

A plazmamembrán foszfoinozitidek sejtélettani szerepének vizsgálata újonnan fejlesztett bioszenzorokkal

Doktori értekezés

Dr. Tóth József

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

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

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

Budapest
2016.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	8
2.1. A foszfoinozitidek metabolizmusa és sejtben belüli megoszlása	9
2.1.1. PtdIns	11
2.1.2. PtdIns3P	12
2.1.3. PtdIns4P	13
2.1.4. PtdIns5P	15
2.1.5. PtdIns(3,4)P ₂	15
2.1.6. PtdIns(3,5)P ₂	16
2.1.7. PtdIns(4,5)P ₂	17
2.1.8. PtdIns(3,4,5)P ₃	20
2.2. A foszfoinozitidek szerepe a fehérjék működésében	23
2.3. A foszfoinozitidek szintjének kimutatására alkalmas módszerek	27
2.3.1. A foszfoinozitidek kimutatása biokémiai módszerekkel	27
2.3.2. A foszfoinozitidek vizsgálata mikroszkóp-alapú módszerekkel	29
2.4. A foszfoinozitidek szintjének befolyásolása	41
2.4.1. Genetikai módosítások	41
2.4.2. Enzim inhibitorok	42
2.4.3. Foszfoinozítid analógok	44
2.4.4. Kémiai indukált dimerizáció	45
2.4.5. Fényindukált dimerizáció	48
2.4.6. Elektrogén manipuláció	49
3. Célkitűzések	50
4. Módszerek	51

4.1.	A kísérletek során használt anyagok	51
4.2.	Plazmidkonstrukciók	51
4.3.	Sejtvonalak, tranziens transzfekció	54
4.4.	Western blot.....	55
4.5.	Konfokális mikroszkópia.....	56
4.6.	Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések kivitelezése	56
4.7.	A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérés kivitelezése szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel.....	57
4.8.	Fehérje mennyiségi meghatározás SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel	58
4.9.	Statisztikai analízis	58
5.	Eredmények.....	59
5.1.	Egysejtes és sejtpopulációs méréseknél egyaránt alkalmazható intramolekuláris Ins(1,4,5) P_3 szenzor fejlesztése	59
5.2.	Intermolekuláris PPIIn-szenzorok tervezése.....	63
5.3.	A BRET-szenzorok karakterizálása	68
5.3.1.	A vad típusú és mutáns Ins(1,4,5) P_3 szenzorok dinamikus tartományának és reverzibilitásának összehasonlítása	68
5.3.2.	A PPIIn-szenzorok lipidszelektivitásának és gátlószer-érzékenységének vizsgálata	70
5.4.	A PM-on belüli, PtdIns(4,5) P_2 -ban gazdag területek vizsgálata.....	75
5.5.	Az EGF és M_3 receptorok aktivációját követő PPIIn-változások kimutatása.....	78
5.6.	A receptoringerlést követő PtdIns4 P -szint emelkedés enzimatis háttérének vizsgálata	81
5.7.	A PtdIns4 P reszintézis szerepe a receptorok jelátvitelében	87
5.8.	A PtdIns4 P reszintézis szerepe a receptorok internalizációjában	90
6.	Megbeszélés.....	94
7.	Következtetések.....	103

8.	Összefoglalás	104
9.	Summary.....	105
10.	Irodalomjegyzék	106
11.	Saját publikációk jegyzéke	133
12.	Köszönetnyilvánítás	134

1. Rövidítések jegyzéke

5ptase	5-foszfátáz
Ang II	angiotenzin II
AT ₁ R	1-es típusú angiotenzinreceptor
β ₂ AR	β ₂ adrenerg receptor
BIM	biszindolilmaleimid I
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
Btk	bruton tirozin-kináz
Cch	karbakol (carbachol)
DAG	diacilglicerin
EGF	epidermális növekedésifaktor (epidemal growth factor)
EGFR	epidermális növekedésifaktor-receptor
ER	endoplazmás retikulum
FKBP	FK506 kötő fehérje (FK506 binding protein)
FP	fluoreszcens fehérje
FRB	FKBP-rapamycin-kötő (FKBP-rapamycin-binding) domén
FRET	Förster rezonancia energiatranszfer
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
GEF	guanin nukleotid kicserélő fehérje
GFP	zöld fluoreszcens protein (green fluorescent protein)
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor (G protein-coupled receptor)
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography)
INPP5	inozitol-polifoszfát-5-foszfátáz
Ins(1,4,5)P ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
InsP ₃ R	inozitol-1,4,5-triszfoszfát receptor
K _d	disszociációs konstans
L ₁₀	az Lck fehérje N-terminális plazmamembránba irányító szekvenciája
LBD	ligand-kötő domén (ligand binding domain)
Luc	<i>Renilla</i> luciferáz

M ₃ R	M ₃ muszkarinos acetilkolin receptor
mRFP	monomer mutációt hordozó piros fluoreszcens protein (monomeric red fluorescent protein)
MTM	myotubularin
mTOR	emlős rapamycin-célfehérje (mammalian target of rapamycin)
OSH2	oxiszterol-kötő fehérje homológ 2 fehérje
PBD	foszfoinozítid-kötő domén (phosphoinositid-binding domain)
PH domén	pleckstrin homológia domén
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PI4K	foszfatidilinozitol-4-kináz
PIPK	foszfatidilinozitol-foszfát-kináz
PIS	foszfatidilinozitol-szintetáz
PKC	proteinkináz C
PLC	foszfolipáz C
PLCδ1	foszfolipáz Cδ1
PM	plazmamembrán
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PPIn	foszfoinozítid
PtdIns	foszfatidilinozitol
PtdIns3P	foszfatidilinozitol-3-foszfát
PtdIns(3,4)P ₂	foszfatidilinozitol-3,4-biszfoszfát
PtdIns(3,4,5)P ₃	foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát
PtdIns(3,5)P ₂	foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát
PtdIns4P	foszfatidilinozitol-4-foszfát
PtdIns(4,5)P ₂	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PtdIns5P	foszfatidilinozitol-5-foszfát
PtdOH	foszfatidsav
PTEN	foszfataz és tenzin homológ
Rapa	rapamycin
RTK	receptor-tirozinkináz
S ₁₅	a c-Src fehérje N-terminális plazmamembránba irányító szekvenciája

SEM	sztenderd hiba (standard error of the mean)
SidM-2xP4M	a SidM fehérje tandem foszfatidilinozitol-4-foszfát-kötő doménje
TIRF	teljes belső visszaverődés fluoreszcencia (total internal reflection fluorescence)
TPC	két-pórus csatorna
TRP	tranziens receptor potenciál
Wm	wortmannin
YFP	sárga fluoreszcens protein (yellow fluorescent protein)

2. Bevezetés

A foszfoinozitideket (PPI_n), a foszfatidilinozitol (PtdIns) foszforilált származékait először az 1950-es években sikerült azonosítani [1]. Az egyes PPI_n-ek funkciói bizonyos mértékig összekapcsolódnak, hiszen keletkezésük, egymásba való átalakulásuk a kinázok és foszfatázok által meghatározott és szigorúan szabályozott. Ez a gyors, regulált átalakulás egyúttal a sejtfunkciók széles spektrumában való részvételre teszi alkalmassá e molekulákat. Míg kezdetben csupán membránalkotó strukturális lipidekként tekintettek rájuk, a sejtbiológiai ismeretek bővülésével ma már kijelenthetjük, hogy szinte nem lehet olyan sejtélettani folyamatot találni, melyben a PPI_n-eknek ne lenne alapvető jelentőségük. Szerepet játszanak a klasszikus jelátviteli folyamatok mellett a membránok közötti közlekedés különböző formáiban, a citoskeleton változásaiban, bizonyos nukleáris folyamatokban és a membránpermeabilitás, valamint egyes transzportfolyamatok szabályozásában [2].

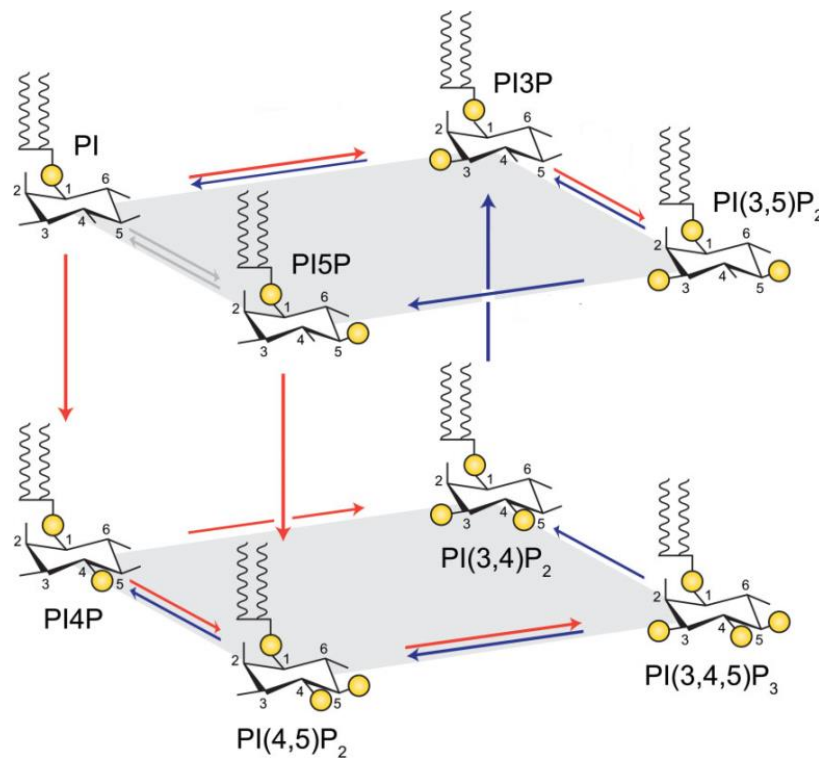
Az intracelluláris lipidek kutatása során számos nehézség adódhat, mely kiemelten igaz a PPI_n-ek kapcsán is. Bár a sejt minden kompartmentjében előfordulnak ezen lipidek, koncentrációjuk mégis nagyon alacsony, néha a jelenlegi módszerekkel detektálhatatlanok, ráadásul szintjük nagyon gyorsan képes változni. Az PPI_n-ek szintézisében több tucat enzim vesz részt, sokszor egyazon szintetikus lépést több is képes katalizálni, így az egyes enzimek specifikus szerepét nehéz vizsgálni. A különböző sejtalkotókban a PPI_n-ek eltérő módon foszforilált származékai vannak jelen, mintegy megjelölik azok membránját, ezáltal a fehérjék sejten belüli lokalizációjának meghatározásában alapvető a szerepük. Szintjük fiziológias vagy mesterséges megváltozása mindezen fehérjék működését befolyásolja, így a különböző sejtélettani folyamatok szintén nehezen vizsgálhatóak specifikusan. PhD munkám célja elsősorban az volt, hogy egy olyan molekuláris eszköztárat fejlesszünk ki a laborunkban, mellyel a különböző PPI_n-ek szintjében beállt változásokat jó időbeli felbontással, kompartment specifikusan tudjuk nyomon követni.

Dolgozatomban előbb bemutatom a PPI_n-eket, azok jellegzetes sejten belüli megoszlását, a szintézisükhöz szükséges metabolikus útvonalakat, illetve az általuk szabályozott legfontosabb sejtélettani folyamatokat. Ezt követően összegzem a PPI_n-ek kimutatására és szintjük befolyásolására alkalmas technikákat. Végezetül ismertetem az

általunk fejlesztett bioszenzorokat és a felhasználásukkal kapott eredményeinket, melyek révén sikerült G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) ill. receptor-tirozinkinázok (RTK) aktivációját követően a PPI-n-ek szintjét monitorozni, eddig nem ismert lipidszintváltozásokat és azok lehetséges regulációját leírni, szerepüket vizsgálni jelátviteli útvonalakban illetve a receptorendocitózis folyamatában.

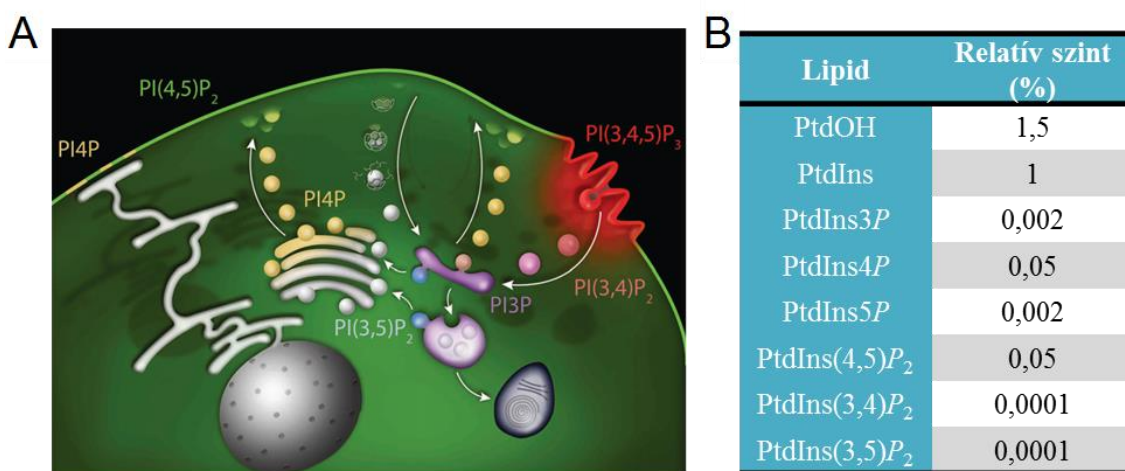
2.1. A foszfoinozitidek metabolizmusa és sejten belüli megoszlása

A PPI-n-ek a glicerofoszfolipidek közé tartozó lipidek. A foszfoinozitid név a foszfatidilinozitol eltérő módon foszforilált formáit jelenti, melyek a lipid kettősréteg szerkezetű membrán citoplazmatikus rétegében helyezkednek el. Szerkezetüket tekintve amfipatikusak, bennük a glicerín három hidroxil-csoportjához *sn*-1 és *sn*-2 pozíciókban zsírsavláncok (általában 1-sztearinsav és 2-arachidonsav) kapcsolódnak, mely így a hidrofób farokrészt képezi, míg az *sn*-3 helyen egy foszfátcsoporton keresztül *myo*-inozitol kötődik, ezt alkotja a hidrofil fejrész [3].



