gamma$  és p110 $\delta$  elsősorban az immunrendszer sejtjeiben fejeződnek ki [22], ahol alapvető szerepet játszanak a különböző immunsejtek aktiválásában és migrációjában, és így ígéretes célpontként szolgálhatnak különböző immuneredetű kórképek terápiájában [3].

A PI3K-ok II-es osztályát az I-es típusúakkal homológ szekvenciájuk alapján fedezték fel. Doménszerkezetük hasonló, de C-terminálisan tartalmaznak további doméneket is, így nagyobb méretűek, mint az I-es osztály tagjai. A II-es típusú PI3K-oknak nincsenek regulátor alegységeik, monomer formában működnek [7]. Az I-es osztállyal szemben nem képesek a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot foszforilálni, PtdIns-t vagy PtdIns(4) $P$ -ot használnak szubsztrátként (1. táblázat), és egyelőre nem minden esetben tisztázott, hogy melyik reakció releváns *in vivo* [3]. A csoportba 3 fehérje tartozik: a PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$  és PI3KC2 $\gamma$ , melyek közül az első kettő a legtöbb szövetben kifejeződik, a  $\gamma$  izoforma elsősorban a májban található meg. A sejtben belül a PI3KC2 $\alpha$  elsősorban a transz-Golgi hálózatban, illetve klatrinburkos vezikulákban található meg, és a közelmúltban Posor és munkatársai kimutatták, hogy már jelen van a még le nem fűződött CCP-kben is, ahol – szemben az eddigi konszenzussal – elsősorban PtdIns(3,4) $P_2$ -t termel, és részt vesz az endocitózis folyamatában [26]. A PI3KC2 $\beta$ -ről szintén kimutatták, hogy képes kötődni a klatrinhoz, de ennek az izoformának a fiziológiás szerepéről - csakúgy, mint a PI3KC2 $\gamma$ -ról – egyelőre nagyon keveset tudunk [3].

A PI3K-ok III-as osztályába egyetlen enzim, a Vps34 fehérje tartozik, amely az I-es osztályhoz hasonlóan egy regulátor alegységgel (p150) komplexben működik, és doménszerkezete is hasonló, de az I-es osztálytól eltérően csak PtdIns-t tud használni szubsztrátként, amit PtdIns(3) $P$ -tá alakít [7]. A Vps34/p150 komplex részt vesz az



endocitózisra került molekulák válogatásában (sorting), illetve alapvető szerepet játszik az autofágia folyamatában, ahol érdekes módon ellentétesen működik az I-es típusú PI3K-okkal, melyek PtdIns(3,4,5) $P_3$  képzésével az Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) jelpályán keresztül gátolják az autofágia kialakulását [27].

## 2.2.2 A foszfoinozítid-foszfátázok

A foszfoinozítideket defoszforiláló enzimek felé a kinázokhoz képest jelentős késéssel fordult a tudományos érdeklődés. Ennek egyik következményeként a foszfoinozítid-foszfátázok többségét már humán genetikai módszerekkel fedezték fel, az általában úttörő, élesztőben végzett kísérletek csak egyetlen foszfátáz (a Sac1 fehérje) esetében játszottak szerepet [3]. Ma már számos olyan örökletes komplex tünetegyüttes ismert, melynek hátterében egy foszfoinozítid-foszfátáz defektusa áll [7], és találunk tumorszuppresszor géneket is ebben a családban, így nem szorul további magyarázatra ezen proteinek jelentősége. A foszfoinozítid-foszfátázok főbb csoportjait és az általuk katalizált reakciókat a 2. táblázat foglalja össze, és az alábbiakban röviden felvázolom az enzimekkel kapcsolatos jelenlegi ismereteinket.

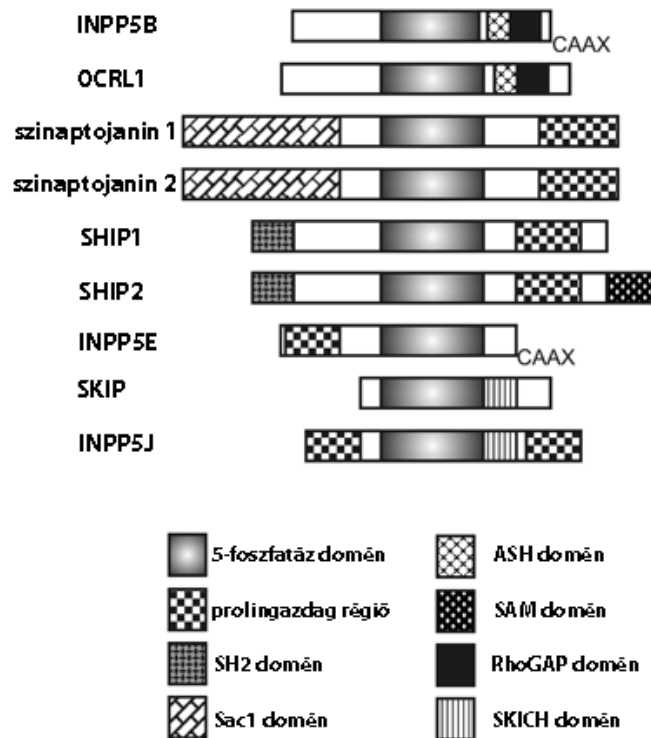
### 2.2.2.1 A foszfoinozítid-5-foszfátázok

Ebbe a csoportba az inozitolgyűrű 5-ös pozícióját defoszforilálni képes enzimeket soroljuk, és bár 4 csoportba sorolhatók, ebből az I-es típus (inozitolpolifoszfát-5-foszfátáz A – INPP5A) csak szolubilis inozitolfoszfátokat képes defoszforilálni, így nem tartozik a foszfoinozítid-foszfátázok közé. A többi típusnak is lehetnek szubsztrátjai inozitolfoszfátok, sok esetben az elnevezés is ezt tükrözi, de ezek az enzimek inozitollipideken is hatnak, és *in vivo* szubsztrátspecifitásuk nem minden esetben egyértelmű [28]. A 9 ide tartozó fehérje az 5-foszfátáz katalitikus domén mellett különböző egyéb molekuláris részeket tartalmaz (2. ábra), melyek a lokalizációjukat és a más fehérjékkel való kölcsönhatásukat befolyásolják.

**2. táblázat – Emlős foszfoinozítid-foszfátázok**

Sasaki és mtsai táblázata [7] alapján. A szögletes zárójelben látható reakciók alárendelt vagy ismeretlen jelentőségűek. A táblázatban csak a katalitikus alegységek szerepelnek, az esetleges szabályozó alegységek nem.

Család	Protein	Katalizált reakció
<b>Foszfoinozítid-5-foszfátázok</b>		
<b>II-es típusú 5-foszfátázok</b>	INPP5B	} PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(3,4) $P_2$ , PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(4) $P$
	OCRL1	
	szinaptotjanin 1	} PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(4,5) $P_2$ , PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(4) $P$ , PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$ , PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(3) $P$ , PtdIns(3) $P$ → PtdIns, PtdIns(4) $P$ → PtdIns
	szinaptotjanin 2	
	INPP5J	PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(3,4) $P_2$ , PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(4) $P$
	SKIP	PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(3,4) $P_2$ , [PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(4) $P$ ]
<b>III-as típusú 5-foszfátázok</b>	SHIP1	} PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(3,4) $P_2$
	SHIP2	
<b>IV-es típusú 5-foszfátáz</b>	INPP5E	PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(3,4) $P_2$ , PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(4) $P$ , PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(3) $P$
<b>Foszfoinozítid-4-foszfátázok</b>		
<b>INPP4 család</b>	INPP4A	} PtdIns(3,4) $P_2$ → PtdIns(4) $P$
	INPP4B	
<b>TMEM55 család</b>	TMEM55A	} PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$
	TMEM55B	
<b>Foszfoinozítid-3-foszfátázok</b>		
<b>PTEN család</b>	PTEN	PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(4,5) $P_2$ , [PtdIns(3) $P$ → PtdIns]
	TPIP	PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(4,5) $P_2$ , PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$
<b>Miotubularinok</b>	MTM1	} PtdIns(3) $P$ → PtdIns, PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$
	MTMR1-4	
	MTMR6	PtdIns(3) $P$ → PtdIns, [PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$ ]
	MTMR7	PtdIns(3) $P$ → PtdIns
	MTMR8	[PtdIns(3) $P$ → PtdIns]
	MTMR14	PtdIns(3) $P$ → PtdIns, PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$
<b>Sac típusú foszfoinozítid-foszfátázok</b>		
	SAC1	PtdIns(3) $P$ → PtdIns, PtdIns(4) $P$ → PtdIns, [PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$ ]
	SAC2	PtdIns(3,4,5) $P_3$ → PtdIns(3,4) $P_2$ , PtdIns(4,5) $P_2$ → PtdIns(4) $P$
	SAC3	PtdIns(3,5) $P_2$ → PtdIns(5) $P$



## 2. ábra – A foszfoinozítid-5-foszfatazok doménszerkezete sematikusán ábrázolva

A foszfoinozítid-5-foszfatazok a katalitikus domén mellett számos egyéb strukturális elemet tartalmaznak, melyek a sejten belüli elhelyezkedésüket, más fehérjékkel vagy lipidekkel való kölcsönhatásukat, illetve szubsztrátspecifitásukat befolyásolják. A C-terminális CAAX motívum, illetve a SKICH domén a membránlokalizációért felel, az SH2 domének és a prolinban gazdag régiók fehérje-fehérje interakciókban szerepelnek, a Sac1 domén szintén foszfataz aktivitással bír. További információk és a rövidítések feloldása a szövegben található (kivéve: SAM – steril alfa motívum). Dyson és munkatársai ábrája nyomán [28].

A II-es típusú 5-foszfatazokhoz hat enzim tartozik, ezek közül 2-2 mutat közelebbi hasonlóságot. A másodikként felfedezett 5-foszfataz az INPP5B volt, ami az 5-foszfataz doménon kívül egy ASH (ASPM-SPD2-Hydin) domént, és egy inaktív Rho GTP-áz aktivátor proteinszerű (RhoGAP-szerű) domént tartalmaz, illetve a C-terminális végén egy lipidmodifikációs CAAX motívumot (2. ábra). Elsősorban a Golgi-komplex és az endoplazmás retikulum kimeneti pontjain található meg, és lokalizációját Rab fehérjék is befolyásolják. Funkcióját nem ismerjük pontosan, de génjének hiánya egerekben a here fejlődési zavarát és spermiumfunkciók károsodását okozza [3]. Hasonló doménszerkezettel rendelkezik az OCRL1 fehérje is, mely nevét a mutációja által okozott okulocerebrorenális Lowe-szindrómáról kapta. Az INPP5B-hez való hasonlósága alapján feltételezték 5-foszfataz aktivitását, és tisztázták, hogy elsősorban a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot bontja [7]. Legnagyobb mennyiségben a Golgi-hálózatban található meg, de egyre több jel utal arra, hogy máshol is lehet szerepe, melyben más fehérjékhez való kapcsolódása kulcsszerepet játszik. A protein N- és C-terminális részén egyaránt

találhatók klatrint kötő szekvenciák, és különböző Rab fehérjékkel is képes interakcióra, és ennek megfelelően a klatrinmediált membrántranszportokban vesz részt [29]. Funkciójának vizsgálatát nehezíti, hogy egérben génjének kiütése után az INPP5B feltehetőleg átveszi a szerepét, ezért nem jelentkeznek a humán Lowe-szindrómához hasonló tünetek. A két fehérje együttes hiánya azonban már embrionálisan letális [3].

A szinaptojanin 1 és 2 molekulákat először a szinaptikus vezikulák exocitózisában és reciklizációjában írták le [30]. Mindkét izoforma több splice-variánssal is rendelkezik, melyek a C-terminális végükön különböznek egymástól. E molekulák jellegzetessége, hogy az 5-foszfátáz doménon kívül egy Sac1, szintén foszfátáz aktivitású domént is tartalmaznak az N-terminális részen (2. ábra), így tulajdonképpen kettős foszfátáznak tekinthetők. Ezek alapján feltételezhető, hogy az 5-foszfátáz által előállított lipidterméket [elsősorban  $\text{PtdIns}(4)P$ ] a Sac1 foszfátázdomén továbbalakítja, és  $\text{PtdIns}$  keletkezik. Ezt támasztja alá, hogy mindkét domén szükséges a fehérje megfelelő funkciójához [3]. A szinaptojaninok jelenléte a klatrinburkos struktúrákon és jelentőségük a klatrinmediált endocitózis folyamatában jól dokumentált [31-35], feltehetőleg több szinten is befolyásolják a folyamatot [35].

A SKIP (skeletal muscle and kidney enriched inositol polyphosphate phosphatase) és INPP5J enzimek közös tulajdonsága, hogy mindkét enzim rendelkezik SKICH (SKIP C-terminális homológia) doménnel, amely a plazmamembránba irányítja őket [3, 28]. A SKIP fehérje nevének megfelelően elsősorban vázizomban és a vesében fejeződik ki, és az inzulin által okozott  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -szintemelkedést ellensúlyozza, csökkentve az Akt aktivációját, a GLUT-4 kihelyeződését a plazmamembránba és így a sejtek glükózfelvételét [28]. Szélesebb szöveti eloszlást mutat az INPP5J enzim, amely szintén csökkenti a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -szintet, és ezáltal gátló hatással bír az Akt jelpályára, jelentősége azonban egyelőre nem tisztázott [28].

A III-as típusú 5-foszfátázok csoportját a SHIP1 és SHIP2 (SH2 domént tartalmazó inozitolpolifoszfát-foszfátáz) molekulák alkotják. Ezek a fehérjék az SH2 domén mellett C2 domént és prolinban gazdag régiót is tartalmaznak, és adaptorfehérjékhez való kapcsolódásuk meghatározza lokalizációjukat és működésüket egyaránt, amely sokféle lehet. A SHIP enzimek  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -ot defoszforilálnak elsősorban, és ezzel szelektíven befolyásolhatnak bizonyos PI3K-ok által elindított jelpályákat, mert a keletkező termék  $\text{PtdIns}(3,4)P_2$  egyes későbbi effektorokat képes a

PtdIns(3,4,5) $P_3$ -hoz hasonlóan aktiválni, míg másokat nem [3, 28]. A SHIP1 kifejeződése a hemopoetikus rendszerre korlátozódik, és hiánya vércépzési és immunfunkciós zavarokat okoz, míg a SHIP2 általánosan előfordul, és az inzulinjelpálya negatív regulátoraként tartják számon [28]. Az utóbbi molekuláról leírták, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot is képes defoszforilálni, és ennek szintén gátló hatása lehet a klatrinmediált endocitózis folyamatára [36].

Az egyetlen IV-es típusú foszfoinozítid-5-foszfátáz az INPP5E, vagy más néven farbin. Ez a molekula a katalitikus domén N-terminális oldalán egy prolinban gazdag régiót, míg a C-terminális végen egy plazmamembránba irányító CAAX motívumot tartalmaz (2. ábra). Az 5-foszfátázok közül ez az enzim köti legnagyobb affinitással a PtdIns(3,4,5) $P_3$  molekulát [37], de ezenkívül a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot és a PtdIns(3,5) $P_2$ -ot is képes defoszforilálni (2. táblázat). A sejten belül a Golgi komplexben, és részben a plazmamembránon található meg, de pontos funkciójáról egyelőre keveset tudunk. Az INPP5E gén mutációit érdekes módon ciliopátiákkal (a sejtek primer ciliumainak funkciózavarából adódó szindrómákkal) hozták összefüggésbe [38], és kimutatták az enzim ciliáris lokalizációját is, amit a mutációk károsítanak [38]. Kísérletes munkám során ennek az enzimnek az 5-foszfátáz doménjét használtam fel a foszfoinozítid-szint mesterséges változtatására.

#### 2.2.2.2 A foszfoinozítid-4-foszfátázok

A foszfoinozítid-4-foszfátázok közé 4 enzimet sorolunk, melyek kétszeresen foszforilált foszfoinozítidekről távolítják el a 4-es pozícióban található foszfátcsoportot. Az inozitolpolifoszfát-4-foszfátáz (INPP4A és INPP4B) enzimek szubsztrátja a PtdIns(3,4) $P_2$ , míg a TMEM55A és B enzimek kizárólag a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot defoszforilálják [7]. Az INPP4A sejtekben kifejezve megjelenik a korai és reciklizáló endoszómákban, és génjének csendesítése csökkenti a transzferrin felvételét a sejtekbe, ami az endocitózis során a plazmamembrán és endoszóma közötti foszfoinozítid-konverzióban veti fel az enzim szerepét [39]. Az INPP4B-ről keveset tudunk, de azt leírták, hogy az INPP4A-val együtt negatív szabályozói a plazmamembrán PtdIns(3,4) $P_2$  által is aktivált Akt jelpályának [28]. Még kevesebbet tudunk a TMEM55 enzimekről, melyek nevüket a C-terminális végükön feltételezett transzmembrán

doménekről kapták. Az A izoforma az EGF receptor degradációját befolyásolja, a TMEM55B pedig a sejtmagi foszfoinozítid-szint szabályozásában vehet részt [3].

### 2.2.2.3 A foszfoinozítid-3-foszfátázok

A foszfoinozítidek inozitolgyűrűjének 3-as pozícióját defoszforiláló enzimeknek két nagy csoportja létezik: az egyikbe a PTEN (foszfátáz és tenzin homológ – phosphatase and tensin homologue) fehérje és néhány rokon molekula tartozik, a másik nagy családot pedig a miotubularinok (MTM) alkotják (2. táblázat).

A PTEN fehérjét tumorszuppressorként fedezték fel, és először protein tirozinfoszfátáznak gondolták. Valóban van ilyen aktivitása is, de később kiderült, hogy elsősorban a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  defoszforilációját végzi [7]. Jelentőségét jól érzékelteti, hogy genetikai hiánya egérben embrionálisan letális, és már heterozigóta formában is jelentősen megnöveli a tumorképződés gyakoriságát [40]. A  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  szerteágazó jelátviteli szerepének megfelelően a PTEN szövetspecifikus, kondicionális génkiütéses vizsgálatai szinte minden szövet- és sejtféleségben igazolták a fehérje valamilyen funkcióját [40]. A PTEN működésének egyik fontos tényezője a membránlokalizáció, melyben a C2 domén mellett az N-terminális,  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -hoz kötődni képes foszfoinozítidkötő doménje (phosphoinositide-binding domain – PBD) is részt vesz [40]. Daganatokban gyakran mutatható ki a PTEN mutációja, amely elsősorban a foszfátáz doménben található, de előfordul azon kívüli részen is, mutatva a fehérje összetett működési módját [41]. Kimutatták például a PTEN-t a sejtmagban is, ahol egyebek mellett a sejtciklus szabályozásából is kivessi a részét, és ezt a funkciót részben a foszfátáz aktivitásától függetlenül látja el [41]. Leírtak számos a PTEN-hez hasonló molekulát, melyek közül néhánynak nincsen foszfátáz aktivitása, némelyiknek van ugyan (TPTE és PTEN homológ inozitollipid-foszfátáz – TPIP), de ezen fehérjék funkciója egyelőre nem ismert [3, 7].

A másik nagy 3-foszfátáz csoportot a miotubularinok (MTM) alkotják. A család 15 tagja közül 9 rendelkezik katalitikus aktivitással (2. táblázat), a maradék 6 molekulát pszeudofoszfátázoknak is szokás nevezni. Ez utóbbi csoport (MTMR5 és 9-13) az aktív enzimekkel való kölcsönhatás révén azok lokalizációjában vállal szerepet, illetve fokozza is aktivitásukat [40, 42]. Bár az MTM-ek nagy része ugyanazt a reakciót katalizálja, funkciójuk mégsem fed át minden esetben, ahogy azt a különböző

betegségekkel összefüggésbe hozott mutációk eltérő tünettana is jelzi [42]. Ezt részben okozhatja az eltérő kifejeződési mintázat, de a szövetspecifikus szabályozó mechanizmusok is. Az MTMR2 aktív enzim például az inaktív MTMR13-mal komplexben a mielinizációban szerepel, míg az MTMR5-tel kapcsolódva a spermatogenezist szabályozza [3]. Az MTMR6 a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{K}^+$ -csatornákat gátolva csökkenti a T-sejtek aktiváltsági állapotát, az MTMR14 hiánya pedig izomgyengeséget okoz, feltehetően a szarkoplazmás retikulumból szivárgó  $\text{Ca}^{2+}$  miatt [3].

#### 2.2.2.4 *Sac típusú foszfoinozítid-foszfatazok*

A Sac1 (suppressor of actin 1) fehérjét élesztősejtekben írták le először mint az aktin citoskeleton egyik szabályozóját, és csak később derült ki, hogy foszfoinozítid-foszfataz aktivitással rendelkezik mind élesztőben [43], mind magasabb rendű szervezetekben megtalálható homológja [44]. A szekvencia hasonlósága alapján később még két másik fehérjét (Sac2 és 3) azonosítottak emlősben, illetve Sac1-szerű domént találtak az 5-foszfataz aktivitással rendelkező szinaptojanin molekulákban is [43]. Ahogy a 2. táblázat is mutatja, ezek az enzimek több pozícióban is képesek a foszfoinozitideket defoszforilálni, így nem sorolhatók be a korábbi csoportokba.

A Sac1 enzim az egyszerűen foszforilált foszfoinozitidekről, illetve a  $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ -ről hasítja le a foszfátcsoportot, de nem szubsztrátja a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  és a  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ . Ez az integráns membránfehérje elsősorban az ER-ban található meg, de kimutatták, hogy ingázik az ER és a Golgi-komplex között is, és lokalizációjának megfelelően elsősorban  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ -t defoszforilál [3]. Fontosságára jellemző, hogy génjének kiütése egérben beágyazódás előtti letalitással jár, és génjének sejt szintű csendesítése is sejthalálhoz vezet [45]. Ennek ellenére kimutatható volt a jelölt  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  szintjének növekedése Sac1 hiányában, ami a Golgi morfológiájának drasztikus szétesésével járt együtt [45]. Kísérletes munkám során a  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  szintjének változtatásához az élesztőből származó Sac1 katalitikus domént használtam.

A Sac2 protein a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ot és a  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -ot használja szubsztrátként, és elsősorban a szívizomműködésben feltételezik a szerepét, mert genetikai hiánya szívizom-hipertrófiára hajlamosít [28]. A Sac3 enzim ezzel szemben a  $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ -ot képes defoszforilálni, és ennek megfelelően intracelluláris vezikulákba lokalizál [28]. Érdekes módon azonban a Sac3 géncsendesítése a várttal ellentétben a

PtdIns(3,5) $P_2$ -szint csökkenését idézi elő, mert katalitikus funkciója mellett a Sac3 a PtdIns(3,5) $P_2$ -szintézisért felelős PIKfyve 3-kináz aktiválásához is hozzájárul fehérje-fehérje kapcsolatokon keresztül [3, 28]. A Sac3 hiánya vagy mutációja neurológiai tünetekkel jár.

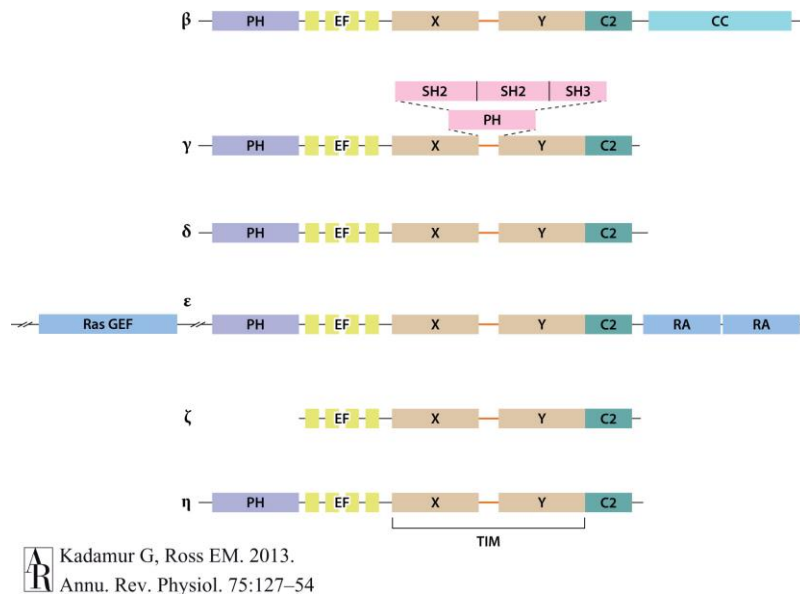
### 2.2.3 A foszfolipáz C enzimek

A foszfolipáz C (PLC) enzimek a foszfoinozítid-molekulát az *sn*-3-as pozícióban képesek hidrolizálni, diacilglicerint (DAG), illetve a kiindulási molekula foszforiláltságától függően valamilyen inozitolfoszfátot képezve. Elnevezésük pontosítható a „foszfoinozítid-specifikus” jelzővel, léteznek ugyanis más foszfolipideket (pl. foszfatidilkolint) bontó PLC enzimek is [3]. Bár az emlős PLC-k *in vitro* többféle szubsztrátot is képesek használni (PtdIns-t, PtdIns(4) $P$ -t és PtdIns(4,5) $P_2$ -ot, de 3-as pozícióban foszforilált foszfoinozítideket nem), jelenleg úgy gondoljuk, hogy élő sejtekben elsősorban a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot bontják DAG-ra és inozitol-1,4,5-triszfoszfátra [Ins(1,4,5) $P_3$ ] [3, 8]. A PLC-k jelentőségét jól mutatja, hogy mind elsődleges szubsztrátjuk, mind a keletkező molekulák mindegyike meghatározó szereplője számos alapvető jelátviteli folyamatnak és egyéb sejtfunkciónak, és ezek térbeli és időbeli szabályozásában többek között a PLC enzimek 6 családba sorolható összesen 13 izoformája is részt vesz [8].

A 6 család ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  és  $\eta$ ) szerkezeti jellegzetességeit mutatja a 3. ábra, melyen jól látszanak azok a konzervált domének, melyek a legtöbb családban megtalálhatók. Ezek közé tartozik az X és Y konzervált régiókból összeálló, trióz-foszfát izomeráz (TIM) hordószerű katalitikus domén, és emellett az N-terminálisan található pleckstrin homológia (PH) domén, az EF-kéz motívumok, és a C-terminális oldalon található C2 domén. A PLC enzimekre általánosan jellemző, hogy az általuk katalizált reakcióhoz  $Ca^{2+}$ -ot igényelnek [8], és hogy nyugalomban az X és Y régió közötti összekötő szakaszuk fontos autoinhibíciós funkciót lát el, ennek hiányában jelentősen megnő az alapaktivitásuk [46]. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$ -bontóképességük már nem növelhető tovább a fiziológiásnak megfelelő ingerekkel [46]. A PLC enzimek főbb aktivátorai közé a heterotrimer G-fehérjék különböző alegységei, RTK-ok, kis G-fehérjék, illetve a  $Ca^{2+}$  tartoznak [8], ezek különböző kombinációban szabályozzák az egyes típusokat. Fontos eleme a PLC-k



regulációjának a membránlokalizáció is, amely szintén eltérően szabályozódik az egyes csoportoknál. Az alábbiakban röviden összefoglalom az egyes enzimesaládok főbb jellegzetességeit és funkcióit.



### 3. ábra – Az emlős foszfolipáz C enzimesaládok doménszerkezete

Az egyes családokat görög betűk ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  és  $\eta$ ) jelölik, és egymás alatt láthatók a homológ domének. Az X és Y konzervált régiók együtt alkotják a trióz-foszfát izomeráz (TIM) hordószerű katalitikus domént. Rövidítések: C2: C2 domén; CC: coiled coil (feltekert tekercs) domén; EF: kalciumkötő EF-kéz domén; RA: Ras asszociációs domén; Ras GEF: Ras GDP/GTP kicserélő faktor domén; SH2/SH3: Src homológia 2/3 domén. Kadamur és Ross ábrája [8].

#### 2.2.3.1 Foszfolipáz C $\beta$ enzimek

A PLC $\beta$  enzimeket elsősorban a G $_{q/11}$ -családba tartozó heterotrimer G-fehérjék  $\alpha$  alegysége aktiválja, és egyes izoformáit ezen kívül G $_i$ -fehérjék  $\beta\gamma$  alegysége is, így PLC $\beta$  család méltán sorolható a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) fő effektorai közé. Négy izoforma tartozik ebbe a csoportba (PLC $\beta$ 1-4), melyek szöveti kifejeződésben és szabályozásban egyaránt különböznek egymástól. A  $\beta$ 1-es és  $\beta$ 4-es típusok elsősorban az idegrendszerben fordulnak elő, míg a PLC $\beta$ 2 leginkább immunsejtekben fejeződik ki, a  $\beta$ 3-as izoforma széleskörű szöveti expressziót mutat [8]. A GTP-t kötő, tehát aktivált G $\alpha_q$  mindegyik  $\beta$  izoforma aktivitását drasztikusan megnöveli, bár a  $\beta$ 2-es típusét relatíve kisebb mértékben [8, 47]. Érdekes módon a két protein közötti kapcsolat nem egyirányú, a PLC $\beta$  ugyanis képes aktiválni a G $\alpha$  alegység GTP-áz működését, tehát tulajdonképpen GTP-áz aktivátor proteinként (GAP) viselkedik, és a G $\alpha$ -fehérjék GTP-GDP ciklusának felgyorsításával a saját aktiválódását is limitálja [48]. Ez a mechanizmus a működés gyors és pontos térbeli és időbeli

szabályozását teszi lehetővé, így a GPCR inaktiválódását a G-fehérjék és ezzel együtt a PLC $\beta$  jelátvitel gyors leállása követi [48]. A G $\alpha$  alegység és a PLC $\beta$  kapcsolódásához korábban az utóbbi molekula C-terminális ún. coiled coil (feltekert tekercs) doménjét tartották esszenciálisnak, újabb adatok szerint azonban a C2-es domént közvetlenül követő szakasznak is nagy jelentősége van [49].

A G-fehérje  $\beta\gamma$  alegység (amely megfelelő koncentrációban elsősorban G $_i$ -fehérjéhez kapcsolt receptorok aktiválódásakor szabadul fel [8]) éppen az  $\alpha$  alegységre legkevésbé érzékeny PLC $\beta$ 2 izoformát aktiválja leginkább, de a PLC $\beta$ 3-ra is hat, és utóbbi esetében a G $\alpha$  és G $\beta\gamma$  alegységek együttes aktiválásának szinergikus hatásáról számoltak be [50]. A heterotrimer G-fehérjék mellett monomer GTP-ázok is képesek aktiválni a PLC $\beta$ 2-t és 3-at, ebben a Rac kis G-fehérje szerepét írták le, amely az enzim N-terminális PH doménjéhez képes kötődni [47]. A PLC $\beta$ 2 Rac-on keresztüli aktiválásról leírták, hogy az enzimnek a plazmamembrán specifikus régióiba történő áthelyeződésével jár együtt, szemben a G $\beta\gamma$  alegységen keresztüli aktiválással, amikor diffúzabb membránlokalizáció figyelhető meg [51].

A PLC $\beta$  enzimek mindegyik izoformája jelen van a sejtmagban is, de ennek jelentőségéről, funkciójáról egyelőre keveset tudunk. Egyedül a  $\beta$ 1-es izoformáról bizonyították, hogy a sejtciklus szabályozásában szerepel [52].

Mindegyik PLC $\beta$  izoformának létezik génhiányos egérmodellje, ezek egyike sem mutat embrionális letalitást, azonban mindegyik súlyos fenotípusos változásokkal jár, kiemelve az enzimek jelentőségét. A szöveti eloszlásnak megfelelően a  $\beta$ 1 és  $\beta$ 4 hiányában elsősorban idegrendszeri tünetek, a  $\beta$ 2 esetében az immunrendszer zavarai dominálnak, a  $\beta$ 3-as izoforma hiánya több szervrendszert érint, és korai halálalással jár, feltehetően fokozott daganatképzés miatt [47].

### 2.2.3.2 Foszfolipáz C $\gamma$ enzimek

A PLC $\gamma$  család tagjai elsősorban RTK-ok jelátviteli folyamatainak fontos szereplői, ennek megfelelően aktiválásuk is elsősorban foszforilációval történik, amiben fontos szerepet kap a katalitikus domént alkotó X és Y szakaszok közé ékelődött, több domént tartalmazó fehérjerész (3. ábra), amely csak a PLC $\gamma$  családra jellemző [8, 47]. Az itt található SH2 és SH3 domének teszik lehetővé az aktivált RTK-okhoz, illetve más, citoplazmatikus tirozinkinázokhoz való kapcsolódást, ami az enzim

foszforilációját, és a foszfolipáz-aktivitás következményes megnövekedését létrehozza [53].

A PLC $\gamma$  enzimes családnak két tagja van: míg a PLC $\gamma$ 1 a legtöbb szövetben és sejtben előfordul, a  $\gamma$ 2-es változat kifejeződése hematopoetikus sejtekre korlátozódik, de számos sejtben mindkét változat jelen van [54]. A növekedési faktorok elsősorban a PLC $\gamma$ 1-en keresztül szignalizálnak, így ennek a formának a sejtnövekedésben és differenciálódásban tulajdonítanak szerepet, míg a PLC $\gamma$ 2 az immunsejtekben főként a T- és B-sejtreceptorokhoz kapcsolódó citoplazmatikus tirozinkinázokon keresztül aktiválódik, és akut sejtválaszokat közvetít [8].

A foszforiláció mellett hozzájárul a PLC $\gamma$  aktiválásához a Rac kis G-fehérjéhez (a PLC $\gamma$ 2 esetében), valamint a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -hoz való kötődés is (mindkét izoformánál). Az előbbi kapcsolódásban a katalitikus doménbe ékelődött PH domén, míg az utóbbiban az N-terminális PH domén játszik fontos szerepet [8, 47].

Génhiányos egérmodellben a PLC $\gamma$ 1 hiánya embrionális letalitást okoz érnövekedési és vérképzési zavarok miatt [47]. A PLC $\gamma$ 2 génjének kiütése nem letális, de immunfunkciós zavarokat okoz, többek között a neutrofil granulociták bizonyos ingerekkel kiváltható aktiválása is zavart szenved [55].

#### 2.2.3.3 Foszfolipáz C $\delta$ enzimek

A PLC $\delta$  enzimeknek három változatát ( $\delta$ 1,  $\delta$ 3 és  $\delta$ 4) ismerjük (a  $\delta$ 2 változatról kiderült, hogy a humán 4-esnek megfelelő forma szarvasmarhában). A PLC $\delta$  fehérjéket tekinthetjük a PLC-k prototípusának is, hiszen a PLC-családra jellemző minden doménnel rendelkeznek, azon kívül pedig nincs specifikus szerkezeti elemük (3. ábra), és ez a csoport hasonlít leginkább az alacsonyabb rendű szervezetekben megtalálható PLC enzimekre [47, 56].

A PLC $\delta$  enzimek szabályozását nem értjük teljesen, a más családokra jellemző szignálok (G-fehérjék, tirozinkinázok) nem aktiválják őket, azonban a többi izoformától eltérően a Ca<sup>2+</sup>-koncentráció növelése fokozza az aktivitásukat [57]. A ma leginkább elfogadott modell szerint a más PLC-k által elindított szignálok felerősítéséért, meghosszabbításáért lehetnek felelősek [47, 58].

Fontos meghatározója a PLC $\delta$  proteinek funkciójának a lokalizáció is. Ebben többek között az N-terminális PH doménnek jut kiemelt szerep, amely a

plazmamembránban található  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -hoz képes kapcsolódni [57]. A PLC $\delta$ 1 izolált PH doménje volt az első jól karakterizált, specifikusan  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ot kötő fehérjedomén [57], melyet azóta is általánosan alkalmaznak a plazmamembránban található  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  kimutatására [59]. Saját kísérletes munkám során is ezt a domént használtam.

Az egyes izoformák specifikus funkcióiról keveset tudunk, de génhányos állatmodellek alapján feltételezhető, hogy a PLC $\delta$ 1 és PLC $\delta$ 3 funkciója átfedhet egymással, mert külön-külön egyik fehérje hiánya sem letális (a  $\delta$ 1-es bőrfenotípust mutat,  $\delta$ 3 hiánya tünetmentes) [3, 47], a két gén együttes kiütése azonban már embrionális halált okoz [60]. A PLC $\delta$ 4 elsősorban a sejtmagban található meg, és szintje a sejtciklussal együtt változik, de hiánya fejlődési zavart nem okoz, a hím állatokban azonban sterilitással jár [47].

