A foszfoinozitidek szerepének vizsgálata a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok endocitózisában

Doktori tézisek

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

BEVEZETÉS

A foszfatidilinozitol (PtdIns), valamint foszforilált származékai, a foszfoinozitidek, 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 foszfoinozitid molekula hozható létre, melyek megtalálhatók emlős sejtekben; ezek jellegzetes megoszlást mutatnak a sejtek különböző membránjai között. A foszfoinozitidek 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 organellumok szerveződésében és az ezek között zajló vezikuláris transzportfolyamatok szabályozásában. A foszfoinozitidek jelentőségét aláhúzza az a tény is, hogy a szintézisükben és lebontásukban közel 50 különböző kináz és foszfatáz enzim vesz részt, melyek közül jó néhányat hoztak már kapcsolatba humán megbetegedésekkel, köztük olyan gyakoriakkal is, mint a daganatos betegségek, az elhízás vagy a cukorbetegség.

A foszfoinozitidek közül legnagyobb mennyiségben a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát [PtdIns(4,5)P_2] fordul elő. Ez a lipid elsősorban a plazmamembránban található meg, ahol a legkülönbözőbb sejtélettani folyamatok szabályozásában vesz részt. A foszfolipáz Cβ (PLCβ) enzim szubsztrátjaként szükséges az inozitol-1,4,5-triszfoszfát és diacilglicerin képződéséhez, és így az általuk elindított Ca^{2+}-szignálhoz és proteinkináz C jelpályához. Ezenkívül a PtdIns(4,5)P_2 prekurzorként szolgál a foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát [PtdIns(3,4,5)P_3] képződéséhez is, amely jellemzően tirozinkináz aktivitású receptorok hatására keletkezik, és a hozzá specifikusan kötődni képes fehérjéken keresztül szerteágazó szignalizációs rendszert hoz működésbe, ezzel számos alapvető sejtfunkciót, többek között a

sejtek túlélését és vándorlását is szabályozva. Egy másik fontos és jól ismert hatása a plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2-nek az ioncsatornák és egyéb membrántranszporterek szabályozása: a tranziens receptorpotenciál csatornák jelentős hányada, de ezen túl számos feszültségfüggő és háttér K^+-csatorna, illetve egyéb transzmembrán transzportfehérjék is PtdIns(4,5)P_2-függő módon működnek. Elengedhetetlen a plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2 a citoszkeletáris rendszer dinamikus szerveződéséhez, a membrán-citoszkeleton kapcsolat szabályozásához is, amely a hozzá kötődni képes citoszkeletáris adaptorfehérjéken keresztül valósul meg.

A plazmamembrán-receptorok működésének egyik fontos meghatározója a sejtfelszínen található, és így az aktiváló ligandok számára elérhető receptorok száma, melyet a plazmamembránba kerülő és az onnan endocitózissal eltávolított receptorok közötti egyensúly határoz meg. Az endocitózis leginkább ismert és legtöbbet tanulmányozott formája a klatrinmediált endocitózis, melyet a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, a receptor-tirozinkinázok és számos más sejtfelszíni fehérje is igénybe vesz a sejt belsejébe való bejutáshoz.

A klatrinmediált endocitózis egy a citoplazma felé irányuló membrángörbület kialakulásával kezdődik (iniciáció), ezt követi a szállítandó molekulák összegyűjtése. Az endocitózisra kerülő membránfehérjéket különböző adaptorproteinek irányítják az endocitózis helyszínére: a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok esetében például ezt a funkciót az aktivált receptorhoz kötődő β-arresztin molekulák látják el. A szállítmány összegyűjtésével párhuzamosan a membrángödör köré klatrinburok épül, az így létrejött struktúrát nevezi az irodalom klatrinburkos gödörnek. Az egyre mélyülő érett klatrinburkos gödör nyaka összeszűkül, majd a dinamin GTP-áz fehérje közreműködésével lefűződik a plazmamembránról. A lefűződés után a keletkezett vezikuláról leválik a klatrinburok, a szállított molekulák pedig a korai endoszomális kompartmentbe továbbítódnak, 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.