1. ábra – A foszfoinozitidek metabolizmusa, forrás: [4]. A foszfoinozitidek (PPI-n) a foszfatidilinozitol (PtdIns) foszforilált formái. A foszforiláció a PtdIns 3 hidroxil-csoportján történhet meg, a 3', 4' és 5' pozíciókban, így összesen 7 féle PPI-n jöhet létre (a különböző formák foszforilációját az ábrán a sárga karikák jelölik). Ezen PPI-n-ek képesek egymásba átalakulni, mely folyamatokat számos enzim végezheti. A piros nyilak a kinázok, míg a kék nyilak a foszfatázok által katalizált folyamatokat jelképezik, a szürkével jelölt lépések jelentősége emlőssejtekben mindeztáig nem ismert.

Az inozitol-gyűrű 5 szabad hidroxil-csoporttal rendelkezik, melyek közül a 3' 4' és 5' pozíciókban reverzibilisen foszforilálódhat, így összesen 7 féle különböző PPIIn jöhet létre. Ahogy azt az 1. ábra is mutatja, a PPIIn-ek átalakulhatnak egymásba, melyekért specifikus kináz és foszfatáz enzimek felelősek, de a foszfolipáz C (PLC) enzim is képes hidrolizálni a PPIIn-ek egy részét, mely tovább bővíti a metabolikus folyamatok tárházát. Ráadásul ugyanazon lépéseket az eltérő sejtalkotókban más és más izoformák képesek katalizálni, így például négy darab foszfatidilinozitol-4-kináz (PI4K) enzim is ismert, melyek mindegyike a PtdIns – foszfatidilinozitol-4-foszfat (PtdIns4P) átalakulásért felel. Jelenlegi ismereteink szerint emlős sejtekben 47 különböző gén által kódolt 19 kináz és 28 foszfatáz felelős a PPIIn-ek metabolizmusáért [5].



2. ábra – A foszfoinozitidek sejten belüli megoszlása és szintje, forrás:[6] (A) PtdIns(4,5)P₂ nagy része a plazmamembránban található, és itt történik meg a PtdIns(3,4,5)P₃-tá történő foszforilációja is. A PtdIns4P szintje relatíve nagy mennyiségben található a plazmamembránban, de emellett az endoplazmatikus retikulum és a transz-Golgi hálózathoz sorolható endoszómák membránjának is fontos összetevője. A PtdIns3P főként a korai endoszómára, míg a PtdIns(3,5)P₂ a késői endoszómára és a multivezikuláris testre jellemző. A PtdIns(3,4)P₂-ot a plazmamembránban és a klatrin-burkos vezikulák esetén írták le. Fontos megjegyezni, hogy feltehetően más lokalizációban is megtalálhatóak ezek a lipidek, de a jelenlegi kimutatási technikákkal ezek detektálása nem kivitelezhető. [3] **(B)** A PPIIn-ek relatív szintje a vörösvértestek összlipid tartalmához viszonyítva [7]. A PtdIns(3,4,5)P₃ szint nem került feltüntetésre, mivel ezen lipid csak a sejtet ért bizonyos ingerek hatására képződik detektálható mennyiségben. A rövidítéseket ld. a szövegben.

A PtdIns és a PPIIn-ek mindegyike megtalálható az emlős sejtekben, de szintjük eltérő a különböző szövetekben és sejtekben [8, 9], így pontos mennyiségüket nehéz megbecsülni. Sejten belüli eloszlásuk jellegzetes mintázatot mutat, melyet a 2.A. ábra szemléltet. A 2.B. ábrán feltüntetett adatok a vörösvértestek összlipid tartalmához viszonyított relatív szinteket tükrözik. Általánosságban elmondható, hogy az emlős sejtek összlipid mennyiségének 1-1,5%-áért, összfoszfolipid tartalmának 10-20%-áért felelnek [10]. Legnagyobb mennyiségben a prekursornak tekinthető PtdIns van jelen az

endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában. A PtdIns-monofoszfátok közül a PtdIns4P mennyisége a legnagyobb, mely főként a Golgi-komplex membránjának alkotója, míg a kétszeresen foszforilált inozitol lipidek közül a plazmamembránra (PM) jellemző foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát [PtdIns(4,5)P₂] a leggyakoribb. Ezen lipidek szintje közel megegyező, nagyjából az összes foszfolipid 0.2-1%-át teszik ki, a PtdIns-hoz képest relatív arányuk körülbelül 2-5% [7, 11]. A PtdIns(4,5)P₂ PM-on belüli sűrűségét 5.000-20.000 molekula/μm² körülire becsülik [12]. A többi PPIIn-ből lényegesen kevesebbet tartalmaz a sejt, néhány közülük – így a háromszorosan foszforilált foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát [PtdIns(3,4,5)P₃] is – csak a sejtet ért bizonyos ingerek hatására képződik detektálható mennyiségben. A foszfatidilinozitol-3-foszfát (PtdIns3P) és a foszfatidilinozitol-5-foszfát (PtdIns5P) relatív mennyisége a PtdIns-hez képest mindössze 0.2%, míg a sejt foszfatidilinozitol-3,4-biszfoszfát [PtdIns(3,4)P₂] és foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát [PtdIns(3,5)P₂] tartalma még ennél is egy nagyságrenddel kisebb [7]. A PtdIns3P elsősorban a korai endoszómák membránjában található meg, a PtdIns(3,5)P₂ a késői endoszómák és a multivezikuláris testek meghatározó PPIIn-je. [13]. A PtdIns(3,4)P₂-ot a közelmúltban írták le, mint a plazmamembrán, azon is belül a klatrin-burkos gödröcskék és vezikulák kialakulásában fontos PPIIn-et [14].

2.1.1. PtdIns

A PPIIn-ek metabolizmusához szükséges *myo*-inozitol szintézise történhet *de novo*, de a sejtek legtöbbször fel tudja venni az extracelluláris térből is. A szintézis kulcsenzime a *L-myo*-inozitol 1- foszfát szintetáz, mely szubsztrátként glükóz-6-foszfátot használ fel, és azt egy oxidoredukciós és egy aldol ciklizációs enzimatis lépéssel alakítja át [15], majd ezt követően *myo*-inozitol-monofoszfátok hatására jön létre a *myo*-inozitol. Emellett több olyan szekunder aktív transzporter is ismert, melyek nátrium- vagy proton együttes felvételével képesek a *myo*-inozitol a sejtbe juttatni [16]. Ezen transzportereknek fontos szerepet tulajdonítanak a sejtek ozmoregulációjának szabályozásában is [17].

A PtdIns szintézise főként az ER-ban történik, itt találhatóak meg a szükséges enzimek, egyrészt a CDP-diacilglicerol szintetáz, másrészt a CDP-diacilglicerint a *myo*-inozitolhoz kapcsoló foszfatidilinozitol-szintetáz (PIS) [18]. Ennek megfelelően itt a legnagyobb a PtdIns szintje is, bár kisebb-nagyobb mennyiségben majdnem minden

sejtalkotó membránjában megtalálható, hiszen a többi PPI_n szintéziséhez elengedhetetlen a jelenléte. Több elmélet is született arra vonatkozóan, hogy miképpen jut el a különböző endomembránokba, egyrésztől lehetséges vezikuláris transzporttal, másrésztől lipid transzfer proteinek segítségével [19, 20]. Ezen transzfer proteinekről sikerült bebizonyítani, hogy szerepet játszanak az ER-Golgi ill. az ER-PM irányú PtdIns szállításában. Emellett nemrégiben leírtak egy olyan az ER-ből származó mobilis membránkompartmentet, melyben szintén megtalálhatóak a szintézishez szükséges enzimek, így felmerül, hogy ezen képletnek is a többi membrán PtdIns-ellátásában van szerepe [18].

A sejtek inozitol homeosztázisának fenntartásában fontos az ún. PPI_n-ciklus, mely fogalom azt a körforgást jelöli, melynek során a különböző sejtalkotókból, például PLC enzim hatására a PM-ből a PtdIns(4,5)*P*₂ hasítás során létrejövő degradációs termékek visszakerülnek az ER-ba, így biztosítva a CDP-diacilglicerin szintetáz és a PIS szubsztrát igényét [3]. Maradva a jól ismert példánál, a PLC aktivációjakor inozitol-1,4,5-triszfoszfát [Ins(1,4,5)*P*₃] és diacilglicerin (DAG) keletkezik. A citoplazmatikus Ins(1,4,5)*P*₃ szekvenciális defoszforilációval alakul vissza inozitollá [3]. A DAG a PM-ban marad, ahol a DAG-kináz enzim foszfátidsavvá (PtdOH) alakítja. A közelmúltban jelent meg egy közlemény, mely azonosított egy Nir2 nevű fehérjét, mely úgy tűnik kettős szerepet tölt be a PtdIns-szintézisben. Egyrésztől szerepet játszik a PtdIns PM-ba juttatásában, másrésztől a foszfátidsav ellentétes irányú transzportjában is részt vesz, így biztosítva a megfelelő szubsztrát utánpótlást. [21]

2.1.2. PtdIns3P

Mind emlős, mind élesztősejtekben a PtdIns3*P* elsősorban az endoszómákban fordul elő [22], ám élesztősejtekben lényegesen magasabb a szintje, a PtdIns4*P*-tal közel összemérhető [23]. A korai endoszómában a lipid fontos szerepét támasztják alá azok a korai megfigyelések, melyek szerint a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) inhibitor Wortmanninnal (Wm) kezelt sejtekben elmarad a korai endoszómák membránjának fúziója [24], és egyes fehérjék, mint például az EEA1 eltűnnek a kompartmentből [25]. Ma már közel 100 olyan fehérjét ismerünk az emlős sejtekben, melyek képesek a lipidet kötni foszfoinozitid-kötő doménjeik (PBD) segítségével és ezek majd mindegyike fontos szerepet játszik a korai endoszómák működésében [26]. Elektronmikroszkópos vizsgálattal a multivezikuláris test belső membránjában is sikerült kimutatni a lipidet

[27], illetve jelent meg olyan tanulmány is, mely az ER lokalizációt valószínűsíti [28]. Összességében az elmúlt években a PtdIns3P-ot számos sejtleletani folyamattal hozták kapcsolatba, úgymint az endoszómák fúziójával és osztályozásával, a motilitással, autofágiával, citokinezissel, excitózissal és jelátviteli útvonalakkal [29].

Emlős sejtekben a PI3K-ok három osztályát különítjük el, melyek mindegyike képes az inozitol-gyűrű 3-as pozícióját foszforilálni, de szubsztrátspecificitásuk eltérő. A PtdIns3P keletkezésében legfontosabbnak a III-as csoport egyetlen tagját alkotó hVPS34 enzim tűnik [30], mely mind az endoszómákban mind az autofagoszómákban (melyek feltehetően ER eredetűek) megtalálható [31], de a II-es osztályba sorolt PI3K-ok hasonló funkciójáról is egyre több adat lát napvilágot [32]. Az I-es osztályba sorolható enzimek bár *in vitro* képesek a PtdIns – PtdIns3P reakciót katalizálni, de *in vivo* elsődlegesen a PM-ban végbemenő PtdIns(4,5) P_2 – PtdIns(3,4,5) P_3 átalakulásért felelősek [3]. A korai endoszómában emellett 4- és 5-foszfátázok is megtalálhatóak, melyek a sejtorganelum alacsony PtdIns(3,4,5) P_3 és PtdIns(3,4) P_2 szintjét fogják eredményezni, és egyben a hVPS34 mellett egy másik lehetőséget jelentenek a PtdIns3P – képződésére [26]. Fontos megemlíteni, hogy a PtdIns3P forgalom nagyon magas a sejtekben, ami a kináz enzimek konstitutív aktivitását igényli, erre utal legalábbis, hogy PI3K gátlót adva a lipidet érzékelő bioszenzor gyorsan eltűnik a membránokról [27].

A PtdIns3P szintjének szabályozásában fontos szerepet játszanak a korai endoszómákba lokalizált myotubularin (MTM) lipid-foszfátáz enzimek is, melyek lehasíthatják 3-as pozíciójú foszfátcsoportját, és így PtdIns-t hozhatnak létre. Kimutatták, hogy az MTM1 enzim overexpressziója a korai endoszóma és a multivezikuláris test PtdIns3P-tartalmának csökkenéséhez vezet [33], az MTM1-depléción pedig megnövekedett PtdIns3P-szintet eredményezett a sejtben [34]. Az MTM által katalizált folyamatok fontosságát támasztja alá, hogy számos mutációjukat írták már le, melyek súlyos neuropátiás és miopátiás kórképekhez vezettek [35].

2.1.3. PtdIns4P

A PtdIns4P-ra kezdetben úgy tekintettek, mint egy intermedier molekulára, melynek a PM PtdIns(4,5) P_2 -szintéziséhez szükséges szubsztrát ellátáson kívül más sejtleletani szerepe nincs. Éppen ezért meglepő volt, hogy egészen a közelmúltig egyetlen PI4K enzimet sem sikerült az emlős sejtek PM-jában kimutatni, hanem ehelyett a klónozott izoenzimek az endoszóma membránokban és a Golgiban voltak

megtalálhatóak (megjegyzendő, hogy élesztősejtekben a PI4K aktivitással rendelkező Stt4p enzim PM lokalizációt mutat [36]). Tovább erősítette a PtdIns4*P* PM jelenlétének gyanúját az a tény is, hogy a PtdIns(4,5)*P*₂ szintézisben elengedhetetlen foszfatidilinozitol-foszfát-5-kináz (PIP5K), melynek szubsztrátja a PtdIns4*P*, szintén a PM-ban található. A PM-ban található PtdIns4*P*-ot végül többféle technikával (immunfestés, metabolikus jelölést követő sejtfractionálás, PBD alapú bioszenzor) is sikerült kimutatni [28, 37, 38]. Emellett az is világossá vált, hogy a PtdIns4*P* nem csak egy metabolikus intermedier, hiszen számos fehérje rendelkezik a lipid kötésére alkalmas doménnel, ami a lipid szélesebb körű szerepére utal a sejtműködés során [39]. Élesztőgombában is történtek olyan korai megfigyelések, melyek szintén a PtdIns4*P* önálló szerepét támasztják alá bizonyos sejt folyamatokban, például a szekréciós vezikulák kialakulásában [40]. Mára már számos közlemény látott napvilágot, mely a PtdIns4*P* PtdIns(4,5)*P*₂-től független meghatározó szerepét taglalja a Golgiban [41] és a PM-ban [42, 43]. Ilyen folyamatok többek között az ER export, autofágia, PM receptorok jelátvitel, citokinezis, citoskeleton átrendeződés, endoszomális útvonalak szabályozása, sejtnövekedés, apoptózis, vagy a manapság a gyógyszeripar által is egyre intenzívebben kutatott szerepük az intracelluláris patogének, például a hepatitis-, entero- vagy kobuvírusok replikációjában [44].