#### 2.2.3.4 Foszfolipáz C $\epsilon$ , $\zeta$ és $\eta$ enzimek

A klasszikus módszerekkel felfedezett három PLC-család mellé a genomikai módszerek elterjedése három újabb enzimescsoportot sorakoztatott fel: ezeket a görög ábécé soron következő betűi alapján nevezték el ( $\epsilon$ ,  $\zeta$  és  $\eta$ ). Későbbi felfedezésük okán ezen családokról egyelőre kevesebbet tudunk, jelentőségük még a klasszikus enzimekénél is kevésbé tisztázott.

A PLC $\epsilon$  családnak egyetlen tagja van. Ez a legnagyobb PLC, a klasszikus szerkezetalkotó doméneken kívül számos további doménje van (3. ábra), melyek részben az enzimaktivitástól független funkciót töltenek be [47]. N-terminálisan egy GEF (GDP/GTP kicserélő faktor) domén található, amely Rap1 és Ras kis G-fehérjéket képes aktiválni, a C-terminális végen pedig két Ras asszociációs doménnel rendelkezik, melyek Ras-kötődést, és ezen keresztül az enzimaktivitás fokozódását közvetítik [61]. A PLC $\epsilon$  tehát egyszerre aktivátora és célpontja a Ras fehérjéknek, amely így a Ras jelpályát erősítő aktivációs huroknak tekinthető [61]. Ezenkívül a PLC $\epsilon$ -t képes a Rho kis G-fehérje is aktiválni különböző jelátviteli útvonalak részeként, és a PLC $\delta$  családdal hasonlóan a más PLC izoformák által kiváltott szignálok tartósságát is játszhat fontos szerepet [47, 61].

A PLC $\zeta$  az enzimescsalád legkisebb tagja, az alapvető strukturális elemek közül az N-terminális PH domént nem tartalmazza (3. ábra). Kizárólag spermiumokban

fejeződik ki, ahol a megtermékenyítés után létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk létrejöttében szerepel [47]. Tartalmaz nukleáris lokalizációs szignálokat, és megfigyelték, hogy a kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációs hullámokkal összefüggésben ingázik a sejtmag és a citoplazma között, tehát szabályozása feltehetően ezen a lokalizációs változáson alapul [8, 47].

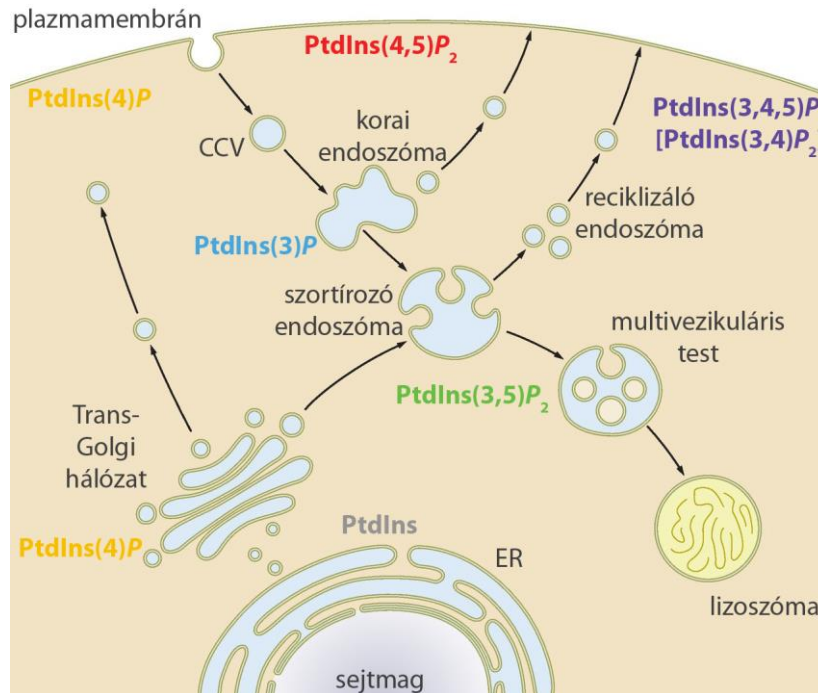
A PLC $\eta$  család két fehérjét 2005-ben fedezték fel, és bár azóta kiderült, hogy ezek az enzimek csaknem kizárólag az idegrendszerben fejeződnek ki, és G-fehérje  $\beta\gamma$  alegységek képesek aktiválni őket, de szabályozásukról és fiziológiai szerepükről egyelőre keveset tudunk [8, 47].

### 2.3 A foszfoinozitidek sejtműködésben betöltött szerepe

Mára világossá vált, hogy a foszfoinozitidek a sejtműködések alapvető regulátorai közé tartoznak, és egymásba történő gyors átalakulásukkal rendkívül hatékonyan és dinamikusán képesek befolyásolni a sejtfunkciók széles skáláját. A foszfoinozitidek funkcióinak átfogó összefoglalása túlmutat jelen dolgozat keretein, ezért az enzimek tárgyalása során felmerülteken túl csak néhány szemelvényt szeretném érzékeltetni azok szerteágazó mivoltát, kiemelve a kísérletes munkám szempontjából fontos részleteket.

A foszfoinozitidek jellegzetes eloszlást mutatnak a sejt különböző membránjaiban, melyet a 4. ábra szemléltet vázlatosan, és amely értelemszerűen csak a mai detekciós módszerekkel kimutatható lipidkészleteket ábrázolja, de nem zárja ki az egyes lipidek időleges vagy kisebb, nem detektálható mennyiségben történő megjelenését más membránkompartmentekben, ahogy azt a lipidmodifikáló enzimek lokalizációja sok esetben valószínűsíti. A 4. ábra alapján feltűnhet a foszfoinozitidek hierarchikus elrendeződése. A sejtmag felől a plazmamembrán felé haladva az inozitollipidek foszforiláltsága egyre nagyobb lesz: míg a mag körüli endoplazmás retikulumban csak PtdIns-t találunk, addig az endoszomális kompartmentek és a Golgi-komplex egyszerűen foszforilált foszfoinozitideket tartalmaznak, a többszörös foszforiláció pedig elsősorban a plazmamembránra jellemző [3]. Ez természetesen nem kizárólagos, hiszen a plazmamembrán is tartalmaz PtdIns(4)P-ot, a multivezikuláris test pedig PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>-ot.

A foszfoinozítidek különböző mechanizmusok révén befolyásolják az egyes működéseket: jelátviteli molekulák prekursoraként, a transzmembrán fehérjék konformációjának változtatásával, vagy a hozzájuk kötődni képes doméneken keresztül citoplazmatikus fehérjék membránhoz horgonyzásával, hogy csak néhány példát említsék. A következőkben a főbb lokalizációk szerinti bontásban ismertettek néhány jellemző példát a foszfoinozítidek sejten belüli szerepének illusztrálásaként.



#### 4. ábra – A foszfoinozítidek sejten belüli elhelyezkedése

Az ábra a foszfoinozítidek jellemző eloszlását mutatja a sejt különböző membránkompartimentjeiben. Fontos megjegyezni, hogy nem mindegyik lipid van folytonosan jelen az adott membránban, például  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  csak bizonyos stimulusokra képződik. Az itt látható eloszlás nem zárja ki, hogy egy foszfoinozítid másol is előforduljon kis, nem detektálható mennyiségben. Balla Tamás ábrája nyomán [3]

### 2.3.1 Foszfoinozítidek a plazmamembránban

A foszfoinozítidek kutatásának egyik kiindulópontja volt a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitelhez fűződő viszonyuk feltárása az 1980-as években [3], és a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  PLC-k általi bontása  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -ra és DAG-re, és az általuk létrehozott  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál és proteinkináz C (PKC) jelpálya ma már jól ismert tankönyvi adatok. A PLC enzimek működését már jellemeztem korábban, ehhez itt csak annyit tennék hozzá, hogy mindkét jelzőmolekula komplex, a molekuláris környezetre érzékeny jelpályát indít el, melyek alapvető élettani funkciókat szolgálnak [62]. Egy másik fontos jelátviteli út a  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  termelődésével aktiválódik, melyet a már szintén taglalt PI3K-ok indítanak el

különböző hatásokra, többek között RTK-ok aktiválódása után, és a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -hoz specifikusan kötődni képes fehérjéken keresztül szerteágazó szignalizációs rendszert hoznak működésbe [63], a sejt- és szöveti folyamatok széles spektrumát szabályozva.

Egy másik fontos és jól ismert hatása a plazmamembrán foszfoinozítidjeinek az ioncsatornák (és egyéb membrántranszporterek) szabályozása [64]. Ioncsatornák egész garmadáját hozták már összefüggésbe a foszfoinozítidekkel, köztük a sokszínű és számos érzékelési folyamatban részt vevő tranziens receptorpotenciál (TRP) csatornákat [65], jó néhány feszültségfüggő [66] és háttér  $K^+$ -csatornát [67, 68], és ligandaktivált csatornákat is. Az esetek többségében a PtdIns(4,5) $P_2$  szerepét írták le, de néhány esetben a PtdIns(3,4,5) $P_3$  is megjelenik, illetve például a kapacitív  $Ca^{2+}$ -beáramlásért felelős Orai1 esetében a PtdIns(4) $P$  jelentőségét feltételezik [69], a hőérzékelésben részt vevő TRPV1-es (vanilloid receptornak is nevezett) csatornákat pedig együtt szabályozza a PtdIns(4,5) $P_2$  és a PtdIns(4) $P$  [70].

Fontos szerep jut a foszfoinozítideknek az exo- és endocitózis regulátoraként is. Bár a pontos mechanizmus egyelőre nem tisztázott, de a PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének növelése serkenti, csökkentése pedig gátolja a vezikulák exocitózist [71], és számos exocitotikus fehérje (pl. szinaptotagmin 1, szintaxin 1A) képes kapcsolódni ehhez a lipidhez [3]. A foszfoinozítid endocitózisban betöltött szerepéről a későbbiekben részletesebben lesz még szó az endocitózist ismertető alfejezetben, illetve az eredményeknél, hiszen kísérletes munkám során ezt vizsgáltam.

A membrán-citoszkeleton kapcsolat szabályozásában is elengedhetetlenek a foszfoinozítidok, a citoszkeletáris adaptorfehérjék közül is több rendelkezik PtdIns(4,5) $P_2$ -kötő képességgel [4]. Többek között a citoszkeletáris szerveződés dinamikus működéséhez is fontos a plazmamembránon belül a lokális foszfoinozítidszint-változás, melyben számos szintetizáló és lebontó enzim helyi működése is szerepet játszik [72]. A PtdIns(4,5) $P_2$  és PtdIns(3,4,5) $P_3$  polarizált elhelyezkedése jól dokumentált például a kemotaxist végző sejtekben, illetve a polarizált epitélisejtek membránjában [4, 72].

### 2.3.2 Foszfoinozítidok intracelluláris membránokban és a sejtmagban

A Golgi komplex fő foszfoinozítid alkotója a PtdIns(4) $P$  (4. ábra). A korábbiakban láttuk, hogy mind a négy PI4K izoforma megtalálható ebben a

kompartimentben, és funkcióik nem fednek át teljesen egymással, jelezve a lokalizált PtdIns(4)*P* metabolizmus fontosságát. A PtdIns(4)*P* kis G-fehérjékkel (elsősorban az Arf1-gyel) szorosan együttműködve térben és időben koordinálja a Golgiból induló transzportfolyamatokat, a különböző irányba tartó vezikulákat éppúgy, mint a transzportfehérjéken keresztüli lipidmozgásokat [73, 74]. A vezikuláris transzportban különböző klatrinadaptorok, köztük az AP-1 és AP-3 (adaptorprotein) komplexek rendelkeznek PtdIns(4)*P*-kötő képességgel, míg a lipidtranszportot végző fehérjék közül többek között az OSBP (oxiszterolkötő protein – oxysterol binding protein) és a FAPP1 és 2 (négy- foszfát adaptorprotein – four-phosphate adaptor protein) esetében írták le, hogy funkciójukhoz szükséges a PtdIns(4)*P*-kötés [73]. Nem közvetlenül a transzportban vesz részt, de a Golgi morfológiájának fenntartásán keresztül indirekt módon szükséges a normális funkcióhoz a GOLPH3 (Golgi phosphoprotein) fehérje, amely a PtdIns(4)*P*-kötésen keresztül az aktin citoszkeletont kapcsolja össze a Golgi membránjával, és jelentősen hozzájárul többek között a vezikulák képződéséhez [75].

Az endoszomális-lizoszomális membránokban a PtdIns(3)*P* az uralkodó foszfoinozítid, illetve jelen van még a PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> is, elsősorban a multivezikuláris testről befelé lefűződő vezikulákon (4. ábra). A többi lipidhez hasonlóan a PtdIns(3)*P* is a hozzá kötődni képes fehérjéken keresztül befolyásolja az adott kompartment működését, a kötődés elsősorban a FYVE doménon [76] vagy a PX (phox-homológia) doménon keresztül jön létre [77]. A PtdIns(3)*P* által szabályozott transzportfolyamatok között megtaláljuk például az ún. retromer komplexet, amely a Golgiból a lizoszómába irányuló [és PtdIns(4)*P*-függő] transzport vivőmolekuláinak Golgiba való visszajuttatásáért felel [77]. A különböző endoszomális vezikulák közötti fúziót a PtdIns(3)*P* és a Rab5 kis G-fehérje közösen regulálják, a legtöbb ehhez szükséges fehérje mind a lipidet, mind a G-fehérjét képes kötni [77]. Egy másik fontos endomembránokra jellemző folyamat, amit a PtdIns(3)*P* szabályoz, az autofágia. Ebben a foszfoinozitidek sajátos kettős szerepet látnak el: a III-as típusú PI3K által szintetizált PtdIns(3)*P* nélkülözhetetlen az autofágia elindításához, az I-es típusú PI3K által a plazmamembránban előállított PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> ellenben az Akt/mTOR jelpálya aktiválásán keresztül gátolja azt [27].

A foszfoinozitidek jelen vannak a sejtmagban is, és szintjük változik is különböző stimulusok hatására, illetve korábban láttuk, hogy számos foszfoinozítid-



módosító enzim is bejut a sejtmagba, ami arra utal, hogy specifikus funkciót is ellátnak ott ezek a lipidek. Érdekes módon a nukleáris foszfoinozitidek nagy valószínűséggel elsősorban nem membránhoz kötöttek, hanem fehérjék fedik el hidrofób lipidláncaikat, vagy pedig micellákat képeznek [3, 78]. A funkcióik feltérképezését nehezíti, hogy egyelőre kevés általuk szabályozott magi fehérjét azonosítottak. A kivételek közé tartozik az ING2 molekula, melyről megmutatták, hogy a PtdIns(5)*P*-hoz képes kötődni a sejtmagban, és a kromatin acetilációját befolyásolja, illetve képes apoptózist is indukálni [79].

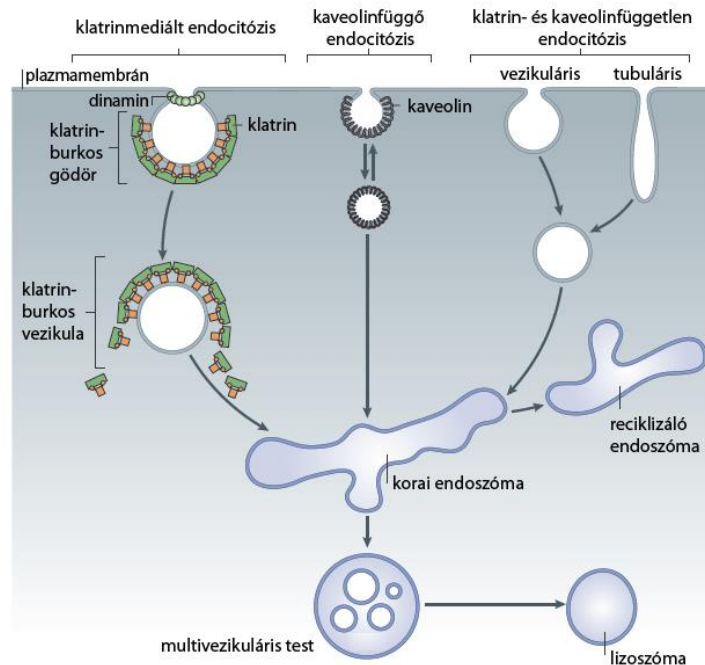
## 2.4 A receptorendocitózis folyamatának jellemzése

Az endocitózis a sejtműködés alapvető folyamatai közé tartozik, melynek során a plazmamembrán egy darabja felvételre kerül a sejt belsejébe, a folyamat során körülzárt extracelluláris folyadékkal együtt. Amellett, hogy bizonyos tápanyagok felvételét is lehetővé teszi, a sejtfelszíni fehérjék eltávolításával alapvető befolyással bír a sejteknek a környezetükkel való kölcsönhatására, és szerepet játszik olyan látszólag nem kapcsolódó folyamatok szabályozásában is, mint a sejtosztódás, az antigénprezentálás, vagy a sejtváándorlás [80, 81]. Ennek a dolgozatnak a kereteit meghaladná az endocitózis minden aspektusának részletes tárgyalása, ezért áttekintésem a továbbiakban a bemutatandó kísérleti eredményeink szempontjából releváns egyik fontos funkciójára, a sejtfelszíni receptorok működését befolyásoló hatására fókuszál.

### 2.4.1 Az endocitózis típusai

Az endocitózis nem egy egységes folyamat, számos párhuzamosan működő, eltérően szerveződő és szabályozott útvonala lehetséges, melyek közül sokat még csak kezdünk megismerni. A legdurvább megközelítés csak két csoportot különböztet meg: az egyik csoportot a legrégebben ismert és legjobban tanulmányozott klatrinmediált endocitózis (clathrin-mediated endocytosis – CME) alkotja, míg a másikba tartozik minden egyéb, klatrintól független endocitózisforma (clathrin-independent endocytosis – CIE) [82]. Az utóbbi csoportból még a kaveolinfüggő útvonalat szokták külön említeni, melyet a palackformájú membránbemélyedések tesznek jellegzetessé. Ebben a felosztásban a többi típust klatrin- és kaveolinfüggetlen endocitózisként foglalhatjuk

össze (5. ábra). Mivel kísérleteinkben elsősorban a klatrinmediált receptorendocitózist vizsgáltuk, így először ennek a formának a mechanizmusát fejtem ki részletesebben, azután pedig röviden összefoglalom a klatrintól független útvonalak főbb jellegzetességeit.

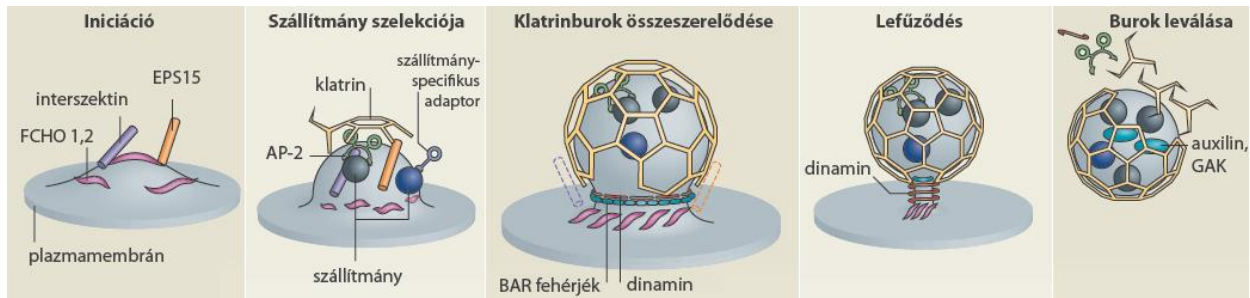


#### 5. ábra – Klatrinfüggő és klatrinfüggetlen endocitózisformák

Az endocitózisnak számos párhuzamos útja létezik, ezek közül legjobban a klatrinmediált endocitózist (CME) ismerjük, kevésbé jól karakterizált a kaveolinfüggő útvonal. A klatrintól és kaveolintól is független endocitózisformákról egyelőre keveset tudunk. Az endocitózisa kerülő molekulák a korai endoszómába kerülnek, ahonnan szortírozás után a recikláló endoszómán keresztül visszakerülhetnek a plazmamembránba, vagy a multivezikuláris testbe és a lizoszómába továbbítva lebontásra kerülnek. McMahon és Boucrot ábrája nyomán [83].

#### 2.4.1.1 A klatrinmediált endocitózis mechanizmusa

A CME nevét onnan kapta, hogy a folyamat során a sejtbe betüremkedő membránrészlet köré egy ideiglenes fehérjeburok épül, melynek fő alkotórésze a klatrin. A klatrinburkos vezikulákat minden eukarióta sejtben megtaláljuk, és bár ezek a sejten belüli membránokról is lefűződhetnek, és így az intracelluláris membrántranszportban is részt vesznek, de klatrinmediált endocitózis alatt csak a plazmamembránból induló, saját adaptorfehérje-készlettel működő folyamatot értjük. Mint említettem, ez a leginkább tanulmányozott endocitózisforma, de ez koránt sem jelenti azt, hogy minden részletében ismert. A jelenleg irányadó modell ultrastrukturális és sejtbiológiai megfigyelések alapján 5 szakaszt különíti el: iniciáció, a szállítmány szelekciója, a klatrinburok képződése, lefűződés és a burok leválása (6. ábra) [83].



#### 6. ábra – A klatrinmediált endocitózis (CME) szakaszainak sematikus rajza

A CME egy membrángörbület képzésével indul (inicialió), melyet a szállítandó molekulák összegyűjtése követ különböző adaptorfehérjék segítségével, és ezzel párhuzamosan elindul a klatrinburok képződése a membránbetüremkedés köré. A vezikula plazmamembrántól való elválása (lefűződés) után a klatrinburok leválik. Az egyes szakaszok legfontosabb szabályozó fehérjéi külön megjelölve láthatók. McMahon és Boucrot ábrája nyomán [83].

A CME morfológiailag egy a citoplazma felé irányuló membrángörbület kialakulásával kezdődik (inicialió). A kutatási terület egyik vitatott kérdése, hogy ez a folyamat pontosan hogyan zajlik, és mi szabályozza. Egy munkacsoport a membrángörbületet érzékelni és létrehozni képes FCHO 1 és 2 (FES-CIP4 homology domain only) fehérjéket találta fontosnak, melyek a klatrin előtt megjelennek a későbbi membrángödör helyén [84]. Mások azonban az AP-2 (adaptor protein) komplex szerepét hangsúlyozzák az inicialióban, amely a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -hoz képes kötődni, és odavonzza a citoplazmából a klatrinmolekulákat [85]. Egyéb adaptorfehérjék is korán megjelennek a későbbi endocitózis helyén (pl. interszeptin, epsinek, EPS15 (epidermális növekedésifaktor-receptor útvonal szubsztrát 15) – 6. ábra és [33]), de leginkább úgy tűnik, hogy a CME inicialiójáért nem egyetlen mesterregulátor felel, hanem többféle módon is elindulhat [86].

A következő fázisban történik a szállítandó molekulák összegyűjtése: az endocitózisra kerülő membránfehérjék nem képesek közvetlenül kötődni a klatrinhoz, így ebben a fázisban alapvető az adaptorfehérjék szerepe. Ezek közül kiemelkedik a már említett AP-2 komplex, mert amellett, hogy egyes szállítandó receptormolekulákat közvetlen kötődéssel vonz az endocitózis helyére, a többi adaptorfehérje jelentős része is az AP-2 komplexen keresztül lokalizál az endocitotikus gödrökbe [83]. A szállítandó molekulákon specifikus jelzések találhatók az adaptorfehérjék számára. A legtöbb endocitózisra kerülő receptorokon található ilyen jelzés, ezekről és az őket felismerő adaptorokról később még részletesebben lesz szó.

A szállítvány összegyűjtésével párhuzamosan elindul a membrángödör köré a klatrinburok összeszerelődése is, ebben is kulcsfontosságú az AP-2 komplex szerepe,

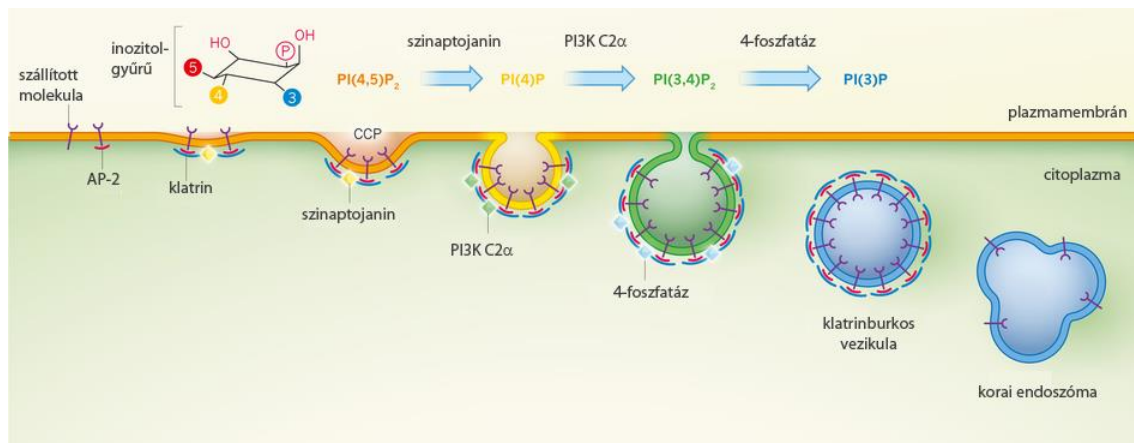
amely a klatrinhoz is képes kötődni. Az AP-2 egy heterotetramer komplex, mely két nagyobb láncból ( $\alpha$  és  $\beta 2$ , ezeket nevezik  $\alpha$ - és  $\beta 2$ -adaptinnak is), és két kisebb molekulából ( $\mu 2$  és  $\sigma 2$  láncok) épül fel, és sokrétű funkciójának megfelelően a klatrin után ez található meg a legnagyobb mennyiségben a folyamat során kialakuló gödrökben [83, 87]. A klatrinburkot jellegzetes, háromágú ún. triszkelion protomerek alkotják, melyek a polimerizáció során penta- és hexagonális struktúrákat építenek fel (6. ábra). Az így kialakult membránrészt nevezi az irodalom klatrinburkos gödörnek (CCP), amely tehát a CME kialakulásának helye a plazmamembránban, és fluoreszcens mikroszkópiával, illetve elektronmikroszkópiával jól detektálható.

A CCP további mélyülésével formálódó vezikula nyakánál már korán megjelenik a dinamin [33, 88], melyet a membrángörbületet érzékelő, BAR (Binamfifizin-Rvs) doménnel rendelkező adaptorfehérjék (pl. amfifizin1, SNX9 – szortírozó nexin 9) vonzanak a CCP erősen görbült részére (6. ábra) [89]. A dinamin egy polimerizációra hajlamos GTP-áz aktivitású fehérje, és mindkét említett tulajdonsága szükséges a formálódó klatrinburkos vezikula (clathrin-coated vesicle – CCV) lefűződésének elindításához, melyben a PH-doménjének PtdIns(4,5) $P_2$ -hoz való kötődése is szerepet játszik [90-92]. A lefűződést segíti elő a formálódó vezikula körül elinduló aktinpolimerizáció is, melyet szintén adaptorfehérjék irányítanak, a HIP1 (huntingtin-interacting protein 1) és HIP1R (HIP1-related), valamint a kortaktin érdemelnek említést ezek közül [83].

A lefűződés után az újonnan keletkezett CCV-ről azonnal megkezdődik a klatrinburok leválása. Ezt a feladatot a HSC70 (heat shock cognate 70) nevű, ATP-áz aktivitással rendelkező fehérje végzi, egy kofaktor (auxilin, illetve egyes szövetekben helyette a ciklin G-asszociált kináz – GAK) közreműködésével [83]. A burkot alkotó és a szabályozásban részt vevő fehérjék visszakerülnek a citoplazmába, ahonnan újra beléphetnek az endocitotikus ciklusba, a vezikula pedig a szállított molekulákat a korai endoszomális kompartmentbe továbbítja, ahonnan több irányba is folytatódhat az útjuk: visszakerülhetnek a plazmamembránba a reciklizáló endoszómán keresztül, vagy a késői endoszómán és multivezikuláris testen keresztül a lizoszómába kerülhetnek, ahol lebomlanak (5. ábra).

Ahogy korábban már említettem, a foszfinozítidek nélkülözhetetlen szereplői a CME folyamatának, szinte minden szinten [35, 93]. Már az iniciációban szerepet

tulajdonítanak a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -nak az AP-2 komplex plazmamembránhoz történő kihelyeződésében [85], és a CME adaptorfehérjéinek elsöprő többsége is rendelkezik valamilyen  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -kötő doménnel vagy fehérjerészlettel [94, 95]. A foszfoinozitideket egymásba átalakító kinázok és foszfatázok közül is többet megtalálhatunk a CCP-kben (a teljesség igénye nélkül:  $\text{PIPKI}\gamma$  [96, 97], szinaptojanin [32, 34], SHIP2 [36]). Újabb eredmények feltételezik a  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  szerepét is, közvetlenül a lefűződés előtt, melyet alátámaszt az is, hogy a szintézisét végző  $\text{PI3KC2}\alpha$  enzim szintén kimutatható a CCP-kben (7. ábra) [26]. A lefűződés után a vezikuláról eltűnnek a plazmamembránra jellemző foszfoinozitidek, amely elősegíti a burok leválását, és megjelenik az endoszómákra jellemző  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$  (7. ábra). Ennek a foszfoinozítid-váltásnak a részletes mechanizmusáról egyelőre keveset tudunk, de több foszfoinozítid-foszfatázról (pl. az OCRL1-ről és a szinaptojaninokról) ismert, hogy jelen vannak a CCP-kben és a lefűződött vezikulákon [33], így feltételezhető hozzájárulásuk ehhez a folyamathoz.



**7. ábra – A foszfoinozítidek klatrinmediált endocitózisban betöltött szerepének feltételezett sémája**

A plazmamembránban jelen levő  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  (az ábrán *narancs színnel* jelölve) fontos regulátora a klatrinmediált endocitózisnak. Egy friss tanulmány szerint a CCP-k érésének késői szakaszában a  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  (*zöld*) és az őt szintetizáló  $\text{PI3KC2}\alpha$  enzim bírhatnak fontos szereppel [26]. A szubsztrátként szolgáló  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  (*sárga*) eredete egyelőre nem tisztázott, a vezikulákon a  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ -ra (*kék*) történő foszfoinozítid-konverzióban több foszfoinozítid-módosító enzim szerepét feltételezik [39]. Schmid és Mettlen ábrája nyomán [98]

#### 2.4.1.2 A klatrintól független endocitotikus útvonalak

A klatrintól független endocitózisformákat (CIE) több jellemzőjük alapján (szállított molekulák, részt vevő adaptor- és szabályozó molekulák, morfológia, stb.) lehet csoportosítani [80-83, 99], az egyik ilyen lehetséges felosztást mutatja a 3. táblázat. Megjegyzendő azonban, hogy a CIE egyes formáiról egyre többet tudunk meg ugyan, mégis sokszor nehéz még egyértelmű határvonalat húzni köztük, és fiziológias

jelentőségük feltárását nehezíti, hogy vizsgálatuk általában a CME részleges vagy teljes gátlása mellett zajlik [80].

### 3. táblázat – Az endocitotikus útvonalak főbb morfológiai és molekuláris jellegzetességei

Máshol elő nem forduló rövidítések: CTxB: koleratoxin B; SV40: simian virus 40; ARHGAP10: Rho GTPáz aktivátor protein 10; GRAF1: fokális adhéziós kinázzal asszociált GTPáz regulátor 1 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase 1); FcεRI: immunglobulin E receptor I; PAK1-2: p21-aktivált kináz 1-2; MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (main histocompatibility complex); ec. folyadék: extracelluláris folyadék. [80, 81, 100] alapján.

Endocitózis formája	Morfológia	Példák szállított molekulákra	Szabályozó kis G-fehérjék	Dinamin-függés	Egyéb részt vevő fehérjék
Klatrinmediált útvonal	vezikuláris	RTK-ok, GPCR-ok, TfR, LDLR, toxinok	Rab5, (Arf6)	igen	klatrin, AP-2, epszin, SNX9, szinaptojanin, aktin, amfifizin, stb.
Kaveolinfüggő útvonal	vezikuláris (palackforma)	GPI-horgonyzott fehérjék, CTxB, SV40	nem tisztázott	valószínű	kaveolin, kavin 1, Src kinázok, PKC, aktin
CLIC/GEEC útvonal	tubuláris / gyűrűalakú	GPI-horgonyzott fehérjék CTxB	Cdc42, Arf1	nem	ARHGAP10, aktin, GRAF1
IL2Rβ útvonal	vezikuláris	IL2Rβ, FcεRI	RhoA, Rac1	feltételezett	PAK1, PAK2
Arf6-függő útvonal	vezikuláris / tubuláris	MHC I-es fehérjék, CD59	Arf6	nem	tisztázatlan
Flotillinfüggő útvonal	vezikuláris	CTxB, CD59, proteoglikánok	nem tisztázott	nem tisztázott	flotillin 1 és 2
Fagocitózis	szállítmánytól függő	kórokozók	Arf6/Cdc42/Rac1/RhoA (típusfüggő)	feltételezett	aktin, amfifizin 1, Rho-kináz, adhéziós proteinek
Makropinocitózis	fodrozott	ec. folyadék, RTK-ok	Rac1	bizonyos esetekben	aktin, PAK1, PI3K, Ras, Src kinázok

A klatrintól független endocitotikus útvonalak közül legtöbbet a kaveolák rendszeréről tudunk, amely elektronmikroszkóppal jól látható, jellegzetes palackformájú bemélyedéseket képez a plazmamembránban. Ezek a struktúrák koleszterinben gazdagok, és a kaveolin (valamint kavin) fehérjék segítségével alakulnak ki, melyek egyfajta burkot képeznek körülöttük. Bár valóban képesek lefűződni is a plazmamembránról, de a legújabb eredmények arra utalnak, hogy az endocitózis mellett más fontos funkciókkal is bírnak, úgymint a membránfeszülés elleni védelem simaizmokban, sejtvándorlás elősegítése és a sejtek lipidanyagcseréjének szabályozása [101]. A kaveolákhoz hasonló, de kaveolin 1 helyett flotillin 1 és 2 segítségével

szerveződő struktúrákról is leírták, hogy képesek endocitózisa [102], ezek jelentősége azonban egyelőre nem tisztázott.

A klatrintól és kaveoláktól is független endocitotikus útvonalakat általában egy specifikus szállított molekula (pl. IL2R $\beta$  [interleukin-2 receptor  $\beta$ ] útvonal), vagy egy jellegzetes szabályozófehérje alapján (pl. Arf6-függő) azonosítják. Tudásunk általában hiányos ezekről, habár általános jellemzőjüknek tűnik például, hogy koleszterinben gazdag membránrészekből (tehát speciális mikrodoménekből) indulnak [80]. Az egyik részletesebben tanulmányozott forma a glikozil-foszfatidilinozitolhoz (GPI) horgonyzott fehérjék endocitózisa. Ennek során a szállított molekulák a klatrinburkos vezikuláktól jól elkülöníthető intracelluláris struktúrákba (klatrinfüggetlen karrier – clathrin-independent carrier, CLIC) kerülnek, majd onnan egy szintén különálló endoszomális kompartmentbe (GPI-horgonyzott fehérjékben gazdag korai endoszomális kompartment – GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment, GEEC) továbbítódnak, így erre az útvonalra az irodalomban a CLIC/GEEC elnevezés terjedt el [103]. A többitől lényegileg eltérő mechanizmussal lezajló folyamatok a fagocitózis és a makropinocitózis, melyek tehát az endocitózis speciális formájának tekinthetők [99].

A legtöbb endocitózisforma szabályozói között megtalálhatjuk valamelyik kis G-fehérjét, elsősorban az Arf, Rab és Rho család tagjait. Ahogy a 3. táblázat is mutatja, a különböző útvonalak különböző kis G-fehérjéket igényelnek, melyek több szinten is részt vehetnek az endocitózis folyamatában: irányíthatják bizonyos adaptorfehérjék membránlokalizációját, befolyásolhatják a membrán görbületét, a lefűződés körüli citoszkeletonváltozásokat, és a lipidösszetételt is bizonyos lipidmodifikáló enzimek odavonzásával [80]. Ez utóbbira példa az Arf6, mely számos endocitotikus útvonalat szabályoz, és hatásai között megtaláljuk többek között a PtdIns(4,5) $P_2$  lokális szintézisének változtatását is [104].