Számos tanulmány utal arra, hogy a plazmamembrán foszfoinozitidjei, és azon belül elsősorban a PtdIns(4,5)P_2 szerepet játszik a klatrinmediált endocitózis folyamatában is. Egyrészt jónéhány endocitózisban részt vevő fehérjéről kimutatták, hogy rendelkezik PtdIns(4,5)P_2-ot kötni képes doménnel vagy molekularészlettel. Másrészt több sejtes rendszerben is igazolást nyert, hogy a PtdIns(4,5)P_2 szintjének különböző módszerekkel történő, általában hosszútávú csökkentése negatívan befolyásolja a klatrinmediált endocitózis folyamatát, illetve a modellként használt receptor, legtöbbször a transzferrinreceptor endocitózisát. Habár a klatrinmediált endocitózis folyamatának vannak általános, minden szállított protein esetében azonos mozzanatai, az endocitózis során használt adaptorfehérjékben, illetve az endocitotikus mechanizmus egyes részleteiben jelentős eltérések mutatkozhatnak a receptorok között, ami felveti a lehetőségét annak, hogy az egyes receptorcsaládok, sőt, egyes receptorok endocitózisa egyedi módon szabályozódhat. A transzferrinreceptornál találtakhoz hasonló adatok a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok tekintetében munkám kezdetén még nem álltak rendelkezésre.

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_1R) endocitózisának, illetve plazmamembránon belüli mozgásának összehasonlítása.
- Annak meghatározása, hogy a plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2-szintjének, illetve PtdIns(4)P-szintjének mesterségesen indukált akut csökkentése hogyan befolyásolja az AT_1R és más plazmamembrán-receptorok endocitózisának egyes lépéseit.
- Az 5-foszfatázzal létrehozott, illetve a hormon által indukált, foszfolipáz Cβ aktiválással kiváltott PtdIns(4,5)P_2-depléció receptorendocitózisra kifejtett hatásának összehasonlítása.

MÓDSZEREK

Plazmidkonstrukciók

A kísérleteinkben vizsgált plazmamembrán-receptorok közül az AT_1R-nak a jelöletlen, illetve a humanizált *Renilla* luciferáz szekvenciával jelölt változatát (AT_1R-luc) használtuk, a többi receptorhoz ($5HT_{2C}R$, β_2AR, EGFR) pedig a *Renilla* luciferáznak egy mutációkkal optimalizált változata („szuper luciferáz”) volt fuzionálva, minden esetben a receptor C-terminális, citoplazmatikus végéhez illesztve. A vad típusú AT_1R-t kódoló plazmidból irányított mutagenezis (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit) segítségével készítettük el a G-fehérjét nem aktiváló DRY-AAY mutánst, illetve a nem internalizálódó TSTS-AAAA mutánst kódoló szekvenciákat.

Az endocitotikus markerként használt molekulákat különböző fluoreszcens fehérjékkel (sárga fluoreszcens fehérje – YFP, Venus, illetve Cerulean) jelöltük meg. A β-arresztin 2-nek a C-terminális végéhez, míg a korai endoszóma marker Rab5 molekulának az N-terminálisához kapcsoltuk a jelölést. A plazmamembrán megjelöléséhez a fluorofórokat több különböző szekvenciával fuzionáltunk, melyek különböző speciális mikrodoménekbe irányítják az adott fehérjét. A plazmamembrán rendezett (lipid raft) régióit a Lyn kináz, illetve egyes kísérleteknél az Lck kináz fehérjék N-terminális szekvenciájával jelöltük meg, melyek mirisztoiláción és palmitoiláción mennek keresztül. A plazmamembrán rendezetlen (non-raft) struktúráinak jelölésére a K-Ras fehérje C-terminális CAAX motívumát használtuk.

Az általunk használt PtdIns(4,5)P_2-depléciós rendszert két fehérjekonstrukció alkotta: a már említett Lyn vagy Lck irányítószekvenciával a plazmamembránba irányított FRB domén, illetve a IV-es típusú inozitolpolifoszfát-5-foszfatáz katalitikus doménje (5-foszfatáz) az FKBP doménhez fuzionálva. Egyes kísérleteinkben ezt a két fehérjét egyetlen plazmidból fejeztük ki a virális eredetű T2A összekötő szekvencia segítségével,

amely a plazmidról képződött egyetlen mRNS transzlációjának megszakításával két különálló fehérjeterméket eredményez azonos mennyiségben. Az 5-foszfatáz plazmamembránba irányításához bizonyos kísérletekben a vad típusú, illetve TSTS-AAAA mutáns AT_1R citoplazmatikus végéhez kapcsolt FRB domént alkalmaztuk. A PtdIns(4)*P* depléciójához az 5-foszfatáz helyett a Sac1 enzim 4-foszfatáz aktivitású katalitikus doménjét használtuk a fent leírtakhoz hasonló módon.