A különböző sejtorganellumok PtdIns4*P* szintéziséért összesen négy PI4K izoenzim felelős, melyeket két csoportba sorolunk, egyrészt a Wm-érékeny III-as (újabb jelölés szerint PI4KA és PI4KB), másrészt az adenzinnal gátolható II-es típusú PI4K-okra (PI4K2A és PI4K2B) [45]. A Golgi PtdIns4*P* tartalmáért főként a PI4KB felel [46], de a PI4K2A és 2B szerepét is felvetik, főként a transz-Golgi hálózatban [47, 48]. Utóbbi két enzim a korai és késői endoszómában jelentős igazán [38]. A PM PtdIns4*P* szintézisét a PI4KA végzi [39, 49]. A közelmúltban szinte egy időben több közlemény is megjelent, melyben olyan gyorsan transzlokálódó fehérjekomplexeket írtak le, melyben megtalálható a PI4KA a PM-on is, amennyiben stabilizáló faktorok jelen vannak (pl. EFR3, TMEM150A), gátló faktorok (pl. TTC7) pedig nincsenek [50, 51]. Ezen komplex szerepét elsősorban a PM PPIn-ek reszintézisében tartják jelentősnek. Emellett a PI4KA enzim nagyfokú ER lokalizációt mutat, holott az ER-ban a PtdIns4*P* nincs jelen detektálható mennyiségben. A lipid jelenléte azonban feltételezhető, főként az ER kilépési helyeken, erre utal legalábbis,

hogy a PtdIns4*P*-re szükség van a COPII burokfehérje (coatomer protein II) mediált ER exportban [52]. Az ER-ban ugyanakkor megtalálható egy 4-foszfataz enzim a Sac1 is, melynek szerepe lehet az itt tapasztalható alacsony PtdIns4*P*-szintben. Ezenkívül leírtak egy az ORP5 és ORP8 fehérjék által mediált transzportot az ER és a PM között, melynek során a kontaktpontokban PtdIns4*P* - foszfatidilszerin cseretranszport jön létre, így csökken a PM PtdIns4*P* és nő a foszfatidilszerin szintje [53].

2.1.4. PtdIns5*P*

Ahogy korábban már említettem, a PtdIns5*P* szintje rendkívül alacsony, és pontos lokalizációja és szerepe a sejtéletani folyamatokban a mai napig vitatott. Sejtfractionálást követően elsősorban a PM-ban sikerült detektálni, de kimutatható az ER-Golgi frakcióban illetve a korai endoszómákban is [28].

Szintézise egyrésztől történhet a PtdIns direkt foszforilációjával a PIKfyve enzim hatására [54], de képződésében legalább ilyen fontosnak tűnik a PtdIns(3,5)*P*₂ MTM foszfatázok általi 3-as pozícióban történő defoszforilációja [55]. Szintjének szabályozásában a II-es típusú foszfatidilinozitol-kinázok is fontos szerepet töltenek be, melyek a 4-es pozícióban képesek foszforilálni a PtdIns5*P*-ot, így csökkentve mennyiségét [56]. Bár számos foszfatidilinozitol-5-foszfataz enzim ismert, ezek szerepét a PtdIns5*P* – PtdIns átalakulásban mindezidáig nem sikerült igazolni [5].

A PtdIns5*P* elsősorban a sejtmagban zajló folyamatok, mint például a stresszhelyzetek által kiváltott jelpályák regulálása kapcsán tűnik fontosnak [57], de emellett kapcsolatban állhat az Akt [58] és mTOR [59] jelpályákkal, a T-sejtek jelátvitelével [60], patogének inváziójával [61, 62], valamint az ING2 tumorszupresszor regulációja révén a daganatképződéssel is [63, 64].

2.1.5. PtdIns(3,4)*P*₂

A PtdIns(3,4)*P*₂ bazális szintje rendkívül alacsony, de PI3K enzimek aktiválódása során jelentősen képes nőni. Ennek mértéke sejtenként eltérő, főként attól függ, hogy az adott sejttípusban mennyire aktívak az 5- és 4-foszfataz enzimek [65]. Fő lokalizációja a PM, azon belül is a lamellipódiumokban sikerült emelkedett szintjét kimutatni [66], de emellett fontosnak tűnik a klatrin-burkos vezikulák kialakulása során is [14]. A PM-ban keletkezett PtdIns(3,4)*P*₂ egy kis része az endocitózis folyamán megmarad, és így eljuthat más sejtalkotókba is, erre utal, hogy elektronmikroszkóppal

készült felvételeken sikerült a lipidet kis mennyiségben az ER-ban, illetve az endoszomális kompartmentekben, főként a multivezikuláris testben detektálni [67].

Bár elméletileg a $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ keletkezhet a $\text{PtdIns}4P$ 3-as, illetve a $\text{PtdIns}3P$ 4-es pozícióban végbemenő foszforilációjával is, de a lipid szintjének növekedésében fontosabbnak tűnik a $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ SHIP1/2 5-foszfátázok általi defoszforilációja. A legnagyobb emelkedést úgy lehet elérni, ha a sejteket H_2O_2 -dal kezelik, mely egyrészt gátolja a 3-foszfátáz aktivitású foszfátáz és tenzin homológ (PTEN) valamint feltehetően a 4-foszfátáz aktivitású enzimeket is, így a $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ degradáció csak a $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ irányában tud végbemenni [68]. A $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ bontása főként inozitol-polifoszfát-4-foszfátázok (INPP) által történik, melyek közül mind az INPP4A, mind az INPP4B egyaránt specifikusan csak ezt a lipidet bontja. A két enzim csökkent működését számos kórképpel hozták már összefüggésbe (neurodegeneratív eltérések [69], daganatos megbetegedések [70], asztma [71], oszteoporózis [72]), melyek az említett szubsztrátspecifitása miatt egyértelműen jelzik a $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ központi szerepét ezen patológiás folyamatok kialakulásában. A már említett sejtelettani folyamatokon túl a lipid szerepet játszik az Akt, a lamelipodin, az SNX9, a TAPP1 és TAPP2 fehérjék által regulált jelpályákban is [73].

2.1.6. $\text{PtdIns}(3,5)P_2$

Míg élesztőben a lipid szintje magasnak mondható, hozzávetőlegesen fele a $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ mennyiségének, addig emlős sejtekben két nagyságrenddel kevesebb található belőle [10]. Pontos lokalizációjának feltérképezése sokáig nem volt megoldott, mert nem sikerült olyan bioszenzort fejleszteni, mely egyértelműen és specifikusan képes lenne felismerni a lipidet. Végül a közelmúltban, a mukolipin csatorna TRPML1 N-terminális tandem szekvenciájának segítségével sikerült a $\text{PtdIns}(3,5)P_2$ -ot a késői endoszómában és lizoszómában detektálni [74]. Ezt a lokalizációt a korábbi funkcionális vizsgálatok illetve a lipid metabolizmusában szerepet játszó enzimek elhelyezkedése is valószínűsíti. Egy másik tanulmány ugyanakkor immunfestéses vizsgálatok alapján a mitokondriumban mutatta ki [75], bár ez az elhelyezkedés a jelenleg a $\text{PtdIns}(3,5)P_2$ -ről rendelkezésre álló adatok alapján erősen vitatható.

A $\text{PtdIns}(3,5)P_2$ keletkezésekor első lépésben a PtdIns 3-as pozíciójú foszforilációja történik a már korábban is említett hVPS34 révén, majd a $\text{PtdIns}3P$ -ot a III-as típusú PtdIns -foszfát-kináz, más néven PIKfyve enzim foszforilálja az 5-ös

pozícióban [76] (élesztőkben ezt a Fab1 végzi). Más útvonalat ezidáig nem sikerült leírni, így a PtdIns5*P* 3-foszforilációja vagy a PtdIns(3,4,5)*P*₃ 4-foszfátázok általi bontása bár elvileg lehetséges lenne, de a természetben valószínűleg nem játszik szerepet a PtdIns(3,5)*P*₂-szint kialakításában. Bontását a Sac3 5-foszfátáz (élesztőben Fig4) illetve az MTM 3-foszfátáz enzimek végzik [5]. Utóbbi folyamat a korábban említetteknek megfelelően kiemelten fontos lehet a sejt PtdIns5*P*-szintjének növekedése szempontjából. A metabolikus útvonal érdekessége, hogy a szintézisben fontos PIKfyve és a lebontásban lényeges Sac3 egyazon molekuláris komplexben helyezkednek el (a komplex része még az ArPIKfyve állványfehérje [77]), ami élesztősejtekben is megfigyelhető [78]. A jelenség felhívja a figyelmet a PtdIns(3,5)*P*₂ szintjének szigorú szabályozására és gyors turnover-re.

Az első megfigyelés a lipid sejtéletteni szerepével kapcsolatban az volt, hogy PtdIns(3,5)*P*₂-hiányos sejtekben nagy vakuólumok keletkeztek a késői endoszómák és a lizoszómák helyén [79]. Ezen struktúrák kialakulásában szerepet játszhatnak PtdIns(3,5)*P*₂ érzékeny fehérjék, pl. Atg18, Atg21, Hsv2 [76]. Számos endoszomális és lizoszomális ioncsatornáról is sikerült igazolni, hogy a lipid szintje képes befolyásolni működésüket, melyek közül legfontosabbak a mukolipin transziens receptor potenciál (TRP) TRPML1, TRPML2 és TRPML3 [80], illetve a két-pórus (TPC) TPC1, TPC2 csatornák [81], de a szarkoplazmás retikulumban található rianodin receptor is érzékeny a lipidekre [80]. Emellett a PtdIns(3,5)*P*₂-nak szerepet tulajdonítanak többek között a multivezikuláris testben történő osztályozó funkciók, a kortikális aktin átrendeződés, az endoszóma és transz-Golgi hálózat közötti transzport, az inzulin hatására bekövetkező GLUT4 és mTORC1 kihelyeződés, az autofágia, a folyadék-fázisú endocitózis, az exocitózis, az AMPA receptor és a Ca_v1.2 csatorna szabályozásában is [4]. Sokrétú szerepe alapján nem meglepő, hogy a lipid szintézisében résztvevő enzimek mutációi számos súlyos, de szerencsére ritka kórkép kialakulásához vezetnek. Igazolt ezen enzimdefektusok kóroki szerepe a Charcot-Marie-Tooth betegség különböző formái [82], az amiotrófiás- és primer laterálszklerózis [83], a Yunis-Varón szindróma [84], illetve a Francois-Neeten-féle szaruhártya disztrófia [85] esetén is.

2.1.7. PtdIns(4,5)*P*₂

Az állati sejtek leggyakoribb PPIIn-je a PtdIns(4,5)*P*₂, mely ugyanakkor jóval kisebb mennyiségben fordul elő élesztő- és növényi eredetű sejtekben [10]. Fő

lokalizációja a PM, ami fluoreszcensen jelölt szenzorral [86, 87] és antitesttel [88] egyaránt könnyen detektálható. Elektronmikroszkópos analízis segítségével, GST-kötött PLC δ 1-PH domének felhasználásával sikerült Golgi, endoszóma, ER és magi lokalizációt is kimutatni [89]. Feltehetően a többi PPIIn-re is igaz, de talán széleskörűen a PtdIns(4,5) P_2 esetén terjedt el legfőképp az a vélemény, hogy a PM-on belül nyugvó sejtekben is találhatóak a lipidben gazdag régiók [90]. Bár ezek vizualizálása a mai napig nem megoldott, funkcionális vizsgálatok PtdIns(4,5) P_2 -ban dús membránterületek jelenlétére utalnak [87, 91]. Ugyanakkor felmerül annak a lehetősége is, hogy a lipidben szegényebb területek valójában nem tartalmazznak kevesebb PtdIns(4,5) P_2 -t, csak szekvesztrálva vannak a lipidhez nagy affinitással kötődő fehérjék, mint például a mirisztoilált alanin-gazdag c-kináz szubsztrát, a citoszteleon-asszociált protein 23 vagy a növekedés-asszociált protein 43 által, és ezért nem hozzáférhetőek ezek a raktárak az enzimek vagy a bioszenzorok számára [92]. Mindezen megfontolások miatt vitatott a PtdIns(4,5) P_2 -gazdag mikrodomének létezése, és számos kutatás zajlik jelenleg is a kérdéskör tisztázása céljából.

A lipid szintéziséért foszfatidilinozitol-foszfát-kinázok (PIPK) felelősek, melyeket 6 gén kódol a humán genomban. Két 3 fős csoportba soroljuk ezen enzimeket, az egyes típusú vagy PIPKI fehérjék elsősorban a PtdIns4*P* inozitol-gyűrűjének 5-ös hidroxil-csoportját képesek foszforilálni, míg a kettes típusba tartozók (PIPKII) a PtdIns5*P* 4-foszforilációját végzik [93]. Mivel a PtdIns4*P* szintje a PM-ban lényegesen meghaladja a PtdIns5*P*-ét, ezért elsősorban a PIPKI enzimek által katalizált folyamatokat tartják fontosnak a PM PtdIns(4,5) P_2 szintézisében [94], melyet PI4K gátlószeres vizsgálatok is alátámasztanak [95]. A PIPKI enzimek szubsztrátját a PM-ban a korábbiakban leírtaknak megfelelően főként a PI4KA hozza létre [49], bár egyes tanulmányok felvetik, hogy a Golgiban a PI4KB által szintetizált PtdIns4*P* is szerepet játszhat a PM PtdIns(4,5) P_2 szintjének fenntartásában [96]. A hormonális ingerlést követő PtdIns(4,5) P_2 reszintézisben szintén a PI4KA tűnik fontosnak [39]. Kinetikai vizsgálatok úgy találták, hogy a PIPKI enzimek rendkívül gyorsan képesek foszforilálni a PtdIns4*P*-t, így a PtdIns(4,5) P_2 reszintézisében a PtdIns4*P* képződése a sebesség-meghatározó lépés [12]. Arról, hogy az állati sejtek miként érzékelik a receptor ingerlést követően létrejövő csökkent PtdIns(4,5) P_2 -szintet, és milyen jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválódnak a reszintézisben fontos enzimek, még nem áll rendelkezésre

meggyőző irodalmi adat. Élesztősejtekben azonosították az Opy1 fehérjét, mely a PIPKI-nak megfelelő Mss4 enzim regulátora, és ami a PM magas PtdIns(4,5) P_2 szintje esetén leállítja az Mss4-et [97], így a túlzott reszintézisnek szabhat gátat. A tanulmány felveti a TAPP1 fehérje hasonló szerepét, de ezt állati eredetű sejtben még nem sikerült igazolni.