#### **2.4.2 A receptorendocitózis jelentősége**

A klatrinmediált endocitózisa tulajdonított egyik első élettani funkció volt specifikus receptorok plazmamembránból való eltávolítása, amely szolgálhat tápanyagfelvételi módozatként (pl. transferrinreceptor – TfR, alacsony sűrűségű lipoproteinreceptor – LDLR), vagy csökkentheti a sejt egy adott hormonnal vagy neurotranszmitterrel szembeni válaszkészségét (pl. epidermális növekedésifaktor-

receptor – EGFR,  $\beta_2$  adrenerg receptor –  $\beta_2$ AR). A plazmamembrán-receptorok többsége részt vesz egy állandó endocitózis-exocitózis körforgásban, amely független attól, hogy a receptor köt-e ligandot vagy szignalizál-e. Ezt a folyamatot konstitutív internalizációnak nevezzük, szemben a ligandindukált endocitózissal, melyet a receptor ligandkötését követő konformációváltozás vált ki [83]. Ez a kétfajta endocitózis akár ugyanazon receptor esetében is különbözőképpen szabályozódhat.

A klasszikus nézet szerint az endocitózis célja tehát a receptor jelátvitelének leállítása, korlátozása. Ugyan ez számos esetben így is van (pl. a  $\beta_2$ AR-nál is [105]), de ma már tudjuk, hogy bizonyos receptoroknál a szignalizáció az endocitózis után is folytatódhat [106], vagy új, eltérő jelátviteli utak aktiválódhatnak, például a  $\beta$ -arresztin kötődésén keresztül [107, 108]. Egyre inkább úgy tűnik tehát, hogy a szignalizáció és az endocitózis nem két külön rendszert alkotnak, hanem egy számos ponton összefonódó hálózat részeinek tekinthetők [100, 109, 110].

Bár a CME kiemelt szerepe a receptorendocitózisban elfogadott, ez semmiképp sem jelent kizárólagosságot, ahogyan arra a CIE tárgyalásakor is láthattunk példákat. Akár ugyanaz a receptor is használhat különböző útvonalakat párhuzamosan a fent említettek közül. Az EGFR-ról és más RTK-okról is ismert például, hogy a ligandkoncentráció függvénye is, hogy milyen útvonalon internalizálnak: alacsony ligandkoncentráció mellett elsősorban klatrinmediált endocitózissal, míg magas hormonszinteknél jelentős mértékben klatrintól függetlenül jutnak be a sejtbe [111, 112].

### 2.4.3 Endocitotikus szortírozó jelzések és adaptorfehérjék

A receptorok internalizációja az endocitózisra kerülő molekulák kiválasztásával kezdődik: a fehérjék citoplazmatikus szakaszának specifikus jelzéseit felismerik a megfelelő adaptormolekulák, melyek azután a CCP-kbe gyűjtik össze a szállítmányt. Mind az endocitotikus szignálszekvenciák [113, 114], mind az adaptorfehérjék [115] nagy változatosságot mutatnak. Előbbiek mérete a néhány aminosavnyi hosszútól egy hajtogatott fehérjedomén nagyságig terjedhet [113], a legfontosabbak jellemzőit a 4. táblázatban foglaltam össze. Az adaptorfehérjék is sokfélék lehetnek: vannak olyan jelzések, melyeket maga az AP-2 (annak  $\mu$ 2 alegysége, vagy az  $\alpha$  és  $\sigma$ 2 alegységek együtt) ismer fel, és vannak olyanok is, ahol egy köztes adaptor szükséges, amely vagy



az AP-2-höz, vagy a klatrinhoz kötődik [115]. A tirozinalapú (YXXØ) és dileucin-alapú ([DE]XXXL[LI]) jelzések közvetlen AP-2-kötést eredményeznek, míg a foszfortirozin-alapú motívumot ([YF]XNPX[FY]) tartalmazó proteinek foszfortirozin-kötő (PTB) domént tartalmazó adaptorfehérjéken (pl. Dab2, Numb) keresztül kerülnek endocitózisra. (A szekvenciákban az aminosavak egybetűs kódjai szerepelnek, X tetszőleges aminosavat, míg az Ø egy nagy, hidrofób oldallánccal bíró aminosavat jelent.) Az AP-2 megfelelő kötőhelyei csak foszforilált állapotban érhetőek el a szignálszekvenciák számára, így ez a foszforiláció (melyet az AAK1 – adaptor-asszociált kináz 1 – végez) nélkülözhetetlen a receptorendocitózishoz [115].

#### 4. táblázat – A legfontosabb szortírozó jelzések és az őket felismerő adaptorfehérjék

A szortírozó jelzéseknél az egybetűs kódok az aminosavakat jelölik, ahol X bármilyen aminosav lehet, és Ø-vel a nagyméretű, hidrofób aminosavat jelölik. A szögletes zárójelben lévők közül bármelyik megfelelő az adott pozícióban. Rövidítések: PAR: proteináz-aktivált receptor; GABA<sub>A</sub>R  $\gamma$ 2:  $\gamma$ -aminovajsav receptor  $\gamma$ 2; P2X4R: P2X4 típusú purinerg receptor; LRP1-2: LDLR-hez kapcsolódó fehérje 1-2; ARH: autoszomális recesszív hiperkoleszterinémia adaptorfehérje. Traub táblázata alapján[87]

Szortírozó jelzés	Példák szállítmányra	Felismerő adaptorfehérje, domén
YXXØ	TfR, PAR, GABA <sub>A</sub> R $\gamma$ 2, P2X4R	AP-2 $\mu$ 2 alegysége
[DE]XXXL[LI]	CD4, CD3 $\gamma$	AP-2 $\alpha$ és $\sigma$ 2 alegységei
[YF]XNPX[FY]	LDLR, LRP1-2, $\beta$ 1A integrin	ARH, Dab2, Numb fehérjék foszfortirozin-kötő (PTB) doménje
ubikvitináció	EGFR	EPS15 és epszinek ubikvitin-interakciós motívuma
Ser/Thr foszforiláció	GPCR-ok	$\beta$ -arresztin 1 és 2 N-terminális szakasza

Az eddigi, receptorszekvenciában kódolt jelzésekkel szemben a receptor kovalens módosításán alapul az ubikvitinációs szignál, melyet meghatározott lizin-oldalláncokhoz kapcsolt ubikvitinmolekulák alkotnak. Ezt a szignált az epszinek, illetve az EPS15 adaptorok ismerik fel ubikvitin-interakciós motívumaik (UIM) segítségével, és a CCP-kbe irányítják az ubikvitinált receptort. Az ubikvitináció mint endocitotikus jelzés leginkább a RTK-okra jellemző [112].

Szintén kovalens módosítás a szignál a GPCR-ok esetében: a C-terminális szakaszon bizonyos szerin és treonin-oldalláncok foszforilálódnak (általában egy G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz – GRK által) [116, 117], és ez teszi lehetővé a  $\beta$ -arresztin kötődését, ami sok egyéb mellett a receptorok CCP-kbe irányításáért is felel.

Ezt a mozgást a  $\beta$ -arresztin 2 klatrinhoz és AP-2 komplexhez történő kötődése váltja ki, melyek közül az utóbbi tűnik fontosabbnak [118].

Az arresztin-receptor kapcsolat erőssége és tartóssága alapján két csoportba sorolhatók a GPCR-ok: az A osztályba tartozó receptorok már a plazmamembránban vagy az endocitózis után röviddel elengedik az arresztint, míg a B osztályú GPCR-oknál tartósan megmarad a kötődés, és ez a receptor endoszómán belüli további sorsát is meghatározza [117]. Az endocitózis és a jelátvitel szoros összefonódását jól jelzi, hogy az utóbbi esetben az arresztin állványfehérjeként olyan jelátviteli útvonalakat indíthat el a már internalizálódott receptorról, melyek az eredeti, G-fehérjén keresztüli úttól teljesen függetlenek, és fontos részét képezhetik a receptor hatásának hosszútávon [108].

## **2.5 A foszfoinozítidek kimutatására és változtatására alkalmas módszerek**

Mivel kísérletes munkámnak fontos részét képezte a foszfoinozítidek sejten belüli szintjének követése, illetve annak manipulálása, ezért a bevezetés végén röviden bemutatom az ehhez rendelkezésre álló főbb módszereket.

### **2.5.1 Foszfoinozítidek kimutatása**

A foszfoinozítidek kimutatása lehetséges ugyan hagyományos analitikai módszerekkel (pl. nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával [6], vagy tömegspektroszópiával [5]), de több szempontból is nehézkes: egyrészt alacsony koncentrációjuk, másrészt az egyes foszfoinozítidek egymáshoz nagyon hasonló szerkezete miatt [119]. A fenti módszerek alternatívájaként ezért elterjedt a lipidek közvetett vizsgálata, ahol nem magát a lipidet, hanem egy ahhoz specifikusan kötődő fehérjedomént mutatnak ki. Ez természetesen nem teszi lehetővé a foszfoinozítidek abszolút mennyiségének mérését, de ha erről le tudunk mondani, akkor számos előnnyel is szolgálhat: megfelelő jelöléssel a lipid sejten belüli elhelyezkedését is láthatjuk akár élő sejtekben, és valós időben követhetők a lipidszintek változásai is.

Az első ilyen célra használt lipidekötő domén a PLC $\delta$ 1 enzim PH doménje volt, amely a PtdIns(4,5) $P_2$ -hoz kötődik specifikusan, így fluoreszcensen jelölve ennek a

foszfoinozitudnak a mikroszkópos (és egyéb módszerekkel történő) vizsgálatát teszi lehetővé [59, 120]. Kísérleteimben én is ezt a domént használtam a PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének követésére. Később megjelentek más foszfoinozitud-markerek is: a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -ra specifikus Btk (Bruton tirozinkináz) PH domén [121], az endoszomális PtdIns(3) $P$ -hoz specifikusan kötődő FYVE domének [76], és ma már szinte mindegyik foszfoinozitudnak létezik legalább egy, de sok esetben több, hasonló elven működő szondája [120, 122]. A legújabb fejlemény ezen a téren egy PtdIns(3,5) $P_2$ -szonda leírása néhány hónappal ezelőtt [123], ami mutatja a téma aktualitását, de egyben azt is, hogy koránt sem megoldott a lipidek ily módon történő detektálása. Ezen lipidkötő domének használatánál mindenképpen figyelembe kell venni, hogy bár az adott lipidhez specifikusan kötődnek, de sejten belüli elhelyezkedésüket befolyásolhatja más molekulákhoz (egyéb membránalkotó lipidekhez vagy fehérjékhez) való kötődésük is, és ez azzal járhat, hogy a vizsgálni kívánt foszfoinozitudnak nem a teljes készletét, vagy nem minden lokalizációját képesek mutatni [122]. Ezenkívül fennáll annak veszélye is, hogy a nagy mennyiségben kifejezett szonda maga szekvesztrálja az általa kötött foszfoinozitud-molekulákat, így megváltoztatva a természetes egyensúlyt [122].

A lipidkötő doménekkal párhuzamosan fejlődött a foszfoinozitidek antitesttel történő kimutatása is, ma már a legtöbb molekulához elérhető ellenanyag [26, 124-126]; ezek használata azonban membránokat megkímélő fixálási módszereket igényel, ami ráadásul membránoként eltérhet [126], és ez körülményessé teszi az eljárást, illetve korlátozza az antitestek felhasználási körét.

## 2.5.2 Foszfoinozitidek szintjének mesterséges változtatása

Rendkívül hasznos információkkal szolgálhat a foszfoinozitidek funkciójáról, ha meg tudjuk figyelni a sejten belüli szintjük mesterséges változtatásának következményeit. Több különböző megközelítés is létezik erre a feladatra, melyek közül néhányat röviden ismertetek a bevezetés zárásaként.

Amint már említettem, a lipidkötő domének overexpressziója befolyásolhatja a megkötött foszfoinozitud mennyiségét. Ezt használta ki az a munkacsoport, amelyik a PLC $\delta$ 1 PH doménje segítségével a plazmamembránban található PtdIns(4,5) $P_2$ -ot megkötve gátolni tudta a TfR endocitózisát [127]. Egy másik lehetőség a kalcium

ionofór ionomicin alkalmazása: a citoplazmatikus kalciumszint emelésével a kalciumfüggő PLC enzimek aktiválódnak, és lebontják a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ot. Ez a módszer hatékonyan bontja a foszfoinozitideket [59, 128], de kevésbé tekinthető specifikusnak.

A foszfoinozítid-szintet specifikusabban befolyásolhatja egy az adott lipidet módosító enzim kifejezése vagy lecsendesítése a sejtben, és ez sok esetben értékes információval is szolgálhat. Például a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  szintézisének utolsó lépését katalizáló PIP5K egyik izoformájának overexpressziója fokozni tudta a transferrin felvételét a sejtbe [129], míg ugyanezen enzimek géncsökkentése, illetve az 5-foszfátáz aktivitású szinaptojanin 1 kifejezése gátolta a TfR internalizációját [31]. Egy újabb tanulmány a  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  lebontását érte el az INPP4B enzim tranziens kifejezésével, amelynek szintén gátló hatása volt az endocitózissra [26]. Specifitásuk ellenére azonban ezek a módszerek hosszútávú változásokat idéznek elő a sejtek foszfoinozítid-háztartásában, ami együtt járhat különböző kompenzáló mechanizmusok beindításával is, így a lipidek pontos funkciójának tisztázására előnyösebbnek tűnik a foszfoinozítid-szint akut változtatása.

A rövidtávú foszfoinozítidszint-változtatásra példa a primer alkoholok (1-butanol) alkalmazása, amely az említett PIP5K-ok gátlásán keresztül csökkenti a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -szintet, és ez szintén képes a fentebb részletezett endocitózist gátló hatást létrehozni [84, 130]. Egy másik megközelítés a lipidszintek akut befolyásolására az indukálható enzimtranszlokáció, amely két fehérjedomén (FRB és FKBP12 domének) kémiaiilag aktiválható heterodimerizációján alapul. Ha az egyik fehérjedomént megfelelő irányítószekvenciával a kívánt membránhoz horgonyozzuk, a másik doménhez pedig hozzákapcsolunk egy foszfoinozítidet átalakító enzimdomént, a heterodimerizáció indukálásával az eredetileg citoplazmatikus enzimet a kívánt membránba tudjuk áthelyezni, ahol akutan megváltoztatja a foszfoinozítid-szintet. Ezt a módszert két munkacsoport használta először párhuzamosan, és mindkét esetben a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -szint csökkenését sikerült elérni vele egy 5-foszfátáz enzimdomén használatával [131, 132]. Később több csoport is ezt a rendszert alkalmazva vizsgálta az endocitózis foszfoinozítid-függését [128, 133], illetve egyéb sejtfunkciókat [70, 134]; és kísérleteimben én is ezzel a módszerrel változtattam a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  szintjét a sejtekben, így később részletesen is ismertetem a működését. Azóta számos más enzimmel, és más membránokban is sikerrel alkalmazták ezt a

technikát, például a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  szintjének emelésére a plazmamembránban [36], vagy a  $\text{PtdIns}(4)P$  lebontására a Golgi-komplexben [135]. Ezen rendszerek egyik korlátja, hogy a heterodimerizáció és így az enzimáthelyeződés is irreverzibilis. A továbblépést ebben egy hasonlóan dimerizáción alapuló, de fényel aktiválható, és reverzibilisnek tűnő módszer jelentheti, amely a visszafordíthatóságon túl alkalmas a lokalizált, például csak a sejt egyik oldalán létrehozott lipiddeplécióra is [136, 137]. Érdekes és ígéretes új megközelítést tesz lehetővé a feszültségérzékeny foszfatázok (voltage-sensitive phosphatase – VSP) alkalmazása, melyeket alacsonyabb rendű állatokban írtak le, és a foszfatáz aktivitás mellett transzmembrán feszültségérzékelő részekkel is rendelkeznek. Ezeket a fehérjéket sikerrel alkalmazták a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -szintjének extrém gyors és reverzibilis változtatására a membránpotenciál befolyásolásával [138, 139].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során a foszfoinozitidek sejten belüli hatásait, ezen belül is elsősorban a plazmamembrán-receptorok endocitózisában betöltött szerepüket vizsgáltam. Kísérletes munkám fő célkitűzései a következők voltak:

- Egy olyan biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) alapú rendszer kifejlesztése, melyben a plazmamembrán-receptorok aktiválás utáni mozgása, endocitózisa lépésekre bontva, molekuláris kölcsönhatások vizsgálatával követhető.
- Ezen módszer felhasználásával a vad típusú, valamint G-fehérjét nem aktiváló, illetve nem deszenzitizálódó mutáns 1-es típusú angiotenzin receptorok (AT<sub>1</sub>R) endocitózisának, illetve plazmamembránon belüli mozgásának összehasonlítása.
- Annak meghatározása, hogy a plazmamembrán PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-szintjének, illetve PtdIns(4)P-szintjének mesterségesen indukált akut csökkentése hogyan befolyásolja az AT<sub>1</sub>R és más plazmamembrán-receptorok endocitózisának egyes lépéseit.
- Az 5-foszfáttal létrehozott, illetve a hormon által indukált, foszfolipáz C $\beta$  aktiválással kiváltott PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció receptorendocitózisra kifejtett hatásának összehasonlítása.

## 4. MÓDSZEREK

### 4.1 Munkánk során használt anyagok

A molekuláris biológiai reagenseket a Fermentas cégtől (Vilnius, Litvánia) szereztük be. A sejttenyésztéshez használt edényeket és a BRET-mérésekhez használt 96-lyukú lemezeket a Greiner Bio-One GmbH-től (Kremsmünster, Ausztria) vásároltuk. A cölienterazin *h*, a Lipofectamine 2000, és az Opti-MEM<sup>®</sup> az Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) cégtől származtak. A sejttenyésztéshez használt DMEM és főtális borjúsérum (FBS) a Lonza cég (Basel, Svájc) terméke volt. A rapamicint a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől szereztük be. A GeneCellin transzfekciós reagenst a BioCellChallenge (Toulon, Franciaország) cégtől rendeltük. A rodaminnal konjugált Ang II a Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA), az Ang II Alexa Fluor 488 konjugátuma pedig a Molecular Probes (Invitrogen<sup>™</sup>) terméke volt. Amennyiben másképp nem jelöltem, a többi anyag a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) származott.

### 4.2 Plazmidkonstrukciók

A *Renilla* luciferázzal jelölt AT<sub>1</sub>R (AT<sub>1</sub>R-luc) konstrukciót a munkacsoportunk által korábban már használt AT<sub>1</sub>R-YFP konstrukcióból [140] kiindulva készítettük, a fluoreszcens fehérje szekvenciáját cseréltük le a humanizált *Renilla* luciferáz szekvenciájára (Promega, Madison, WI, USA), *AgeI* és *NotI* restrikciós enzimek segítségével. Az AT<sub>1</sub>R DRY-AAV mutánsát (D125A, R126A) szintén használta már munkacsoportunk korábban [141], mint ahogy az AT<sub>1</sub>R  $\Delta$ 319 deléziós mutánst is [142], amelybe az Y319 pozícióban lett egy stopkodon beillesztve. A TSTS-AAAA mutációkat (T332A, S335A, T336A, S338A) [142, 143] irányított mutagenézissel, a Stratagene<sup>®</sup> cég (La Jolla, CA, USA) QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit-jének segítségével hoztuk létre. A mutációkat láncterminációs DNS-szekvenálással ellenőriztük, majd a mutációt tartalmazó darabot megfelelő restrikciós enzimek segítségével visszahelyeztük az eredeti, vad típusú plazmidba, a szekvenált régió kívülről eső esetleges mutációk kizárása érdekében.

A humán 5HT<sub>2C</sub>R *Renilla* luciferázzal jelölt változata úgy készült, hogy először a humán 5HT<sub>2C</sub>R cDNS klónjából (klón azonosító: HTR02C0000, GenBank elérési szám: NM\_000868, S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA) sokszorosítottuk a receptor szekvenciáját, melyet azután a pEGFP-N1 plazmidba illesztettünk be *Xho*I és *Kpn*I restrikciós enzimek használatával. Ezután a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) szekvenciáját *Age*I és *Not*I enzimek segítségével a „szuper *Renilla* luciferáz” [144] szekvenciájára cseréltük. Az általam használt konstrukció egy olyan receptorszekvenciát tartalmazott, amely az 5HT<sub>2C</sub>R egy RNS-editált változatának felel meg, 3 pozícióban aminosavcserét eredményezve (I156V, N158G, I160V). A receptor ezen verziója egy korábbi vizsgálat során a nem editált formához képest nagyobb sejtfelszíni expressziót mutatott, és nem rendelkezett konstitutív aktivitással [145]. Az említett mutációkat szintén irányított mutagenézissel, a fent részletezett módon vittük be a plazmidba.

Az 5HT<sub>2C</sub>R-hoz hasonlóan készült a  $\beta_2$ AR *Renilla* luciferázzal jelölt konstrukciója, azzal a különbséggel, hogy a megvásárolt cDNS klónból (klón azonosító: AR0B200000, GenBank elérési szám: NM\_000024.3, S&T cDNA Resource Center) PCR reakcióval sokszorosított receptorszekvenciát ez esetben a pEYFP-N1 vektorba illesztettük bele *Xho*I és *Eco*RI enzimek segítségével. A YFP szekvenciáját ebben az esetben is *Age*I és *Not*I enzimekkel cseréltük a szuper *Renilla* luciferáz szekvenciájára.

Az EGFR-Sluc konstrukció szintén hasonlóan készült, a pCDNA3.1(-) vektorból [146] történt amplifikálás után a humán EGFR szekvenciája a pEGFP-N1 vektorba lett klónozva *Nhe*I és *Sal*I enzimek használatával, majd a GFP szekvenciája újfent a szuper *Renilla* luciferázra lett lecserélve az *Age*I és *Afl*III vágóhelyek felhasználásával.

A Ceruleannal [147], Venusszal [148], illetve YFP-vel jelölt Rab5 molekulákat a fluoreszcens fehérjét kódoló plazmidrész cseréjével hoztuk létre a munkacsoportunk által korábban már használt GFP-Rab5 konstrukcióból [149]. A plazmamembrán megjelöléséhez a Cerulean, YFP illetve Venus fluoreszcens fehérjéket a Lyn kináz plazmamembránba irányító szekvenciájával fuzionáltuk, a munkacsoport által már korábban részletezett módon [150]. A Lyn ezen N-terminális aminosav-szekvenciája (MGCIKSKGKDS) képes mirisztoilálódni és palmitoilálódni, és ezzel a plazmamembrán raft mikrodoménjeibe irányítódik [151]. Egyes kísérletekben az Lck kináz N-terminális plazmamembránba irányító szekvenciáját (MGCVCSNPE)



használtuk ( $L_{10}$ ), amely szintén lipidmodifikáción megy keresztül, és elsősorban a raft régiókban dúsul [152]. A plazmamembrán rendezetlen struktúráinak megjelölésére a YFP, illetve Venus molekulát a K-Ras kis G-fehérje C-terminális CAAX motívumával és hipervariábilis régiójával (KMSKDGKKKKKSKTKCVIM) fuzionáltuk [153]. A dolgozatban szereplő minden Cerulean és Venus konstrukció tartalmazta az A206K mutációt, amely megakadályozza a molekulák di- és oligomerizációját [151]. A  $\beta$ -arresztin 2-YFP készítéshez a  $\beta$ -arresztin 2 szekvenciáját klónoztuk be a pEYFP-N1 plazmidba *NheI* és *KpnI* restriktív enzimekkel, ahogy az korábban már leírásra került [140]. Ebből a fluoreszcens fehérje cseréjével készült a  $\beta$ -arresztin 2-Cerulean konstrukció. A teljes hosszúságú humán WDFY2 proteint, valamint annak FYVE doménjét (277-353 sorszámú aminosavak között) külön is felsokszoroztuk a humán WDFY2 fehérje cDNS klónjából, melyet az Invitrogen<sup>®</sup> cégtől vettünk meg (klónazonosító: 3842589, GenBank elérési szám: NM\_052950). Ezután ezeket a szekvenciákat a pEGFP-C1 vektorba illesztettük bele egyenként, *EcoRI* és *KpnI* enzimeket használva, majd a GFP szekvenciáját a Venuséra cseréltük, *AgeI* és *BglII* enzimekkel.

A GFP-klatrin könnyűlánc Louis Greene (NHLBI, NIH, Bethesda, MD, USA) ajándéka volt [154], azonban a plazmid citomegalovírus promoterét a gyengébb expresszió érdekében a herpes simplex vírus timidinkinázának (TK) promoterére cseréltük. A PLC $\delta$ 1PH-Sluc és PLC $\delta$ 1PH-Venus konstrukciókat a fluoreszcens fehérjét kódoló szekvencia cseréjével készítettük el a PLC $\delta$ 1PH-YFP-t kódoló vektorból [122] kiindulva, az *AgeI* és *NotI* enzimek felhasználásával.

A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszert alkotó fehérjekonstrukciók (PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP-5-foszfátáz) szintén korábban használt plazmidokon alapultak [132], annyiban változtattunk rajtuk, hogy az FRB domént a plazmamembránba irányító korábbi szekvenciát (amely a GAP43 fehérjéből származott), a Lyn fehérje N-terminális aminosavaira cseréltük le (PM-FRB-mRFP), melyet már korábban ismertettem. Egyes kísérletekben egy harmadik, szintén már említett plazmamembránba irányító szekvenciát tartalmazó konstrukciót használtunk ( $L_{10}$ -FRB-mRFP). A T2A virális szekvenciát tartalmazó plazmidot, melynek használatával a lipiddeplécióhoz szükséges mindkét fehérje kifejezhető, két lépésben készítettük el. Először a T2A peptidszekvenciát [155] fuzionáltuk az FKBP-5-foszfátáz konstrukció N-terminális

végéhez, majd ezt az új proteint kapcsoltuk hozzá a PM-FRB-mRFP fehérje C-terminális végéhez. A folyamat végén a PM-FRB-mRFP-linker1-T2A-linker2-FKBP-5-foszfataz konstrukció DNS szekvenciáját kaptuk, egyetlen stopkodonnal a végén (linker1: VDSGS, linker2: PVAT). A PM-FRB-mRFP helyett PM-FRB-Cerulean-t tartalmazó konstrukció is hasonló módon készült. A harmadik T2A-t tartalmazó plazmidot (L<sub>10</sub>-Venus-linker1-T2A-linker3-PH-Sluc) is hasonló módon készítettük el, ebben azonban a T2A szekvencia után található összekötő régió különbözött (linker3: GIHG).

Az mRFP-FKBP-4-foszfataz-5-foszfataz konstrukciót [134] Gerald Hammond és Balla Tamás bocsátották rendelkezésünkre. A csak 4-foszfataz-t tartalmazó változatot (mRFP-FKBP-4-foszfataz) az előbbi konstrukcióból készítettük el úgy, hogy KpnI és BamHI enzimek segítségével az 5-foszfataz domén nagy részét eltávolítottuk, majd az így kapott plazmid egyszálú végeit Klenow fragment segítségével feltöltöttük, és a plazmidot ligáltuk. Ezzel a módszerrel egy olyan konstrukciót nyertünk, melyben a 4-foszfataz domén után még néhány aminosav (GGSTGSR) található a stop kodon előtt.

A vad típusú AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP konstrukciót úgy készítettük el, hogy a PM-FRB-mRFP plazmidban a PM szekvenciáját cseréltük le az AT<sub>1</sub>R-t kódoló szekvenciára. Ebben a plazmidban az AT<sub>1</sub>R és az FRB domén között egy viszonylag hosszú, 20 aminosavból álló összekötő régió (DPTRSANSGAGAGAGAILSR) található.

### 4.3 Sejtvonalak, tranziens transzfekció

Munkánk során két különböző humán embrionális vesefibroblaszt-sejtvonalat használtunk: az eredeti HEK293 sejtvonalat, és egy olyan változatát, amely az SV40 vírus T antigénjét is tartalmazza (HEK293T). Ahol nem jelöltem külön, ott a HEK293 sejtvonal volt használva. Mindkét sejtvonal az ATCC (Manassas, VA, USA) cégtől származott, és 10% főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és streptomocint (50 µg/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM – Lonza 12-604) tenyésztettük őket.

A BRET-kísérletekhez a HEK293 vagy HEK293T sejteket 10 cm-es petricsészében növesztettük, és transzfekció előtt tripszinnel felszedtük őket. A tranziens transzfekcióhoz polilizinnel (0,001%, 1 óra) előkezelt 96-lyukú lemezeket

használtunk, a sejteket  $5-10 \times 10^4$  sejt/lyuk sűrűségben ültettük a lemezre, a megjelölt DNS-konstrukciókkal (0,24-0,48  $\mu\text{g}/\text{well}$  összmenyiségben) és a transzfekciós reagenssel (0,5  $\mu\text{l}/\text{well}$  Lipofectamine 2000 vagy 1,5  $\mu\text{l}/\text{well}$  GeneCellin) együtt. A kísérleteket 24-26 órával a transzfekció után végeztük.

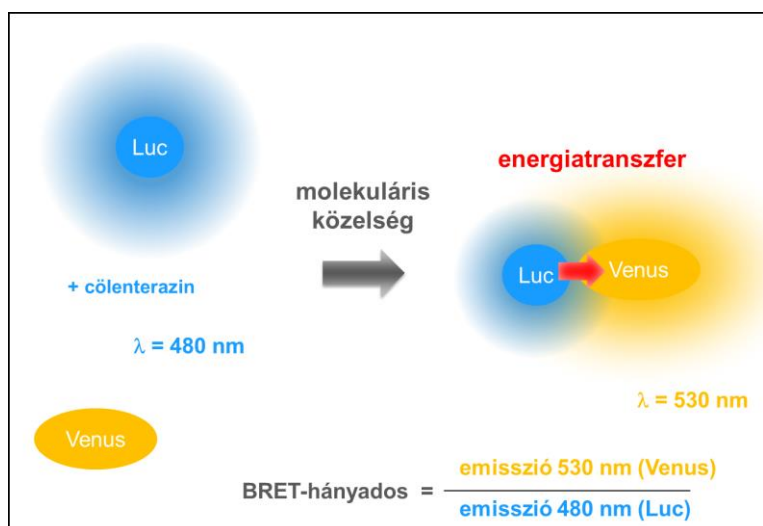
A mikroszkópos mérésekhez a HEK293T sejteket polilizinnel (0,001%, 1 óra) előkezelt 35 mm átmérőjű, 1,5-es vastagságú üveg fedőlemezre ültettük  $3 \times 10^5$  sejt/fedőlemez sűrűségben, a transzfekciót megelőző napon. A transzfekciót fedőlemezenként 1-2  $\mu\text{g}$  összmenyiségű DNS és 2  $\mu\text{l}/\text{fedőlemez}$  Lipofectamine 2000 reagens hozzáadásával végeztük, a kísérleteket 24 órával megelőzően.

#### **4.4 A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) működési elve és mérése luminométerrel**

A rezonancia energiatranszfer egy olyan mérési módszer, amellyel két megfelelően megjelölt molekula közötti kölcsönhatás (molekuláris közelség, pontosabban annak változása és/vagy orientációváltozás) mérhető élő sejtekben [156, 157]. Alapja egy fényt kibocsátó donor- és egy fluoreszcens akceptormolekula közötti, fotonkibocsátás nélküli energiatranszfer (Förster-mechanizmus), ami akkor jöhet létre, ha a donor emissziós spektruma és az akceptor gerjesztési spektruma között átfedés van, és ha a két molekula megfelelő közelségben (10 nm távolságon belül) található egymáshoz [156]. Az energiatranszfer mérésének a fluoreszcens donort használó változata, a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) széleskörben használatos molekuláris kölcsönhatások mérésére [156]. Ennek egyik változataként kezdték alkalmazni a biolumineszcencia rezonancia energiatranszfert (BRET), melyben a fluoreszcens donort a biolumineszcens *Renilla* luciferázra cserélték, és így gerjesztés nélkül tudtak energiatranszfert mérni [158, 159]. A gerjesztés mellőzése számos előnnyel jár, hiszen kiküszöböli az akceptor direkt excitációját, és nem kell számolni jelentős mértékű autofluoreszcenciával sem [157].

Az általunk használt BRET rendszerben tehát a donormolekula a *Renilla* luciferáz, amely szubsztrátja, a cöclenterazin oxidálásával 480 nm körüli emissziós maximummal fényt bocsát ki (8. ábra). Az akceptormolekula – esetünkben a YFP, vagy ennek továbbfejlesztett változata, a Venus – megfelelő közelsége esetén azonban megtörténik az energiatranszfer, és az akceptormolekula a rá jellemző emissziós

hullámhosszon (530 nm körüli maximummal) bocsát ki fényt (8. ábra). Kísérleteinkben a vizsgálni kívánt partnermolekulákat az említett donor- és akceptormolekulákkal fuzionáltuk, és a köztük létrejövő energiatranszfert az akceptor- és donorintenzitások hányadosával (BRET-hányados) jellemeztük (8. ábra).



#### 8. ábra – A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) működése

A *Renilla* luciferáz (Luc) szubsztrátja, a cölienterazin oxidálása közben fényt bocsát ki 480 nm körüli emissziós maximummal (*bal oldal*). Amennyiben az enzim kellő közelségbe (< 10 nm) kerül egy megfelelő fluoreszcens fehérjéhez (pl. Venus), akkor fénykibocsátás helyett átadja energiáját annak, amely a rá jellemző emissziós hullámhosszon (530 nm körüli maximummal) fényt bocsát ki külső gerjesztés nélkül (*jobb oldal*). A két molekula közötti kapcsolat a fényintenzitások hányadosával (BRET-hányados) jellemezhető.

A BRET kísérleteket 24-26 órával a transzfekció után végeztük, és egyes kísérleteknél a sejteket a mérést megelőző 4-6 órára szérumentes médiumban (DMEM 0,1% borjúsérum albuminnal) tartottuk. A mérések előtt közvetlenül a sejtek médiumát módosított Krebs-Ringer pufferre cseréltük, melynek összetétele: 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glükóz és 10 mM Na-HEPES, pH 7,4. A hiperozmotikus körülmények közötti méréshez ezt az oldatot kiegészítettük 300 mM szacharózzal. A méréseket 37 °C-on végeztük, Mithras LB940 többfunkciós lemezleolvasóval (Berthold), illetve Varioskan<sup>TM</sup> Flash többfunkciós lemezleolvasóval (Thermo Scientific). A kísérleteket a luciferáz sejtpemeabilis szubsztrátja, cölienterazin *h* (Invitrogen) hozzáadásával indítottuk el (5 μM), és a donor-, illetve akceptorintenzitásokat 480 és 530 nm-es emissziós filterek segítségével mértük, hullámhosszonként 0,5 másodpercig. A kísérletekben minden kondícióhoz három párhuzamos pontot mértünk. A BRET hányadost az 530 nm-es és 480 nm-es intenzitásokból képeztük a 8. ábra feltüntetett egyenlet szerint, és ahol nincs másképp

jelezve, ott az ingerelt és nem ingerelt sejtek BRET-hányadosának különbségét ábrázoltuk, az alapvonalra történt korrekció után, az idő függvényében.

#### **4.5 Konfokális mikroszkópia**

A konfokális mikroszkópos kísérleteket fedőlemezre szélesztett, és a korábban részletezett módon transzfektált HEK293T sejteken végeztük, 35°C-on, a fentebb leírt módosított Krebs-Ringer pufferben. A konfokális képeket Zeiss LSM510 típusú pásztázó konfokális mikroszkóppal, 63-szoros nagyítású, 1,4-es numerikus apertúrájú Plan-Apochromat objektívvel készítettük. A gerjesztéshez 25 milliwattos, 458 nm-en és 488 nm-en emittáló argonlézert, valamint 1 milliwattos, 543 nm-en emittáló hélium-neon lézert alkalmaztunk. Általában 1-2  $\mu\text{m}$  optikai szeletvastagságú képeket készítettünk, a kolokalizációs mérések esetében multitrack line-scan módban, a többi felvételnél multi-track frame-scan módban, a fluorofórok közötti átbeszélés minimalizálása érdekében. Az elkészült képek utólagos feldolgozásához a Photoshop (Adobe) programot használtuk.