A PtdIns(4,5)P_2-depléció ellenőrzéséhez egy hozzá specifikusan kötődni képes fehérjedomént, a foszfolipáz Cδ1 enzim pleckstrin homológia doménjét (PLCδ1PH) alkalmaztuk, a C-terminális végén Renilla luciferázzal, illetve Venusszal vagy YFP-vel megjelölve.

Sejtvonalak, tranziens transzfekció

Munkánk során két különböző humán embrionális vesefibroblaszt-sejtvonalat használtunk: az eredeti HEK293 sejtvonalat, és annak egy olyan változatát, amely az SV40 vírus T antigénjét is tartalmazza (HEK293T). 10% fötális borjúszérumot, valamint penicillint és streptomicint tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban 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 előkezelt 96-lyukú lemezeket használtunk, a sejteket 5-10x10^4 sejt/lyuk sűrűségben ültettük a lemezre, a bejuttatni kívánt DNS-konstrukciókkal és a transzfekciós reagenssel (Lipofectamine 2000 vagy GeneCellin) együtt. A kísérleteket 24-26 órával a transzfekció után végeztük. A mikroszkópos mérésekhez a HEK293T sejteket polilizinnel előkezelt üveg fedőlemezre ültettük 3x10^5 sejt/fedőlemez sűrűségben, a transzfekciót megelőző napon. A transzfekciót Lipofectamine 2000 reagens és fedőlemezenként 1-2 μg összmennyiségű DNS hozzáadásával végeztük, a kísérleteket 24 órával megelőzően.

A BRET technika

Az általunk vizsgált receptorok kapcsolatát különböző endocitotikus jelölőmolekulákkal a biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) elvén alapuló módszerrel vizsgáltuk. Ennek lényege, hogy fotonkibocsátás nélküli energiatranszfer jön létre egy biolumineszcens donor- és egy fluoreszcens akceptormolekula között, amennyiben megfelelően közel (10 nm-en belülre) kerülnek egymáshoz. Az általunk használt BRET rendszerben a donormolekula a *Renilla* luciferáz volt, amely szubsztrátja, a cölenterazin oxidálásával 480 nm körüli emissziós maximummal fényt bocsát ki. Az akceptormolekula (esetünkben YFP vagy Venus) megfelelő közelsége esetén azonban megtörténik az energiatranszfer, és az akceptormolekula a rá jellemző emissziós hullámhosszon (530 nm körüli maximummal) bocsát ki fényt. Kísérleteinkben a vizsgálni kívánt partnermolekulákat az említett donor- és akceptormolekulákkal fuzionáltuk, és a közöttük létrejövő energiatranszfert az akceptor- és donorintenzitások hányadosával (BRET-hányados) jellemeztük, melynek nagysága tehát a donor-akceptor távolságtól függ. A BRET kísérleteket 24-26 órával a transzfekció után végeztük 37°C-on, Mithras LB940 többfunkciós lemezleolvasóval (Berthold), illetve Varioskan™ Flash többfunkciós lemezleolvasóval (Thermo Scientific).

Konfokális mikroszkópia

Az AT_1R és a különböző endocitotikus molekulák sejten belüli elhelyezkedését, kolokalizációját konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a kifejezett jelöletlen receptort fluoreszcens ligand (rodaminnal, illetve Alexa-Fluor488 molekulával jelölt angiotenzin II) segítségével tettük láthatóvá, míg az endocitotikus molekuláknak a fluoreszcens fehérjével fuzionált változatát használtuk. A kísérleteket fedőlemezre szélesztett, és a korábban részletezett módon transzfektált HEK293T sejteken végeztük, 35°C-on. A konfokális képeket Zeiss LSM510 típusú pásztázó konfokális

mikroszkóppal, 63-szoros nagyítású objektívvel készítettük. Az elkészült képek utólagos feldolgozásához a Photoshop (Adobe) programot használtuk.