A PtdIns(4,5) P_2 szintjének csökkenése 3 útvonalon is bekövetkezhet. Egyrészt receptor ingerlést követően aktiválódhatnak PLC enzimek, melyek a PtdIns(4,5) P_2 -ot két fontos másodlagos hírvivőre, Ins(1,4,5) P_3 -ra és DAG-re bontják [98]. Másrészt, szintén hormonális stimulusra aktiválódhatnak a PI3K-ok is, melyek a 3-foszforiláció révén PtdIns(3,4,5) P_3 -ot fognak képezni (részletesebben ld. 2.1.8. fejezet). Harmadrészt a sejtben megtalálhatóak széles szubsztrátspecifitású 5-foszfátáz enzimek is. Az elsőként leírt ilyen fehérje az inozitol-polifoszfát-5-foszfátáz A (INPP5A) volt, melyről kiderült, hogy PPIIn-eket nem, csak inozitol-foszfátokat bont [99], így szerepe van az Ins(1,4,5) P_3 -jelpálya regulálásában, de nem a PtdIns(4,5) P_2 csökkentése révén. Később azonosították az OCRL (mutációja okulocerebrorenális tünetekkel járó Lowe szindrómát okoz, innen ered a neve), az INPP5B, INPP5E, INPP5J és INPP5K izoenzimeket, melyek mindegyike képes a PtdIns(4,5) P_2 bontására, de legtöbbjük a PtdIns(3,4,5) P_3 - és az inozitol-foszfátok 5-foszfátját is hidrolizálja [100]. Emellett léteznek olyan 5-foszfátáz aktivitású enzimek is, melyek rendelkeznek a 4-foszfát hasítására alkalmas doménnel is. Ez a két enzim, a synaptojanin 1 és 2, az idegsejtek végkészülékein fordul elő nagyobb mennyiségben, és feltehetően az exocitózis és endocitózis folyamatához szükséges gyors PPIIn metabolizmusban vesznek részt, előbb az 5-ös majd a 4-es pozícióban lévő foszfát-csoport hidrolízisével [101]. A sok izoenzim és a némiképp eltérő szubsztrátspecifitás jól mutatja, hogy a lipid szintjének regulálása rendkívüli módon szabályozott, és a különböző sejtélettani funkciókért más-és más enzim komplexek felelnek.

A PtdIns(4,5) P_2 , mint a PM-ban legnagyobb mennyiségben előforduló PPIIn, rendkívül sok sejtélettani folyamatot képes befolyásolni. A legrégebbiről ismert szerepe, mint azt már korábban is említettem, hogy két fontos másodlagos hírvivő molekulának, az Ins(1,4,5) P_3 /DAG illetve a PtdIns(3,4,5) P_3 -nak is előanyaga, így kulcsszereplőnek tekinthető a GPCR és RTK jelátvitelben. A Ca^{2+} szignalizációban több fronton is kulcsszereplő, egyrészt az Ins(1,4,5) P_3 révén az ER-ből történő Ca^{2+} felszabadulásban,

másrészt számos PM Ca^{2+} -csatornát és transzportert regulál, kezdve a PM Ca^{2+} -pumpától [102], a legtöbb TRP csatornán át [103] a kapacitív kalcium beáramlásban fontos STIM1-Orai1 komplexig [91] (bár utóbbiban felmerül a PtdIns4P központi szerepe is [104]). Egyéb PM ioncsatornák szabályozásában is részt vesz, többek között a Kir2.2 [105] vagy az IRK1 [106] kálium-csatorna működését is meghatározza a lipid szintje. Emellett az aktin polimerizáció, és így a citoskeleton átrendeződésért felelős számos fehérje áll a PtdIns(4,5) P_2 befolyása alatt, mint például a gelsolin, az N-WASP, a cofilin, az aktin depolimerizáló faktor (ADF), a profilin vagy az α -actinin [3], így a lipid fontos szerepet játszik a membrándeformálódással járó valamennyi sejtelettani folyamatban. Számos nemrégiben megjelent összefoglaló közlemény taglalja a PtdIns(4,5) P_2 és a többi PPIIn jelentőségét a migráció [107], a fagocitózis és makropinocitózis [108], az exocitózis [109] és az endocitózis [110] kapcsán. Utóbbi folyamat és a PtdIns(4,5) P_2 közötti kapcsolat kimutatásával munkacsoportunk is kiemelten foglalkozik. A témában egy társszerzős közleményem jelent meg, melyben leírtuk, hogy a PM PtdIns(4,5) P_2 szintjének akut mesterséges csökkentése esetén a GPCR-ok internalizációja gátolódik, mert bár a receptorok az ingerelést követően klaszterekbe rendeződnek a PM-on belül, de a lefűződésük nem tud megtörténni a lipid hiányában [111].

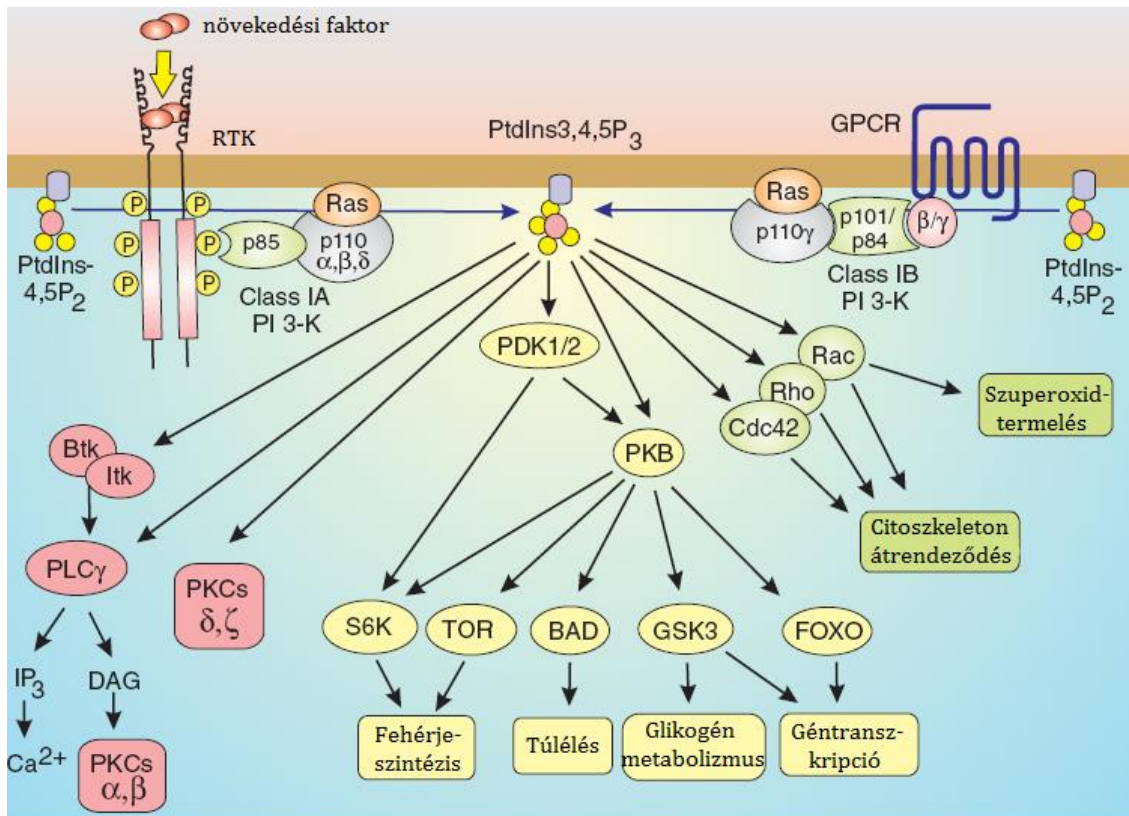
A PtdIns(4,5) P_2 metabolizmusában szerepet játszó enzimek számos betegségokozó eltérése ismert. A PIPKI γ funkcióvesztéses mutációja letális kongenitális kontraktúras szindrómához vezet [112], míg a PI4K-ok és PIPKI-ok növekedett aktivitását mutatták ki több hepatóma eredetű sejtvonalban is [113]. Az OCRL defektusa tehető felelőssé a Lowe- [114] és a Dent-szindróma [115] kialakulásáért, a synaptojanin 1 és 2 kóros működése pedig szerepet játszhat a Down-szindróma, a bipoláris zavar illetve a korai parkinsonizmus tüneteinek létrejöttében [100].

2.1.8. PtdIns(3,4,5) P_3

A PtdIns(3,4,5) P_3 szintje nyugvó sejtekben detektálhatatlanul alacsony, de külső ingerek hatására, mint például RTK-ok stimulálásakor nagymértékben megnövekszik, akár a nyugalmi érték többszázszorosára is [116]. Elsősorban a PM-ban található meg, amit több bioszenzorral és antitesttel is sikerült kimutatni [117], de felmerül magi jelenléte is. A PM-on belül főként a migráló sejteknél a kemotaktikus ágens felé néző membránrészben, a kialakuló fagoszómában illetve a lamellipódiumokban dúsul [118].

Szintéziséhez a PtdIns(4,5) P_2 3-as pozíciójú foszforilációja szükséges, melyet az I-es osztályba tartozó PI3K-ok végeznek. Ezen osztályba 4 izoenzim tartozik (α , β , γ , δ), melyek egy 110 kDa-os katalitikus és egy regulátoros (p85) alegységből állnak. Ez utóbbi döntően befolyásolja az enzimek aktiválódásának módját: míg a p110 α , β és δ izoformák a p85 alegység SH2-doménje segítségével képesek foszforilált RTK-okhoz kötődni vagy GTP-kötött Ras fehérjék révén aktiválódni, addig a p110 γ GPCR-ok jelátvitelén keresztül, a heterotrimer G-fehérje $\beta\gamma$ alegysége segítségével aktiválódik [119]. Emellett már régen leírtak olyan útvonalat is, melyben a PtdIns3P-ot a PtdIns4P-5 kinázok egy többlépcsős folyamat révén képesek PtdIns(3,4,5) P_3 -tá alakítani [120], bár ezen szintetikus út jelentősége mind a mai napig nem ismert. A PtdIns(3,4,5) P_3 -szint csökkentése történhet egyrészt a 3-as pozíciójú foszfát lehasítása révén, melyet a PTEN végez, másrészt a SHIP 1 és 2 (SH2-t tartalmazó inozitol-foszfátáz) 5-foszfátázok által. Míg előbbi reakció főként az alacsony bazális PtdIns(3,4,5) P_3 -szint fenntartása szempontjából tűnik fontosnak, utóbbi a stimulusra bekövetkező túlzott szintemelkedésnek szab gátat [121]. Emellett más 5-foszfátázok is rendelkeznek PtdIns(3,4,5) P_3 -bontó képességgel (a korábban már említett synaptojanin 1 és 2, OCRL, INPP5E, INPP5J, INPP5K), de pontos szerepük a lipid szintjének csökkentésében, még nem tisztázott [100].

Számos sejtelettani folyamat és hozzájuk köthető fehérje ismert, melyet a PM PtdIns(3,4,5) P_3 szintje képes befolyásolni, ezeket mutatja be vázlatosan a 3. ábra. Az egyik legismertebb ilyen a protein kináz B (PKB vagy más néven Akt), mely a sejtek túlélési jelpályájában, metabolizmusában, a géntranszkripció és a fehérjeszintézis szabályozásában is központi szereplő. A PKB kihelyeződésében és aktivációjában fontos szerepet játszik a foszfoinozítid-dependens kináz 1, mely enzim - ahogy azt a neve is mutatja - szintén PtdIns(3,4,5) P_3 által szabályozott [122]. További PtdIns(3,4,5) P_3 -kötő fehérje a GRP1, az ARNO és a cantaurin-1, melyek az ARF guanin nukleotid kicserélő fehérjéi (GEF), a Rho és Rac esetén hasonló funkciót betöltő Tiam1 és Vav fehérjék, az integrin jelátvitelben fontos cytohesin, illetve a főként immunsejtekben jelentős Bruton tirozin-kináz (Btk) [123]. A PPI_n-háztartásban és jelátvitelben központi enzimek, mint például a PLC γ [124] és a protein kináz C (PKC) ζ [125] szintén képesek kötni a lipidet, mely jól mutatja a receptoringerlést követő dinamikus PPI_n változások komplexitását.



3. ábra - A PM PtdIns(3,4,5)P₃-szint emelkedéséhez vezető, és a lipid által befolyásolt legfontosabb sejtéleti folyamatok, forrás: [126] Mind RTK, mind GPCR ingerlés hatására létrejöhet a különböző PI3K-ok aktivációja, melyek szubsztrátként PtdIns(4,5)P₂-ot felhasználva növelik a PM PtdIns(3,4,5)P₃ mennyiségét. A lipidszint emelkedése további szignalizációs komponenseket aktiválhat, mint például a Btk, PLCγ, PKCδ és ζ enzimeket (rózsaszínnel jelölve) melyek jelentős szereplők a PPI-n-ek metabolizmusában is. A PDK1/2 és PKB a fehérjeszintézist, a sejt túlélést, a glikogén metabolizmust és a géntranszkripciót képesek regulálni az említett folyamatokban résztvevő kulcsfehérjék (S6K, TOR, BAD, GSK3, FOXO) foszforilálása révén (sárga színnel jelölt folyamatok). Kis G-fehérjék (Cdc42, Rho, Rac) is érzékenyek a lipid szintjére, melynek így szerepe van a citoszkeleton átrendeződés és a szuperoxid-termelés folyamatában is (zölddel mutatva).