#### **4.6 Statisztikai analízis**

Az adatok átlag  $\pm$  standard hiba formában kerültek feltüntetésre. A csoportok közötti különbséget két szempontos ANOVA módszerrel, és Bonferroni post-hoc összehasonlítással vizsgáltuk. Az adatok elemzéséhez és az ábrák készítéséhez a Sigmaplot 10.0 programot használtuk (Systat Software), és a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 Plazmamembrán-receptorok mozgásának követése BRET módszerrel

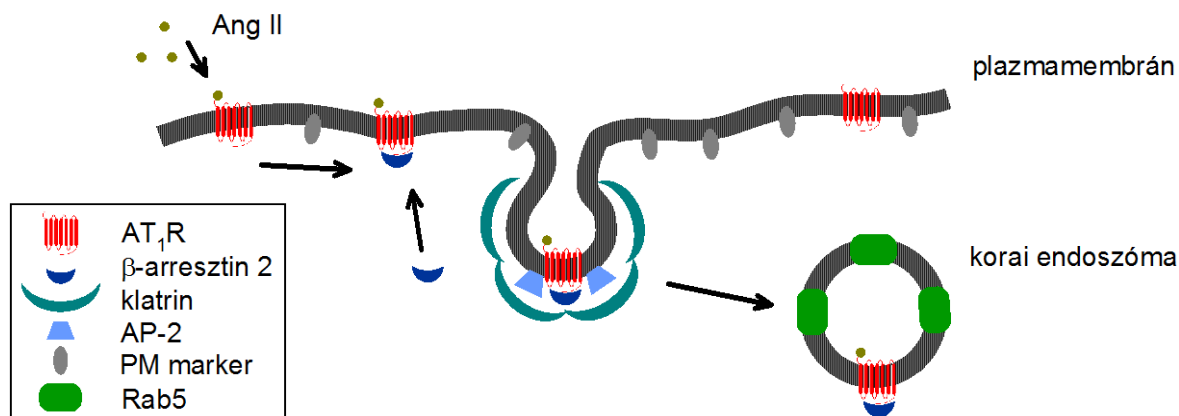
A plazmamembrán-receptorok ligandkötése a receptorra jellemző jelátviteli útvonal beindításán kívül többek között a receptor mozgását is kiválthatja. Ez jelentheti egyrészt a receptor endocitózis felé irányítását, de akár a plazmamembránon belüli áthelyeződést, eltérő molekuláris környezetbe kerülést (mikrodoménaváltást) is takarhat. Kísérletes munkám első részében ezen mozgásokat vizsgáltam a G-fehérjéhez kapcsolt 1-es típusú angiotenzinreceptor (AT<sub>1</sub>R), illetve néhány másik plazmamembrán-receptor esetében, elsősorban a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) módszer felhasználásával.

#### 5.1.1 Az AT<sub>1</sub>R klatrinmediált endocitózisának követése

Agonistastimulus hatására a plazmamembrán-receptorok többségénél elindul egy deszenzitizációs és internalizációs folyamat. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (G protein-coupled receptors – GPCR) esetében ennek első lépései legtöbbször a receptor foszforilációja, illetve ennek hatására az arresztin adaptorfehérje kötődése a receptorhoz, amely leállítja a G-fehérjén keresztüli jelátvitelt, és egyúttal az endocitózis felé irányítja a receptort [110]. A GPCR-ok esetében a legáltalánosabb internalizációs mechanizmus a CME, melynek során a receptor először a plazmamembránban található CCP-kbe kerül. Ezek azután a membránról lefűződve klatrinburkos vezikulává (CCV) alakulnak, és a korai endoszómába továbbítják szállítmányukat, köztük a receptorokat is.

Kísérleteinkben először az AT<sub>1</sub>R endocitózisát vettük górcső alá, ennek a folyamatnak a főbb lépéseit mutatja a 9. ábra. Célunk az volt, hogy képesek legyünk a folyamatot molekuláris kölcsönhatások sorozataként detektálni, ahol az AT<sub>1</sub>R és bizonyos endocitotikus molekulák, vagy sejtkompartmenteket jelölő fehérjék kapcsolatát mutatjuk ki BRET segítségével. Ehhez első körben három molekulát hívtunk segítségül: az AT<sub>1</sub>R-hoz specifikusan kötődni képes  $\beta$ -arresztin 2 adaptorfehérjét; egy plazmamembránba irányított peptidet, mely a Lyn kináz N-

terminális, lipidmodifikációs irányítószekvenciáját tartalmazza (és a továbbiakban PM rövidítéssel szerepel); illetve a Rab5 kis G-fehérjét, amely jól ismert markere a korai endoszómának [160].



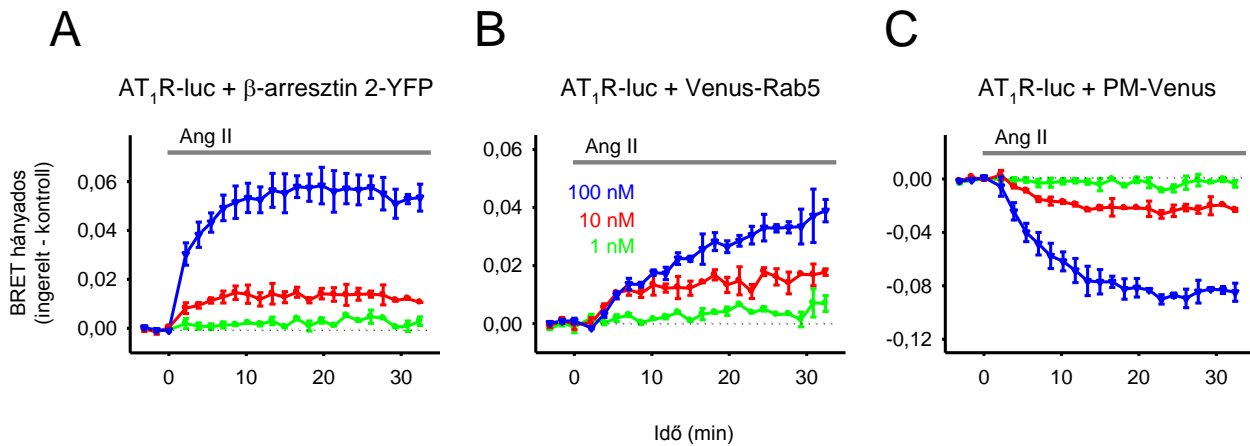
**9. ábra – Az AT<sub>1</sub>R endocitózisának főbb lépései**

A sematikus ábrán az AT<sub>1</sub>R klattrinmediált endocitózisának főbb mozzanatai láthatók, illetve feltüntettem azokat a molekulákat, amelyeket a receptor mozgásának követésére használtunk.

A BRET mérésekhez az AT<sub>1</sub>R *Renilla* luciferázzal jelölt változatát (AT<sub>1</sub>R-luc) használtuk, a partnermolekulákat pedig sárga fluoreszcens fehérjével (yellow fluorescent protein – YFP), illetve Venusszal jelöltük meg ( $\beta$ -arresztin 2-YFP, PM-Venus és Venus-Rab5). HEK293T sejteket transzfektáltunk ezen fúziós fehérjéket kódoló plazmidokkal, majd különböző koncentrációkban (1-100 nM között) angiotenzin II-vel (Ang II) ingereltük őket, és vizsgáltuk a receptor és partnermolekulája között létrejövő BRET-jel változásait az idő függvényében.

Ang II hatására jelentős, dóziszfüggő BRET-szignálemelkedést tapasztaltunk az AT<sub>1</sub>R-luc és  $\beta$ -arresztin 2-YFP között (10. ábra, A), annak a jól ismert specifikus kölcsönhatásnak megfelelően, amely a receptor és a  $\beta$ -arresztin 2 között létrejön, és amely elindítja a receptorendocitózist [108, 140]. Az internalizálódott AT<sub>1</sub>R-luc megérkezését a korai endoszómális kompartmentbe a receptor és Venus-Rab5 között mérhető BRET-jel dóziszfüggő emelkedése jelezte (10. ábra, B). A BRET-szignál hasonló változását kaptuk más, szintén a korai endoszómát jelölő partnermolekulák (az EEA1, illetve WDFY2 fehérjék FYVE doménje, valamint a teljes hosszúságú WDFY2 fehérje [161]) esetében is, mivel azonban a jelváltozások nem tértek el jelentősen a Rab5-tel mérhetőtől, így a továbbiakban, ahol lehetséges volt, Rab5-tel dolgoztunk. Az eddigiekkel szemben az AT<sub>1</sub>R-luc és PM-Venus molekulák között mért BRET esetében Ang II hatására csökkenést tapasztaltunk, ami a receptor eltávolodását jelezte a PM-

Venus fehérje által megjelölt plazmamembrán-kompartmenttől (10. ábra, C). Fontos megjegyezni, hogy a receptor és  $\beta$ -arresztin közötti specifikus kapcsolattal szemben a Rab5 és PM molekulák esetében nincs szó specifikus kapcsolódásról, a jelváltozások itt az azonos membránba kerülő molekulák közelségével, illetve ennek a közelségnek a megszűnésével magyarázhatók.



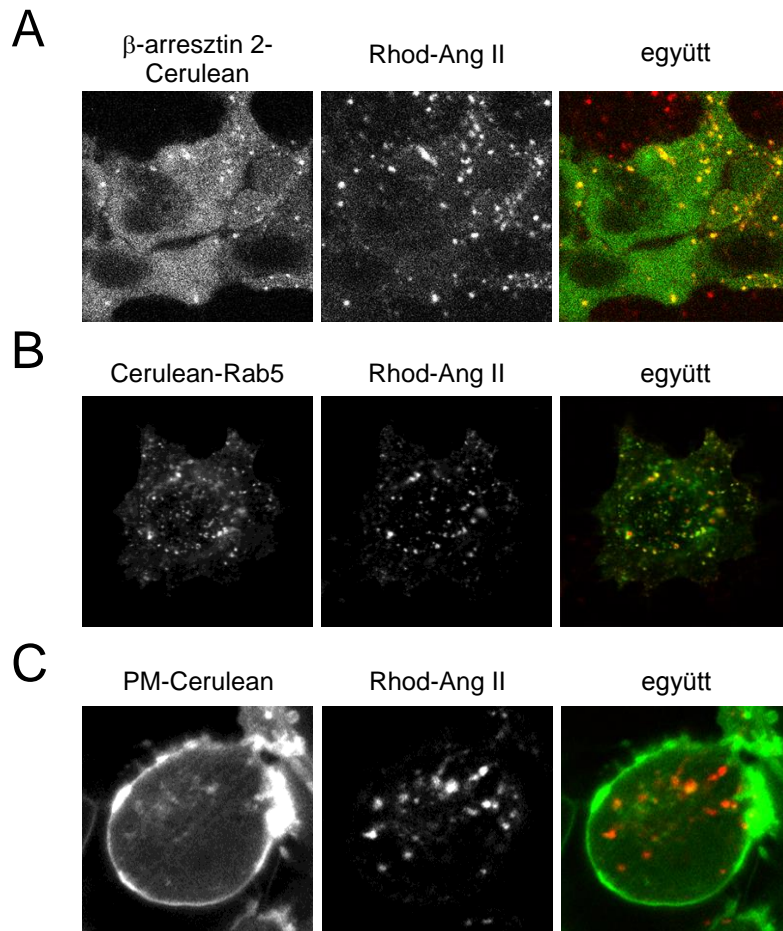
#### 10. ábra – AT<sub>1</sub>R internalizációjának vizsgálata BRET módszerrel

BRET-mérések a *Renilla* luciferázzal jelölt AT<sub>1</sub>R (AT<sub>1</sub>R-luc) és a fluoreszcens fehérjével megjelölt partnermolekulák: (A)  $\beta$ -arresztin 2-YFP, (B) Venus-Rab5, illetve (C) PM-Venus között HEK293T sejtekben. Az Ang II-t három különböző koncentrációban (1 nM, 10 nM és 100 nM) adtuk, melyeket a zöld, piros és kék görbék mutatnak ebben a sorrendben. Az értékeket az egy kísérleten belüli ingerelt és kontroll sejtek BRET-hányadosának különbségéből számoltuk, a görbék  $n=3$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

Annak ellenőrzésére, hogy a BRET-mérésekben látott változások valóban az AT<sub>1</sub>R és az említett molekulák egymást követő kolokalizációját mutatják, konfokális mikroszkóppal készítettünk képeket. Az AT<sub>1</sub>R-t stabilan kifejező HEK293 sejteket tranziensen transzfektáltunk a partnermolekulák ( $\beta$ -arresztin 2, Rab5 vagy PM) Ceruleannal jelölt változatának DNS-ét tartalmazó plazmiddal. Magát a receptort rodaminnal jelölt Ang II (Rhod-Ang II, 300 nM) fluoreszcens ligand hozzáadásával tettük láthatóvá. Az ingerlés hatására a receptorok internalizálódtak, így 8 perccel a stimulust követően a Rhod-Ang II már intracelluláris vezikulákban volt látható. A BRET-mérések során látottaknak megfelelően a kezdetben diffúz citoplazmatikus elhelyezkedésű  $\beta$ -arresztin 2-Cerulean megjelent intracelluláris vezikulákban, melyek részleges kolokalizációt mutattak az internalizált fluoreszcens liganddal (11. ábra, A). Hasonló kolokalizációs mintázatot láttunk a Rhod-Ang II és Cerulean-Rab5 között is az ingerlést követően (11. ábra, B). Ezzel ellentétben az elsősorban a plazmamembránban elhelyezkedő PM-Cerulean nem követte a Rhod-Ang II-t az intracelluláris vezikulákba,



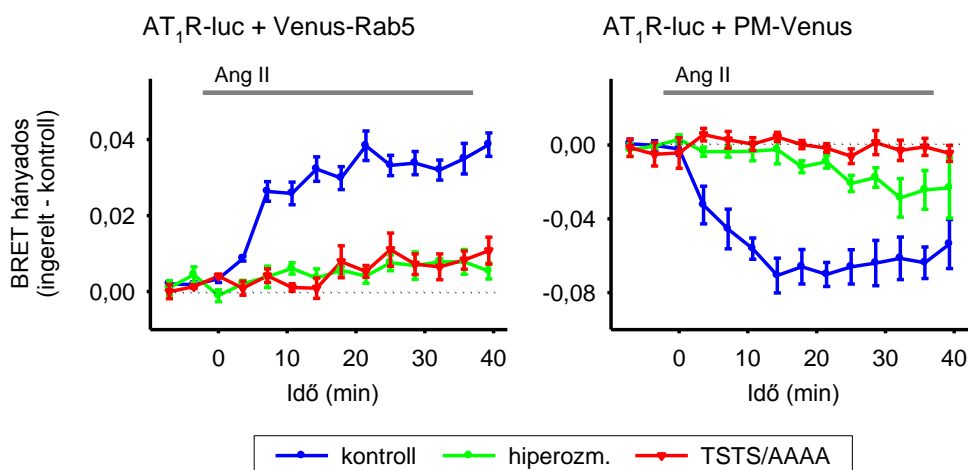
és a liganddal mutatott kolokalizációja 8 percnyi stimulus után elhanyagolható volt (11. ábra, C).



**11. ábra – Az AT<sub>1</sub>R kolokalizációjának vizsgálata endocitotikus markerekkel**

Konfokális mikroszkópos felvételek AT<sub>1</sub>R-t és (A)  $\beta$ -arresztin 2-Ceruleant, (B) Cerulean-Rab5-öt, illetve (C) PM-Ceruleant kifejező HEK293 sejtekről. A képek rodaminnal jelölt Ang II-ingerlés (Rhod-Ang II, 300 nM) után 8 perccel készültek. Az együttes képeken a Ceruleannal jelölt fehérjék láthatók zöld, a fluoreszcens ligand piros színnel, a kolokalizációt sárga szín mutatja. A képek legalább három független kísérlet eredményét reprezentálják.

Annak megerősítésére, hogy az általunk látott jelváltozások valóban a receptor klatrinmediált endocitózist tükrözik, végeztünk BRET kísérleteket hiperozmotikus körülmények között is, 300 mM szacharóz jelenlétében. Erről a kezeléstről leírták, hogy gátolja a klatrinmediált endocitózist azáltal, hogy a klatrin üres mikrocellákba történő polimerizációját váltja ki [162]. Ezekben, és minden további kísérletben 100 nM koncentrációban adtuk az Ang II-t. A hiperozmotikus előkezelés csaknem teljesen meggátolta a receptor endocitózist, ahogy azt az AT<sub>1</sub>R-luc és PM-Venus, illetve AT<sub>1</sub>R-luc és Venus-Rab5 közötti BRET-jelváltozás elmaradása jelzi (12. ábra, zöld görbék).



### 12. ábra – BRET-mérések gátolt endocitózis mellett

BRET-mérések az AT<sub>1</sub>R-luc és Venus-Rab5, illetve PM-Venus között, HEK293T sejtekben. A *kék* kontroll görbék a 10. ábrán látható megfelelő mérésekhez hasonló körülmények között készültek. A *zöld* színnel látható méréseket hiperozmotikus oldatban (300 mM szacharóz hozzáadásával) végeztük, melyről leírták, hogy gátolja a klatrinmediált endocitózist [162]. A *piros* görbék az AT<sub>1</sub>R-luc TSTS-AAAA mutánsának felhasználásával készültek, amely nem képes  $\beta$ -arresztin 2-t kötni, és így nem internalizálódik [143]. A sejteket 100 nM Ang II-vel ingereltük. Az ábrán  $n=4$  független kísérlet méréseinek átlaga, valamint az átlag hibája (SEM) lett feltüntetve.

Elvégeztük a kísérleteket az AT<sub>1</sub>R-luc egy olyan mutánsával is, melyben a receptor négy jól ismert foszforilációs helyén a szerin és treonin aminosavak alaninra lettek cserélve (TSTS-AAAA mutáns), és ebből kifolyólag károsodott a receptor  $\beta$ -arresztin 2-kötése, és ezzel együtt az endocitózis felé irányítása is [142, 143]. Ez a mutáns receptor szintén nem mutatott BRET-jelváltozást az említett kísérletekben (12. ábra, *piros* görbék). Ezek az adatok együtt arra utalnak, hogy a (vad típusú) AT<sub>1</sub>R-luc és PM-Venus, valamint Venus-Rab5 közötti BRET-szignálok általunk kimutatott változásai a receptor klatrinmediált endocitózisának felelnek meg.

### 5.1.2 Vad típusú és mutáns AT<sub>1</sub>R-ok aktiválódást követő mozgásának vizsgálata

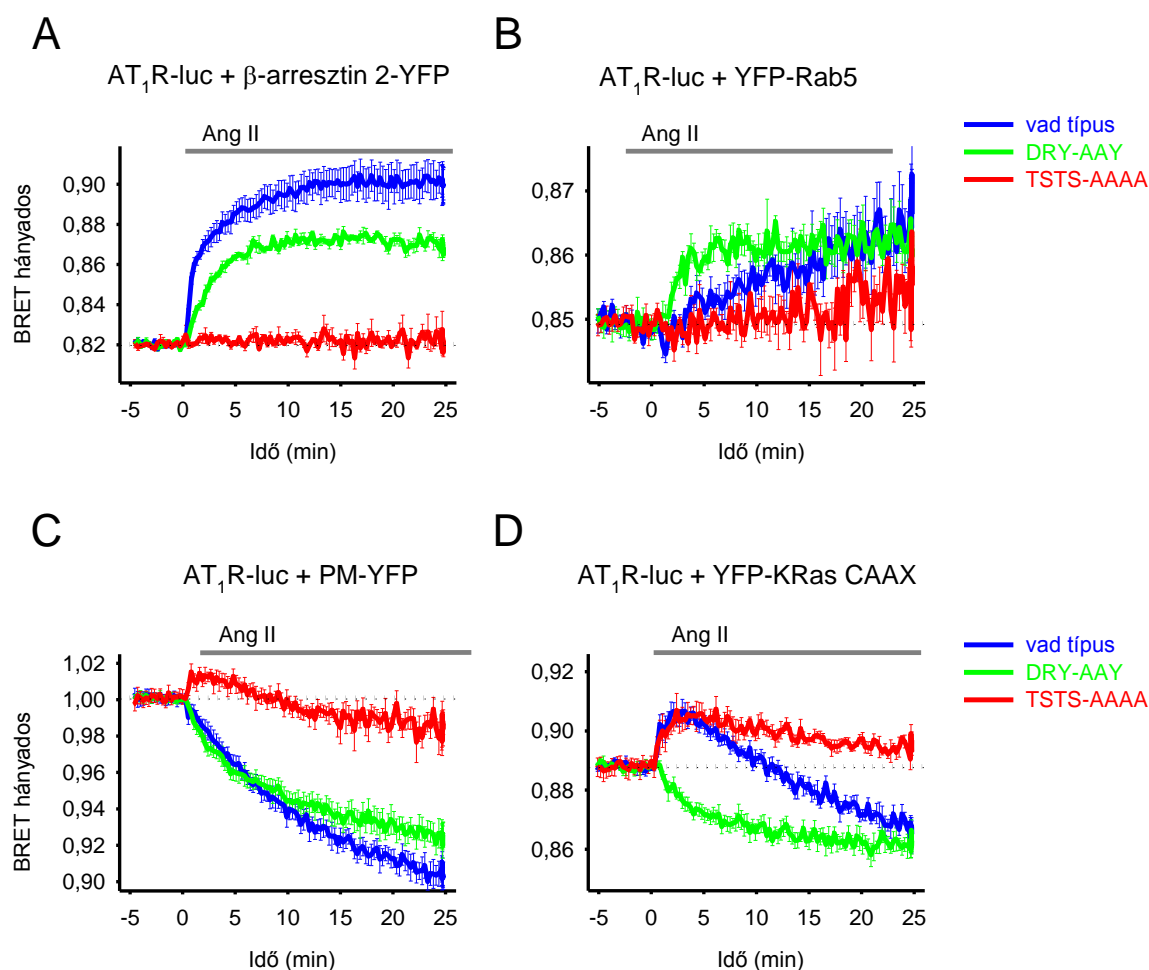
Egy másik kísérletsorozatban a BRET módszert arra használtuk fel, hogy a vad típusú és különböző mutáns AT<sub>1</sub>R-ok aktiválódást követő mozgását hasonlítsuk össze molekuláris interakciók segítségével. Ezekben a kísérletekben a már említett három partnermolekula ( $\beta$ -arresztin 2, Rab5, PM) mellett vizsgáltuk a receptorok kapcsolatát a K-Ras kis G-fehérje plazmamembránba irányító C-terminális CAAX doménjével (KRas CAAX) is. Az újabb plazmamembrán-marker molekula vizsgálatát az indokolta, hogy az addig használt PM irányító szekvenciáról ismert, hogy elsősorban a plazmamembrán ún. lipidraft mikrodoménjeiben található meg [151], míg a KRas CAAX inkább a plazmamembrán rendezetlen régióiba (a nem-raft kompartmentbe) lokalizál [153]. Így e

két markernek a receptorral való kapcsolatát összehasonlítva próbáltuk meg pontosabban meghatározni az AT<sub>1</sub>R helyét a plazmamembránban, illetve annak aktiválódást követő esetleges változását.

A vad típusú AT<sub>1</sub>R-on kívül még két mutáns receptort vizsgáltunk: egyrészt egy olyan mutánst, melyben a G-fehérjék aktiválásában fontos szerepet játszó konzervált DRY motívum aszpartát és arginin aminosavai lettek alaninra cserélve (DRY-AAY mutáns), és így nem képes G-fehérjét aktiválni [141]; másrészt pedig a már említett TSTS-AAAA mutánst, melyben a receptor kitüntetett foszforilációs helyei lettek megváltoztatva [142, 143]. Ezekben a kísérletekben is luciferázzal jelölt AT<sub>1</sub>R-t használtunk, és a korábbiaktól eltérően a partnermolekulák minden esetben YFP-vel voltak megjelölve. Az ábrákon ezúttal is a stimulált és kontroll görbék különbsége látszik, azonban a korábbiakkal szemben a görbék alapvonala el lett tolvá a kiindulási BRET-hányados értékre, az alapszintek összehasonlíthatósága érdekében.

A vad típusú AT<sub>1</sub>R-luc és  $\beta$ -arresztin 2-YFP közötti mérés a már bemutatotthoz hasonló jelet adott, Ang II stimulusra (100 nM) jelentős emelkedést láttunk (*13. ábra, A, kék görbe*), ami a  $\beta$ -arresztin 2-YFP AT<sub>1</sub>R-hoz való specifikus kötődésének felel meg. A G-fehérjét kötni nem képes DRY-AAY mutáns AT<sub>1</sub>R-luc – a mások által korábban már leírtaknak megfelelően [107, 163, 164] – a BRET-jel emelkedés nagysága alapján kissé csökkent mértékben ugyan, de szintén képes volt kötni a  $\beta$ -arresztin 2-t (*13. ábra A, zöld görbe*). Ezzel szemben a TSTS-AAAA mutáns AT<sub>1</sub>R-luc esetében nem változott a BRET-szignál (*13. ábra A, piros görbe*), szintén egy korábbi megfigyelést megerősítve, mely szerint az ebből a mutánsból hiányzó foszforilációs helyek szükségesek a receptor  $\beta$ -arresztinkötéséhez [165].

A *13. ábra B* panelén az AT<sub>1</sub>R-luc és YFP-Rab5 közötti BRET-mérések eredményei láthatók, melyek azt mutatják, hogy a vad típusú AT<sub>1</sub>R-luchoz (kék görbe) hasonlóan a DRY-AAY mutáns változat is megjelenik az endoszomális kompartmentben aktiválódás után, sőt, az energiatranszfer növekedése alapján ez hamarabb következik be, mint a vad típusú receptor esetében (*13. ábra B, zöld görbe*). A TSTS-AAAA mutáns a YFP-Rab5-tel is jelentősen kisebb jelváltozást generál (*13. ábra B, piros görbe*), egybevágóan a korábban mutatott eredményeinkkel (*12. ábra*), valamint azon korábbi tanulmányokkal, melyek szerint ez a mutáns jelentősen csökkent mértékben internalizálódik [142, 143].



### 13. ábra – Vad típusú és mutáns AT<sub>1</sub>R-ok aktiválódás utáni követése BRET módszerrel

HEK293 sejteket transzfektáltunk az AT<sub>1</sub>R-luc megjelölt típusát (*kék görbe*: vad típus; *zöld görbe*: G-fehérjét nem aktiváló DRY/AA Y mutáns [141]; *piros görbe*: nem deszenzitizáló TSTS-AAAA mutáns [162]), valamint a feltüntetett YFP fúziós fehérjéket: (A) β-arresztin 2-YFP-t, (B) YFP-Rab5-öt, (C) PM-YFP-t, illetve (D) YFP-KRas CAAX domént kódoló plazmidokkal. A sejteket 100 nM Ang II-vel ingereltük a megjelölt időpontban. Az ingerelt sejtek BRET-hányadosából levontuk az Ang II-t nem kapott sejtek hányadosát, majd az így kapott értékekhez hozzáadtuk a kiindulási BRET-hányados értéket (amit a pontozott vonal mutat), a kiindulási érték más BRET-párokkal való összehasonlíthatósága érdekében. A görbék  $n=3$  független kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

A plazmamembrán raft régióit megjelölő PM-YFP és a vad típusú AT<sub>1</sub>R-luc között sikerült reprodukálnunk a korábban látott BRET-jelcsökkenést Ang II hatásra (13. ábra C, *kék görbe*), és ez a hatás hasonló volt a DRY-AA Y mutáns AT<sub>1</sub>R-luc esetében is, itt is azonnali csökkenést láttunk, bár a későbbi időpontokban kissé elmarad a csökkenés mértéke a vad típusétól (13. ábra C, *zöld görbe*). A TSTS-AAAA mutáns AT<sub>1</sub>R-luc és a PM-YFP között mért BRET – szintén a korábban látottaknak megfelelően – alig változik az ingerlést követően, előbb enyhén emelkedik, majd kis mértékben csökken, de jelentősen eltérő változásokat mutat mindkét másik vizsgált receptorváltozathoz képest (13. ábra C, *piros görbe*).

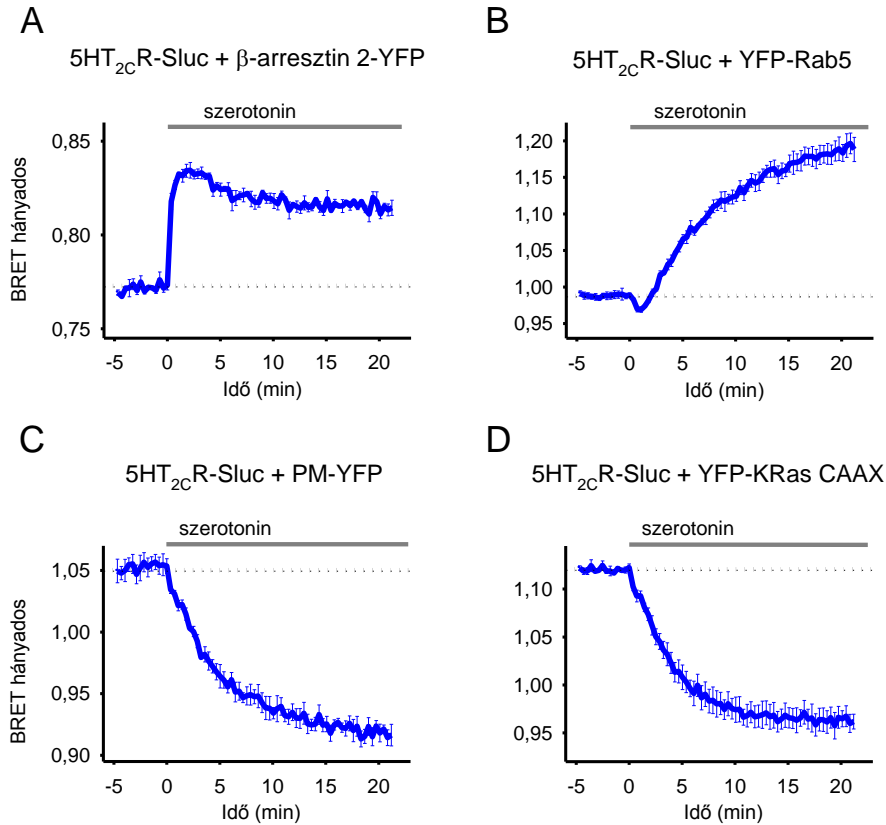
A fent leírtaktól lényegesen különböző változásokat láttunk azokban a mérésekben, ahol az AT<sub>1</sub>R-luc és a plazmamembrán nem-raft (rendezetlen) régióiba lokalizáló, YFP-vel jelölt K-Ras CAAX domén (YFP-KRas CAAX) közötti energiáttranszfert követtük. A vad típusú receptort Ang II-vel ingerelve a mért BRET-szignál az első néhány percben emelkedést mutatott, mielőtt csökkenni kezdett volna (13. ábra D, kék görbe). Ez a kezdeti emelkedés teljesen elmaradt a DRY-AAY mutáns aktiválása után, itt a szignál azonnal lefelé indult (13. ábra D, zöld görbe). A nem internalizálódó TSTS-AAAA mutáns AT<sub>1</sub>R-luc és a YFP-KRas CAAX között megmaradt a kezdeti emelkedés a stimuláció után, ott a későbbi csökkenés volt jelentősen kisebb mértékű a vad típushoz képest (13. ábra D, piros görbe). Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy ingerlés után az AT<sub>1</sub>R-luc különböző jelváltozásokat mutat attól függően, hogy a plazmamembrán melyik kompartmentjébe irányított partnermolekulával vizsgáljuk a kapcsolatát, és ez utalhat egyrészt a receptor által inaktív állapotban preferált plazmamembrán-kompartmentre, illetve jelezheti a receptor plazmamembránon belüli helyének változását ingerlés hatására.

### 5.1.3 Az 5HT<sub>2C</sub>R és EGFR aktiválódás utáni mozgásának követése

Ezek után arra voltunk kíváncsiak, hogy más plazmamembrán-receptoroknak hogyan alakul a kapcsolata az általunk vizsgált partnermolekulákkal nyugalomban, illetve agonista ingerlést követően. Két másik receptort vizsgáltunk meg: egy az AT<sub>1</sub>R-ral egy családba tartozó, szintén G<sub>q</sub>-fehérjét aktiváló receptort, a 2C típusú szerotoninreceptort (5HT<sub>2C</sub>R); illetve egy ezektől teljesen eltérő szerkezetű, a RTK-ok családjába tartozó molekulát, az epidermális növekedésifaktor-receptort (EGFR). Mindkét receptornak a *Renilla* luciferáz egy módosított változatával, a nagyobb hatékonysága miatt Super luciferáznak (Sluc) [144] nevezett enzimmel jelölt változatát használtuk (5HT<sub>2C</sub>R-Sluc és EGFR-Sluc). Az 5HT<sub>2C</sub>R esetében, melynek számos különböző RNS-editált formája fordul elő, egy olyan editált formával végeztük a kísérleteket, amelyről leírták, hogy nincs konstitutív aktivitása, és nyugvó sejtekben elsősorban a plazmamembránban található meg [145, 166].

Az AT<sub>1</sub>R-hoz hasonlóan az 5HT<sub>2C</sub>R-Sluc is képes volt kötni a β-arresztin 2-YFP-t szerotoniningerlés (10 μM) hatására, bár a kötés kinetikája nem egyezett meg az AT<sub>1</sub>R esetében látottakkal: egy kezdeti meredek BRET-jelemelkedés után csökkenés

látszott, majd beállt egy az alapszintnél magasabb egyensúlyi állapot (14. ábra, A). Az 5HT<sub>2C</sub>R-Sluc is megjelent a korai endoszómában aktiválódás után, amit a YFP-Rab5-tel mért BRET-hányados (átmeneti, kismértékű csökkenést követő) robosztus emelkedése mutatott (14. ábra, B). Az átmeneti csökkenéshez hasonló, bár kevésbé egyértelműen, de az AT<sub>1</sub>R-luc esetében is láttunk (13. ábra B, kék görbe).



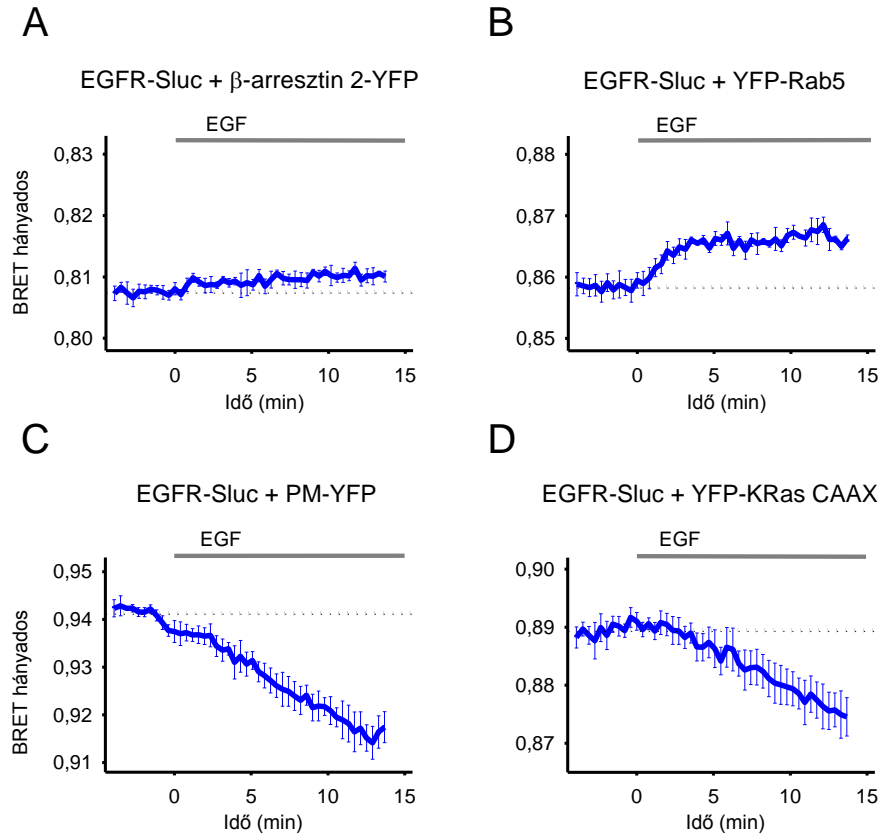
**14. ábra – Az 5HT<sub>2C</sub>R aktiválódás utáni követezése BRET módszerrel**

HEK293 sejteket transzfektáltunk a görbék felett feltüntetett konstrukciók plazmidjaival: az 5HT<sub>2C</sub>R-Sluc mellett (A)  $\beta$ -arresztin 2-YFP-vel, (B) YFP-Rab5-tel, (C) PM-YFP-vel, illetve (D) YFP-KRas CAAX doménnel. A sejteket 10  $\mu$ M szerotoninnal ingereltük a megjelölt időpontban. A mért eredményeket a 13. ábrán részletezett módon dolgoztuk fel, a pontozott vonalak a kiindulási BRET-hányadost („alaplínia”) mutatják. A görbékben  $n=3$  független kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékei láthatók.

Érdekes módon a kétféle plazmamembránt jelölő molekula az 5HT<sub>2C</sub>R-Sluc esetében nem viselkedett eltérően: mind a PM-YFP-vel, mind a YFP-KRas CAAX doménnel mért BRET-hányados lefelé indult el a receptor aktiválódása után, a kezdeti emelkedés elmaradt (14. ábra, C és D). A BRET-jel csökkenése ebben az esetben is a receptor internalizációjára utal.