Statisztikai analízis

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

EREDMÉNYEK

Doktori ösztöndíjasként elsősorban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy mi történik a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok endocitózisával, ha a plazmamembrán 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 HEK293 sejtekben. A rendszer a molekuláris közelséget nagy érzékenységgel detektálni képes BRET módszeren alapult, melyben a *Renilla* luciferázzal jelölt receptor és különböző sejtkompartmentekbe irányított, vagy a receptorral kapcsolatba lépő fehérjéket megjelölő fluoreszcens molekulák között mért energiatranszfer változása utalt a receptor mozgására. Ezzel a megközelítéssel sikerült detektálnunk három G-fehérjéhez kapcsolt receptor, az AT_1R, $5HT_{2C}R$ és β_2AR ingerlést követő endocitózisát három különböző interakció aspektusából. Az aktivált receptorok és a β-arresztin 2 között létrejött kapcsolatot a BRET-jel dózisfüggő emelkedése mutatta, míg a fluoreszcensen jelölt plazmamembrán-markerektől való távolodás a szignál csökkenésében nyilvánult meg. A receptorok megérkezését a korai endoszomális kompartmentbe a Rab5-tel mérhető BRET-szignál emelkedése jelezte, szintén dózisfüggő módon. Az AT_1R kapcsolatát, közös lokalizációját az említett partnermolekulákkal konfokális mikroszkóppal is megerősítettük, és BRET mérésekben a klatrinmediált endocitózis hiperozmoláris oldattal történő gátlásával igazoltuk, hogy a kapott jelváltozások a receptor endocitózisának felelnek meg.

Kísérleteinkben a plazmamembrán jelölésére többfajta irányítószekvenciát is alkalmaztunk: egyrészt a Lyn tirozinkináz N-terminális szekvenciáját, amely elsősorban a plazmamembrán raft régióiban helyezkedik el; másrészt az inkább nem-raft régiókba lokalizáló, C-terminális KRas CAAX szignálszekvenciát. Az AT_1R-t vizsgálva eltérő BRET-jelváltozásokat kaptunk a kétféle plazmamembrán-marker esetében. Ingerlés hatására a raft markernél 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-AAY, 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, de nem szükséges hozzá a receptor internalizációt indukáló foszforilációja.

A plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2-szintjének akut csökkentésére egy az FRB és FKBP fehérjedomének rapamicinnel indukálható heterodimerizációján alapuló, munkacsoportunk által korábban kifejlesztett módszert használtunk. Az FRB domént a plazmamembránba irányítottuk a már említett N-terminális szignálszekvenciával, az FKBP doménhez pedig egy PtdIns(4,5)P_2-ot defoszforilálni képes 5-foszfatáz enzim katalitikus doménjét kapcsoltuk. Rapamicin adásakor a két domén heterodimerizációja a nyugalomban citoplazmatikus 5-foszfatázt a plazmamembránba helyezi át, amely lebontja az ott található PtdIns(4,5)P_2-ot. A depléciós rendszer működését egy a PtdIns(4,5)P_2-hoz specifikusan kötődni képes fehérjedomén, a PLCδ1PH domén segítségével ellenőriztük konfokális mikroszkóppal és BRET módszerrel, melyek megerősítették, hogy rapamicin adása után a plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2-szintje jelentősen csökken.

Következő lépésként a fent leírt, receptorendocitózist vizsgáló BRET-es módszerünket ötvöztük a PtdIns(4,5)P_2-depléciós rendszerrel. Ennek segítségével kimutattuk, hogy a plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2-depléciója teljes mértékben gátolja az AT_1R, $5HT_{2C}R$ és β_2AR aktiválódás utáni megjelenését a Rab5-tel jelölt korai endoszómában. A β-arresztin 2 kötődését a foszforilálódott receptorokhoz azonban ezen foszfoinozitid hiánya nem befolyásolja. A receptorok plazmamembrán-markertől való távolodásában részleges gátlást tapasztaltunk a PtdIns(4,5)P_2 lebontása után.

Annak további vizsgálatára, hogy mi állhat a plazmamembrán-marker esetében látott részleges gátlás hátterében, konfokális mikroszkóppal végeztünk kísérleteket. Ezekhez a mérésekhez a PtdIns(4,5)P_2-depléciós rendszert továbbfejlesztettük, az egysejtes szinten is megbízható lipidbontási képesség érdekében. A deplécióhoz szükséges két fehérjét a virális T2A összekötő szekvencia segítségével egyetlen kódoló plazmidból fejeztük ki, így a két fehérje azonos mennyiségben keletkezett a sejtekben. Az új rendszer PtdIns(4,5)P_2-bontó képességének ellenőrzése után az AT_1R endocitózisát vizsgáltuk tovább, fluoreszcens ligand használatával. Azt találtuk, hogy PtdIns(4,5)P_2 hiányában az AT_1R aktiválódás után képes klasztereket képezni a plazmamembrán mentén, de a kontrollmérésekkel ellentétben nem jut be a sejt belsejébe. Megmutattuk, hogy az így kialakult klaszterekben az AT_1R kolokalizál a klatrin könnyűláncával, ezek a struktúrák tehát megfelelhetnek a plazmamembrán klatrinburkos gödreinek.