A PM-ban betöltött szabályozó szerepe mellett több adat is utal arra, hogy a PtdIns(3,4,5)P₃ a sejtmagban zajló folyamatoknál is központi tényező. Itt található meg például a GTPáz aktivitású PI3K-szabályozó PIKE (PI3K-enhancer) fehérje, a PtdIns(3,4,5)P₃ receptornak tartott nucleophosmin, illetve a lipid kötésére egyaránt képes SF-1 és LRH-1 magreceptorok, melyek a PtdIns(3,4,5)P₃ kiterjedt szerepére utalnak ezen sejtalkotóban is [127].



A leírt, PtdIns(3,4,5)P₃ által regulált folyamatok alapján nem meglepő, hogy a szintézisében résztvevő enzimek defektusai számos kórképben fellelhetőek. Ezek közé néhány ritka genetikai megbetegedésen túl [128] olyan népbetegségek is beletartoznak, melyek a fejlett világ legjelentősebb morbiditási és mortalitási tényezőit jelentik, mint például a cukorbetegség, daganatos megbetegedések, kardiovaszkuláris és gyulladásos kórképek [129].






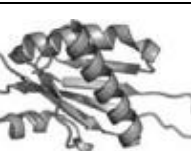
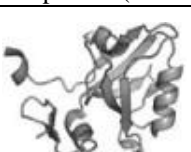
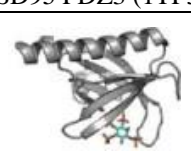

2.2. A foszfoinozitidek szerepe a fehérjék működésében

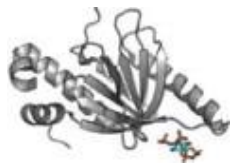


Azáltal, hogy a PPIIn-ek elhelyezkedése jellegzetes mintázatot mutat a sejtben, mintegy megjelölik a különféle sejtalkotókat, és lehetővé teszik a fehérjék számára azok felismerését. A perifériás fehérjék PPIIn-tartalmú membránokhoz történő elsődleges kapcsolódása jellegzetesen elektrosztatikus kölcsönhatások által vezérelt, de ezt követhetik és így stabilizálhatják H-hidak, további elektrosztatikus kötések vagy membrán penetráció [130]. Erre példa az endocitózisban fontos 4 alegységből (α , β 2, μ 2 és σ 2) álló AP-2 adaptor komplex, mely képes a PM-hoz kötődni. Azt feltételezik, hogy az α -alegységen keresztül egy kezdeti gyenge kötés lép fel a PtdIns(4,5) P_2 -tal, ami egy konformációs változást idéz elő a μ 2 alegységben. Ennek hatására elérhetővé válik egy újabb PtdIns(4,5) P_2 -kötő régió illetve egy olyan molekularész, mely az endocitózisra szánt fehérjék YXX Φ -motívumával képes kötetést kialakítani [2]. Ez a többszintű interakció már egy erős kötetést jelent a PM és az AP-2 között.

A PPIIn-ek bemutatása során számos fehérje került megemlítésre, melyek PBD-jeik segítségével képesek többé-kevésbé specifikusan kötni valamelyik lipidet. Az elsőként leírt PBD a pleckstrin homológia vagy röviden PH-domén volt [131], melyet aztán számos másik követett. A PH-domének alkotják egyben a legnépesebb családot is, melynek közel 300 tagja ismert [132]. Mostanáig legalább 14 féle PBD-t azonosítottak, melyek nevét, jellegzetes PPIIn-kötését és kristályszerkezetét az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat – A PPIIn-kötő domének, szelektivitásuk és szerkezetük; forrás:[130] Jelenleg 14 féle PBD-t ismerünk, melyek eltérő szelektivitással képesek kötődni a különböző PPIIn-ekhez. Az egy családba tartozó doménekről fontos megemlíteni, hogy nem szükségszerűen kötik ugyanazon lipidet, illetve a domének ritkán lipid szelektívek. A jobb oldali oszlopban az adott család egyik jellegzetes képviselőjének kristályszerkezete látható. A fehérje neve mellett zárójelben a protein adatbank azonosítója van feltüntetve (protein adatbank url-kódja: www.rcsb.org).

Domén	PPIIn szelektivitás	Szerkezet
ANTH	PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns(3,4,5) P_3 némely PtdIns(3,4) P_2	 Calm ANTH (3ZYK)
BAR	PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns4P	 Amphiphysin BAR (4ATM)

C2	Főként $\text{PtdIns}(4,5)P_2$, de kisebb mértékben valamennyi PPIIn	 PKCα C2
ENTH	$\text{PtdIns}(4,5)P_2$	 Epsin ENTH (1HOA)
FERM	$\text{PtdIns}(4,5)P_2$	 Moesin (1E5W)
FYVE	Főként $\text{PtdIns}3P$ Protrudin: $\text{PtdIns}(4,5)P_2$, $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ és $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$	 EEA1 FYVE (1HYD)
GOLPH	$\text{PtdIns}4P$	 GOLPH3 (3KN1)
KA1	Anionos lipidek	 Kcc4p KA1 (3OST)
PDZ	$\text{PtdIns}(4,5)P_2$, de bizonyos fehérjék PDZ-doménje nem-szelektív	 PSD95 PDZ3 (1TP3)
PH	Vannak szelektív és nem-szelektív domének $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$, $\text{PtdIns}(4,5)P_2$, $\text{PtdIns}(3,4)P_2$, $\text{PtdIns}(3,5)P_2$, $\text{PtdIns}3P$, $\text{PtdIns}4P$	 Akt PH (1UNQ)
PROPPINS	$\text{PtdIns}(3,5)P_2$ és $\text{PtdIns}3P$	 Hsv2p PROPPINS (4EXV)

PTB	PtdIns(4,5) P_2	
		Disabled-2 PTB (1NU2)
PX	Főként PtdIns3 <i>P</i> , némely PtdIns4 <i>P</i> , PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns(3,4,5) P_3 vagy PtdIns(3,4) P_2	
		P40 ^{phox} PX (1H6H)
TUBBY	PtdIns(4,5) P_2	
		TUBBY (1I7E)

Ahogy az a táblázatból is látható, az egyazon családba tartozó PBD-ek nem feltétlenül kötik specifikusan ugyanazon lipidet. A *Saccharomyces cerevisiae* PX-doménjeinek mindegyike nagy PtdIns3*P*-affinitással rendelkezik [133], ugyanakkor a különböző PH-domének különféle PPIIn-eket képesek kötni [134]. Jól ismert például, hogy az Akt-PH egyaránt kötődik a PtdIns(3,4) P_2 és a PtdIns(3,4,5) P_3 -hoz [135], míg a PLC δ 1-PH elsősorban a PtdIns(4,5) P_2 -ot és alacsonyabb affinitással az Ins(1,4,5) P_3 -ot ismeri fel [136].

A felsorolt domének némelyike csak nagyon gyengén képes a lipidet kötni, így önmagukban nem elegendők ahhoz, hogy a fehérjét a membránhoz kapcsolják, de dimerként vagy oligomerként már képesek erre. Ismertek olyan fehérjék, mint például a korai endoszóma antigén-1 (EEA1), pleckstrin, TAPP1 és TAPP2, melyek több PBD-nel rendelkeznek, hogy a membránasszociációt biztosítsák [7, 97]. Máskor, mint például az endocitózisban jelentős dinamin esetében, a monomer fehérje PtdIns(4,5) P_2 -ot tartalmazó membránterületekhez történő kötődésének disszociációs konstansa (K_d) a millimoláris nagyságrendbe esik, de dimerként, az additív hatás következtében ez az érték mikromoláris nagyságrendűvé válik [137]. A PBD-nel rendelkező fehérjék működésének vizsgálatán túl a PBD-ek affinitásának és lipidszelektivitásának vizsgálata abból a szempontból is jelentős, hogy a jelölt klónozott PBD-ek felhasználhatóak a

PPIn-ek nyomon követésére is, mely alkalmazási területre a 2.3.2.3 fejezetben később részletesen kitérek.

Sok esetben a domének membránkötéséhez nem elegendő pusztán a lipidek jelenléte, hanem egyéb faktorokra is szükség van, mely jelenséget koincidenciafelismerésnek, vagy más néven kettős detektálásnak neveznek [138]. Ez a faktor lehet valamilyen fizikai hatás, mint például az osztályozó nexinek BAR-doménje esetén a membrán görbülete [139], de sok esetben egy másik molekula jelenlétére van szükség, mint ahogy azt az említett AP-2-nél is láthattuk. Ez a kettős detektálás egyben még pontosabban meghatározza az adott fehérje sejten belüli elhelyezkedését, hiszen csak mindkét tényező együttes jelenléte esetén irányítódnak a fehérjék az adott sejtalkotóba. Ez a magyarázata például annak, hogy a PtdIns4P - érzékeny FAPP1-PH a Golgiban fordul elő ahol a másik kötőpartnere, az Arf1 is megtalálható [140], de a PtdIns4P-ban szintén gazdag PM-ban csak elenyésző mennyiségben van jelen [49].

Fontos megemlíteni, hogy a PPIn-ek nem csak olyan fehérjék membránkötését képesek előidézni, melyek rendelkeznek valamilyen többé-kevésbé specifikus PBD-nel, hanem anionos tulajdonságuk következtében a bázikus aminosavakban gazdag fehérjéket is vonzzák elektrosztatikus kölcsönhatások révén [141]. Bár ezen funkciót főként egy másik PM foszfolipid, a foszfatidilszerin kapcsán szokás hangsúlyozni, a PtdIns4P és a PtdIns(4,5)P₂ is részt vesz a PM belső lipidrétegének negatívvá tételében [42]. Több esetben is sikerült kimutatni, hogy a PM belső rétegének átrendeződése, és így a negatív töltések számának csökkenése az elsősorban elektrosztatikusan kötött fehérjék, mint például a K-Ras vagy a Rac1 PM lokalizációjának elvesztésével jár [142].

A membránkötésen túl a PPIn-ek és a PBD-ek a fehérjék konformációjának megváltoztatásában és aktiválásában is részt vesznek. Az Akt-PH, Arf GTPáz aktivitású fehérjék (GAP) illetve az Arf GEF Brag2 PPIn-kötése a membránkapcsolódástól függetlenül képes aktiválni a fehérjéket, de számos korábban említett csatorna kapuzását is befolyásolja a lipid jelenléte [10]. A Kir2.2 kálium-csatorna kristályszerkezetének vizsgálatakor például leírták, hogy a tetramer szerkezetű csatorna minden alegységének PtdIns(4,5)P₂-kötése szükséges a pórus nyitáshoz [143].

Egy közelmúltban megjelent közlemény felveti a PPIn-ek szerepét a nem-vezikuláris lipidtranszport szabályozásában is [144]. Az ER-Golgi kontaktpontban

elhelyezkedő OSBP PH-doménje révén a Golgi-membránban található PtdIns4P-hoz kötődik, míg FFAT motívuma az ER VAP-A fehérjéjével lép interakcióba, így mintegy egymáshoz horgonyozza a két sejtalkotót. A fehérje rendelkezik egy lipidtranszport doménnel is, mely koleszterint juttat a Golgiba és helyette PtdIns4P érkezik az ER-ba. A transzporthoz szükséges energiát a PtdIns4P hidrolízise biztosítja, melyet a Sac1 enzim hajt végre az ER-ban, ezáltal a lipid egyben a transzport limitáló tényezője is [144].

Összességében elmondható, hogy jelenlegi tudásunk szerint a PPIIn-ek 5 módon képesek fehérjék működését szabályozni [10]:

- Jellegzetes intracelluláris megoszlásuk, és az őket felismerni képes PBD-ek révén magas-affinitású sztöchiometrikus kötéssel irányíthatják a fehérjék membránlokalizációját.
- Kettős detektálás során más molekuláris partnerekkel együtt specifikusan megjelölhetnek membránterületeket.
- Anionos tulajdonságuk révén elektrosztatikus kölcsönhatásokban vehetnek részt.
- Fehérjék allosztérikus szabályozását végezhetik.
- Regulálhatják a nem-vezikuláris lipidtranszportot.

2.3. A foszfoinozitidek szintjének kimutatására alkalmas módszerek

Az eddigiek alapján látható, hogy a PPIIn-ek rendkívül fontos szerepet töltenek be a sejtek fiziológiás működésében. Nem meglepő, hogy a korábban felsorolt, a PPIIn metabolizmusban szerepet játszó enzimek számos mutációja ismert, melyek szerepet játszanak különféle kórképek kialakulásában is. Nemcsak a sejtbiológia, de az orvostudomány szempontjából is elengedhetetlen fontosságú olyan módszerek kifejlesztése, melyek segítségével a PPIIn-ek szintje mérhető. Ezen módszereket alapvetően kétféle csoportba sorolhatjuk, biokémiai- és mikroszkóp-alapú megközelítésekre [6].

2.3.1 A foszfoinozitidek kimutatása biokémiai módszerekkel

A PPIIn-ek vizsgálatának egyik legrégebbi módja a sejtek metabolikus jelölése radioaktív *myo*-[³H]inozitolal vagy ³²P-foszfáttal, majd ezt követően a lipidek kivonása, és papírkromatográfiás analízise [145]. Modernebb technikát jelent a vékonyréteg- vagy

ion-kicserélő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazása [146]. Az utóbbi módszer egyik továbbfejlesztett változata a HPLC-t követő vezetőképességmérés, melynek során nincs szükség radioaktív jelölésre, ugyanakkor a technika érzékenysége kisebb, mint a metabolikus jelölésen alapulóké [8]. Bár az így végzett kísérletek számos fontos információval szolgáltak a kutatások során, az alkalmazásuk és az általuk nyert adatok interpretálhatósága számos nehézségbe ütközik. Kérdéses például a metabolikus jelölés megbízhatósága, a detektálható jel eléréséhez több millió sejtre van szükség és a mintákban így is csak a mono- és bifoszforylált PPIIn-ek vannak jelen kimutatható mennyiségben.

Korszerűbb, a mai napig széles körben használt technikának számít a folyadék-kromatográfiával kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrometria [9, 147, 148]. Nagyfokú érzékenysége mellett további előnye, hogy a PPIIn-ek zsírsavláncairól is információt nyújt, képes megkülönböztetni a telített és telítetlen zsírsavláncokat, ugyanakkor mindenképpen meg kell említeni, hogy az eszköz rendkívül drága és a kísérletek kivitelezése rendkívül bonyolult [149].