Az EGFR az egyik leginkább ismert és legjobban tanulmányozott növekedésifaktor-receptor, és széles körben használatos többek között a receptorendocitózis vizsgálatára is modellreceptorként [111]. A GPCR-októl eltérően az EGFR aktiválódást követő internalizációjában nem játszanak szerepet a  $\beta$ -arresztin

molekulák, ezért nem volt meglepő, hogy az EGFR-Sluc és a  $\beta$ -arresztin 2-YFP között mérhető BRET-hányados nem változott EGF-ingerlés (50 ng/ml) hatására (15. ábra, A). Az EGFR endocitózisa is elsősorban (bár nem kizárólagosan) klatrinmediált úton megy végbe, és a folyamat során a receptor először a korai endoszómába kerül, ennek megfelelően a YFP-Rab5 molekulát partnerként használva a GPCR-ok esetében látotthoz képest kisebb amplitúdóval ugyan, de szintén emelkedést kaptuk (15. ábra, B).



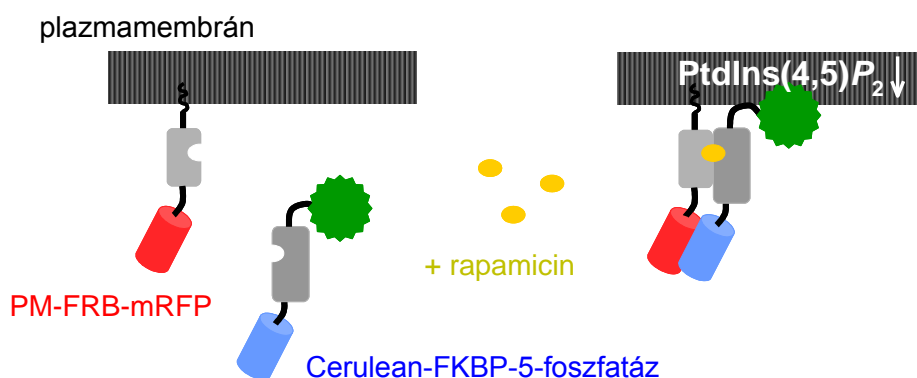
**15. ábra – Az EGFR aktiválódás utáni követése BRET módszerrel**

HEK293 sejteket transzfektáltunk a görbék felett feltüntetett konstrukciók plazmidjaival: az EGFR-Sluc mellett (A)  $\beta$ -arresztin 2-YFP-vel, (B) YFP-Rab5-tel, (C) PM-YFP-vel, illetve (D) YFP-KRas CAAX doménnel. A sejteket 50 ng/ml EGF-fel ingereltük a megjelölt időpontban. A mért eredményeket a 13. ábrán részletezett módon dolgoztuk fel, a pontozott vonalak a kiindulási BRET-hányadost („alaponvonalat”) mutatják. A görbéken  $n=3$  független kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékei láthatók.

A plazmamembrán-markerekkel mért energiatranszfer csökkenése az EGFR-Sluc esetében is képes volt jelezni a receptor eltávolodását a membrántól agonistastimulus után (15. ábra, C és D), és az AT<sub>1</sub>R-luc és YFP-KRas CAAX között tapasztalt kezdeti emelkedés az 5HT<sub>2C</sub>R-hoz hasonlóan ebben az esetben is elmaradt (15. ábra, D).

## 5.2 A plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintjének akut csökkentése

Munkacsoportunk korábban kifejlesztett egy olyan rendszert, mellyel akutan és indukálható módon lehet csökkenteni a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintjét [132]. Ez a rendszer két fehérjedomén, az FKBP és FRB heterodimerizációján alapul, melyet rapamicin hozzáadásával lehet kiváltani [132]. Rendszerünkben az FRB domént monomer piros fluoreszcens fehérjével (mRFP) jelöltük, és a már bemutatott PM irányító szekvenciával a plazmamembránba (és azon belül elsősorban a lipidraftokba) irányítottuk (PM-FRB-mRFP). Az indukálható dimer másik tagját, az FKBP fehérjedomént pedig Ceruleannal jelöltük, és hozzákötöttük a IV-es típusú 5-foszfátáz enzim (INPP5E) katalitikus doménjét (Cerulean-FKBP-5-foszfátáz), amely képes defoszforilálni, és ez által eltávolítani a plazmamembránból a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot. A rapamicinnel létrehozott FRB-FKBP dimerizáció a kezdetben citoplazmatikus elhelyezkedésű Cerulean-FKBP-5-foszfátázt a plazmamembránba helyezi át, ahol az enzim specifikusan lebontja a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot (16. ábra).



16. ábra – A PtdIns(4,5) $P_2$ -deplációs rendszer működésének vázlatja

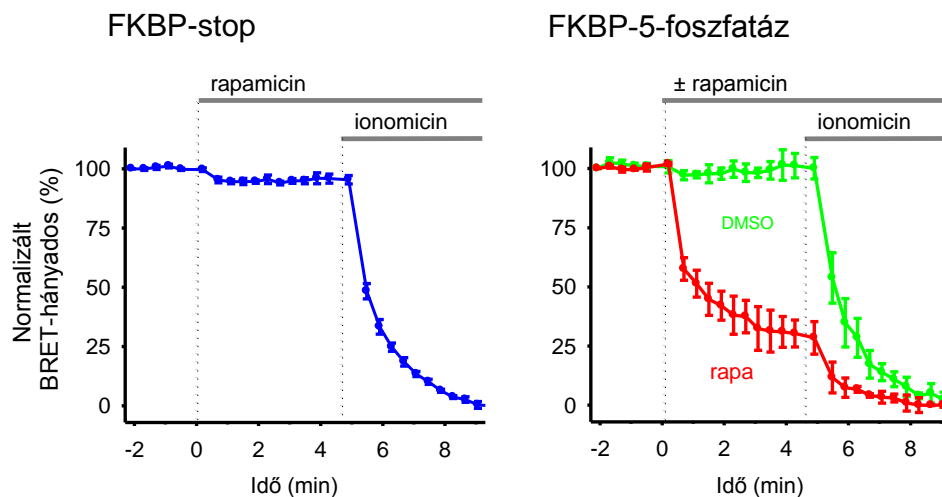
A plazmamembránban található PtdIns(4,5) $P_2$ -ot lebontó rendszer [132] az ábrán világos-, illetve sötétszürkével jelölt FRB és FKBP domének rapamicin hatására kialakuló heterodimerizációján alapul, amely a plazmamembránhoz horgonyzott PM-FRB-mRFP és a citoplazmatikus Cerulean-FKBP-5-foszfátáz esetében az utóbbi fehérje áthelyeződését okozza a plazmamembránba, ahol az 5-foszfátáz domén (zölddel jelölve) lebontja a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot. Kísérleteinkben a fluoreszcens jelölések esetenként eltértek az itt láthatótól, ami azonban az áthelyeződést és a lipidbontást nem befolyásolta.

Annak érdekében, hogy a deplációs módszer hatékonyságát ellenőrizzük, illetve hogy meghatározzuk a lipidlebontás mértékét és kinetikáját a BRET-kísérletek körülményei között, egy a PtdIns(4,5) $P_2$ -hoz specifikusan kötődni képes fehérjedomént, a PLC $\delta$ 1 enzim PH doménjét (PLC $\delta$ 1PH) hívtuk segítségül, amely alkalmas a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintjének követésére [59]. Ezt a domént jelöltük meg egyrészt *Renilla* luciferázzal, másrészt pedig YFP-vel, és a két így megjelölt PH domén



(PLC $\delta$ 1PH-Sluc és PLC $\delta$ 1PH-YFP) között mértünk energiatranszfert. PtdIns(4,5) $P_2$  jelenlétében mindkét domén a plazmamembránhoz kötődik, és ez egy viszonylag magas BRET-szignált eredményez. A PtdIns(4,5) $P_2$  lebomlását követően azonban mindkét domén a citoplazmába kerül, ami jelentős BRET-jelcsökkenést von maga után.

A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszerünk fehérjeelemeit tehát a fent említett két PH doménnal együtt fejeztük ki tranziensen, HEK293T sejtekben. Annak kizárására, hogy a kapott változások esetleg a rapamicin nem specifikus hatásai miatt alakulnak ki, két különböző típusú kontrollt alkalmaztunk. Az egyik esetben a PM-FRB-mRFP mellett az mRFP-FKBP fehérjét fejeztük ki az 5-foszfátáz domén nélkül (FKBP-stop), majd a sejteket rapamicinnel (200 nM) kezeltük (17. ábra, kék görbe). A másik kontroll esetében az mRFP-FKBP-5-foszfátáz konstrukciót fejezték ki a sejtek, rapamicin helyett azonban csak oldószert (dimetil-szulfoxidot – DMSO) kaptak (17. ábra, zöld görbe).



#### 17. ábra – A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció mérése BRET módszerrel

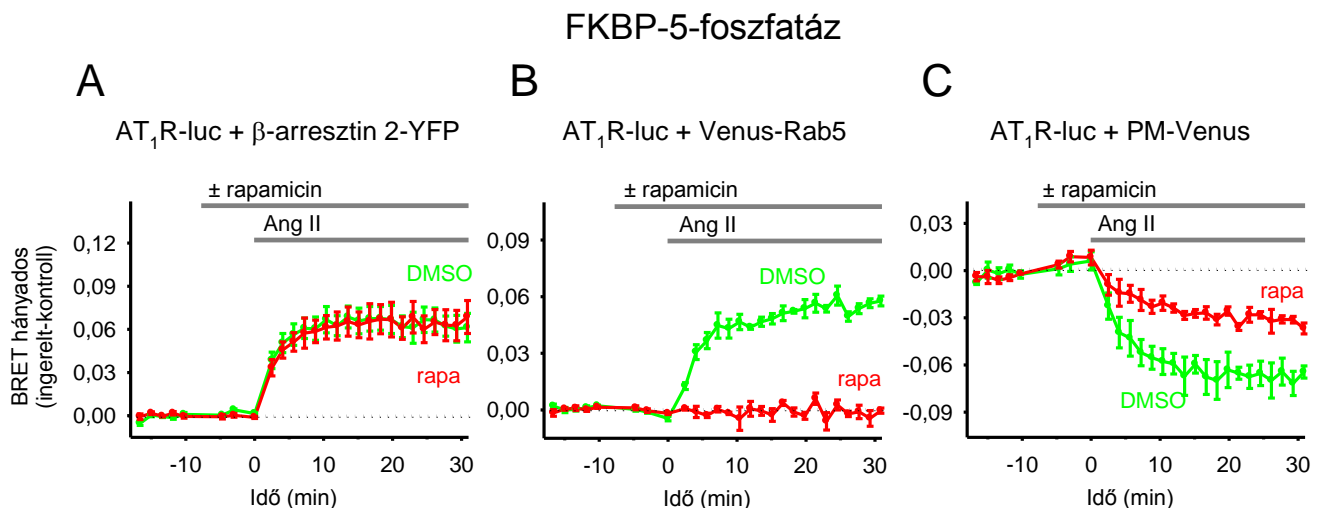
A PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének változását a specifikusan ezt a lipidet kötni képes PLC $\delta$ 1PH-Sluc és PLC $\delta$ 1PH-YFP között mért BRET segítségével követtük. Ezt a két konstrukciót, valamint a PM-FRB-mRFP fehérjét fejeztük ki HEK293T sejtekben, negyedikként vagy az mRFP-FKBP konstrukcióval (FKBP-stop, kék görbe), vagy az mRFP-FKBP-5-foszfátáz molekulával (FKBP-5-foszfátáz, zöld és piros görbék) együtt. A sejteket rapamicinnel (200 nM, kék és piros görbék) vagy csak oldószert DMSO-val (zöld görbe) kezeltük, a kísérletek végén ionomicin (10  $\mu$ M) hozzáadásával hoztunk létre teljes PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontást [59]. A mért BRET-hányadosokat úgy normalizáltuk, hogy egy adott kísérletben a kontroll értékeket vettük 100%-nak, a teljes PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciónak megfelelő pontokat pedig 0%-nak. A görbéken  $n=3$  független kísérlet méréseinek átlag  $\pm$  SEM értékei láthatók.

Mindkét kontroll esetében lényegében változatlan maradt a BRET-hányados a kezelés után, azonban mindkét mérésben jelentős BRET-jelcsökkenést váltott ki 10  $\mu$ M ionomicin hozzáadása, melyről ismert, hogy a citoplazmatikus  $Ca^{2+}$ -szint megemelése és a PLC enzimek következményes aktiválódása révén teljes PtdIns(4,5) $P_2$ -lebomlást idéz elő [59]. Méréseinket az így kialakult BRET-hányados (0%), illetve a kiindulási értéket (100%) alapul véve normalizáltuk. A 17. ábra piros görbájén látható, hogy

amennyiben a sejtek az mRFP-FKBP-5-foszfataz konstrukciót tartalmazták, a rapamicinkezelés a BRET-hányados gyors és jelentős csökkenését eredményezte, mutatva a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  lebomlását. A jelváltozás 3 perc után érte el a maximumát, amely azután ionomicin adásával csak kismértékben volt tovább fokozható.

### 5.3 A plazmamembrán $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléciójának hatása az $\text{AT}_1\text{R}$ endocitózisára

A továbbiakban azt kívántuk vizsgálni, hogy hogyan befolyásolja a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -szintjének változása az  $\text{AT}_1\text{R}$  endocitózist. Ehhez ötvöztük az energiatranszferen alapuló, endocitózist vizsgáló módszerünket a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  rapamicinnel indukálható lebontásával. HEK293T sejteket tranziensen transzfektáltunk az  $\text{AT}_1\text{R}$ -luc-t, fluoreszcensen jelölt partnermolekuláit ( $\beta$ -arresztin 2-YFP, Venus-Rab5 vagy PM-Venus), valamint lipiddepléciós rendszerünk két fehérjeelemét kódoló plazmidokkal. Rapamicin (200 nM) adásával lebontottuk a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ot a plazmamembránban, majd 5 perccel később a sejteket 100 nM Ang II adásával ingereltük, és 30 percen át követtük a BRET-hányados változását. Mindegyik felállás esetében alkalmaztuk mindkét fent említett kontrollt.

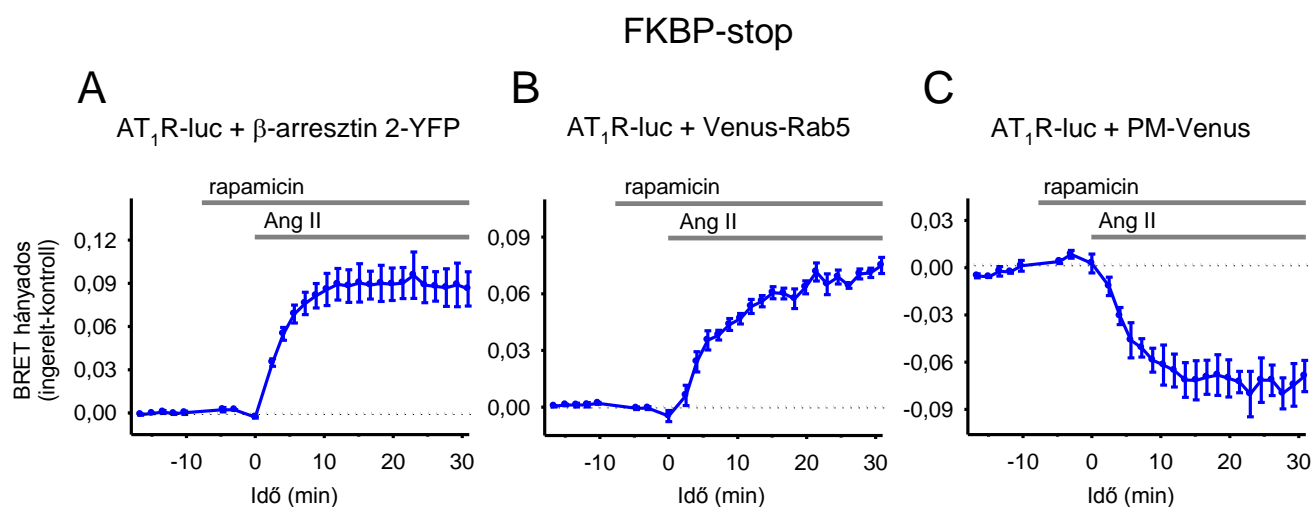


#### 18. ábra – A $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléció hatása az $\text{AT}_1\text{R}$ BRET módszerrel mért internalizációjára

A  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléció receptorendocitózisra kifejtett hatásának vizsgálatához HEK293T sejtekben a depléciós rendszer elemei (azaz a PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP-5-foszfataz konstrukciók) mellett az  $\text{AT}_1\text{R}$ -luc fehérjét és a fluoreszcensen jelölt partnermolekulákat: (A)  $\beta$ -arresztin 2-YFP-t, (B) Venus-Rab5-öt, illetve (C) PM-Venust fejeztük ki tranziens transzfekcióval. A sejteket 5 percig előkezeltük az oldószer DMSO-val (zöld görbék), illetve rapamicinnel (200 nM, piros görbék), majd Ang II-ingerlést (100 nM) alkalmaztunk. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=3$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

Az FKBP-5-foszfátáz kifejező, de rapamicin helyett csak DMSO-kezelést kapott sejtekben a depléciós rendszert nem tartalmazó korábbi mérésekhez hasonló változásokat kaptunk, mindhárom vizsgált esetben (18. ábra, zöld görbék). A PtdIns(4,5) $P_2$  depléciója azonban jelentősen gátolta az AT<sub>1</sub>R-luc és Venus-Rab5, valamint az AT<sub>1</sub>R-luc és PM-Venus közötti BRET-jelváltozásokat (18. ábra B és C, piros görbék), míg a receptor és a  $\beta$ -arresztin 2-YFP közötti jelet nem befolyásolta (18. ábra A, piros görbe).

Azokban a rapamicinnal kezelt sejtekben, melyek az FKBP-stopot tartalmazták az 5-foszfátáz domén nélkül, az Ang II stimulus szintén a korábban bemutatott méréseknek megfelelő BRET-jelváltozást eredményezett mind a  $\beta$ -arresztin 2-YFP, mind a Venus-Rab5, mind a PM-Venus esetében (19. ábra), bár a változások mértéke kissé nagyobb volt, mint az 5-foszfátázot is tartalmazó sejtekben. Ezt az eltérést feltehetőleg az eltérő méretű konstrukcióból adódóan megváltozott fehérjekifejeződési arányok okozták.



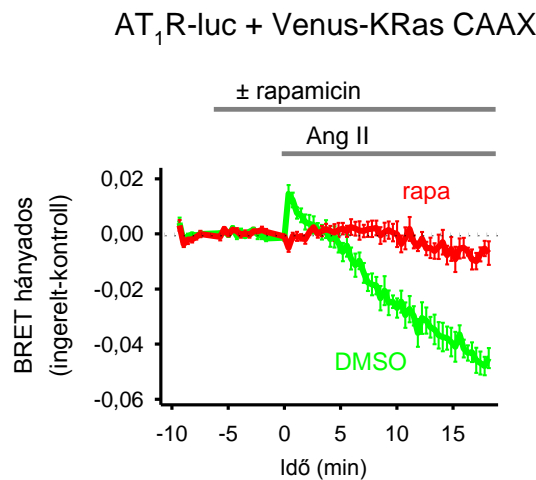
**19. ábra – A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszer hatása az AT<sub>1</sub>R BRET módszerrel mért internalizációjára**

A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszerünk receptorendocitózisra gyakorolt hatásának vizsgálatához célunk volt kizárni a rapamicin nem specifikus hatását. Ehhez HEK293T sejtekben a depléciós rendszer 5-foszfátázot nem tartalmazó változata (azaz a PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP konstrukciók) mellett az AT<sub>1</sub>R-luc fehérjét és a fluoreszcensen jelölt partnermolekulákat: (A)  $\beta$ -arresztin 2-YFP-t, (B) Venus-Rab5-öt, illetve (C) PM-Venust fejeztük ki transziens transzfekcióval. A sejteket 5 perc rapamicin-előkezelés (200 nM) után Ang II-vel (100 nM) ingereltük. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=3$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

A gátló hatás számszerűsítése érdekében a 18. ábrán látható görbék utolsó 5 pontját átlagoltuk, és az így kapott értéket viszonyítottuk százalékosan a megfelelő kontrollhoz. Annak ellenére, hogy a  $\beta$ -arresztin 2-ről ismert, hogy képes PtdIns(4,5) $P_2$ -ot kötni [167], a lipid depléciója nem változtatta meg a receptor és a  $\beta$ -arresztin 2

kapcsolatát ( $100,3 \pm 4,8\%$ ,  $n=3$ ), míg a kontrollban látható jelváltozás teljesen eltűnt a Venus-Rab5 esetében ( $-1,9 \pm 0,7\%$ ,  $n=3$ ), és részlegesen gátlódott a PM-Venus esetében ( $49,6 \pm 9,2\%$ ,  $n=3$ ).

Megvizsgáltuk az AT<sub>1</sub>R-luc és a plazmamembrán rendezetlen régióit jelölő Venus-KRas CAAX között mérhető változásokat is PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> jelenlétében és hiányában. Ezt a mérést rövidebb ideig, de nagyobb időbeli felbontással végeztük, és azt tapasztaltuk, hogy a receptor és a Venus-KRas CAAX közötti BRET-jel kezdeti emelkedése a lipiddepléciónak hatására elmarad, és érdekes módon az internalizációra utaló csökkenés is szinte teljesen hiányzik (20. ábra), szemben a PM-Venus esetében látott részleges gátlással (18. ábra C).

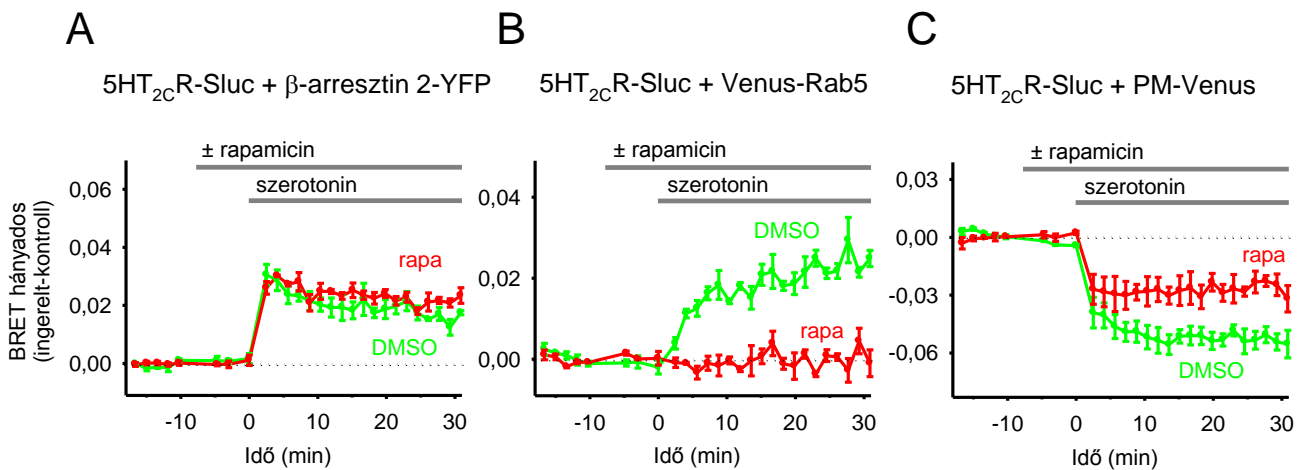


**20. ábra** – A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciónak hatása az AT<sub>1</sub>R aktiválódást követő plazmamembránon belüli mozgására HEK293T sejteket transzfektáltunk tranziensen a depléciónak rendszer elemeit (azaz a PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP-5-foszfátáz konstrukciókat), valamint az AT<sub>1</sub>R-luc fehérjét és a Venus-KRas CAAX-ot kódoló plazmidokkal. A sejteket 5 percig előkezeltük az oldószer DMSO-val (zöld görbe), illetve rapamicinnel (200 nM, piros görbe), majd Ang II-ingerlést (100 nM) alkalmaztunk. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=6$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

#### 5.4 A plazmamembrán PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciónak hatása az 5HT<sub>2C</sub>R, a $\beta_2$ AR és az EGFR endocitózisára

Kíváncsiak voltunk, hogy az általunk látott internalizációgátlás csak az AT<sub>1</sub>R-ra korlátozódik-e, vagy más receptorok esetében is hasonlóan alakul. Ezért elvégeztük a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciónak kísérleteket más GPCR-okon is: egyrészt a már korábban is vizsgált, szintén G<sub>q</sub>-fehérjét aktiváló 5HT<sub>2C</sub>R-t teszteltük, másrészt a G<sub>s</sub>-fehérjéhez kapcsolt  $\beta_2$  adrenerg receptort ( $\beta_2$ AR).

A 21. ábrán láthatók az 5HT<sub>2C</sub>R-ral kapott BRET-eredmények: a kontroll (rapamicin helyett csak DMSO-t kapott) görbék (zöld) nagyon hasonlók a korábban mutatottakhoz (14. ábra) mind a  $\beta$ -arresztin 2-YFP, mind a Venus-Rab5 és a PM-Venus esetében. Bár a szerotoniningerlést (10  $\mu$ M) követően a BRET-hányados változása ezekben a kísérletekben kisebb volt, mint a már bemutatott görbéken, a korábbi mérésekben azonban a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciós rendszer fehérjéit nem tartalmazták a sejtek, és ez magyarázatul szolgálhat az eltérő amplitúdóra.



**21. ábra – A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció hatása az 5HT<sub>2C</sub>R BRET módszerrel mért internalizációjára**

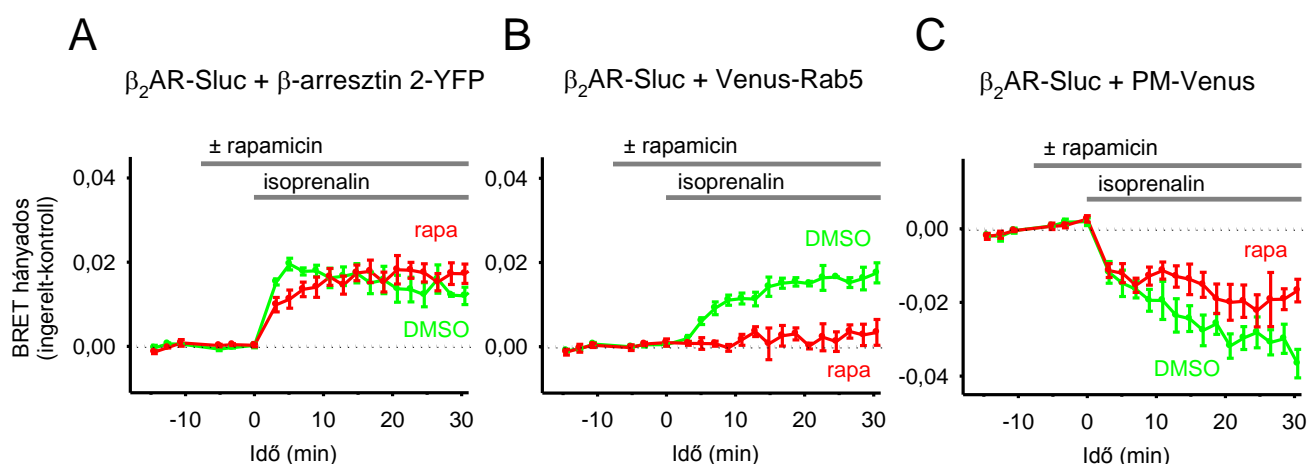
A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció 5HT<sub>2C</sub>R endocitózisára kifejtett hatásának vizsgálatához HEK293T sejtekben a depléciós rendszer elemei (PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP-5-foszfátáz) mellett az 5HT<sub>2C</sub>R-Sluc fehérjét és a fluoreszcensen jelölt partnermolekulákat: (A)  $\beta$ -arresztin 2-YFP-t, (B) Venus-Rab5-öt, illetve (C) PM-Venust fejeztük ki transziens transzfekcióval. A sejteket 5 percig előkezeltük az oldószer DMSO-val (zöld görbék), illetve rapamicinnel (200 nM, piros görbék), majd szerotoniningerlést (10  $\mu$ M) alkalmaztunk. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=3$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

A rapamicinnel indukált lipidlebonthatás az AT<sub>1</sub>R-luc-hoz hasonló hatást váltott ki az 5HT<sub>2C</sub>R-Sluc internalizációjában is: nem befolyásolta érdemben a  $\beta$ -arresztin 2 kötődését a receptorhoz, azonban meggátolta a Rab5-tel jelzett endoszómákban való megjelenését, és részlegesen gátolta a receptor és PM-Venus közötti BRET-jelcsökkenést (21. ábra, piros görbék).

A két eddig vizsgált receptornak megfelelő képet mutatott a  $\beta_2$ AR-Sluc is: kontroll körülmények között az isoprenalin ingerlés mindhárom vizsgált molekulával a már látottakhoz nagyon hasonló jelváltozásokat generált (22. ábra, zöld görbék).

A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> lebontása is a többi vizsgált receptorhoz hasonló következményekkel járt: a  $\beta_2$ AR és  $\beta$ -arresztin 2 közötti kapcsolat kinetikáját kissé megváltoztatta ugyan, de a jel nagyságát nem befolyásolta, ellenben részlegesen gátolta

a PM-Venusszal mérhető jelcsökkenést, és megakadályozta a Rab5-tel mérhető BRET-jel kialakulását (22. ábra, zöld görbék).

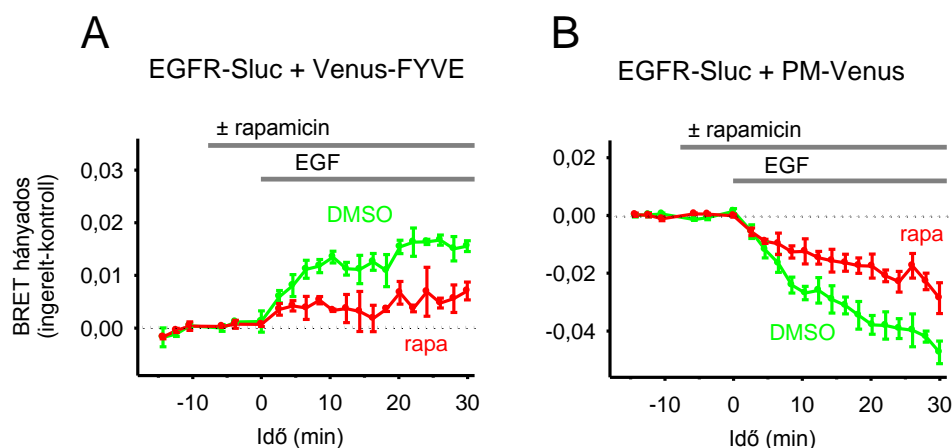


**22. ábra – A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció hatása a β<sub>2</sub>AR BRET módszerrel mért internalizációjára**

A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció β<sub>2</sub>AR endocitózisára kifejtett hatásának vizsgálatához HEK293T sejtekben a depléciós rendszer elemei (PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP-5-foszfátáz) mellett a β<sub>2</sub>AR-Sluc fehérjét és a fluoreszcensen jelölt partnermolekulákat: (A) β-arresztin 2-YFP-t, (B) Venus-Rab5-öt, illetve (C) PM-Venust fejeztük ki transziens transzfekcióval. A sejteket 5 percig előkezeltük az oldószer DMSO-val (zöld görbék), illetve rapamicinnel (200 nM, piros görbék), majd a receptorokat isoprenalinnal (1 μM) ingereltük. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék n=3 független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag ± SEM értékeit mutatják.

Várnai Péter és munkatársai egy korábbi tanulmányban már kimutatták konfokális mikroszkópia és fluoreszcensen jelölt ligand segítségével, hogy a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> depléciója csökkenti az EGFR internalizációját [132]. Célunk volt ez BRET kísérletek során is megerősíteni, ehhez a már korábban használt EGFR-Sluc molekulát használtuk fel. Mivel a RTK családba tartozó EGFR nem köt β-arresztin 2-t, ahogy azt láthattuk már korábban is (15. ábra, A), így a lipiddepléciónak csak a receptor plazmamembrántól való eltávolodására (PM-Venus), illetve a korai endoszómába való megérkezésére kifejtett hatását vizsgáltuk, utóbbi esetben a korábban használt Rab5 molekula helyett a kissé nagyobb jelváltozást mutató, szintén endoszómába lokalizáló WDFY2 fehérje FYVE doménjének [161] segítségével (23. ábra, piros görbék).

A korábbi eredményekkel összhangban a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> depléciója mindkét vizsgált felállásban gátolta az EGFR-Sluc internalizációját, de a GPCR-októl eltérően a gátló hatás itt mindkét esetben csak részleges volt (23. ábra, piros görbék).



23. ábra – A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciónak hatása az EGFR BRET módszerrel mért internalizációjára

A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciónak EGFR endocitózisára kifejtett hatásának vizsgálatához HEK293T sejtekben a depléciós rendszer elemei (PM-FRB-mRFP és mRFP-FKBP-5-foszfátáz) mellett az EGFR-Sluc fehérjét és a fluoreszcensen jelölt partnermolekulákat: (A) a Venus-FYVE domént (a WDFY2 fehérjéből), illetve (B) PM-Venust fejeztük ki transziens transzfekcióval. A sejteket 5 percig előkezeltük az oldószer DMSO-val (zöld görbék), illetve rapamicinnel (200 nM, piros görbék), majd a receptorokat EGF-fel (100 ng/ml) ingereltük. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=3$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

## 5.5 A plazmamembrán PtdIns(4) $P$ szerepének vizsgálata a receptorendocitózisban

Az már régóta ismert, hogy a plazmamembrán a PtdIns(4,5) $P_2$  mellett vele összemérhető mennyiségben tartalmaz PtdIns(4) $P$ -ot is. Az utóbbi lipid azonban sokáig csak a PtdIns(4,5) $P_2$ -szintézis közti-termékeként volt elkönyvelve, és nem vizsgálták, hogy van-e külön funkciója. Ez az utóbbi években kezd megváltozni, aminek többek között az adott lendületet, hogy kiderült: a plazmamembránban található PtdIns(4,5) $P_2$  – legalábbis részben – a plazmamembrán PtdIns(4) $P$ -készletétől függetlenül keletkezik [134], és a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot bizonyos funkcióiban helyettesíteni tudja a PtdIns(4) $P$  [70, 134]. Mindenesetre az általunk eddig használt PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszerben rapamicin adására a PtdIns(4,5) $P_2$ -ből PtdIns(4) $P$  keletkezik, így elvileg elképzelhető, hogy a látott hatásokért nem (vagy nem csak) az előbbi lipid hiánya, hanem az utóbbi többlete (is) felelős.

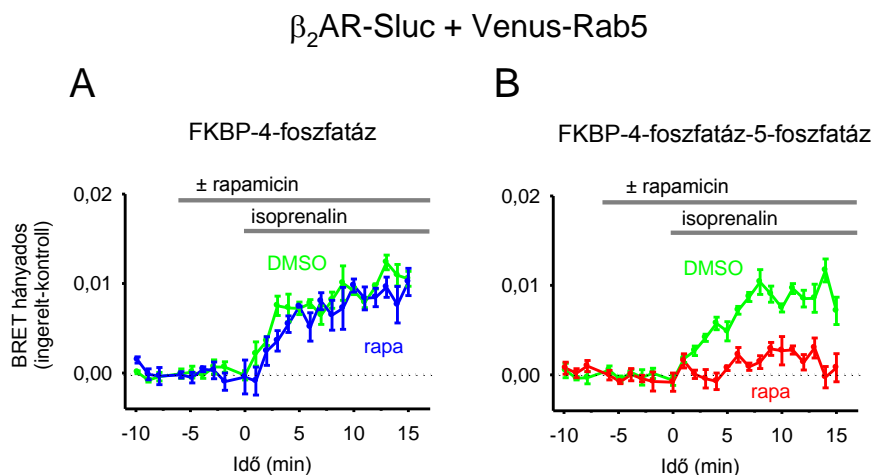
Ennek vizsgálatára végeztünk kísérleteket a plazmamembránba irányítható Sac1 4-foszfátáz doménnel is, amely a PtdIns(4) $P$ -ot defoszforilálja, de a PtdIns(4,5) $P_2$ -t nem. Emellett egy olyan konstrukciót is használtunk, amely egy szekvencián belül tartalmazza mind a Sac1 4-foszfátáz domént, mind az általunk eddig használt 5-foszfátáz domént [134]. Ezekről a konstrukciókról korábban már megmutatták, hogy

funkcióképesek, a megfelelő pozícióban defoszforilálják a plazmamembrán foszfoinozítidjeit [134]. Az enzimek plazmamembránba történő áthelyeződését ebben az esetben is a rapamicin hatására létrejövő FRB-FKBP dimerizáció hozta létre, azonban az FRB domén plazmamembránba irányítását ebben az esetben egy másik fehérje, az Src kinázok családjába tartozó Lck protein N-terminális 10 aminosava biztosította (L<sub>10</sub>-FRB-mRFP), amely szintén elsősorban a membrán raft régióiba irányítja a fehérjét [152]. A FKBP doménhez pedig az élesztőből (*Saccharomyces cerevisiae*) származó Sac1 enzim 4-foszfátáz aktivitással rendelkező katalitikus doménje volt hozzákapcsolva (mRFP-FKBP-4-foszfátáz) önmagában, illetve a korábban használt 5-foszfátáz doménnal együtt (mRFP-FKBP-4-foszfátáz-5-foszfátáz). Az utóbbi esetben tehát egy fehérjén belül találjuk meg a két foszfátáz domént, hasonlóan a szinaptojanin 1 fehérjéhez, amely szintén két, eltérő specificitással rendelkező foszfátáz domént tartalmaz [30].