Megvizsgáltuk a plazmamembránban található PtdIns(4)*P* szerepét is a receptorendocitózisban. Ehhez a depléciós rendszerünkben az 5-foszfatáz domént egy olyan 4-foszfatázra cseréltük, amely specifikusan a PtdIns(4)*P*-t defoszforilálja. BRET kísérletekben a PtdIns(4)*P* szelektív lebontása nem befolyásolta a β_2AR ingerlést követő megjelenését a Rab5-pozitív endoszómákban, a 4-foszfatáz és 5-foszfatáz doméneket együtt használva azonban újra az endocitózis teljes gátlását tapasztaltuk.

Az 5-foszfatázzal létrehozott, illetve a hormonhatásra létrejövő, PLCβ aktiválásával indukált PtdIns(4,5)P_2-depléció összehasonlítása céljából elkészítettük az AT_1R-FRB konstrukciót, vad típusú és nem deszenzitizálódó TSTS-AAAA mutáns receptorral egyaránt. Ezek a fúziós fehérjék egyrészt szolgálhatnak plazmamembrán-horgonyként az FKBP-5-foszfatáz számára rapamicinkezelés után, másrészt kiválthatnak PtdIns(4,5)P_2-lebontást a PLCβ-n keresztül is, amennyiben angiotenzin II-vel ingereljük őket. BRET kísérletekben igazoltuk, hogy mind rapamicin, mind angiotenzin II adásakor létrejön a PtdIns(4,5)P_2-depléció. A β_2AR és Rab5 közötti kapcsolatot vizsgálva

megállapítottuk, hogy a vad típusú AT_1R-FRB esetében mind a rapamicinnel kiváltott lipiddepléció, mind az angiotenzin II ingerlés meggátolta a β_2AR endocitózisát. A TSTS-AAAA mutáns AT_1R-FRB esetében az 5-foszfatázzal létrehozott PtdIns(4,5)P_2-depléció létrehozta a gátlást, az angiotenzin II ingerléssel kiváltott depléció azonban nem befolyásolta a β_2AR megjelenését a korai endoszómában.

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_1R 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_1R-ra jellemző plazmamembránon belüli változások nem jelennek meg az $5HT_{2C}R$, illetve az EGFR aktiválódása után.

- Megmutattuk, hogy az AT_1R és két másik G-fehérjéhez kapcsolt receptor (β_2AR és $5HT_{2C}R$) ingerlést követő endocitózisa során a β-arresztin 2 kötődése a receptorhoz PtdIns(4,5)P_2-tól függetlenül megy végbe. A PtdIns(4,5)P_2 lebontása a receptorok plazmamembrántól való eltávolodását részlegesen, korai endoszómában való megjelenésüket pedig teljesen gátolta. Kimutattuk, hogy PtdIns(4,5)P_2 hiányában az aktivált AT_1R 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 β_2AR aktiválódást követő endocitózisához, és nem képes pótolni a hiányzó PtdIns(4,5)P_2 funkcióját a folyamatban.

- Megállapítottuk, hogy az 5-foszfatáz segítségével létrehozott PtdIns(4,5)P_2-deplécióval szemben az internalizációra nem kerülő mutáns AT_1R-on keresztül, a PLCβ aktiválásával kiváltott foszfoinozitid-lebontás nem képes gátolni a β_2AR endocitózisát. Ez az eredmény alátámasztja azt a korábbi felvetést, mely szerint a plazmamembránban funkcionálisan elkülönülő PtdIns(4,5)P_2-készletek lehetnek jelen.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

Toth DJ, Toth JT, Gulyas G, Balla A, Balla T, Hunyady L,Varnai P. Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*, 2012; 125: 2185-97.

IF: 5,877

Balla A, **Toth DJ**, Soltesz-Katona E, Szakadati G, Erdelyi LS, Varnai P,Hunyady L. Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *J Biol Chem*, 2012; 287: 9090-9.

IF: 4,651

Egyéb közlemény:

Varnai P, Toth B, **Toth DJ**, Hunyady L,Balla T. 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*, 2007; 282: 29678-90

IF: 5,581