A biokémiai technikák egyik legnagyobb problémája, hogy a technika nem teszi lehetővé a különböző pozíciókban foszforylált PPIIn izomerek egymástól történő elkülönítését, márpedig a korábban leírtak is mutatják, hogy a különböző monofoszforylált PPIIn-ek, például a PtdIns3P, PtdIns4P merőben eltérő szerepet töltenek be a sejtéletbeni folyamatokban. Ezen túlmenően a PPIIn-ek sejten belüli elhelyezkedéséről semmilyen információval nem szolgálnak ezek a technikák, bár a legújabb képalkotóval kombinált tömegspektrometriás eljárások már mikrométeres nagyságrendű felbontást is lehetővé tesznek, mely megnyithatja az utat a szubcelluláris mérések felé [150], illetve egyes HPLC-n alapuló kísérletek megfelelő frakcionálási technikákat követően képesek választ adni ezekre a kérdésekre is [28]. A térbeli felbontáson túl azonban problémás az időbeli felbontás is, hiszen a biokémiai módszerek csak egy pillanatnyi PPIIn-megoszlásról adnak információt, nem teszik lehetővé a külső ingerekre, például receptoringerlésre bekövetkező dinamikus változások nyomon követését. Éppen ezért a biokémiai módszerek jelenleg csak kiegészítő szerepet töltenek be a PPIIn kutatások során, a fő csapásirányt a mikroszkópos megközelítések jelentik.

2.3.2 A foszfoinozitidek vizsgálata mikroszkóp-alapú módszerekkel

Összességében elmondható, hogy a mikroszkópos technikák nagy előnye, hogy a lipidek sejten belüli megoszlásáról és relatív szintjéről is képesek információval szolgálni. Általában az ilyen mérések epifluoreszcens vagy konfokális mikroszkóppal történnek, de a PM vizsgálatát lehet teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia (TIRF) mikroszkóppal is végezni. Ezek felbontása (maximálisan 0.1 μm körül) nem teszi lehetővé a membrándómén-szintű vizsgálatokat, de a legkorszerűbb szuperrezolúciós mikroszkópokkal már ez is kivitelezhető (10 nm környéki maximális felbontás) [151]. Ilyen technikával sikerült például PtdIns(3,4,5) P_3 -ban gazdag régiókat kimutatni a szinaptikus vezikulák exocitózisa során *Drosophila* neuronokban [152]. Még ennél is nagyobb felbontást tesznek lehetővé az elektronmikroszkópos mérések, bár ezek kivitelezésénél általában fixációra van szükség, mely befolyásolhatja a mérési eredményeket. Alkalmazhatóságukat ugyanakkor jól mutatja, hogy nemrégiben sikerült velük PtdIns(4,5) P_2 -ban gazdag PM területeket elkülöníteni élő sejtekben [153].

A mikroszkópos kimutatási technikákat alapvetően az alapján különítjük el, hogy milyen módon történik a lipidek jelölése. Ez történhet egyrészt fluoreszcensen jelölt PPIn-ek sejtbe juttatásával és azok nyomon követésével, de az endogén lipideket is ki lehet mutatni antitestekkel vagy PPIn-eket kötő fluoreszcensen jelölt fehérjedomének segítségével.

2.3.2.1 Fluoreszcensen jelölt lipidek

A fluoreszcensen jelölt lipidek már régóta a kutatók eszköztárát gyarapítják, a PPIn-eken kívül más lipidek, mint például a szfingozinek vizsgálatánál is hasznosak [154]. Túl azon, hogy mikroszkóppal jól nyomon követhető a sejten belüli megoszlásuk és mozgásuk, kapilláris elektroforézissel kis mintából is nagy pontossággal lehet kvantitatív méréseket végezni velük [155]. Használatuk legfőbb limitációja, hogy a fluorofór, mely általában a lipidek egyik zsírsavláncához van kötve, megnehezíti a molekula sejtbe juttatását, megváltoztatja a lipidek hidrofobicitását, ami kihathat a sejten belüli elhelyezkedésükre, megoszlásukra, mozgásukra [156]. Ezen felül, ha már benn is vannak, az inozitol gyűrű foszforiláltsága gyorsan változhat, de a módszer nem képes erről információt nyújtani, hiszen a fluoreszcens jelölést mindez nem érinti, így a lipidek egymásba történő átalakulása félrevezető eredményeket adhat. További problémaként még mindenképp megemlítendő, hogy a kívülről bejuttatott PPIn-ek

természetesen felborítják a sejtek endogén lipidegyensúlyát, így az általuk nyert adatok nem vonatkoztathatóak egy az egyben a fiziológiai szintekre.

2.3.2.2 Antitestek

A PtdIns5P kivételével az összes PPIIn ellen létezik kereskedelmi forgalomban kapható antitest [6], mely lehetővé teszi a minták immunfluoreszcens vizsgálatát. Főként azokban az esetekben hasznosak, amikor a kísérletek valamilyen okból nem kivitelezhetőek fluoreszcensen jelölt lipiddoménekkel (ld. 2.3.2.3. fejezet), mint például szövetminták jelölése, vagy nehezen transzfektálható sejtek esetén. A legjobban karakterizáltak és legszélesebb körben alkalmazottak a PtdIns(4,5)P₂-ellenes antitestek, melyekkel többek között sikerült sejtciklus-függő, az mRNS-érésben fontosnak tűnő PtdIns(4,5)P₂-ban gazdag elektrodenz képleteket kimutatni HeLa sejtek magjában [157]. Egy másik munkacsoport PtdIns4P- és PtdIns(4,5)P₂-ellenes antitestekkel végzett kísérletek során azt találta, hogy különböző PI4K aktivitáshoz köthető PtdIns4P-ban gazdag membránterületek különíthetők el a PM-on és a Golgin belül, sőt ezenfelül korábban még nem azonosított citoplazmatikus vezikulákban is találtak PtdIns4P-ot [37]. Szintén ebben a közleményünkben mutatnak be olyan, a saját kísérleti eredményeim szempontjából is fontos adatokat, melyek arra utalnak, hogy a PM-ban jelentős mennyiségű olyan PtdIns4P található, mely metabolikusan független a nyugalmi PtdIns(4,5)P₂-tól.

A PPIIn-ellenes antitestek használatának nehézsége, hogy alkalmazásukkor szükség van a minta fixálására, amit nagyon körültekintően kell elvégezni, mert az eljárás során a megszokott fixáló anyagokkal és detergenssekkel a lipidek kivonódhatnak a sejtekből [158]. Szintén a fixáláshoz köthető probléma, hogy ezzel az eljárással is csak egy pillanatnyi képet lehet kapni a lipidek sejten belüli megoszlásáról, de a dinamikus átalakulásokat, az átmeneti változásokat nem lehet nyomon követni. Az antitestek szenzitivitását és specificitását mindig validálni kell az adott sejteken valamilyen más, nem immunfluoreszcens módszerrel is, mely szintén körülményessé teszi felhasználásukat. Az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni, hogy az antitestekkel kapott adatok legjobb esetben is csak szemikvantitatívnak tekinthetőek, hiszen a fixált sejtekben a fehérjék PPIIn-ekhez történő kötődése megakadályozhatja az antitestek bekötődését.

2.3.2.3 Jelölt PPIIn-kötő fehérjedomének

A jelenlegi PPIIn kimutatás fő csapásiránya a korábban bemutatott (2.2 fejezet) jelölt PPIIn-kötő fehérjedomének alkalmazása. A specifikus, nagy affinitású, 1:1 sztöchiometriával kötődő izolált PBD-ek klónoozhatóak, mutálhatóak, tetszés szerint jelölhetőek, így ideális molekulák a PPIIn-ek detektálására. Mivel kísérleteimben kulcsszerepet játszanak a PPIIn-kötő fehérjedomének, ezért ezeket a többi módszernél részletesebben szeretném jellemezni.

A PBD-ekre jellemző, hogy diffúz citoszolikus vagy magi lokalizáció mellett általában egy adott membránban dúsulnak [10]. Ha a mérések fixált sejteken történnek, akkor hasonlóan a 2.3.2.2 fejezetben leírtakhoz, itt is nagyon fontos a megfelelő fixálási és permeabilizálási technikák alkalmazása, hiszen ezek jelentősen befolyásolhatják a kapott eredményeket [37, 89]. Ugyanakkor a PBD-ek fluoreszcens jelölése esetén intakt élő sejtekben is monitorozhatjuk a PPIIn-eket. Amennyiben valamilyen olyan külső behatás éri a sejtet, mely megváltoztatja a monitorozott lipid szintjét, akkor a bioszenzor elveszíti (a lipid szintjének csökkenése esetén) vagy fokozza membránlokalizációját (ha a lipid szintje nő), mely jelenség mikroszkóppal könnyen nyomon követhető, így a PPIIn elhelyezkedéséről és szintjének dinamikus változásáról is információt szolgáltat a technika. Az első ilyen mérések a PLC δ 1 enzim PH doménjével történtek [86, 87], mely a PtdIns(4,5) P_2 kimutatását tette lehetővé, de röviddel ezt követően más lipideket is sikerült hasonló módon nyomon követni ARNO-PH és FYVE-doménekkel [159, 160]. Mára már tisztított rekombináns PBD-ek segítségével mind a 7 különféle PPIIn kimutatása lehetővé vált [10]. A leggyakrabban használt bioszenzorokat és legfontosabb jellemzőiket a 2. táblázatban mutatom be.

A jelölt PBD-ek használata kapcsán is igaz, hogy az eredményeket nagyon körültekintően kell kiértékelni. Az egyik kulcskérdés, hogy mennyiben tekinthetőek ezek a domének a PPIIn-kötés szempontjából specifikusnak. Ennek meghatározása korábban *in vitro* vizsgálatokkal, például ELISA vagy protein-lipid kötődési (overlay) technika segítségével történt [158, 161]. Utóbbi során egy nitrocellulóz membránra hígítási sorot visznek fel a különböző lipidekből, a membránt inkubálják epitóppal jelölt PBD-nel, majd az epitópot felismerő antitest segítségével immunfestéssel határozzák meg, hogy a PBD mely lipidhez, és hozzávetőlegesen mekkora affinitással képes kötődni.

2. táblázat – A PPIIn-ek kimutatására leggyakrabban használt PBD-alapú bioszenzorok, forrás: [10] Mára már PBD-alapú bioszenzorokkal mind a 7 különféle PPIIn kimutatása lehetővé vált. A szenzorok elnevezése általában utal arra, hogy mely fehérje (a név első tagja) mely doménjét (második tag) tartalmazzák, és azt is, hogy hány kópiában (pl. a x2 jelölés tandem szerkezetre utal). Sok esetben egyfajta PPIIn követésére több szenzor is használatos, melyek eltérő lokalizációban vagy eltérő affinitással képesek detektálni a lipidet (ahol nem ismert a szenzor K_d értéke ott az n.a. rövidítés szerepel, melynek jelentése nincs adat). Emellett a szenzor megválasztásánál azt is figyelembe kell venni, hogy szelektíven ismer-e fel egy adott lipidet (✓), vagy esetleg kisebb affinitással más PPIIn-ekhez is képes kötődni (x).

PPIIn	Bioszenzor	Elhelyezkedés	K_d	PPIIn szelektivitás
PtdIns3P	Hrs-2xFYVE	korai endoszóma	2,5 μ M	✓
	EEA1-FYVE	korai endoszóma	45 nM	✓
	P40 ^{phox} -PX	korai endoszóma	5 μ M	✓
PtdIns4P	OSBP-PH	Golgi/PM*	3,5 μ M	x PtdIns(4,5) P_2
	FAPP1-PH	Golgi	18,6 μ M	x PtdIns(4,5) P_2
	Osh2-2xPH	PM	n.a.	x PtdIns(4,5) P_2
	SidM-P4M	Golgi/PM/késői endoszóma	~1 μ M	✓
PtdIns5P	Ing2-PHDx3	mag/PM*	n.a.	x PtdIns3P
PtdIns(3,4) P_2	TAPP1-PH-CT	PM*	80 nM	✓
PtdIns(3,5) P_2	ML1-Nx2	késői endoszóma	n.a.	✓
PtdIns(4,5) P_2	PLC δ 1-PH	PM	2 μ M	x Ins(1,4,5) P_3
	PLC δ 4-PH	PM	n.a.	x Ins(1,4,5) P_3
	Tubby	PM	n.a.	x PtdIns(3,4) P_2 és PtdIns(3,4,5) P_3
	ENTH/ANTH	PM	5 μ M	✓
PtdIns(3,4,5) P_3	Akt-PH	PM*	590 nM	x PtdIns(3,4) P_2 és Ins(1,3,4,5) P_4
	Btk-PH	PM*	80 nM	x Ins(1,3,4,5) P_4
	Grp1-PH	PM*	170 nM	x Ins(1,3,4,5) P_4

Szintén *in vitro* méréseket tesznek lehetővé a különböző lipid-összetételű liposzómák, melyek előnye, hogy az itt fellépő körülmények jobban hasonlítanak az *in vivo* tapasztalhatóakra mint egy blot esetén [162]. Az ilyen liposzómákat fel lehet

használni felületi plazmon rezonancia vizsgálatra is, mely módszer értékes adatokkal szolgálhat a PPIIn-kötő fehérje lipidaffinitásáról [158]. Ugyanakkor egy nagymérvű kutatás, melyben az élesztősejtekben ismert összes PH-domén lipidkötését megvizsgálták, kimutatta, hogy az *in vitro* leírt specifikus kölcsönhatások nem minden esetben jelzik előre a PBD-ek alkalmazhatóságát *in vivo* képalkotó technikák során [134]. Ennek háttérében a már korábban leírt kettős detektálás jelensége állhat, mely szerint a PBD membránasszociációjához nem elegendő pusztán a lipid jelenléte, hanem más faktorok is szükségesek hozzá. Ez egyben azt is jelenti, hogy a szenzor lokalizációjának megváltozása nem feltétlenül a lipid szintjében beállt változások következtében jön létre, hanem egyéb körülmények módosulása is okozhatja.