Megvizsgáltuk tehát, hogyan befolyásolják ezek a depléciós rendszerek a receptorendocitózist. Ehhez a  $\beta_2$ AR-Sluc és Venus-Rab5 közötti, korábban már vizsgált interakciót (22. ábra, B) használtuk modellként. A 4-foszfátáz, illetve 4-foszfátáz-5-foszfátáz konstrukciót tartalmazó lipiddepléciós rendszerünk mellé a fent említett két molekulát transzfektáltuk HEK293T sejtekbe, és 100 nM rapamicin (illetve a kontroll esetében ehelyett DMSO) adása után a  $\beta_2$ AR-t isoprenalinnal (1  $\mu$ M) ingerelve vizsgáltuk az internalizáció létrejöttét. Azt tapasztaltuk, hogy a PtdIns(4)P lebontása önmagában nem változtatta meg a receptor aktiválódás utáni internalizációját (24. ábra A, kék görbe). A PtdIns(4)P és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> együttes lebontása azonban már létrehozta azt az internalizációgátlást (24. ábra B, piros görbe), amit a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szelektív lebontásakor is láttunk (22. ábra, B).

Eredményeink egybevetve tehát arra utalnak, hogy a PtdIns(4)P feltehetően nem szükséges a plazmamembrán-receptorok endocitózisához, és hogy az általunk 5-foszfátáz segítségével létrehozott PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció esetében nem a következményesen felszaporodó PtdIns(4)P váltja ki a receptorendocitózis gátlását. Méréseink ezenkívül azt is valószínűsítik, hogy a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> lebontása esetén a vele azonos mennyiségben keletkező PtdIns(4)P nem képes pótolni a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> funkcióját a receptorendocitózisban.





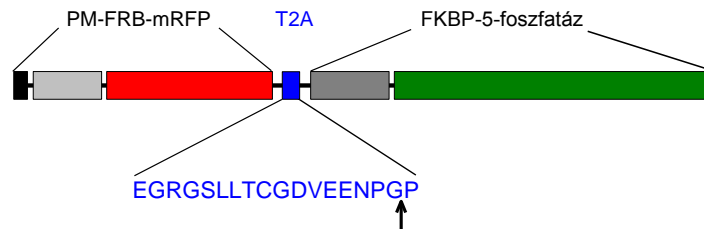
**24. ábra** – Különböző fosfoinozitidek depléciójának hatása a  $\beta_2$ AR BRET módszerrel mért internalizációjára HEK293T sejteket transzfektáltunk a következő fehérjéket kódoló plazmidokkal:  $\beta_2$ AR-Sluc és Venus-Rab5, L<sub>10</sub>-FRB-mRFP, valamint (A) mRFP-FKBP-4-foszfataz, illetve (B) mRFP-FKBP-4-foszfataz-5-foszfataz. A sejteket 5 percig előkezeltük DMSO-val (zöld görbék), illetve rapamicinnel (100 nM, kék és piros görbék), majd a receptorokat isoprenalinnal (1  $\mu$ M) ingereltük. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=3-5$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

## 5.6 A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszer továbbfejlesztése

Következő lépésként annak szerettünk volna utánajárni, hogy mi állhat a háttérben annak a részleges gátlásnak, amit a PM-Venus és a receptorok közötti BRET mérésekben a PtdIns(4,5) $P_2$  lebontása után tapasztaltunk. Visszatértünk a konfokális mikroszkópiához, ahol azonban egy technikai jellegű problémával találtuk szembe magunkat. A rapamicinnel indukálható depléciós rendszerünk két fehérjeelemét (PM-FRB és FKBP-5-foszfataz) addig a két fehérjét kódoló két külön plazmid segítségével fejeztük ki a sejtekben, az ilyen kísérletekben azonban sohasem érhető el teljes kotranszekció, azaz hogy minden transzfektálódott sejtbe bejusson mindkét plazmid. És még abban az esetben is, ha megjelenik mindkét fehérjetermék ugyanazon sejtben, a két fehérje egymáshoz viszonyított mennyisége jelentős különbségeket mutathat a sejtek között. Esetünkben ez a PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontás mértékének nagy szóródását okozza az egyes sejtek között, ami – különösen az egysejtes rendszerekben, mint a konfokális mikroszkópia – nehézkessé és bizonytalanná teheti a méréseket.

A probléma kezelésére, a kiszámíthatóbb lipiddepléció eléréséhez megpróbáltuk a rendszert úgy átalakítani, hogy egyetlen plazmid transzfekciója elég legyen a stabil PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció eléréséhez. Ennek érdekében egy olyan plazmidot hoztunk létre, amely tartalmazza a rendszer mindkét proteinjének kódoló szekvenciáját, egy T2A virális peptid szekvenciával összekötve (25. ábra).

Ennek a virális szekvenciának az a tulajdonsága, hogy a transláció során a peptid két meghatározott aminosava között (a 25. *ábra* nyíllal jelölve) nem jön létre a peptidkötés, de a transláció folytatódik, és így két különálló, de azonos mennyiségű fehérjetermék keletkezik [155]. Depléciós rendszerünk esetében ez a két fehérje a PM-FRB-mRFP-T2A és az FKBP-5-foszfataz voltak, mivel a kapcsolt átíródás miatt már nem volt szükség mindkét fehérje fluoreszcens jelölésére.

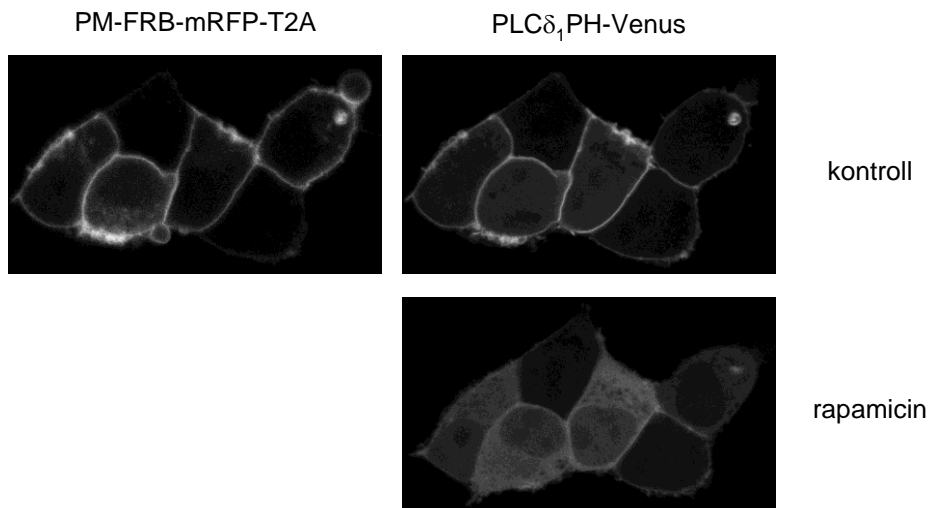


**25. *ábra* – A plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszer egyetlen plazmidban kódolva**

A plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszer két elemének sematikus rajza a T2A virális peptidszekvenciával összekötve. A teljes szekvencia egyetlen mRNS molekulára íródik át, de a transláció során a T2A szekvenciában a nyíllal megjelölt aminosavak között nem jön létre a peptidkötés, ami két külön polipeptidlánc (PM-FRB-mRFP-T2A és FKBP-5-foszfataz) létrejöttét eredményezi.

Annak ellenőrzésére, hogy az így megváltoztatott rendszerünk is képes-e lebontani a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot a plazmamembránban, HEK293T sejteket transzfektáltunk ezzel a plazmiddal, valamint a PLC $\delta$ 1PH-Venust kódoló plazmiddal, és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk őket. A vártan megfelelően a PM-FRB-mRFP-T2A protein egyértelműen a plazmamembránban látszódott (26. *ábra*, *bal oldal*), és nyugalomban ehhez nagyon hasonló eloszlást mutatott a Venusszal jelölt PH domén is (26. *ábra*, *jobbra fent*), jelezve, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  jelen van a membránban. Ez egyúttal arra is utalt, hogy a mikroszkóppal nem detektálható FKBP-5-foszfataz nincs a plazmamembránban. Rapamicin adása után azonban a PH domén áthelyeződött a citoplazmába (26. *ábra*, *alul*), mutatva ezzel a lipiddepléció létrejöttét.

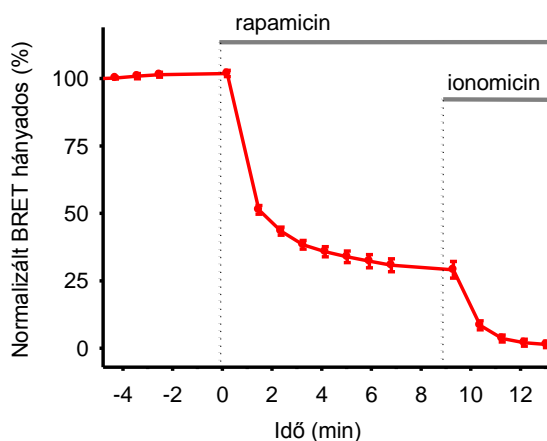
A régi és az új lipiddepléciós rendszer kvantitatív összehasonlításához megismételtük az új rendszerrel azt a korábbi BRET kísérletet (17. *ábra*), melyben a luciferázzal és Venusszal jelölt PH domének közötti energiáttranszferből következtettünk a PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció mértékére. Ebben az esetben csak a rapamicin hatását vizsgáltuk, a kontrollok ismétlésétől eltekintettünk (27. *ábra*).



**26. ábra – Az egyetlen plazmidban kódolt PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciós rendszer működésének vizsgálata**

Az átalakított depléciós rendszer konfokális mikroszkópos vizsgálatához a PM-FRB-mRFP-T2A és FKBP-5-foszfátáz konstrukciókat, valamint a PLCδ1PH-Venus fehérjét fejeztük ki HEK293T sejtekben. A felső kontroll képeken a PM-FRB-mRFP-T2A és PLCδ1PH-Venus fehérjék plazmamembrán-lokalizációt mutatnak, ami az ebben a rendszerben nem detektálható FKBP-5-foszfátáz citoplazmatikus elhelyezkedésére utal. Rapamicinkezelés (200 nM, 5 perc) hatására az FKBP-5-foszfátáz a plazmamembránba helyeződik át, amit a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> következményes lebomlása nyomán a citoplazmába kerülő PH domén jelez (alsó kép).

A két rendszer hatékonyságát nagyon hasonlóan találtuk: a rapamicin (200 nM) adása után 5 perccel a normalizált BRET-hányados a régi depléciós rendszerrel a kiindulási érték 28,7±4,2%-ára ( $n=3$ ) csökkent (17. ábra, piros görbe), míg az új rendszerrel ugyanez az érték 32,5±2,1%-nak ( $n=4$ ) adódott (27. ábra).



**27. ábra – Az egy plazmidban kódolt PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciós rendszer működésének vizsgálata BRET-tel**

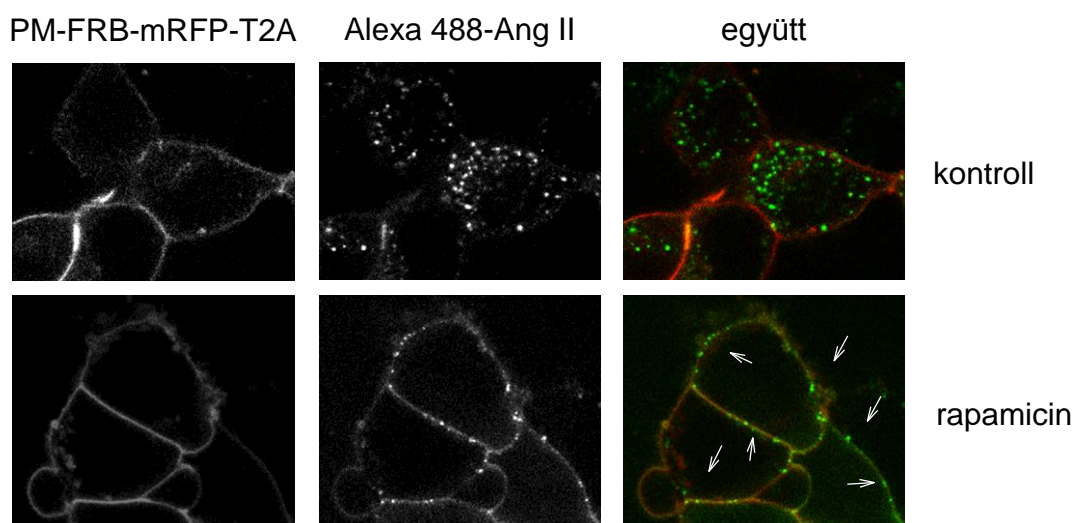
Megvizsgáltuk az átalakított lipiddepléciós rendszert BRET kísérletekben is, a 17. ábrán mutatotthoz hasonló felállásban. A PM-FRB-mRFP-T2A és FKBP-5-foszfátáz konstrukciókat a PLCδ1PH-Sluc és PLCδ1PH-Venus fehérjékkel együtt fejeztük ki HEK293T sejtekben, transziens transzfekcióval. A sejteket rapamicinnel (200 nM) kezeltük, majd ionomicin (10 μM) hozzáadásával értünk el teljes PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciót. Az adatokat a 17. ábrán részletezett módon normalizáltuk. A görbén  $n=4$  független kísérlet méréseinek átlag ± SEM értékei láthatók.

## 5.7 A plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -deplíciója nem gátolja az AT<sub>1</sub>R klaszterekbe rendeződését

A PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontás receptorendocitózisra gyakorolt hatásának vizsgálatát tehát konfokális mikroszkópiával folytattuk, és visszatértünk az AT<sub>1</sub>R vizsgálatához. HEK293T sejteket transzfektáltunk tranziensen a jelöletlen AT<sub>1</sub>R-t kódoló plazmiddal, illetve továbbfejlesztett lipiddeplíciós rendszerünk plazmidjával, amely tehát a PM-FRB-mRFP-T2A és FKBP-5-foszfataz fehérjét kódolja. A kísérletek során a deplíciós rendszer megfelelő kifejeződését a PM-FRB-mRFP-T2A fluoreszcens intenzitása alapján ítéltük meg, hiszen ez a fehérje és az FKBP-5-foszfataz azonos mRNS molekuláról íródnak át, tehát az előbbi fehérje megfelelő mennyisége garantálja az utóbbi jelenlétét, és ezzel a hatékony PtdIns(4,5) $P_2$ -deplíció lehetőségét is.

A sejtek kiválasztása után rapamicin vagy DMSO előkezelést végeztünk, majd Alexa-Fluor-488 fluoreszcens molekulával megjelölt Ang II-vel (Alexa488-Ang II) ingereltük a mintákat, 100 nM végkoncentrációban. Azokban a sejtekben, melyek tartalmazták a lipiddeplíciós rendszer fehérjéit, de nem kaptak rapamicin előkezelést (kontroll sejtek), az Alexa488-Ang II 2-3 percen belül kiváltotta az AT<sub>1</sub>R-ok internalizációját (28. ábra, kontroll), és a 11. ábra láthatóhoz hasonló intracelluláris elhelyezkedést eredményezett. Ezzel szemben a rapamicinnel (200 nM, 4 min) előkezelt sejtekben az Alexa488-Ang II a plazmamembránt rajzolta körül, és annak mentén nagy intenzitású csomókba, klaszterekbe rendeződött, és nem jelent meg a sejtek belsejében legalább 5 percig (28. ábra, rapamicin).

A korábbi BRET kísérleteink azt mutatták, hogy az AT<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztin 2 közötti kapcsolódást nem befolyásolja a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintjének változtatása. Ezenkívül az AT<sub>1</sub>R a GPCR-ok A osztályába tartozik, melyben az aktiválódást követően a receptor- $\beta$ -arresztin-2 kötés tartósan megmarad, még a receptor endocitózisa után is. Mindezek alapján felmerült annak lehetősége, hogy a jelölt ligandokhoz hasonlóan a fluoreszcens fehérjével fuzionált  $\beta$ -arresztin 2 is alkalmas lehet az AT<sub>1</sub>R követésére.

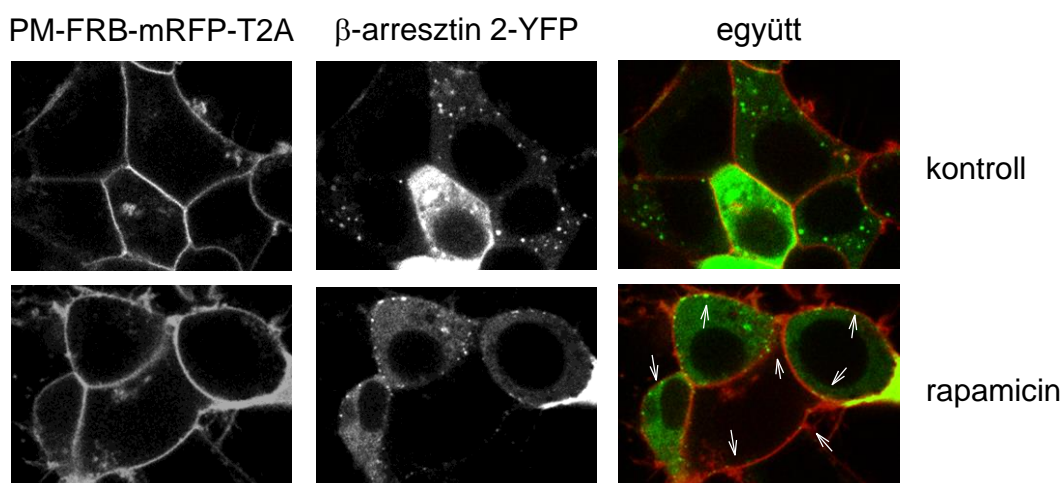


**28. ábra – A PtdIns(4,5) $P_2$  depléciója nem gátolja az aktivált AT<sub>1</sub>R klaszterekbe rendeződését**

AT<sub>1</sub>R-t, PM-FRB-mRFP-T2A-t, valamint FKBP-5-foszfatazt kifejező HEK293T sejteket előkezeltünk DMSO-val (kontroll sejtek, felső sor), illetve rapamicinnel (200 nM, alsó sor) 4 percig. Ezután a fluoreszcens ligand Alexa488-Ang II-vel (100 nM) ingereltük a sejteket, és 6 perc elteltével készítettük az ábrán látható felvételeket. Az egyesített képeken a PM-FRB-mRFP-T2A látható piros színnel, míg az Alexa488-Ang II zöld színnel látszik. Megfigyelhető, hogy kontroll körülmények között a fluoreszcens liganddal megjelölt AT<sub>1</sub>R-ok megjelentek a sejtek belsejében, míg a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciója után (*rapamicin*) a sejtek felszínén maradtak (*nyilakkal jelölve*), és klaszterekbe rendeződtek. Az ábrán látható képek legalább 5 független kísérletből származó 25-30 sejtre reprezentatívak.

Feltételezésünk igazolására HEK293T sejteket transzfektáltunk ismét a T2A-alapú PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszerrel, jelöletlen AT<sub>1</sub>R-ral, valamint ezúttal  $\beta$ -arresztin 2-YFP-vel is. PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció kiváltása nélkül az Ang II ingerlés (100 nM) először a  $\beta$ -arresztin 2-YFP plazmamembránba való kihelyeződését okozta, ahol kötődött az aktivált receptorokhoz, majd azokkal együtt endocitózisra került (29. ábra, *kontroll*). Azokban a sejtekben azonban, melyekben a PtdIns(4,5) $P_2$  rapamicinkezeléssel (200 nM, 4 min) lebontásra került, a  $\beta$ -arresztin 2-YFP a plazmamembránba történt áthelyeződés és a receptorhoz való kötődés után szintén az aktivált receptorok által képzett klaszterekben gyűlt össze a plazmamembrán mentén (29. ábra, *rapamicin*).

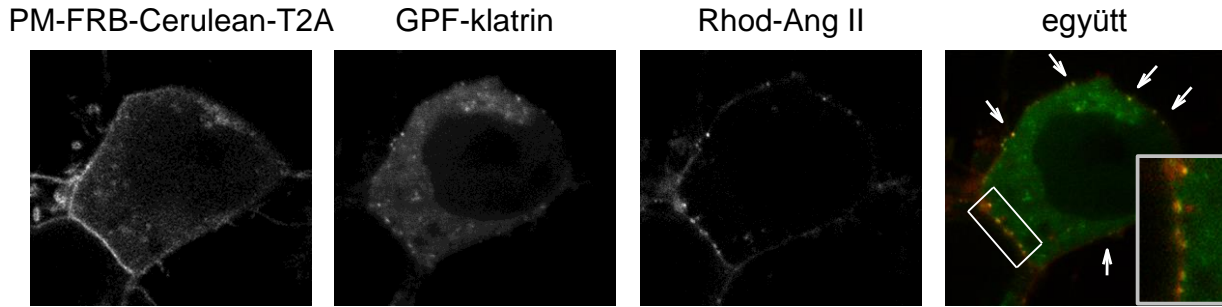
Annak megítélésére, hogy ezek a receptorklaszterek megfeleltethetők-e a plazmamembrán klatrint tartalmazó struktúráinak, egy következő kísérletben a jelöletlen AT<sub>1</sub>R plazmidjával és a klatrin könnyűláncának GFP-vel jelölt változatát (GFP-klatrin) kódoló, TK promotert tartalmazó plazmiddal transzfektáltunk tranziensen HEK293T sejteket, illetve bejuttattuk ezek mellett még a PM-FRB-Cerulean-T2A-FKBP-5-foszfataz plazmidot is, a rapamicinnel indukálható PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció biztosításához.



**29. ábra – A PtdIns(4,5) $P_2$  depléciója nem gátolja az aktivált AT<sub>1</sub>R klaszterekben rendeződését**

Mivel az AT<sub>1</sub>R és β-arresztin 2 közötti kapcsolatot korábban PtdIns(4,5) $P_2$ -től függetlennek találtuk, a 28. ábrán bemutatott kísérletet elvégeztük úgy is, hogy az AT<sub>1</sub>R-t fluoreszcens ligand helyett β-arresztin 2-YFP segítségével tettük láthatóvá. Az AT<sub>1</sub>R-t, PM-FRB-mRFP-T2A-t, FKBP-5-foszfátáz és β-arresztin 2-YFP-t kifejező HEK293T sejteket előkezeltünk DMSO-val (kontroll sejtek, felső sor), illetve rapamicinnel (200 nM, alsó sor) 4 percig. Ezután Ang II-vel (100 nM) ingereltük a sejteket, és 6 perc elteltével készítettük az ábrán látható felvételeket. Az egyesített képeken a PM-FRB-mRFP-T2A látható piros színnel, a β-arresztin 2-YFP pedig zöld színnel. A rapamicinnel előkezelt sejtek felszínén itt is megfigyelhető a klaszterképződés (*nyilakkal jelölve*). Az ábrán látható képek legalább 5 független kísérletből származó 25-30 sejtre reprezentatívak.

A sejteket előkezeltük 5 percig 200 nM rapamicinnel, majd Rhod-Ang II-vel ingereltük őket újabb 5 percen keresztül. Ezután olyan sejtekről készítettünk felvételeket, melyek a felsorolt fehérjék mindegyikét tartalmazták (PM-FRB-Cerulean-T2A-t kék, GFP-klatrint zöld, illetve Rhod-Ang II-t piros szignálként). A GFP-klatrin megfelelő expressziós szintje kritikus volt, mert alacsony kifejeződés mellett nem vagy alig volt látható a sejtekben, míg a erősebb kifejeződés esetén a CCP-kben található klatrint elfedte a citoplazmatikus klatrin túl magas szintje. Érdekes módon a jól elkülöníthető GFP-klatrint tartalmazó gödrökkel rendelkező sejtekben a rapamicinkezelés semmilyen konfokális mikroszkóppal észlelhető változást nem okozott a gödrök elhelyezkedésében vagy eloszlásában. A rapamicinkezelés után adott Rhod-Ang II a korábbiakkal megegyezően a plazmamembránban formált klasztereket, ezzel mutatva a PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontás megtörténtét, és ezek a klaszterek egyértelmű kolokalizációt mutattak a GFP-klatrinnal (30. ábra).



**30. ábra – A  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  hiányában a sejt felszínén látható klaszterekben kolokalizál az  $\text{AT}_1\text{R}$  és a klatrin**  
 Annak vizsgálatára, hogy a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléció mellett képződő klaszterek megfelelnek-e a plazmamembrán klatrint tartalmazó struktúráinak, HEK293T sejtekben kifejeztük az  $\text{AT}_1\text{R}$ -t, a PM-FRB-Cerulean-T2A és FKBP-5-foszfataz konstrukciókat, valamint a klatrin könnyűláncának GFP-vel jelölt változatát (GFP-klatrin). 5 perc rapamicin-előkezelés (200 nM) után Rhod-Ang II-t (100 nM) adtunk a sejteknek, majd újabb 5 perc után készítettük az ábrán látható felvételeket. Az egyesített képen csak a GFP-klatrin (zöld színnel), és a Rhod-Ang II látható (piros színnel). Megfigyelhető a klatrin és a fluoreszcens liganddal megjelölt receptor kolokalizációja (nyilakkal jelezve, illetve a kinagyított betétképen). Az ábrán látható képek legalább 5 független kísérletből származó 25-30 sejt reprezentatívak.

Ez az eredmény azt mutatja, hogy a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléció ellenére az  $\text{AT}_1\text{R}$  képes volt eljutni klatrint tartalmazó struktúrákba a plazmamembránban, ami arra utal, hogy az endocitózis folyamatának korai szakasza legalábbis részben  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -től függetlenül zajlik. Az aktivált receptornak ez a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -független laterális mozgása magyarázatul szolgálhat arra a részleges BRET-jelcsökkenésre, amely a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  lebontása után is megmarad a receptor és a PM-Venus fehérje között (18. ábra, C).

## 5.8 A hormonindukált $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléció hatásának vizsgálata

Eddig bemutatott eredményeink alapján tehát a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -szintje képes befolyásolni a receptorok internalizációját. Napjainkra már számos tanulmány utal a plazmamembránon belül különböző  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -készletek létezésére, és vannak példák arra is, hogy ezek a külön készletek a lipid által betöltött egyes funkciókhoz eltérő mértékben járulhatnak hozzá [72, 168]. Ezenkívül számos plazmamembrán-receptor ingerlése indít be olyan folyamatokat, melyek csökkenthetik a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -szintjét (akár PLC, akár PI3K enzimek aktiválásán keresztül). Mindezek fényében következő kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a hormonok által kiváltott  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -depléció képes-e az általunk 5-foszfataz enzimmel létrehozott lipidebontás korábban látott, receptorendocitózist gátló hatását szintén kiváltani.

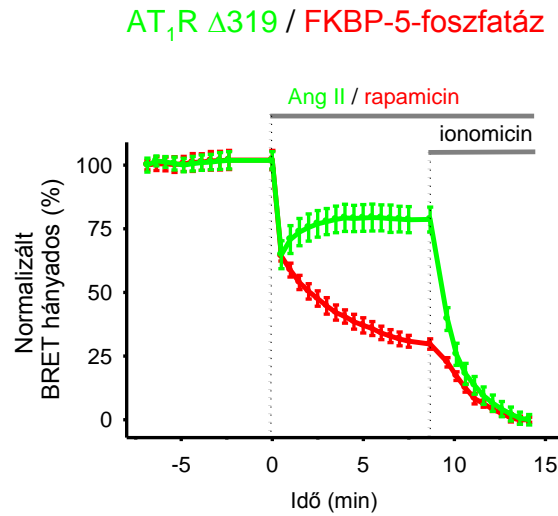
A hormonhatásra kialakuló lipidbontást a  $G_q$ -fehérjéhez kapcsolt  $AT_1R$  segítségével terveztük elérni, amely Ang II-ingerlés hatására aktiválja a  $PLC\beta$  enzimet, és ezen keresztül okoz  $PtdIns(4,5)P_2$ -szintcsökkenést. A nagyobb mértékű és tartósabb lipiddepléció érdekében a receptornak egy olyan deléciós mutánsát használtuk, melyből a receptor deszenzitizációjában szerepet játszó foszforilációs helyeket tartalmazó C-terminális szakasz (a 319-es aminosavtól kezdődően) hiányzik, így nem képes deszenzitizálódni, és internalizációra sem kerül ( $AT_1R \Delta 319$ ) [142].

Egy korábbi összehasonlítás alapján az eddigiekben a  $PtdIns(4,5)P_2$ -szint változásának követésére használt, lipidkötő domének ( $PLC\delta 1PH$ -Sluc és  $PLC\delta 1PH$ -Venus) között mérthez nagyon hasonló jelváltozásokat kaphatunk akkor is, ha az energiatranszfert egy plazmamembrán-marker és lipidkötő domén között követjük [122]. Ez alapján a receptor által létrehozott lipidbontás mértékének és kinetikájának ellenőrzésére ezúttal a plazmamembránhoz horgonyzott  $L_{10}$ -Venus-T2A és a lipidkötő  $PLC\delta 1PH$ -Sluc közötti energiatranszfert mértük. Ezt a két fehérjét, valamint az  $AT_1R \Delta 319$ -et kifejező HEK293T sejteket 100 nM Ang II-vel ingerelve azt láttuk, hogy a BRET-hányados csökkent, de az 5-foszfátazzal létrehozott deplécióhoz képest eltérő kinetikával: pillanatszerű jelentős csökkenés után emelkedni kezdett, majd a kiindulásnál alacsonyabb szinten állandósult (31. ábra, zöld görbe). A depléció mértéke kisebb volt, mint az 5-foszfátáz plazmamembránba irányítása után ugyanezzel a módszerrel mérhető csökkenés (31. ábra, piros görbe).

A kisebb mértékű lipiddepléció ellenére megvizsgáltuk az  $AT_1R \Delta 319$  aktiválásának hatását a receptorendocitózisra, újfent a  $\beta_2AR$ -Sluc és Venus-Rab5 között mérhető BRET-jelváltozás felhasználásával. A 32. ábra látható mérési eredmények szerint az  $AT_1R \Delta 319$  által kiváltott  $PtdIns(4,5)P_2$ -lebontás nem gátolta meg a  $\beta_2AR$ -Sluc megjelenését a korai endoszómában. Mivel azonban az Ang II-ingerlés után mért BRET-jelnövekedés (32. ábra A, zöld görbe) a mérési pontok többségében elmaradt a kontroll értéktől, az adatok statisztikai kiértékelése mellett döntöttünk.

Ehhez a 32. ábra A és B panelén látható görbék utolsó 5 pontját kísérletenként átlagoltuk, és ezen értékek átlagát hasonlítottuk össze. Az  $AT_1R \Delta 319$  esetében az Ang II ingerés után kapott válasz nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól, míg az 5-foszfátáz kifejező rendszerben a rapamicinnel létrehozott lipiddepléció szignifikánsan gátolta a  $\beta_2AR$ -Sluc endocitózisát (32. ábra, C).

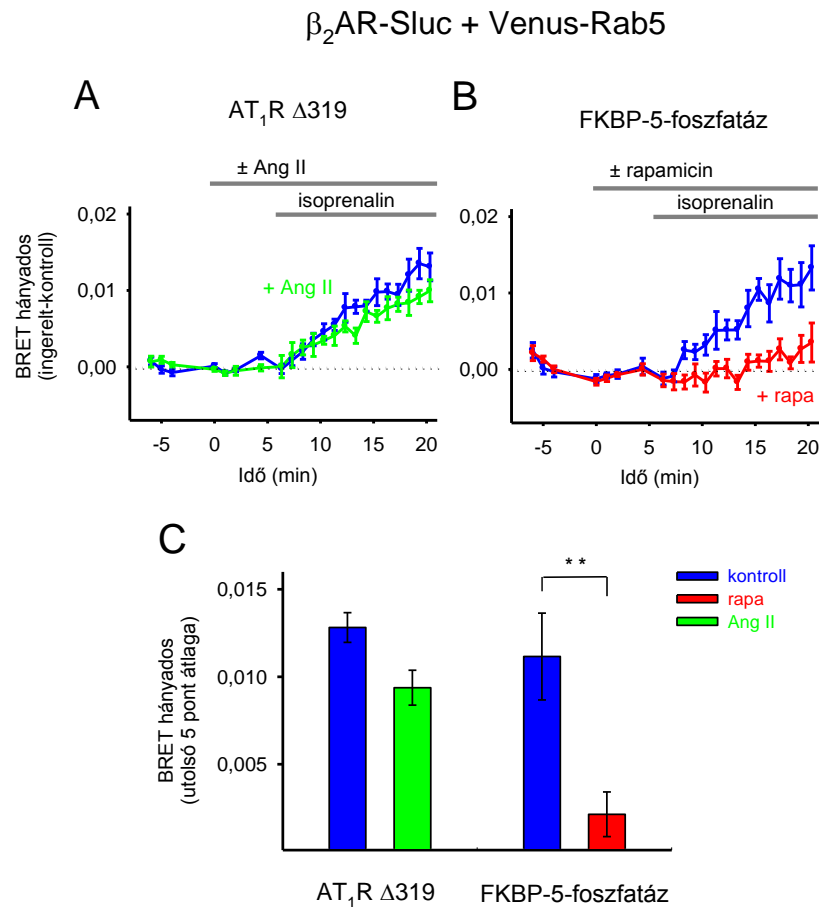




**31. ábra – A hormonindukált és az 5-foszfátázzal kiváltott PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció összehasonlítása BRET-tel**

Az AT<sub>1</sub>R Δ319 mutáns és az 5-foszfátáz enzim transzlokációján alapuló rendszerek PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-bontóképességét szintén BRET kísérletekben vizsgáltuk, az energiatranszfert ezúttal az L<sub>10</sub>-Venus-T2A és PLCδ1PH-Sluc fehérjék között mértük. HEK293T sejtekben az említett két molekulán kívül az AT<sub>1</sub>R Δ319 fehérjét (*zöld görbe*), illetve az L<sub>10</sub>-FRB-mRFP-T2A konstrukciót és az mRFP-FKBP-5-foszfátáz (*piros görbe*) fejeztük ki transziens transzfekcióval. A sejteket Ang II-vel (100 nM, *zöld görbe*), illetve rapamicinnel (100 nM, *piros görbe*) kezeltük, majd ionomicin (10 μM) hozzáadásával értünk el teljes PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciót. Az adatokat a 17. ábrán részletezett módon normalizáltuk. A görbén *n*=3 független kísérlet méréseinek átlag ± SEM értékei láthatók.

Mivel az AT<sub>1</sub>R Δ319 által létrehozott PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció hatástalanságát egyaránt okozhatta a kisebb mértékű lipidbontás, illetve az eltérő PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-készletek lebontása, ezért egy másik megközelítéssel is megpróbáltuk eldönteni, hogy melyikről lehet szó. A lipidbontó enzim áthelyeződéséhez szükséges FRB domént az eddig használt plazmamembrán-horgonyok helyett magához az AT<sub>1</sub>R-hoz kapcsoltuk hozzá (AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP), és ezzel elértük, hogy egyazon rendszerben tudtuk a kétféle lipiddepléciót létrehozni attól függően, hogy rapamicinnel kezeltük a sejteket, vagy Ang II-vel ingereltük őket (33. ábra). A vad típusú AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP konstrukció mellett elkészítettük a nem internalizáló TSTS-AAAA mutáns változatot is, és a két konstrukciót párhuzamosan vizsgáltuk.

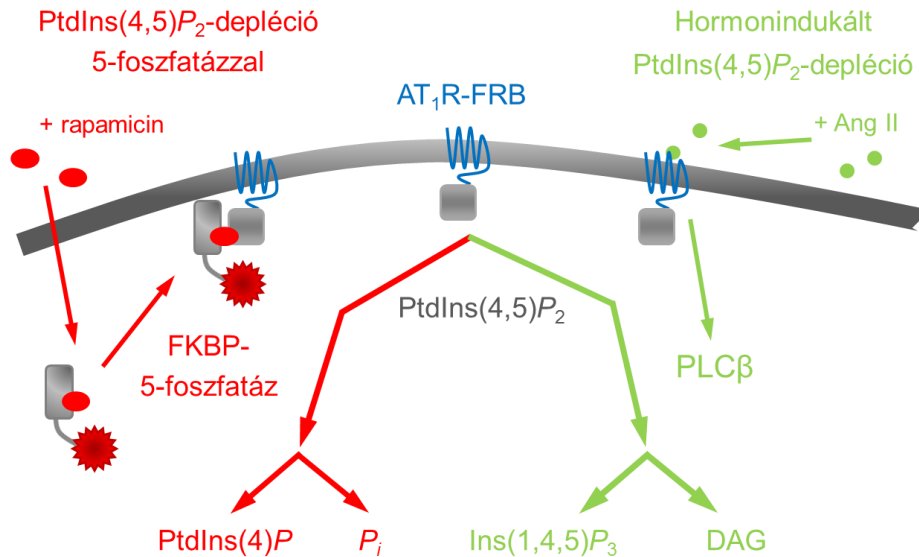


### 32. ábra – Különböző PtdIns(4,5) $P_2$ -deplációs rendszerek hatása $\beta_2$ AR BRET-tel mért internalizációjára

A hormon által indukált és az 5-foszfataz transzlokációján alapuló PtdIns(4,5) $P_2$ -depláció hatásának összehasonlításához HEK293T sejteket transzfektáltunk a következő fehérjéket kódoló plazmidokkal:  $\beta_2$ AR-Sluc és Venus-Rab5, valamint **(A)**  $AT_1R \Delta 319$  mutáns receptor, illetve **(B)**  $L_{10}$ -FRB-mRFP-T2A és mRFP-FKBP-5-foszfataz. A sejteket 5 percig előkezeltük az oldószer DMSO-val (*kék görbék*), illetve Ang II-vel (100 nM, *zöld görbe*) vagy rapamicinnel (100 nM, *piros görbe*), majd a receptorokat isoprenalinnal (1  $\mu$ M) ingereltük. Az ábrázolt értékeket a 10. ábrán részletezett módon számítottuk ki. A görbék  $n=4-7$  független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják. **(C)** Az A és B paneleken látható görbék utolsó 5 pontját kísérletenként átlagoltuk, és az így kapott értékek átlagát ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk oszlopdiagramon. Az adatok statisztikai kiértékelését kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük, amely mind a depláció típusa, mind a kezelés megléte vagy hiánya szempontjából szignifikáns különbséget mutatott ( $p < 0,05$ ), de a két szempont között nem volt szignifikáns interakció ( $p > 0,05$ ). Bonferroni-féle post hoc teszttel a deplációs csoportokon belül a jelölt oszlopok között mutatkozott szignifikáns különbség. \*\*  $p < 0,01$

Kísérleteinkhez tehát az  $AT_1R$ -FRB-mRFP (vad típus vagy TSTS-AAAA mutáns) és az mRFP-FKBP-5-foszfataz konstrukciókat kódoló DNS-t juttattunk be HEK293T sejtekbe, és a depláció követésére emellett az  $L_{10}$ -Venus-T2A-PLC $\delta$ 1PH-Sluc plazmidot transzfektáltuk. Azokban a sejtekben, amelyek rapamicin kezelést (300 nM) kaptak, a korábban használt felálláshoz képest kisebb mértékű PtdIns(4,5) $P_2$ -depláció látszott, a vad típusú és a mutáns receptor esetében közel azonos mértékben (34. ábra, *piros görbék*). A vad típusú  $AT_1R$ -FRB Ang II-ingerlésre hasonló kinetikával hozott létre PtdIns(4,5) $P_2$ -deplációt (34. ábra A, *zöld görbe*), mint ahogy azt korábban a

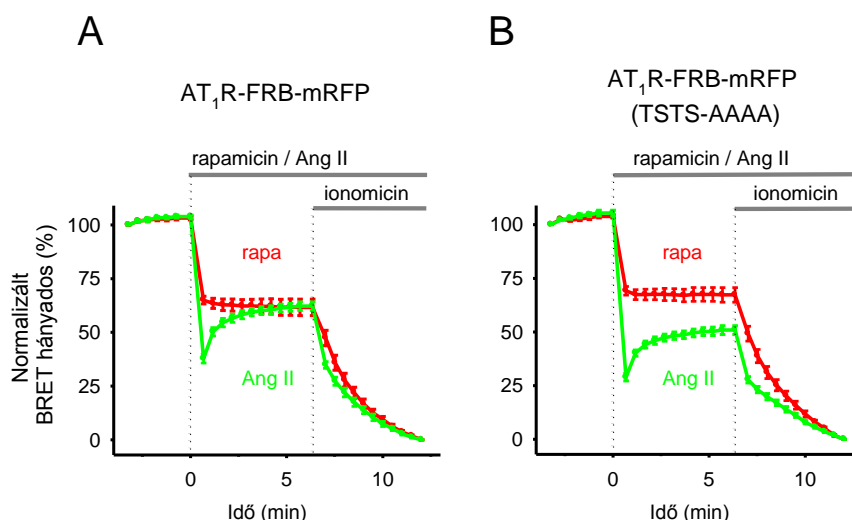
nem deszenzitizálódó AT<sub>1</sub>R Δ319-nél láttunk (31. ábra, zöld görbe). A TSTS-AAAA mutáns AT<sub>1</sub>R-FRB a vad típushoz képest nagyobb jelcsökkenést produkált Ang II hozzáadása után (34. ábra B, zöld görbe), gátolt deszenzitizációjának megfelelően.



### 33. ábra – Kétféle PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció egy rendszeren belül

Az ábra a kétféle PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-lebontásra alkalmas rendszert mutatja sematikusan. A rendszer elemei az AT<sub>1</sub>R-FRB és az FKBP-5-foszfátáz (kísérleteinkben mindkét fehérjének az mRFP-vel jelölt változatát használtuk, melyet az ábrán nem jelöltem külön). A rendszerhez rapamicint adva az FRB és FKBP heterodimerizációja nyomán az FKBP-5-foszfátáz a plazmamembránra kerül és defoszforilálja a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-t (*piros nyilak*). Ang II ingerlésre ezzel szemben az AT<sub>1</sub>R-FRB a PLCβ enzimet aktiválja, amely a lipidet Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-ra és DAG-re hidrolizálja (*zöld nyilak*). Rövidítések: P<sub>i</sub>: inorganikus foszfátsoport, PLCβ: foszfolipáz Cβ, DAG: diacilglicerin

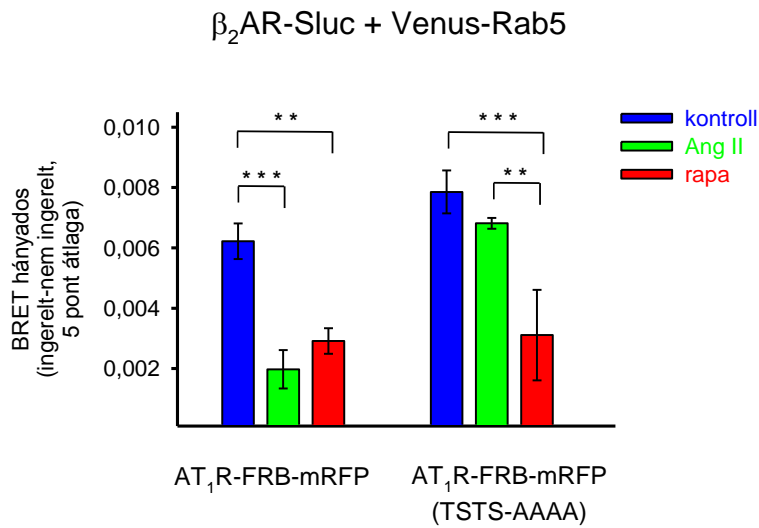
Mivel a korábban látottakkal ellentétben ezekben a kísérletekben a hormonindukált PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció ugyanakkora vagy még nagyobb arányú volt, mint az 5-foszfátázal létrehozott, kíváncsian vártuk, hogy milyen hatással lesznek ezek a rendszerek a receptorinternalizációra. Ezt ismételten a β<sub>2</sub>AR-Sluc és a Venus-Rab5 közötti BRET kísérletekben teszteltük, melynek során e két konstrukció mellett az AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP és az mRFP-FKBP-5-foszfátáz fehérjéket fejezték ki a vizsgált sejtek. A korábbi protokollnak megfelelően a sejteket 5 percig előkezeltük DMSO-val (kontroll), Ang II-vel (100 nM) vagy rapamicinnel (300 nM), majd 1 μM isoprenalinnal ingereltük a β<sub>2</sub>AR-t. A BRET-hányados változását ezután 15 percig követtük, és az utolsó 5 mérési pontot átlagoltuk, az így kapott értékeket mutatja a 35. ábra.



**34. ábra – Az AT<sub>1</sub>R-FRB által létrehozott kétféle PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció összehasonlítása BRET-tel**

Az AT<sub>1</sub>R-FRB fehérje kétféle, hormon által indukált, illetve az 5-foszfátáz transzlokációján alapuló PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-bontóképességét BRET kísérletekben, a 31. ábrán mutatotthoz hasonló felállásban vizsgáltuk, az energiatranszfer az L<sub>10</sub>-Venus-T2A és PLCδ1PH-Sluc fehérjék között mérve. HEK293T sejtekben az említett BRET-partnereken kívül az mRFP-FKBP-5-foszfátáz konstrukciót fejeztük ki transziens transzfekcióval, valamint az AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP (A) vad típusú, illetve (B) TSTS-AAAA mutáns formáját. A sejteket Ang II-vel (100 nM, zöld görbék), illetve rapamicinnel (300 nM, piros görbék) kezeltük, majd ionomicin (10 μM) hozzáadásával értünk el teljes PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciót. Az adatokat a 17. ábrán részletezett módon normalizáltuk. A görbén  $n=5$  független kísérlet méréseinek átlag ± SEM értékei láthatók.

A vad típusú AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP használatával kapott eredményeink azt mutatták, hogy mind az ingerlés Ang II-vel, mind a rapamicinkezelés hatékonyan bizonyult az internalizáció gátlásában (35. ábra, bal oldal). Ezzel szemben a nem deszenzitizálódó TSTS-AAAA mutáns AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP AngII-vel ingerelve nem fejtett ki gátló hatást a β<sub>2</sub>AR endocitózisára, miközben rapamicin adásával kiváltható volt a gátlás ezzel a receptorral is (35. ábra, jobb oldal). A TSTS-AAAA mutáns esetében annak ellenére maradt el az internalizáció gátlása Ang II ingerlés után, hogy az a rapamicinnel létrehozotthoz képest nagyobb mértékű PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-lebontást generált (34. ábra B). Ez utóbbi különbség tehát az 5-foszfátázzal létrehozott és a hormon által indukált PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció eltérő hatását mutatja.



**35. ábra – Különböző PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciós rendszerek hatása a  $\beta_2$ AR BRET-tel mért internalizációjára**

A hormon által indukált és az 5-foszfátáz transzlokációján alapuló PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléció hatásának egy rendszeren belüli összehasonlításához HEK293T sejteket transzfektáltunk a  $\beta_2$ AR-Sluc-t, a Venus-Rab5-öt, valamint vad típusú AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP-t (*baloldali oszlopcsoport*), illetve TSTS-AAAA mutáns AT<sub>1</sub>R-FRB-mRFP-t (*jobboldali oszlopcsoport*) kódoló plazmidokkal. A sejteket 5 percig előkezeltük DMSO-val (*kék oszlopok*), illetve Ang II-vel (100 nM, *zöld oszlopok*) vagy rapamicinnel (300 nM, *piros oszlopok*), majd a receptorokat isoprenalinnal (1  $\mu$ M) ingereltük. A mért értékeket a 10. ábrán részletezett módon korrigáltuk a nem ingerelt sejtek értékeivel, majd az ingerlés utáni 10. és 15. perc közötti 5 egymást követő mérési pontot kísérletenként átlagoltunk, és az így kapott értékek átlagát ( $\pm$  SEM) ábrázoltuk oszlopdiaqramon. Az adatok statisztikai kiértékelését kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük, amely mind az AT<sub>1</sub>R típusa, mind az alkalmazott kezelés szempontjából szignifikáns különbséget mutatott ( $p < 0,05$ ), és a két szempont közötti interakció is szignifikánsnak bizonyult. Bonferroni-féle post-hoc teszttel a receptor típusa szerinti csoportokon belül a jelölt oszlopok között mutatkozott szignifikáns különbség.  $n=3-6$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 6. MEGBESZÉLÉS

A sejtek felszínén található receptorok, köztük a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) és receptor-tirozinkinázok (RTK) népes családjai is, számos fiziológias és patológias sejtfunkcióban játszanak alapvető szerepet. A plazmamembrán-receptorok működésének egyik fontos meghatározója a sejt felszínén található, és így az aktiváló ligandok számára elérhető receptorok száma, melyet a plazmamembránba kerülő és az onnan endocitózissal eltávolított receptorok közötti egyensúly határoz meg [112, 169, 170]. Az endocitózis leginkább ismert és legtöbbet tanulmányozott formája a CME, melyet a GPCR-ok, RTK-ok és számos más sejt felszíni fehérje is igénybe vesz a sejt belsejébe való bejutáshoz [80, 112]. Habár a CME folyamatának vannak általános, minden szállított protein esetében azonos mozzanatai [80, 83, 171], az endocitózis során használt adaptorfehérjékben, illetve az endocitotikus mechanizmus egyes részleteiben jelentős eltérések mutatkozhatnak az egyes receptorok között [87, 172-174], ami felveti a lehetőségét annak, hogy az egyes receptorcsaládok, sőt, egyes receptorok endocitózisa egyedi módon szabályozódhat.

Számos tanulmány utal arra, hogy a plazmamembrán foszfoinozítidjei, és azon belül elsősorban a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  szerepet játszik a CME folyamatában. Egyrészt jó néhány endocitózisban részt vevő fehérjéről kimutatták, hogy rendelkezik  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -ot kötni képes doménnel vagy molekularészlettel [94, 95]. Másrészt több sejtes rendszerben is igazolást nyert, hogy a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  szintjének különböző módszerekkel történő, általában hosszútávú csökkentése negatívan befolyásolja a CME folyamatát, illetve a modellként használt receptor, legtöbbször a TfR endocitózisát [31, 127-129]. Hasonló adatok a GPCR-ok tekintetében azonban munkám kezdetén még nem álltak rendelkezésre.

Doktori ösztöndíjasként elsősorban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy mi történik a GPCR-ok endocitózisával, ha a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -szintjét akutan csökkentjük. Ennek vizsgálatához először egy olyan rendszer felállítását tűztük ki célul, melyben molekuláris interakciók segítségével követhető a receptorok endocitózisának útja a plazmamembrántól az endoszómáig, élő sejtekben. A rendszer a molekuláris közelséget nagy érzékenységgel detektálni képes BRET módszeren alapult, melyben a luciferázzal jelölt receptor és különböző sejt kompartmentekbe irányított, vagy a receptorral kapcsolatba lépő fehérjét megjelölő fluoreszcens molekulák között mért

energiatranszfer változása utalt a receptor mozgására. Ezzel a megközelítéssel sikerült detektálnunk három GPCR ( $AT_1R$ ,  $5HT_{2C}R$  és  $\beta_2AR$ ) agonistaindukált endocitózist három különböző interakció aspektusából: a  $\beta$ -arresztin 2 receptorokhoz való kötődése, a receptorok eltávolodása fluoreszcensen jelölt plazmamembrán-markerektől, illetve a receptorok megérkezése a Rab5-tel jellemezhető korai endoszomális kompartmentbe.

Megpróbáltuk az internalizáció egyik fontos korai lépését, a receptorok klatrinburkos gödörbe (CCP) történő áthelyeződését is hasonló módon detektálni. Mivel a dolgozatban be nem mutatott, konfokális mikroszkóppal készített felvételeinken a klatrin és az AP-2 adaptorkomplex egyik alegysége, a  $\beta$ -adaptin 2 is jól észlelhető kolokalizációt mutatott az  $AT_1R$ -ral ingerlést követően, joggal reméltük, hogy ezen molekulák valamelyikével sikerül BRET kísérletekben is kimutatni a receptor megjelenését a CCP-kben. Érdekes módon azonban sem a klatrin, sem a  $\beta$ -adaptin 2 nem produkált mérhető BRET-jelváltozást sem az  $AT_1R$ , sem az  $5HT_{2C}R$  partnereként, ingerlés hatására. Erre feltehetően az szolgálhat magyarázatként, hogy a CCP-ben kialakuló nagy fehérjekomplexben nem optimális a luciferáz enzim és a fluoreszcens marker térbeli orientációja az energiatranszfer kialakulásához.

Kísérleteinkben a plazmamembrán jelölésére többfajta irányítószekvenciát is alkalmaztunk: egyrészt a Lyn tirozinkináz N-terminális szekvenciáját (PM), illetve az Lck fehérje hasonló szakaszát ( $L_{10}$ ), melyek elsősorban a plazmamembrán raft régiókban helyezkednek el [151, 152]; másrészt az inkább nem-raft régiókba lokalizáló, C-terminális KRas CAAX szignálszekvenciát [153, 175]. Az  $AT_1R$ -t vizsgálva eltérő BRET-jelváltozásokat kaptunk a kétféle plazmamembrán-marker esetében. Ingerlés hatására a PM-nél látható azonnali BRET-jelcsökkenéssel szemben a KRas CAAX esetében megfigyeltünk egy kezdeti emelkedést, ami tükrözheti a receptor aktiválódást követő, plazmamembrán-mikrodomének közötti mozgását. G-fehérjét nem aktiváló DRY-AAAY, illetve a C-terminális szakaszon foszforilálódni nem képes és így nem internalizálódó TSTS-AAAA mutáns  $AT_1R$ -ok használatával kimutattuk, hogy ez az aktiválódást követő mozgás feltehetően a G-fehérje aktiválásától függő módon jön létre, nem szükséges hozzá azonban a receptor internalizációt indukáló foszforilációja. Ezt megerősítették további, a dolgozatomban bemutatásra nem került kísérletek is: a vad

típusú AT<sub>1</sub>R-t olyan agonistával ingerelve, amely nem okoz G-fehérje aktiválódást, szintén azonnal csökkenni kezd a receptor és KRas CAAX közötti szignál.

Megvizsgáltuk ugyanezen membránjelölő molekulák kapcsolatát más plazmamembrán-receptorokkal is: a szintén G<sub>q</sub>-fehérjéhez kapcsolt 5HT<sub>2C</sub>R-ral és a tirozinkináz aktivitású EGFR-ral. Ebben a két esetben nem láttunk az AT<sub>1</sub>R-ra jellemző, ingerlést követő emelkedést a receptor és KRas CAAX közötti szignálban. Úgy tűnik tehát, hogy az aktiválást követő receptormozgás eltérő lehet az egyes plazmamembrán-receptorok esetében. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezen kísérletekben nem zárható ki, hogy a BRET-hányados változása nem a receptorok, hanem a fluoreszcensen jelölt markermolekula mozgását reflektálja, így ezek az eredmények mindenképpen további megerősítést igényelnek.

Ahogy korábban már kifejtettem, a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> alapvető szerepéhez a CME folyamatában nem férhet kétség, így nem volt váratlan a GPCR-ok endocitózisának PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-tól való függése. A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-nak az endocitózis egyes lépéseiben betöltött szerepe, illetve a különböző receptorok endocitosisához való hozzájárulása egyelőre nem eldöntött kérdések, mint ahogy az sem, hogy mely lépések tudnak végbemenni alacsony PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-szintek mellett. Munkám ezen kérdések megválaszolásához szolgáltat új információt. BRET-en alapuló kísérleteinkben kimutattuk, hogy a plazmamembrán PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-depléciója teljes mértékben gátolta az AT<sub>1</sub>R (és más GPCR-ok) megjelenését a korai endoszómában. Az internalizáció kezdeti lépéseit azonban, mint a β-arresztin 2 kötődését a foszforilálódott receptorhoz, ezen foszfoinozítid hiánya nem befolyásolta. Ez azért fontos eredmény, mert a GPCR-okat foszforiláló kinázokról, illetve a β-arresztin 2-ről is kimutatták, hogy képesek PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-ot kötni [167, 176, 177]. Érdekes módon a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> lebontása csak részben volt képes gátolni a receptorok eltávolodását a PM-Venusszal jelölt plazmamembrán-régiókból. Ez felveti annak lehetőségét, hogy aktiválódás után a receptorok elhagyják eredeti helyüket és eljutnak egy bizonyos pontig az endocitózis folyamatában, még jelentősen csökkent plazmamembrán PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-szint mellett is. A lipiddepléció után is megmaradó mozgás megfelelhetne a korábban leírt, plazmamembrán-mikrodomének közötti feltételezett mozgásnak is. Ennek ellentmondani látszik, hogy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> hiányában az e modell szerint szintén a



mikrodoménaváltást jelző, KRas CAAX doménnel mérhető kezdeti emelkedés elmarad. Hozzá kell tenni azonban azt is, hogy az alacsony PtdIns(4,5) $P_2$ -szint feltehetően gátolja az aktivált G<sub>q</sub>-fehérjén és PLC $\beta$ -n keresztüli jelátvitelt, ami a mutáns receptorral kapott eredményekkel összhangban oka lehet a mikrodoménaváltás elmaradásának.

Az az eredmény, hogy az AT<sub>1</sub>R-ok PtdIns(4,5) $P_2$  hiányában is képesek voltak a klatrinnal kolokalizáló, a CCP-knek megfelelő klaszterekbe rendeződni a plazmamembrán mentén, arra utal, hogy a lipiddepléció ezeknek a gödröknek inkább a lefűződését akadályozza, semmint a képződésüket. Ezek az eredmények jól egybevágnak annak a munkacsoportnak a kísérleteivel, melyekben a PtdIns(4,5) $P_2$  depléciója gátolta a TfR-nak az AP-2 komplex által mediált, membránon belüli laterális mozgását, de nem befolyásolta a CCP-k összeszerelődését [133]. Egy másik munkacsoport pedig élesztősejtekben vizsgálódva jutott arra a következtetésre, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  szükséges a CCP-k lefűződéséhez, de a képződésük a lipid hiányában is megmarad [178]. Ezekkel látszólag szemben áll két másik tanulmány, melyekben azt találták, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  akut lebontása az endocitotikus CCP-k elvesztésével jár nyugvó sejtekben [128, 130]. A látszólagos ellentmondás feloldható azzal, hogy az endocitotikus komplex kialakulása nem független a szállítandó molekuláktól, sőt, a „szállítmány” maga is hozzájárulhat a CCP-k stabilizálásához [179], és így befolyásolhatja az endocitózis PtdIns(4,5) $P_2$ -függését. Fontos kiemelni, hogy az említett tanulmányok, melyekben a PtdIns(4,5) $P_2$  lebontása a CCP-k szétesését (vagy keletkezésének gátlását) okozta, nyugvó sejtekben vizsgálták a folyamatot, míg mi a kísérleteinkben az AT<sub>1</sub>R aktivációja által kiváltott CCP-képződést vizsgáltuk.

Annak eldöntésére, hogy ezek az eredmények az AT<sub>1</sub>R-ra specifikus jellegzetességek, vagy általánosabb érvénnyel bírnak, megismételtük a BRET-es kísérleteket más GPCR-okkal is: az AT<sub>1</sub>R-hoz hasonlóan G<sub>q</sub>-fehérjét aktiváló 5HT<sub>2C</sub>R-ral, illetve a G<sub>s</sub>-kapcsolt  $\beta_2$ AR-ral. Mindkét receptornál az AT<sub>1</sub>R-hoz nagyon hasonló hatásokat láttunk minden vizsgált kölcsönhatás esetében: a receptorok megérkezését a Rab5-tel jelzett kompartmentbe teljesen gátolta a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintjének csökkentése; míg a PM-Venusszal mért változásokban mindkét receptornál csak részleges gátlást okozott. Említésre méltó, hogy ez utóbbi gátlás elsősorban későbbi időpontoknál (a megfelelő agonistával történt ingerlés után 2-3 perccel) jelent meg, ami egybevágn azzal a következtetésünkkel, hogy az endocitózis első lépései

PtdIns(4,5) $P_2$ -től függetlenek. Nagyságát tekintve a receptorok és a  $\beta$ -arresztin 2 közötti kölcsönhatást is rezisztensnek találtuk a PtdIns(4,5) $P_2$  depléciójára, bár a  $\beta_2$ AR-nál a szignál kinetikája megváltozott kissé, ez mindenképpen további figyelmet érdemel.

Célunk volt a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciójának az EGFR-ra kifejtett, általunk már korábban leírt gátló hatását [132] BRET-es rendszerünkben is megerősíteni, kvantifikálni. Ez sikerült mind az EGFR és a PM-Venus közötti interakció, mind az endoszóma-jelölésre ebben az esetben a Rab5 helyett használt WDFY2 FYVE domén esetében. A GPCR-okkal ellentétben azonban az EGFR endoszómába jutása nem szűnt meg teljes mértékben PtdIns(4,5) $P_2$  hiányában sem, ami felveti annak lehetőségét, hogy az EGFR klatrintól független internalizációját [180] esetleg nem befolyásolja a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintje, illetve hogy az egyes receptortípusoknál más-más szinten jelentkezhet a PtdIns(4,5) $P_2$ -től való függés.

Jól ismert és alaposan körüljárt tény, hogy a dinamin molekula alapvetően fontos a klatrinburkos vezikulák lefűződéséhez, és ebben a PH doménjén keresztüli PtdIns(4,5) $P_2$ -kötése is szerepet játszik [90-92]. Ennek fényében az eredményeink legkézenfekvőbb magyarázata az lehetne, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$ -depletált plazmamembránban a dinamin működésének zavara okozza az endocitózis gátlását. Mindazonáltal a közelmúltban jó néhány olyan tanulmány látott napvilágot, melyekből a CCP-k membránból való lefűződésig tartó érési folyamata egy komplex eseménysorozatként rajzolódik ki, és ennek részét képezi egyebek mellett bizonyos inozitollipid-módosító enzimek megjelenése és eltűnése is [33, 35]. Erre egy példa, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  defoszforilálása a membrán erősen görbült részein az 5-foszfataz aktivitású szinaptojanin 1 egyik izoformája (Synj1-145) által elősegítette a membránról való lefűződést [34]. Azt is kimutatták, hogy ez a szinaptojanin izoforma nincs jelen a CCP-kben azok teljes élettartama során, csupán közvetlenül a vezikulalefűződés előtt jelenik meg bennük [32]. Egy másik tanulmány arról számol be, hogy a SHIP2 – egy 5-foszfataz, amely képes lebontani a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot – gátolni tudja a CCP-k dinamikáját, ezzel megerősítve azt, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  szükséges a CCP-k éréséhez. Gátló hatásának kifejtéséhez a SHIP2 a kezdeti szakasztól jelen van a CCP-kben, de a lefűződés előtt távozik [36]. Azt is kimutatták, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot előállító PIPKI $\gamma$  enzim közvetlenül kapcsolódik az endocitotikus AP-2 komplexhez [96, 97]. Érdekes módon ez a kapcsolat a klatrinon keresztül is szabályozódhat, mert a polimerizálódó

klatrinkosár eltávolíthatja az enzimet az AP-2 komplextől, ezáltal véget vetve a PtdIns(4,5) $P_2$ -termelésnek és lehetővé téve a PtdIns(4,5) $P_2$ -szint csökkenését, ahogy a klatrinburok összeszerelődése halad előre [17]. Ezekből az eredményekből az szűrhető le, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  eltűnése és újra megjelenése koordinálja a CCP-k éréséhez szükséges fehérjék egymás utáni toborzását, de a folyamat végén szükség van a PtdIns(4,5) $P_2$  jelenlétére a lefűződés elindításához. Bethoney és munkatársai egy nem régen megjelent tanulmányban azt vetették fel, hogy a dinaminnal képes a PtdIns(4,5) $P_2$  molekulákat összegyűjteni a CCP-k nyaki részén, ami döntő szerepet játszhat a lefűződés elindításában [181]. Ez alapján felmerül, hogy a lefűződést végző komplex összeállása és aktiválódása PtdIns(4,5) $P_2$ -függő lépése lehet az endocitózisnak, ami az általam bemutatott eredményekkel is összhangban áll.

Felmerülhet magyarázatként a PtdIns(4,5) $P_2$  depléciója mellett tapasztalt eltérő mértékű gátlásra a Rab5 és PM molekulák esetében, hogy PtdIns(4,5) $P_2$  hiányában a receptorok részben internalizálódnak, de egy Rab5-negatív kompartmentbe kerülnek. Ezt adataink alapján nem zárhatjuk ki, egy friss közlemény talált is olyan receptort (a luteinizálóhormon-receptort), amely képes Rab5-független módon internalizálni [182]. Ebben a közleményben azonban az általunk is vizsgált  $\beta_2$ AR Rab5-függő útvonalon internalizált a korai endoszómákba. Ezenkívül a konfokális mikroszkópos adataink arra utalnak, hogy a receptorok leginkább a plazmamembránban vagy annak közvetlen közelében maradnak PtdIns(4,5) $P_2$  hiányában. A Rab5 mellett használtunk más korai endoszomális markert is: a WDFY2 fehérje FYVE doménjét, amely nem mutat kolokalizációt a Rab5-tel, és feltételezik, hogy egy a plazmamembránhoz közelebbi endoszomális kompartmentet jelöl [161]. Eredményeink alapján ezzel a markerrel sem jön létre BRET-jelemlkedés PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció után a GPCR-ok esetében.

A IV-es típusú 5-foszfátáz (INPP5E), melynek katalitikus doménjét a PtdIns(4,5) $P_2$ -depléciós rendszerünkben használtunk, a PtdIns(3,4,5) $P_3$  molekulát is képes defoszforylálni az 5-ös pozícióban [37]. Így nem zárható ki teljesen az a lehetőség, hogy eredményeink nem a PtdIns(4,5) $P_2$ , hanem a PtdIns(3,4,5) $P_3$  lebontásának következményei. Mindazonáltal a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -ot szintetizáló PI3K-ok gátlása wortmanninnal nem befolyásolja érdemben az endocitotikus CCP-k dinamikáját [183], és – ami még fontosabb – nem gátolja az AT<sub>1</sub>R internalizációját [149], így joggal feltételezhetjük, hogy a tapasztalt gátlás a PtdIns(4,5) $P_2$  hiányából adódott.

Az általunk használt 5-foszfátáz a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot PtdIns(4) $P$ -tá alakítja, így az is felmerülhet, hogy a látott hatásokat nem az előbbi lipid hiánya, hanem az utóbbi felszaporodása váltja ki. Ez különösen annak fényében lehet érdekes, hogy a PtdIns(4) $P$ -ról az utóbbi időben egyre elfogadottabbá válik, hogy önálló szabályozómolekula, és nem csupán a PtdIns(4,5) $P_2$  előalakja [134]. Kísérleteink azonban arra utalnak, hogy ebben az esetben nem erről van szó. Amikor heterodimerizációs rendszerünkkel a 4-foszfátáz aktivitású Sac1 enzimet helyeztük a plazmamembránba, amely a PtdIns(4,5) $P_2$ -ot nem bontja, és ezzel szelektíven a PtdIns(4) $P$  szintjét csökkentettük, nem tapasztaltunk gátlást a  $\beta_2$ AR endocitózisában. A PtdIns(4) $P$  és PtdIns(4,5) $P_2$  együttes lebontása azonban létrehozta a gátlást, tehát az 5-foszfátáz használatakor a hatásért nem a felszaporodó PtdIns(4) $P$  felelt. Bár a PtdIns(4,5) $P_2$  és PtdIns(4) $P$  helyettesíthetik egymást bizonyos funkciókban, például egyes ioncsatornák szabályozásában [70], de kísérleteinkből az is látható, hogy a GPCR-ok endocitózisában a PtdIns(4,5) $P_2$  szerepel, ami megfelel az irodalmi konszenzusnak.

A plazmamembrán-receptorok aktiválódása gyakran együttjár a PtdIns(4,5) $P_2$ -szint csökkenésével, és számos adat utal arra, hogy ebben egy hormonszenzitív lipidkészlet játszik szerepet [11, 168, 184]. Az azonban, hogy ez mennyire különül el a plazmamembrán általános lipidkészletétől, nem tisztázott. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  hormon által indukált és PLC $\beta$  által mediált hidrolízise képes-e az 5-foszfátázzal létrehozott depléciónhoz hasonlóan gátolni egy GPCR (esetünkben a  $\beta_2$ AR) endocitózisát. A PLC $\beta$ -n keresztüli lipidbontáshoz az AT $_1$ R-t hívtuk segítségül. Sikerült megmutatnunk, hogy amennyiben a hormonindukált PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontást az internalizációra nem képes mutáns AT $_1$ R-ral hoztuk létre, a  $\beta_2$ AR endocitózisa annak ellenére sem volt gátolt, hogy a depléción (lipidkötő fehérjedoménnel mérhető) mértéke nagyobb volt, mint az 5-foszfátázzal létrehozott, már jelentős endocitózisgátlást okozó lipidlebontás esetében. Ez az eredmény a korábbi felvetésekkel összhangban arra utal, hogy különböző PtdIns(4,5) $P_2$ -készletek lehetnek szükségesek a receptorok által elindított jelátvitelhez és a receptorok endocitózisához. Ezzel egybevág, hogy az AT $_1$ R G-fehérjét nem aktiváló mutánsával (DRY-AAY) végzett kísérleteink, melyekben az endocitózis mértéke összességében nem volt nagyobb a vad típusú receptorhoz képest, a receptor és plazmamembrán jelölő molekulák (PM),

valamint a receptor és Rab5 közötti energiatranszfert mérve. Megjegyzendő azonban, hogy az ingerlést követő első néhány percben mindkét említett mérésben kissé nagyobb volt a jelváltozás mértéke a DRY-AAY mutánsnál (13. ábra B és C). Ez tükrözheti esetleg a receptor aktiválódását követő jelentős mértékű PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontás gátló hatását (amely tehát elmarad a DRY-AAY esetében, gyorsabb jelváltozást idézve elő). A későbbi időpontokban azonban ez a különbség kiegyenlítődik, sőt, a PM-Venus esetében megfordul, annak ellenére, hogy méréseink szerint az AT<sub>1</sub>R aktiválódását követően a PtdIns(4,5) $P_2$  szintje a kiindulási értéknél tartósan alacsonyabb lesz (34. ábra).

Érdekes módon a vad típusú AT<sub>1</sub>R ingerlése képes volt gátolni a  $\beta_2$ AR endocitózist, amit a fentiek fényében kétféleképpen értelmezhetünk. Az egyik lehetőség, hogy a vad típusú AT<sub>1</sub>R aktiválódását követően elmozdult az endocitotikus membránrészek felé, és így ott hozta létre a lipidbontást, ahol az gátolni tudta a másik receptor endocitózist. A másik lehetőség, hogy az AT<sub>1</sub>R nem a lipidbontáson keresztül, hanem kompetitív módon, a saját endocitózisa révén korlátozta a másik receptor hozzáférését az endocitotikus gépezethez. Ez nem lenne meglepő az általunk használt rendszerben, ahol a receptorokat tranziens transzfekcióval fejezzük ki, a fiziológiánál jóval nagyobb mértékben, de az endocitózishoz ezek a receptorok a sejtek endogén endocitotikus fehérjekészletét használják; ilyen körülmények között már megfigyeltek versengést más receptorok esetében [185]. Elvégzett kísérleteink a két említett lehetőség között nem tudnak különbséget tenni, így a kérdés megválaszolása további vizsgálatot igényel.