Másrésről, ha egy bioszenzor nem specifikusan csak egy PPIIn-et képes felismerni, hanem többet is, akkor bizonyos mérések során nehéz eldönteni, hogy a bioszenzor transzlokációja pontosan melyik lipid szintjének változását jelzi. Sok esetben a PBD-ek szolubilis inozitol lipideket is felismernek, ismert például a PLC δ 1-PH doménról, hogy bár lényegesen kisebb affinitással, de a PtdIns(4,5) P_2 mellett az Ins(1,4,5) P_3 -hoz is képes kötődni [163]. Ez abban az esetben lehet problémás, ha adott folyamatnál mindkét lipid szintje változik, mint például egy GPCR stimulációt követő PLC aktivációnál. Az is előfordulhat, hogy egyazon sejtalkotón belül alakul át az egyik PPIIn a másikká, és ha a szenzor mindkettőre érzékeny, akkor a változás nem vizualizálható. Ugyanakkor az sem mindig jó, ha egy domén nagyon nagy affinitással köt egy lipidet, mert ilyenkor a lipid szintjében beállt kisebb változásokat nem, csak a drasztikus eltéréseket fogja jól jelezni [136].

Szintén fontos megemlíteni, hogy az élő sejtekben overexpresszált PBD-ek versengenek endogén PPIIn-kötő fehérjékkel. A membránokban előforduló PPIIn-ek jelentős része nem szabad formában, hanem valamilyen fehérjéhez vagy nagyobb molekuláris komplexhez kapcsolódva van jelen. Könnyen belátható, hogy ha az endogén molekulák lipidaffinitása nagyobb, mint az általunk bevitt PBD-é, akkor a bioszenzor nem fogja tudni kimutatni a membránban jelen lévő PPIIn-et, hiszen a komplex elfedi őket. Ugyanakkor, ha a PBD affinitása a nagyobb, akkor a PBD-ek elrejtetik az endogén fehérjék elől a lipidet, ami számos sejt-folyamatot érinthet [164]. Megfigyelhető például, hogy a zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) jelölt PLC δ 1-PH domének expressziója a sejtek morfológiájának megváltozásához vezet, a sejtek

lekerekednek (saját megfigyelés). Ennek háttérében feltételezhetően a citoskeletális fehérjék nem megfelelő lipidkötése állhat. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ez kompenzatorikus folyamatokhoz vezethet, a PBD expressziója növelheti az össz-PtdIns(4,5) P_2 mennyiséget, így más effektorok pedig nagyobb mértékben képesek kötődni a lipidhez. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a PIP5K-t overexpresszáló sejtekhez hasonlóan ezekben a sejtekben is intracelluláris vezikulák képződnek [165]. Egy tanulmányban megvizsgálták, hogy a különböző PtdIns(3,4,5) P_3 -kötő GFP-vel jelölt PH-domének overexpressziója miképpen érinti az ezen lipidtől függő különböző sejtlejtani folyamatokat [166]. Azt találták, hogy bár az Akt-PH a Btk-PH, az ARNO-PH és a Grp1-PH egyaránt köti a PM PtdIns(3,4,5) P_3 -ot, de míg az Akt-PH és a Btk-PH jelenléte az endogén Akt aktivációját gátolta, a sejtek letapadására és szétterülésére nem volt érdemi hatása. Ugyanakkor a másik két vizsgált fehérje, az ARNO-PH és a Grp1-PH kizárólag utóbbi kettő folyamatot gátolta, de az Akt jelpályát nem érintette. Ez arra utal, hogy bár ez mikroszkóppal nem detektálható, de a domének némiképp eltérő lipidkészleteket ismernek fel és szekvesztrálnak, és így nem a membrán teljes lipidmennyiségét mutatják ki. Mindezen megfontolásokat mindig szem előtt kell tartani azon döntés meghozatalánál, hogy mely PBD-t érdemes használni egy adott jelenség vizsgálatakor, illetve a mikroszkópos mérések kiértékelésekor sem szabad megfeledezni a módszer korlátaitól.

A fluoreszcens jelölés jelenléte is zavaró lehet, hiszen bizonyos fluoreszcens fehérjék (FP) jelentősen befolyásolhatják a lipidszenzorok működését [167]. Ezen túlmenően a FP-k elhalványodása (angolul photobleaching), pH-érzékenysége és a sok esetben jellemző dimerizációja [168] is befolyásolhatja a mérési eredményeket, így az FP megválasztása alapos mérlegelést igényel [169]. Ígéretes továbblépés lehet a „quantum dot” technika, melynek során nem a megszokott fluorofórokat alkalmazzák, hanem egy nagyon szűk excitációs és emissziós spektrumú ún. nanokristályt, mely akár egyetlen molekula detektálását is lehetővé teszi, és spektrális tulajdonságainak köszönhetően ideális szimultán mérések végzésére [170].

A fluoreszcensen jelölt PBD-ekkel végzett kísérletek eredményeinek számszerűsítésére több eljárás is használatos. A legegyszerűbb módszer a membránkötött és a citoplazmatikus próbák megoszlásának vizsgálatára a citoplazmatikus fluoreszcencia intenzitásának mérése, mely növekszik, ha a szenzor

disszociál a membránról, és csökken a membránkötés fokozódásakor. Vonalmenti intenzitás-hisztogram alkalmazásával a membrán és a citoplazma fluoreszcenciájának együttes mérése is megoldható, majd azok hányadosát véve a változás mértéke felnagyítható [86]. Problémát okozhat viszont, hogy mobilis sejtalkotók kerülhetnek a mérési síkba a vizsgált területen, ami jelentős fluktuációt okoz a jelben, főleg ha olyan ingerlés történik, mely a sejtek mozgását is kiváltja. Emellett a fluoreszcencia intenzitása több a lipidszintektől független okból is csökkenhet. Egyrészt a kisméretű bioszenzorok hajlamosak a magba diffundálni, így csökkentve a citoplazmában a koncentrációjukat, másrészt a már említett elhalványulás következtében is tévesen csökkent citoplazmatikus jelenlétre lehet következtetni.

Az elhalványulás illetve az expressziótól való függés elkerülésére egy munkacsoport olyan próbát (2-dimetilamino-6-acil-naftalin) kapcsolt a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ot felismerni képes epsin 1 fehérje ENTH doménjére, mely a lipidkötés hatására jelentős fluoreszcencia intenzitás növekedésen megy át és megváltoznak spektrális tulajdonságai is, ami lehetővé teszi az aránymérési detektálást [171]. Számos korábban felsorolt probléma áthidalható olyan technikákkal is, melyek specifikusan csak egy adott sejtalkotóban vizsgálják a szenzorok jelenlétét. Ilyen vizsgálómódszer például a TIRF, mely remekül alkalmazható a PM frakció vizsgálatára, de más organelumok detektálását nem teszi lehetővé [172]. Az energiatranszfer alapú technikával készült mérések szintén könnyen kvantifikálhatóak, és általuk lehetőség nyílik szinte bármely sejtalkotóban specifikusan monitorozni a lipidek szintjét. Mivel kísérletes munkám jelentős részét energiatranszfer alapú technikákkal végeztem, ezért ezen eljárásokat külön fejezetben ismertetem (2.3.2.4.).

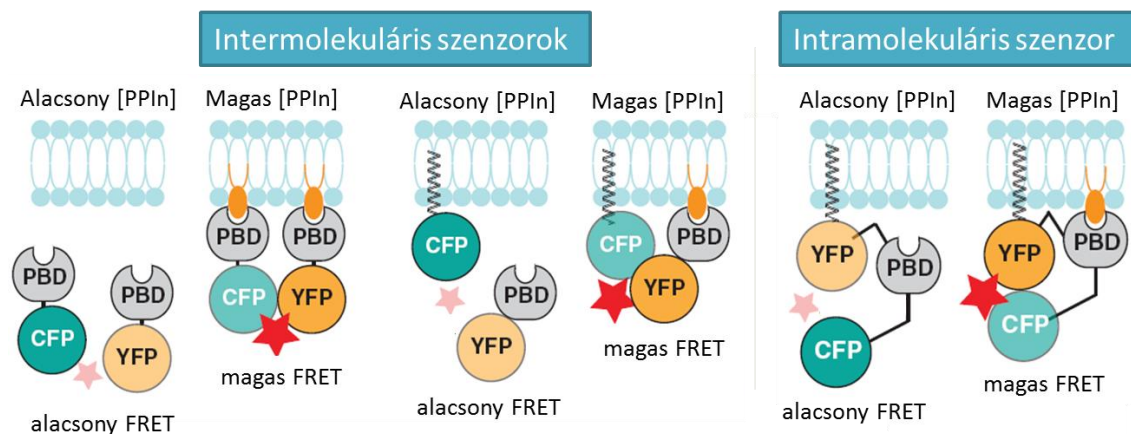
2.3.2.4 Energiatranszfer alapú módszerek

Az ebbe a csoportba tartozó legelterjedtebb módszer a Förster vagy fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET), melynek alapja egy sugárzásmentes energiatranszfer két FP között. Az energiatranszfer mértéke nagymértékben függ a vizsgált molekulák orientációjától, illetve a köztük lévő távolságtól. A FRET hatékonysága a távolság hatodik hatványával fordítottan arányos és a csak mintegy 1-10 nm-es tartományban működik, így rendkívül érzékenyen, és a konvencionális mikroszkópoknál jóval nagyobb felbontóképességgel képes a molekuláris közelséget kimutatni [173]. A méréshez a vizsgálandó fehérjéket olyan FP-kkel kell megjelölni,

melyeknél a donor FP emissziós és az akceptor FP excitációs spektruma átfedésben van. Ha egy külső fényforrás segítségével a donor molekulát gerjesztjük és az akceptor molekula a fent említett távolságon belül helyezkedik el, akkor a donor FP anélkül, hogy fotont bocsájtana ki, átadja az energiáját az akceptornak, és ez utóbbi fog a rá jellemző hullámhosszúságú fotont felszabadítani. Amennyiben egy időben mind a két FP emisszióját mérjük, akkor a leírtak értelmében azt tapasztalhatjuk, hogy a vizsgált két fehérje közeledése esetén a donoré csökken, míg az akceptoré nő. Az akceptor emissziós hullámhosszán mért intenzitásértéket elosztva a donoréval a FRET hányados értéket kapjuk, mely így lehetővé teszi a mérés kvantitatív kiértékelését. FRET-mérések során is kiemelten fontos a megfelelő FP-k, illetve a mikroszkóp filtereinek helyes megválasztása, hogy az esetleges átbeszéléseket a detektálás során kiküszöböljük, de legalábbis minimálisra csökkentsük, illetve az autofluoreszcencia zavaró hatását mérsékelni tudjuk. A leggyakrabban alkalmazott fehérjék a kék FP (CFP) és a sárga FP (YFP), illetve ezek továbbfejlesztett változatai, a pH-változásokra kevésbé érzékeny, dimerizálódásra nem hajlamos és erősebben „világító” Cerulean illetve Venus [174].

A FRET-nél pontosabb méréseket tesz lehetővé a fluoreszcencia élettartam leképezés (FLIM) technika, mely azon alapul, hogy a donor FP gerjesztett állapotának fennmaradása nagymértékben függ az akceptor fehérje jelenlététől. Ezen módszernél csak a donor emissziójának detektálására kerül sor, így az átbeszélés okozta zaj nem zavarja a mérési eredményt [175]. Nem mikroszkópos technika, de szintén az energiatranszfer jelenségén alapul a biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET), amelynél nem külső gerjesztés okozza a fényjelenséget, hanem a *Renilla* luciferáz (luc) katalizál egy olyan a természetben is előforduló oxidációs folyamatot, melynek során az enzim szubsztrátjából, a cölentezainból cölenteramid keletkezik, miközben az fotont bocsát ki [176]. Ha egy akceptor fehérje, ami ennél a technikánál is jellemzően a YFP vagy a Venus, megfelelően közel helyezkedik el a lumineszkáló szubsztráthoz, akkor a donor energiájának terhére gerjesztődik, és fényt emittál. Ebben az esetben is számolni lehet a BRET hányadost, mely érték az 530 nm-en emittáló YFP és a 480nm-en mért cölenterazin intenzitások hányadosa. A technika előnye a FRET-tel szemben, hogy nincs szükség gerjesztésre, így nem kell tartani az átfedő hullámhossztartományok következtében előforduló direkt akceptor excitációtól, vagy az autofluoreszcenciától. A kísérleteket szövetkultúraedény-leolvasó luminométerrel lehet

kivitelezni, így a BRET-nél nem egysejtes, hanem sejtpopulációs jelet lehet detektálni. Ebből kifolyóan a FRET-nél érzékenyebb, illetve további előnye, hogy az egysejtes vizsgálatoknál mindig felmerülő, a sejtek diverzitásából fakadó különbségek nem vezetnek téves következtetésekre, hiszen a BRET az egy időben, több ezer sejtben lejárló folyamatok átlagáról nyújt felvilágosítást. Ugyanakkor csak intenzitásértékek állnak rendelkezésre, a sejtben zajló változások nem vizualizálhatóak, így a BRET-méréseket minden esetben ki kell egészíteni képalkotó eljárásokkal.



4. ábra - A PPI-nek szintjének nyomon követése során alkalmazott inter- és intramolekuláris FRET működési elve, forrás: [6] Intermolekuláris szenzoroknál a FRET-jel detektálásához szükséges kék (CFP) és sárga (YFP) fluoreszcens fehérjék vagy ugyanolyan PBD-hez (bal oldali panel) vagy egy PBD-hez és egy irányító szekvenciához (középső panel) vannak kapcsolva. Alacsony lipidszintek mellett a PBD citoplazmatikus elhelyezkedésű, a FP-k között alacsony FRET-jel jön létre, de ha a lipid szintje nő, akkor a PBD a membránhoz kötődik, a FP-k közötti távolság lecsökken, ami magas FRET-jelet eredményez. Intramolekuláris FRET mérésekor a két FP egyazon PBD-hez van kapcsolva (jobb oldali panel). Ebben az esetben nem a a PBD mozgása, hanem a lipidkötés hatására bekövetkező konformációváltozása eredményeképpen a FP-k távolsága vagy orientációja változik meg, mely szintén a FRET-jel változásához vezethet, így lehetővé téve a lipidek szintjének monitorozását.