Végül, de nem utolsó sorban munkánk fontos részét képezte a heterodimerizáción alapuló lipiddepléciós rendszer fejlesztése. A rendszer működéséhez szükséges két fehérje virális T2A szekvencián keresztüli összekötésével elértük, hogy azok egyetlen plazmidból kifejezhetőek legyenek, és ekvimoláris mennyiségben termelődjenek. A PtdIns(4,5) $P_2$ -depléció sejtpopulációk szintjén mérve az új rendszerrel is az eredetihez hasonló mértékű maradt, és a kifejeződő fehérjék azonos aránya kiszámíthatóvá teszi a várható depléció mértékét (természetesen az expressziós szint függvényében), ami jelentős előrelépést jelent, különösen az olyan kísérleteknél, mint az egysejtes szinten végzett konfokális mikroszkópia.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkám során plazmamembrán-receptorok aktiválódást követő mozgását és endocitózisát vizsgáltam, illetve a foszfoinozitidek szerepét ezekben a folyamatokban. Eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- Kialakítottunk egy olyan rendszert, amellyel élő sejtekben, molekuláris kölcsönhatások sorozatának vizsgálatával követhető a plazmamembrán-receptorok aktiválódás utáni membránon belüli mozgása, illetve endocitózisa.
- Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a vad típusú AT<sub>1</sub>R nem egyenletesen oszlik el a plazmamembránban, hanem specifikus mikrodoménekben található meg, és aktiválódása után (de internalizációja előtt) a plazmamembránon belüli eloszlása megváltozik, melyhez feltehetően szükséges a G-fehérje aktiválódása. Az AT<sub>1</sub>R-ra jellemző plazmamembránon belüli változások nem jelennek meg az 5HT<sub>2C</sub>R, illetve az EGFR aktiválódása után.
- Megmutattuk, hogy az AT<sub>1</sub>R és két másik G-fehérjéhez kapcsolt receptor ( $\beta_2$ AR és 5HT<sub>2C</sub>R) ingerlést követő endocitózisa során a  $\beta$ -arresztin 2 kötődése a receptorhoz PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-tól függetlenül megy végbe. A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> lebontása a receptorok plazmamembrántól való eltávolodását részlegesen, korai endoszómában való megjelenésüket pedig teljesen gátolta. Kimutattuk, hogy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> hiányában az aktivált AT<sub>1</sub>R eljut a plazmamembrán klatrinburkos struktúráiba, de azok érése és/vagy a klatrinburkos vezikulák lefűződése a plazmamembránról gátolt. Kísérleteinkben megerősítést nyert, hogy a PtdIns(4)P nem szükséges a  $\beta_2$ AR aktiválódást követő endocitózisához, és nem képes pótolni a hiányzó PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> funkcióját a folyamatban.
- Megállapítottuk, hogy az 5-foszfataz segítségével létrehozott PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-deplációval szemben az internalizációra nem kerülő mutáns AT<sub>1</sub>R-on keresztül, a PLC $\beta$  aktiválásával kiváltott foszfoinozítid-lebontás nem képes gátolni a  $\beta_2$ AR endocitózisát. Ez az eredmény alátámasztja azt a korábbi felvetést, mely szerint a plazmamembránban funkcionálisan elkülönülő PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-készletek lehetnek jelen.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtek külső ingerekre adott válaszkészségét alapvetően befolyásolja a felszínükön található receptorok száma, melyet az oda kikerülő, és onnan endocitózissal eltávolított receptorok dinamikus egyensúlya határoz meg. A plazmamembrán citoplazmatikus oldalán található foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátról [PtdIns(4,5) $P_2$ ] jól ismert, hogy számos más sejt működés mellett az endocitózis szabályozásában is részt vesz, de ezen funkciójának még nem minden részlete tisztázott.

Kísérleteinkben először egy olyan rendszer kidolgozására törekedtünk, melyben a molekuláris közelséget érzékenyen kimutató biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) felhasználásával követni tudjuk plazmamembrán-receptorok aktiválódás utáni, membránon belüli mozgását, illetve endocitózisuk egymást követő molekuláris interakcióit élő HEK293 sejtekben. Ezen rendszer segítségével sikerült kimutatnunk, hogy az 1-es típusú angiotenzinreceptornak ( $AT_1R$ ) ingerlést követően eltérően változik a különböző plazmamembrán-mikrodoméneket jelölő molekulákkal való kapcsolata, ami feltehetően a G-fehérje aktiválásától függő folyamat, és általunk vizsgált más receptorokban ( $5HT_{2C}R$  és EGFR) nem figyelhető meg.

További kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy milyen szerepet játszik a PtdIns(4,5) $P_2$  a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok endocitózisában. Ehhez a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -szintjét egy 5-foszfátáz domén akut és indukálható plazmamembránba való áthelyezésével csökkentettük, és a receptorok endocitózisának lépéseit a már említett BRET-alapú módszerrel követtük. Megállapítottuk, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  depléciója meggátolja az általunk vizsgált G-fehérjéhez kapcsolt receptorok ( $AT_1R$ ,  $5HT_{2C}R$  és  $\beta_2AR$ ) aktiválódást követő megjelenését a korai endoszómában, a  $\beta$ -arresztin 2 kötődése a receptorokhoz azonban PtdIns(4,5) $P_2$ -tól függetlenül megy végbe. Konfokális mikroszkóppal megmutattuk, hogy az  $AT_1R$  aktiválódás után PtdIns(4,5) $P_2$  hiányában is képes klasztereket képezni a plazmamembrán klatrinburkos struktúráiban, de a sejt belsejébe nem jut be.

Kimutattuk, hogy a plazmamembrán PtdIns(4) $P$  szelektív lebontása nem akadályozza meg a  $\beta_2AR$  endocitózisát, és az 5-foszfátázzal létrehozottal ellentétben a foszfolipáz C aktiválásán keresztül előidézett PtdIns(4,5) $P_2$ -lebontás sem gátolja a receptorendocitózist. Ez utóbbi eredmény a plazmamembránban funkcionálisan elkülönülő PtdIns(4,5) $P_2$ -készletek jelenlétét valószínűsíti.

## 9. SUMMARY

Responsiveness of cells to external stimuli is substantially affected by the number of receptors on the cell surface which in turn is determined by the dynamic balance between the delivery of receptors to the plasma membrane and their removal by endocytosis. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5) $P_2$ ], located on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane, has been shown to regulate endocytosis among several other cellular functions. However, not every detail of its role in this process is clear yet.

In our experimental work we aimed to develop a set-up for the monitoring of post-stimulatory receptor movement both within the plasma membrane and along the endocytic route by measuring molecular proximity with the highly sensitive method of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in live HEK293 cells. Using this set-up we managed to show that type 1 angiotensin receptor (AT<sub>1</sub>R) produces differential signal changes upon stimulation with markers labeling different plasma membrane microdomains. We found this process to be dependent on G protein activation but did not observe similar changes with other investigated receptors (5HT<sub>2C</sub>R and EGFR) in our system.

In further studies we addressed the role of PtdIns(4,5) $P_2$  in G protein-coupled receptor (GPCR) endocytosis. We used the acute and inducible recruitment of a 5-phosphatase domain to the plasma membrane for depletion of PtdIns(4,5) $P_2$  there and followed receptor endocytosis under these conditions with the help of the above mentioned BRET-based method. We concluded that while PtdIns(4,5) $P_2$ -degradation prevented the appearance of the GPCRs examined (i.e. AT<sub>1</sub>R, 5HT<sub>2C</sub>R and  $\beta_2$ AR) in the early endosome after stimulation, it had no effect on their interaction with  $\beta$ -arrestin 2. Using confocal microscopy we showed that activated AT<sub>1</sub>Rs are able to cluster along the plasma membrane into clathrin-containing structures even in the absence of PtdIns(4,5) $P_2$  but cannot enter the cells under these conditions.

We found that selective elimination of PtdIns(4) $P$  from the plasma membrane did not affect the endocytosis of  $\beta_2$ AR. In contrast with the 5-phosphatase-induced method PtdIns(4,5) $P_2$ -depletion elicited by the activation of phospholipase C did not inhibit receptor endocytosis. These data suggest the existence of functionally distinct PtdIns(4,5) $P_2$  pools in the plasma membrane.



## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Epand RM. (2012) Recognition of polyunsaturated acyl chains by enzymes acting on membrane lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1818: 957-62.
- [2] Shisheva A. (2008) Phosphoinositides in insulin action on GLUT4 dynamics: not just PtdIns(3,4,5)P3. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295: E536-44.
- [3] Balla T. (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev*, 93: 1019-137.
- [4] Di Paolo G, De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443: 651-7.
- [5] Wenk MR, Lucast L, Di Paolo G, Romanelli AJ, Suchy SF, Nussbaum RL, Cline GW, Shulman GI, McMurray W, De Camilli P. (2003) Phosphoinositide profiling in complex lipid mixtures using electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 21: 813-7.
- [6] Nasuhoglu C, Feng S, Mao J, Yamamoto M, Yin HL, Earnest S, Barylko B, Albanesi JP, Hilgemann DW. (2002) Nonradioactive analysis of phosphatidylinositides and other anionic phospholipids by anion-exchange high-performance liquid chromatography with suppressed conductivity detection. *Anal Biochem*, 301: 243-54.
- [7] Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A. (2009) Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res*, 48: 307-43.
- [8] Kadamur G, Ross EM. (2013) Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol*, 75: 127-54.
- [9] Kim YJ, Guzman-Hernandez ML, Balla T. (2011) A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositol-synthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes. *Dev Cell*, 21: 813-24.
- [10] Downes P, Michell RH. (1982) Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: lipids in search of a function. *Cell Calcium*, 3: 467-502.

- [11] Balla A, Kim YJ, Varnai P, Szentpetery Z, Knight Z, Shokat KM, Balla T. (2008) Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol Biol Cell*, 19: 711-21.
- [12] Bojjireddy N, Botyanszki J, Hammond G, Creech D, Peterson R, Kemp DC, Snead M, Brown R, Morrison A, Wilson S, Harrison S, Moore C, Balla T. (2014) Pharmacological and genetic targeting of the PI4KA enzyme reveals its important role in maintaining plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *J Biol Chem*, 289: 6120-32.
- [13] Nakatsu F, Baskin JM, Chung J, Tanner LB, Shui G, Lee SY, Pirruccello M, Hao M, Ingolia NT, Wenk MR, De Camilli P. (2012) PtdIns4P synthesis by PI4KIIIalpha at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity. *J Cell Biol*, 199: 1003-16.
- [14] Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N. (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, 141: 799-811.
- [15] Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. (2003) Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *J Membr Biol*, 194: 77-89.
- [16] Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ, Anderson RA. (2007) A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 42: 15-39.
- [17] Thieman JR, Mishra SK, Ling K, Doray B, Anderson RA, Traub LM. (2009) Clathrin regulates the association of PIPKIgamma661 with the AP-2 adaptor beta2 appendage. *J Biol Chem*, 284: 13924-39.
- [18] Lamia KA, Peroni OD, Kim YB, Rameh LE, Kahn BB, Cantley LC. (2004) Increased insulin sensitivity and reduced adiposity in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase beta<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol*, 24: 5080-7.

- [19] Ikononov OC, Sbrissa D, Fligger J, Delvecchio K, Shisheva A. (2010) ArPIKfyve regulates Sac3 protein abundance and turnover: disruption of the mechanism by Sac3I41T mutation causing Charcot-Marie-Tooth 4J disorder. *J Biol Chem*, 285: 26760-4.
- [20] Oppelt A, Lobert VH, Haglund K, Mackey AM, Rameh LE, Liestol K, Schink KO, Pedersen NM, Wenzel EM, Haugsten EM, Brech A, Rusten TE, Stenmark H, Wesche J. (2013) Production of phosphatidylinositol 5-phosphate via PIKfyve and MTMR3 regulates cell migration. *EMBO Rep*, 14: 57-64.
- [21] Traynor-Kaplan AE, Thompson BL, Harris AL, Taylor P, Omann GM, Sklar LA. (1989) Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. *J Biol Chem*, 264: 15668-73.
- [22] Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 34: 115-27.
- [23] Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC. (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci*, 30: 194-204.
- [24] Ciralo E, Iezzi M, Marone R, Marengo S, Curcio C, Costa C, Azzolino O, Gonella C, Rubinetto C, Wu H, Dastru W, Martin EL, Silengo L, Altruda F, Turco E, Lanzetti L, Musiani P, Ruckle T, Rommel C, Backer JM, Forni G, Wymann MP, Hirsch E. (2008) Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci Signal*, 1: ra3.
- [25] Gyori D, Csete D, Benko S, Kulkarni S, Mandl P, Dobo-Nagy C, Vanhaesebroeck B, Stephens L, P TH, Mocsai A. (2014) The phosphoinositide-3-kinase isoform PI3Kbeta regulates osteoclast-mediated bone resorption. *Arthritis Rheumatol*. doi: 10.1002/art.38660.
- [26] Posor Y, Eichhorn-Gruenig M, Puchkov D, Schoneberg J, Ullrich A, Lampe A, Muller R, Zarbakhsh S, Gulluni F, Hirsch E, Krauss M, Schultz C, Schmoranzer J, Noe F, Haucke V. (2013) Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature*, 499: 233-7.

- [27] F OF, Rusten TE, Stenmark H. (2013) Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS J*, 280: 6322-37.
- [28] Dyson JM, Fedele CG, Davies EM, Becanovic J, Mitchell CA. (2012) Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases. *Subcell Biochem*, 58: 215-79.
- [29] Pirruccello M, De Camilli P. (2012) Inositol 5-phosphatases: insights from the Lowe syndrome protein OCRL. *Trends Biochem Sci*, 37: 134-43.
- [30] McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P. (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, 379: 353-7.
- [31] Kim S, Kim H, Chang B, Ahn N, Hwang S, Di Paolo G, Chang S. (2006) Regulation of transferrin recycling kinetics by PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> availability. *Faseb J*, 20: 2399-401.
- [32] Perera RM, Zoncu R, Lucast L, De Camilli P, Toomre D. (2006) Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19332-7.
- [33] Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. (2011) A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 9: e1000604.
- [34] Chang-Ileto B, Frere SG, Chan RB, Voronov SV, Roux A, Di Paolo G. (2011) Synaptojanin 1-mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis is modulated by membrane curvature and facilitates membrane fission. *Dev Cell*, 20: 206-18.
- [35] Antonescu CN, Aguet F, Danuser G, Schmid SL. (2011) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell*, 22: 2588-600.
- [36] Nakatsu F, Perera RM, Lucast L, Zoncu R, Domin J, Gertler FB, Toomre D, De Camilli P. (2010) The inositol 5-phosphatase SHIP2 regulates endocytic clathrin-coated pit dynamics. *J Cell Biol*, 190: 307-15.

- [37] Kisseleva MV, Wilson MP, Majerus PW. (2000) The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem*, 275: 20110-6.
- [38] Jacoby M, Cox JJ, Gayral S, Hampshire DJ, Ayub M, Blockmans M, Pernot E, Kisseleva MV, Compere P, Schiffmann SN, Gergely F, Riley JH, Perez-Morga D, Woods CG, Schurmans S. (2009) INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat Genet*, 41: 1027-31.
- [39] Shin HW, Hayashi M, Christoforidis S, Lacas-Gervais S, Hoepfner S, Wenk MR, Modregger J, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Nystuen A, Frankel WN, Solimena M, De Camilli P, Zerial M. (2005) An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol*, 170: 607-18.
- [40] Davies EM, Sheffield DA, Tibarewal P, Fedele CG, Mitchell CA, Leslie NR. (2012) The PTEN and Myotubularin Phosphoinositide 3-Phosphatases: Linking Lipid Signalling to Human Disease. *Subcell Biochem*, 58: 281-336.
- [41] Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 283-96.
- [42] Hnia K, Vaccari I, Bolino A, Laporte J. (2012) Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*, 18: 317-27.
- [43] Guo S, Stolz LE, Lemrow SM, York JD. (1999) SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem*, 274: 12990-5.
- [44] Hughes WE, Woscholski R, Cooke FT, Patrick RS, Dove SK, McDonald NQ, Parker PJ. (2000) SAC1 encodes a regulated lipid phosphoinositide phosphatase, defects in which can be suppressed by the homologous Inp52p and Inp53p phosphatases. *J Biol Chem*, 275: 801-8.
- [45] Liu Y, Boukhelifa M, Tribble E, Morin-Kensicki E, Uetrecht A, Bear JE, Bankaitis VA. (2008) The Sac1 phosphoinositide phosphatase regulates Golgi

- membrane morphology and mitotic spindle organization in mammals. *Mol Biol Cell*, 19: 3080-96.
- [46] Hicks SN, Jezyk MR, Gershburg S, Seifert JP, Harden TK, Sondek J. (2008) General and versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Mol Cell*, 31: 383-94.
- [47] Gresset A, Sondek J, Harden TK. (2012) The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell Biochem*, 58: 61-94.
- [48] Harden TK, Waldo GL, Hicks SN, Sondek J. (2011) Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C-beta signaling nodes. *Chem Rev*, 111: 6120-9.
- [49] Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, Wang X, Montell C, Kozasa T, Sondek J, Harden TK. (2010) Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science*, 330: 974-80.
- [50] Philip F, Kadamur G, Silos RG, Woodson J, Ross EM. (2010) Synergistic activation of phospholipase C-beta3 by Galpha(q) and Gbetagamma describes a simple two-state coincidence detector. *Curr Biol*, 20: 1327-35.
- [51] Gutman O, Walliser C, Piechulek T, Gierschik P, Henis YI. (2010) Differential regulation of phospholipase C-beta2 activity and membrane interaction by Galphaq, Gbeta1gamma2, and Rac2. *J Biol Chem*, 285: 3905-15.
- [52] Fiume R, Ramazzotti G, Teti G, Chiarini F, Faenza I, Mazzotti G, Billi AM, Cocco L. (2009) Involvement of nuclear PLCbeta1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression. *FASEB J*, 23: 957-66.
- [53] Gresset A, Hicks SN, Harden TK, Sondek J. (2010) Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *J Biol Chem*, 285: 35836-47.
- [54] Homma Y, Takenawa T, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K. (1989) Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun*, 164: 406-12.
- [55] Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mocsai A. (2009) Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil

- functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 206: 577-93.
- [56] Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu SH. (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*, 41: 415-34.
- [57] Allen V, Swigart P, Cheung R, Cockcroft S, Katan M. (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca<sup>2+</sup> ion concentrations. *Biochem J*, 327 ( Pt 2): 545-52.
- [58] Rebecchi MJ, Pentylala SN. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, 80: 1291-335.
- [59] Varnai P, Balla T. (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[<sup>3</sup>H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol*, 143: 501-10.
- [60] Nakamura Y, Hamada Y, Fujiwara T, Enomoto H, Hiroe T, Tanaka S, Nose M, Nakahara M, Yoshida N, Takenawa T, Fukami K. (2005) Phospholipase C-delta1 and -delta3 are essential in the trophoblast for placental development. *Mol Cell Biol*, 25: 10979-88.
- [61] Smrcka AV, Brown JH, Holz GG. (2012) Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal*, 24: 1333-43.
- [62] Berridge MJ. (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1793: 933-40.
- [63] Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 195-203.
- [64] Gamper N, Shapiro MS. (2007) Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat Rev Neurosci*, 8: 921-34.
- [65] Rohacs T, Nilius B. (2007) Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch*, 455: 157-68.
- [66] Kruse M, Hammond GR, Hille B. (2012) Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4,5)P<sub>2</sub>. *J Gen Physiol*, 140: 189-205.

- [67] Lopes CM, Rohacs T, Czirjak G, Balla T, Enyedi P, Logothetis DE. (2005) PIP<sub>2</sub> hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *J Physiol*, 564: 117-29.
- [68] Czirjak G, Petheo GL, Spat A, Enyedi P. (2001) Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281: C700-8.
- [69] Korzeniowski MK, Popovic MA, Szentpetery Z, Varnai P, Stojilkovic SS, Balla T. (2009) Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *J Biol Chem*, 284: 21027-35.
- [70] Lukacs V, Yudin Y, Hammond GR, Sharma E, Fukami K, Rohacs T. (2013) Distinctive changes in plasma membrane phosphoinositides underlie differential regulation of TRPV1 in nociceptive neurons. *J Neurosci*, 33: 11451-63.
- [71] Milosevic I, Sorensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, Jahn R, Neher E. (2005) Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci*, 25: 2557-65.
- [72] Sun Y, Thapa N, Hedman AC, Anderson RA. (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: targeted production and signaling. *Bioessays*, 35: 513-22.
- [73] Santiago-Tirado FH, Bretscher A. (2011) Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol*, 21: 515-25.
- [74] De Matteis MA, Wilson C, D'Angelo G. (2013) Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond. *Bioessays*, 35: 612-22.
- [75] Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, Sim R, Wiharto PA, Galbraith KA, Madhavarapu S, Fuchs GJ, Meerloo T, Farquhar MG, Zhou H, Field SJ. (2009) GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell*, 139: 337-51.
- [76] Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J*, 19: 4577-88.



- [77] Lindmo K, Stenmark H. (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci*, 119: 605-14.
- [78] Shah ZH, Jones DR, Sommer L, Foulger R, Bultsma Y, D'Santos C, Divecha N. (2013) Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. *FEBS J*, 280: 6295-310.
- [79] Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Ferguson CG, Payrastre B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD, Yuan J. (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*, 114: 99-111.
- [80] Doherty GJ, McMahon HT. (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem.* doi.
- [81] Kumari S, Mg S, Mayor S. (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res*, 20: 256-75.
- [82] Maldonado-Baez L, Williamson C, Donaldson JG. (2013) Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp Cell Res*, 319: 2759-69.
- [83] McMahon HT, Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 517-33.
- [84] Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, McMahon HT. (2010) FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 328: 1281-4.
- [85] Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T. (2012) The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 150: 495-507.
- [86] Godlee C, Kaksonen M. (2013) Review series: From uncertain beginnings: initiation mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 203: 717-25.
- [87] Traub LM. (2009) Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 583-96.

- [88] Aguet F, Antonescu CN, Mettlen M, Schmid SL, Danuser G. (2013) Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Dev Cell*, 26: 279-91.
- [89] Daumke O, Roux A, Haucke V. (2014) BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell*, 156: 882-92.
- [90] Achiriloaie M, Barylko B, Albanesi JP. (1999) Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*, 19: 1410-5.
- [91] Lee A, Frank DW, Marks MS, Lemmon MA. (1999) Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol*, 9: 261-4.
- [92] Vallis Y, Wigge P, Marks B, Evans PR, McMahon HT. (1999) Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*, 9: 257-60.
- [93] Haucke V, Di Paolo G. (2007) Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol*, 19: 426-35.
- [94] Balla T. (2005) Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci*, 118: 2093-104.
- [95] Krauss M, Haucke V. (2007) Phosphoinositides: regulators of membrane traffic and protein function. *FEBS Lett*, 581: 2105-11.
- [96] Bairstow SF, Ling K, Su X, Firestone AJ, Carbonara C, Anderson RA. (2006) Type Iγ661 phosphatidylinositol phosphate kinase directly interacts with AP2 and regulates endocytosis. *J Biol Chem*, 281: 20632-42.
- [97] Krauss M, Kukhtina V, Pechstein A, Haucke V. (2006) Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate synthesis by AP-2μ-cargo complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11934-9.
- [98] Schmid SL, Mettlen M. (2013) Cell biology: Lipid switches and traffic control. *Nature*, 499: 161-2.

- [99] Mayor S, Pagano RE. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 603-12.
- [100] Sigismund S, Confalonieri S, Ciliberto A, Polo S, Scita G, Di Fiore PP. (2012) Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiol Rev*, 92: 273-366.
- [101] Parton RG, del Pozo MA. (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 98-112.
- [102] Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 8: 46-54.
- [103] Howes MT, Kirkham M, Riches J, Cortese K, Walser PJ, Simpson F, Hill MM, Jones A, Lundmark R, Lindsay MR, Hernandez-Deviez DJ, Hadzic G, McCluskey A, Bashir R, Liu L, Pilch P, McMahon H, Robinson PJ, Hancock JF, Mayor S, Parton RG. (2010) Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol*, 190: 675-91.
- [104] Aikawa Y, Martin TF. (2005) ADP-ribosylation factor 6 regulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis, endocytosis, and exocytosis. *Methods Enzymol*, 404: 422-31.
- [105] Gagnon AW, Kallal L, Benovic JL. (1998) Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 273: 6976-81.
- [106] Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. (2010) Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31: 221-8.
- [107] Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10782-7.
- [108] Lefkowitz RJ, Shenoy SK. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308: 512-7.

- [109] Sorkin A, von Zastrow M. (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 609-22.
- [110] Scita G, Di Fiore PP. (2010) The endocytic matrix. *Nature*, 463: 464-73.
- [111] Sorkin A, Goh LK. (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res*, 315: 683-96.
- [112] Goh LK, Sorkin A. (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a017459.
- [113] Rao Y, Ruckert C, Saenger W, Haucke V. (2012) The early steps of endocytosis: from cargo selection to membrane deformation. *Eur J Cell Biol*, 91: 226-33.
- [114] Traub LM, Bonifacino JS. (2013) Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a016790.
- [115] Reider A, Wendland B. (2011) Endocytic adaptors--social networking at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 124: 1613-22.
- [116] Wolfe BL, Trejo J. (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic*, 8: 462-70.
- [117] Moore CA, Milano SK, Benovic JL. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69: 451-82.
- [118] Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*, 275: 23120-6.
- [119] Wakelam MJ. (2014) The uses and limitations of the analysis of cellular phosphoinositides by lipidomic and imaging methodologies. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.04.005.
- [120] Balla T, Varnai P. (2002) Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. *Sci STKE*, 2002: PL3.
- [121] Varnai P, Rother KI, Balla T. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem*, 274: 10983-9.

- [122] Varnai P, Balla T. (2007) Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains. *Pflugers Arch*, 455: 69-82.
- [123] Li X, Wang X, Zhang X, Zhao M, Tsang WL, Zhang Y, Yau RG, Weisman LS, Xu H. (2013) Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 21165-70.
- [124] Hammond GR, Dove SK, Nicol A, Pinxteren JA, Zicha D, Schiavo G. (2006) Elimination of plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is required for exocytosis from mast cells. *J Cell Sci*, 119: 2084-94.
- [125] Yip SC, Eddy RJ, Branch AM, Pang H, Wu H, Yan Y, Drees BE, Neilsen PO, Condeelis J, Backer JM. (2008) Quantification of PtdIns(3,4,5)P(3) dynamics in EGF-stimulated carcinoma cells: a comparison of PH-domain-mediated methods with immunological methods. *Biochem J*, 411: 441-8.
- [126] Hammond GR, Schiavo G, Irvine RF. (2009) Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P(2). *Biochem J*, 422: 23-35.
- [127] Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL. (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol*, 8: 1399-402.
- [128] Zoncu R, Perera RM, Sebastian R, Nakatsu F, Chen H, Balla T, Ayala G, Toomre D, De Camilli PV. (2007) Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 3793-8.
- [129] Padron D, Wang YJ, Yamamoto M, Yin H, Roth MG. (2003) Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase Ibeta recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *J Cell Biol*, 162: 693-701.

- [130] Boucrot E, Saffarian S, Massol R, Kirchhausen T, Ehrlich M. (2006) Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits. *Exp Cell Res*, 312: 4036-48.
- [131] Suh BC, Inoue T, Meyer T, Hille B. (2006) Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gate KCNQ ion channels. *Science*, 314: 1454-7.
- [132] Varnai P, Thyagarajan B, Rohacs T, Balla T. (2006) Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol*, 175: 377-82.
- [133] Abe N, Inoue T, Galvez T, Klein L, Meyer T. (2008) Dissecting the role of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in endocytosis and recycling of the transferrin receptor. *J Cell Sci*, 121: 1488-94.
- [134] Hammond GR, Fischer MJ, Anderson KE, Holdich J, Koteci A, Balla T, Irvine RF. (2012) PI4P and PI(4,5)P<sub>2</sub> are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science*, 337: 727-30.
- [135] Szentpetery Z, Varnai P, Balla T. (2010) Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 8225-30.
- [136] Idevall-Hagren O, Dickson EJ, Hille B, Toomre DK, De Camilli P. (2012) Optogenetic control of phosphoinositide metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2316-23.
- [137] Hammond GR. (2012) Membrane biology: Making light work of lipids. *Curr Biol*, 22: R869-71.
- [138] Falkenburger BH, Jensen JB, Hille B. (2010) Kinetics of PIP<sub>2</sub> metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *J Gen Physiol*, 135: 99-114.
- [139] Hertel F, Switalski A, Mintert-Jancke E, Karavassilidou K, Bender K, Pott L, Kienitz MC. (2011) A genetically encoded tool kit for manipulating and monitoring membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in intact cells. *PLoS One*, 6: e20855.

- [140] Turu G, Szidonya L, Gaborik Z, Buday L, Spat A, Clark AJ, Hunyady L. (2006) Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS Lett*, 580: 41-5.
- [141] Gaborik Z, Jagadeesh G, Zhang M, Spat A, Catt KJ, Hunyady L. (2003) The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology*, 144: 2220-8.
- [142] Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ. (1994) Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem*, 269: 31378-82.
- [143] Thomas WG, Motel TJ, Kule CE, Karoor V, Baker KM. (1998) Phosphorylation of the angiotensin II (AT1A) receptor carboxyl terminus: a role in receptor endocytosis. *Mol Endocrinol*, 12: 1513-24.
- [144] Woo J, von Arnim AG. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla. *Plant Methods*, 4: 23.
- [145] Price RD, Weiner DM, Chang MS, Sanders-Bush E. (2001) RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters receptor-mediated activation of G13 protein. *J Biol Chem*, 276: 44663-8.
- [146] Varnai P, Bondeva T, Tamas P, Toth B, Buday L, Hunyady L, Balla T. (2005) Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin-homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> suggest their interaction with protein binding partners. *J Cell Sci*, 118: 4879-88.
- [147] Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol*, 22: 445-9.
- [148] Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 20: 87-90.
- [149] Hunyady L, Baukal AJ, Gaborik Z, Olivares-Reyes JA, Bor M, Szaszak M, Lodge R, Catt KJ, Balla T. (2002) Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *J Cell Biol*, 157: 1211-22.

- [150] Varnai P, Toth B, Toth DJ, Hunyady L, Balla T. (2007) Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem*, 282: 29678-90.
- [151] Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 296: 913-6.
- [152] Johnson CM, Chichili GR, Rodgers W. (2008) Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. *J Biol Chem*, 283: 29920-8.
- [153] Niv H, Gutman O, Kloog Y, Henis YI. (2002) Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol*, 157: 865-72.
- [154] Yim YI, Sun T, Wu LG, Raimondi A, De Camilli P, Eisenberg E, Greene LE. (2010) Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 4412-7.
- [155] Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. (2004) Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol*, 22: 589-94.
- [156] Miyawaki A. (2011) Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem*, 80: 357-73.
- [157] Boute N, Jockers R, Issad T. (2002) The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci*, 23: 351-4.
- [158] Xu Y, Piston DW, Johnson CH. (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 151-6.
- [159] Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using



- bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3684-9.
- [160] Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70: 715-28.
- [161] Hayakawa A, Leonard D, Murphy S, Hayes S, Soto M, Fogarty K, Standley C, Bellve K, Lambright D, Mello C, Corvera S. (2006) The WD40 and FYVE domain containing protein 2 defines a class of early endosomes necessary for endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11928-33.
- [162] Heuser JE, Anderson RG. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol*, 108: 389-400.
- [163] Szidonya L, Supeki K, Karip E, Turu G, Varnai P, Clark AJ, Hunyady L. (2007) AT1 receptor blocker-insensitive mutant AT1A angiotensin receptors reveal the presence of G protein-independent signaling in C9 cells. *Biochem Pharmacol*, 73: 1582-92.
- [164] Bonde MM, Hansen JT, Sanni SJ, Haunso S, Gammeltoft S, Lyngso C, Hansen JL. (2010) Biased signaling of the angiotensin II type 1 receptor can be mediated through distinct mechanisms. *PLoS One*, 5: e14135.
- [165] Qian H, Pipolo L, Thomas WG. (2001) Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. *Mol Endocrinol*, 15: 1706-19.
- [166] Marion S, Weiner DM, Caron MG. (2004) RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. *J Biol Chem*, 279: 2945-54.
- [167] Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *Embo J*, 18: 871-81.

- [168] Wang YJ, Li WH, Wang J, Xu K, Dong P, Luo X, Yin HL. (2004) Critical role of PIP5KI $\gamma$ 87 in InsP3-mediated Ca(2+) signaling. *J Cell Biol*, 167: 1005-10.
- [169] Tsao P, Cao T, von Zastrow M. (2001) Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 91-6.
- [170] Jean-Alphonse F, Hanyaloglu AC. (2011) Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Mol Cell Endocrinol*, 331: 205-14.
- [171] Schmid EM, McMahon HT. (2007) Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature*, 448: 883-8.
- [172] Cao TT, Mays RW, von Zastrow M. (1998) Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J Biol Chem*, 273: 24592-602.
- [173] Leonard D, Hayakawa A, Lawe D, Lambright D, Bellve KD, Standley C, Lifshitz LM, Fogarty KE, Corvera S. (2008) Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *J Cell Sci*, 121: 3445-58.
- [174] Collinet C, Stoter M, Bradshaw CR, Samusik N, Rink JC, Kenski D, Habermann B, Buchholz F, Henschel R, Mueller MS, Nagel WE, Fava E, Kalaidzidis Y, Zerial M. (2010) Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature*, 464: 243-9.
- [175] Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. (2003) Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol*, 160: 165-70.
- [176] DebBurman SK, Ptasienski J, Boetticher E, Lomasney JW, Benovic JL, Hosey MM. (1995) Lipid-mediated regulation of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *J Biol Chem*, 270: 5742-7.
- [177] Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, Lefkowitz RJ. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and

- regulation of the PIP2 binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem*, 271: 24907-13.
- [178] Sun Y, Drubin DG. (2012) The functions of anionic phospholipids during clathrin-mediated endocytosis site initiation and vesicle formation. *J Cell Sci*, 125: 6157-65.
- [179] Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell*, 118: 591-605.
- [180] Goh LK, Huang F, Kim W, Gygi S, Sorkin A. (2010) Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, 189: 871-83.
- [181] Bethoney KA, King MC, Hinshaw JE, Ostap EM, Lemmon MA. (2009) A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 13359-64.
- [182] Jean-Alphonse F, Bowersox S, Chen S, Beard G, Puthenveedu MA, Hanyaloglu AC. (2014) Spatially restricted G protein-coupled receptor activity via divergent endocytic compartments. *J Biol Chem*, 289: 3960-77.
- [183] Shpetner H, Joly M, Hartley D, Corvera S. (1996) Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin. *J Cell Biol*, 132: 595-605.
- [184] Nakanishi S, Catt KJ, Balla T. (1995) A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5317-21.
- [185] Klein U, Muller C, Chu P, Birnbaumer M, von Zastrow M. (2001) Heterologous inhibition of G protein-coupled receptor endocytosis mediated by receptor-specific trafficking of beta-arrestins. *J Biol Chem*, 276: 17442-7.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**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.

Balla A, **Toth DJ**, Soltesz-Katona E, Szakadati G, Erdelyi LS, 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.

### Egyéb közlemény:

Varnai P, Toth B, **Toth DJ**, Hunyady L, Balla T. (2007) Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem*, 282: 29678-90.

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Várnai Péternek szeretnék köszönetet mondani, hogy meghívott diákkörösnek, bevezetett a kísérletezés és a tudományos gondolkodás világába, és sok türelemmel és odaadással egyengette az utamat doktoranduszként is. Köszönöm neki, hogy kritikus észrevételeivel és lelkesítő, bátorító hozzáállásával mindig segítette és irányította munkámat.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, Dr. Spät Andrásnak és Dr. Hunyady Lászlónak, hogy munkámat diákkörösként és doktoranduszként lehetővé tették és támogatták, valamint Ligeti Erzsébet professzorasszonynak, aki a Celluláris és molekuláris élettan program vezetőjeként figyelemmel kísérte és támogatta doktori tanulmányaimat.

Hálás vagyok közvetlen munkatársaimnak, Dr. Tóth Józsefnek és Dr. Gulyás Gergőnek a segítőkészségükért, az előrevivő gondolatokért, és a jó hangulatért, amit a laborban teremtettek. Köszönöm továbbá TDK-hallgatómnak, Tallósy Bernadettnek a kísérletek elvégzésében nyújtott pótolhatatlan segítségét. Szeretnék köszönetet mondani Szabolcsi Katának, Oláh Ilonának és Rác Juditnak, akik asszisztensként mindig készségesen segítettek a munkámat a laborban.

Köszönet illeti a Hunyady labor valamennyi dolgozóját, és köztük is elsősorban Dr. Balla Andrást, Dr. Erdélyi Lászlót, Dr. Gyombolai Pált és Dr. Szalai Bencét, akikhez mindig fordulhattam kérdéseimmel, és akikkel termékeny eszmecseréket folytatva lendült mindig tovább a munkám. Köszönettel tartozom az Élettani Intézet valamennyi munkatársának azért a barátságos légkörért, amely nagyban megkönnyíti a kutatói munkát.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak, a barátomnak és a barátaimnak azért a sok segítségért, támogatásért, szeretetért, ami nélkül nem lehetnék ma ott, ahol vagyok. Köszönöm, hogy elviselnek, segítenek a nehézségekben, és osztoznak velem az örömeimben.