A FRET és BRET alapú PPI detektálásra alkalmas próbák tervezése során alapvetően kétféle stratégiát lehet követni, egyrészt lehetséges intermolekuláris, másrészt intramolekuláris szenzorokat fejleszteni [6]. Ezek működési elvét vázlatosan a 4. ábra szemlélteti. Intermolekuláris próbák esetén a donor és az akceptor FP-k külön külön molekulán helyezkednek el, míg az intramolekuláris szondáknál ugyanazon fehérjéhez vannak kapcsolva.

A PPI-nek mérése intermolekuláris szenzorral egyrészt lehetséges úgy, hogy egyféle PBD-hez kapcsoljuk külön-külön a donor és az akceptor FP-keket [111, 177]. Az így kapott bioszenzorok - ahogy az az ábra bal oldali paneljén is látható - a PPI alacsony szintje esetén citoplazmatikus elhelyezkedésűek, így közöttük alacsony energiatranszfer mérhető. Ha egy sejtalkotóban megnő a lipid szintje, akkor mindkét

jelölt PBD a membránhoz asszociálódik, egymás molekuláris közelségébe kerülnek, mely lehetővé teszi az energia átadását, így növekvő FRET-jel detektálható. Másik stratégia lehet, ha a szenzornak csak az egyik tagja tartalmaz PBD-t, míg a másik egy olyan szekvenciával rendelkezik, mely a FP-t egy választott sejtalkotóba lokalizálja [178] (ezt a felállást a 4. ábra középső panelje szemlélteti). Ilyenkor a PPIIn-szintekben bekövetkező változások esetén a szenzornak csak a PBD-t tartalmazó tagja mozog. Ezzel lehetőség nyílik arra, hogy sejtalkotó-specifikusan, szubcelluláris felbontással lehessen méréseket végezni. Különösen hasznos ez a stratégia BRET-mérések esetén, hiszen ha mindkét tag ugyanazt a PBD-t tartalmazza, akkor könnyen előfordulhat az, hogy a szenzorok bár eltávolodnak egy sejtalkotótól, ha ott lecsökken a lipid szintje, de áthelyeződnek közösen egy másikba, ahol ugyanaz a PPIIn megtalálható. Ilyenkor nem, vagy csak rövid ideig áll fenn jelváltozás. Erre példa, hogy nyugvó sejtekben a YFP-vel és CFP-vel jelölt FAPP1-PH domének között mért FRET-jel mindkettő molekula Golgi-lokalizációja következtében magasnak adódik, de PLC-aktiváció hatására gyorsan lecsökken. A PLC-aktiváció megszüntetését követően, a reszintézis révén a PM PtdIns4P gyorsan helyreáll, és a jelölt FAPP1-PH domének a PM-hoz kötődnek, így köztük az energiatranszfer mértéke gyorsan megnövekszik [164]. Amennyiben BRET-méréssel, „vakon” követjük ezt a folyamatot, akkor az tévesen azt a következtetést eredményezheti, hogy a lipidszintek a kiindulási értékre álltak vissza a Golgiban, holott erről szó sincs, csak a szenzorok transzlokálódtak egy másik membránba, ahol hasonló molekuláris közelségbe kerültek egymással. Ez ismételten felhívja a figyelmet arra, hogy a BRET-méréseket más eljárásokkal is ki kell egészíteni, másrésről a leírt probléma könnyen elkerülhető, ha a szenzor egyik tagja stabilan valamely sejtalkotóban helyezkedik el.

Az intramolekuláris szenzorok esetén a FP-k ugyanazon fehérjén, jellegzetesen N- és C-terminálisan találhatóak meg. Az ilyen szondák nagy előnye, hogy csak egy molekula transzfekciójára van szükség, és az expressziós arányok nem befolyásolják a jelet. A FP-k közötti szakasz ligandkötés esetén konformációváltozáson megy át, melynek eredményeképp a köztük lévő távolság és/vagy orientáció megváltozik (ahogy az a 4. ábra jobb oldali paneljén is látható) mely FRET- (ill. BRET-) jelváltozáshoz vezet. A PPIIn-jelpályákhoz szorosan kapcsolódó Ins(1,4,5) P_3 monitorozására számos

humán, egér és patkány Ins(1,4,5) P_3 receptor (Ins P_3 R) alapú szonda van használatban, melyek főbb jellemzőit a 3. táblázatban tüntettem fel [179-185].

3. táblázat – Az egysejtes intramolekuláris FRET-mérésekre alkalmazott Ins(1,4,5) P_3 szenzorok, forrás:[186] A feltüntetett K_d értékek azon Ins(1,4,5) P_3 koncentrációnak felelnek meg, melynél a szenzorok 50%-os jelváltozást mutatnak. n.a. jelentése: nincs adat

* A LIBRA szenzor Ins(1,4,5) P_3 -ot nem kötő verziója

** a kontroll kísérleteknél használt nem-kötő mutáns

Szenzor	Ins(1,4,5) P_3 -kötő domén	K_d	Fluoreszcens fehérje	Hivatkozás
LIBRA	patkány III-as Ins P_3 R (1-604)	404 nM	CFP/YFP	[183, 185]
LIBRA- Δ N*	patkány III-as Ins P_3 R (227-604)	n.a.	CFP/YFP	[183-185]
LIBRA-vI	patkány I-es Ins P_3 R (1-604)	269 nM	CFP/Venus	[182]
LIBRA-vII	patkány II-es Ins P_3 R (1-604)	234 nM	CFP/Venus	[182]
LIBRA-vIIS	LIBRAvII R440Q	117 nM	CFP/Venus	[182]
LIBRA-vIII	patkány III-as Ins P_3 R (1-604)	492 nM	CFP/Venus	[184]
LIBRA-vIIIS	LIBRAvIII R440Q	\approx 250 nM	CFP/Venus	[182]
Fretino	humán I-es Ins P_3 R (224-579)	8 nM	CFP/YFP	[181]
Fretino-2	Fretino R504Q	190 nM	CFP/YFP	[181]
Fretino-3**	Fretino R508Q	n.a.	CFP/YFP	[181]
Fretino-4	humán I-es Ins P_3 R (1-604)	n.a.	CFP/YFP	[181]
IRIS-1	egér I-es Ins P_3 R (224-575)	549 nM (sejtlyizátum), 437 nM (tisztított)	Venus/CFP	[179]
IRIS-1-Dmut**	IRIS-1 T276A, K508Q	n.a.		[179]
IRIS-1.2	IRIS-1 K249Q	3-4 μ M		[179]
	egér I-es Ins P_3 R (224-579)	95 nM	Venus/CFP	[179]
	egér I-es Ins P_3 R (224-584)	105 nM	Venus/CFP	[179]
	egér I-es Ins P_3 R (224-604)	107 nM	Venus/CFP	[179]
FIRE-1	patkány I-es Ins P_3 R (1-589)	31 nM	CFP/YFP	[180]
FIRE-2	patkány II-es Ins P_3 R (1-604)	n.a.	CFP/YFP	[180]
FIRE-3	patkány III-as Ins P_3 R (1-604)	36 nM	CFP/YFP	[180]

Mivel a PBD-ek általában mindössze 80-100 aminosav méretűek, és PPIIn-kötés hatására nagyfokú konformációváltozás ritkán figyelhető meg [130], így az intramolekuláris szenzorok kevésbé terjedtek el a PPIIn-ek kimutatására, bár a Grp1-PH domén felhasználásával sikerült olyan intramolekuláris szenzort fejleszteni, mely az endomembránok PtdIns(3,4,5) P_3 -szintjének monitorozását lehetővé tette [187]. Egy másik munkacsoport egy pszeudoligandot épített a szenzorba, mely lipid hiányában kötésben tartotta az Akt-PH domént, de ha a PtdIns(3,4,5) P_3 vagy a PtdIns(3,4) P_2 szintje megemelkedett, akkor a kötés megszűnt, ami a FRET-jelet felnagyította [188].

2.4. A foszfoinozitidek szintjének befolyásolása

Az előző fejezetben összefoglaltam, hogy milyen lehetőségek állnak rendelkezésre a PPIIn-ek kimutatására, szintjük nyomon követésére. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a lipid szerepét a különböző sejtélettani folyamatokban, szükség van olyan technikákra is, melyekkel a PPIIn-ek szintjét befolyásolni lehet. A következő fejezetben a legfontosabb ilyen módszereket szeretném röviden áttekinteni.

2.4.1. Genetikai módosítások

A PPIIn-metabolizmusban részt vevő enzimek genetikai módosítását elő lehet idézni sejt kultúrákban géncsendesítéssel vagy fehérjék overexpressziójával, de akár élő organizmusokban is, transzgenikus technikák (knock-out, knock-in, knock-down) alkalmazásával. Egy az intézetünkben folyó kutatás PI3K β knock-out egerek felhasználásával kimutatta az enzim jelentőségét az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, és *in vivo* is igazolta a fehérje központi szerepét a csont homeosztázisának fenntartásában [189]. Az ilyen jellegű vizsgálatok nagyon sok tanulsággal járnak, hiszen a fehérjék szervezet-, szövet-, és sejtspecifikus szerepét is vizsgálni lehet általuk. Ugyanakkor nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy számos bonyodalom léphet fel a transzgenikus állatoknál.

A genetikai módosítások sok esetben súlyos fejlődésbeli rendellenességeket, nem ritkán embrió korban bekövetkező halált okozhatnak. Erre példa, hogy a Sac1 enzim génjének kiütése egerekben beágyazódás előtti letalitással jár [190]. Ezt a problémát el lehet kerülni, ha kondicionális génmódosítást hajtanak végre, illetve ha az elhalt állatból nyert primer sejt kultúrán végzik a kísérleteket. Ez sem jár azonban mindig sikerrel, a PI4KA élő szervezetben betöltött szerepének vizsgálatára például több próbálkozás is történt (gátlószer, génkiütés, és kondicionális inaktiválás), ám az enzim szintjének csökkentése vagy gátlása minden esetben az állat halálát okozta [191]. További problémát okoz, hogy a hatás eléréséhez általában ilyenkor is több órára vagy akár napra lehet szükség. Ezzel együtt viszont megnő az esélye a kompenzatórikus folyamatok beindulásának, így nem csak a célgén, hanem más gének szintje is változhat, mely megnehezíti a fehérje specifikus szerepének vizsgálatát. Tovább bonyolítja a kapott eredmények kiértékelését, hogy a PPIIn-metabolizmusban jelentős redundancia figyelhető meg, így egy gén befolyásolása nem feltétlenül jár fenotípusos elváltozással. Egerekben például a PLC δ 1 vagy a PLC δ 3 kiütése nem okoz

szívproblémát, de a kétszeres knock-out állatokban súlyos dilatatív kardiomiopátia alakul ki [192]. Szerencsés esetekben tehát a genetikai módosítások fontos információkkal szolgálnak a PPIIn-ek illetve az őket szintetizáló és lebontó enzimek működéséről, de a leírt nehézségek miatt más technikákra is szükség van az inozitol lipidek szerepének pontos feltérképezéséhez.

2.4.2. Enziminhibitorok

Talán a legelterjedtebben használt PPIIn-szinteket befolyásoló módszer a PPIIn-metabolizmusban részt vevő enzimek működését gátló vegyületek alkalmazása. A régóta használt legtöbb ilyen szer általában nem csak egy fehérjéhez képes kötődni, vagy legalábbis nagyon szűk az a koncentrációtartomány, amelyben specifikusan csak egy enzimet képes gátolni. Mivel széles hatásspektrumuk következtében a folyamatok és az enzimek szelektív vizsgálata nehezen kivitelezhető, ezért a jelenlegi kutatások olyan inhibitorok kifejlesztésére irányulnak, melyek specifikusan csak egy izoformára vannak hatással. A legfontosabb gátlószereket a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat – A PPIIn metabolizmusban résztvevő főbb enzimek ismert gátlószerei A dőlt betűvel jelölt inhibitorok bizonyos koncentrációtartományban szelektívnek tekinthetők.

Enzim	Gátlószer
PI3K	Wm; LY294002; YM024; TGX221; AS252424; BAY806946; NVP-BYL719; GSK2636771; GS-1101
PI4KII	adenozin; 9-cyclohexyladenin; echiguanin A; quercetin; fisetin, PAO; MD59
PI4KA	Wm; LY294002; AI
PI4KB	Wm; LY294002; PIK-93; T-00127-HEV1
PIKfyve	apilimod; YM201636
PTEN	VO-Ohpic
OCRL	YU142670
SHIP 1/2	AS1949490; 3AC

Az I-es osztályú PI3K-gátló Wm [193] és LY294002 [194] már több mint 20 éve széleskörűen használatos. Mindkét vegyület az enzimek p110 katalitikus alegységének ATP-kötő részéhez képes kötődni, és azt kompetitíven gátolni. Magasabb

koncentrációban gátolják a III-as osztályba sorolt PI3K-okat, az emlős rapamycin-célféherjét (mTOR), a PI4KA és B-t is [6]. Több szelektív PI3K inhibitor is forgalomban van, mint például a kísérleteknél gyakran alkalmazott YM024 (p110 α); TGX221 (p110 β) vagy az AS252424 (p110 δ), sőt léteznek olyan vegyületek is, melyek vizsgálata már a klinikai fázisban tart. Ezek közé sorolható a PI3K páninhibitor BAY806946, az NVP-BYL719 (p110 α) és a GSK2636771 (p110 β) [6]. A klinikumban a legnagyobb sikert eddig a GS-1101 (idelalisib) nevű vegyület érte el, mely a krónikus limfoid leukémia terápiájában már elfogadott gyógyszer [195].

A II-es típusú PI4K-ok gátlása lehetséges purin-származékokkal (adenozin, 9-cyclohexyladenin, echiguanin A), flavonoidokkal (quercetin, fisetin) vagy a régóta használt fenilarzin-oxiddal (PAO), ám ezen vegyületek nem tekinthetők specifikusnak, számos más enzim működését is képesek befolyásolni [196]. Szelektív gátlószer az MD59, mely csak a II-es típusú PI4K-okra, főként a PI4KII α -ra hat [197]. A III-as családba tartozó PI4K-ok gátlására a korábban említett Wm és LY294002 alkalmazható (IC₅₀ értékük magasabb, mint a PI3K-ok esetén). Specifikus PI4KB inhibitornak tekinthető a PIK-93 [198, 199] (bár képes PI3K-okat is gátolni), illetve a kevésbé elterjedt T-00127-HEV1 [200]. A PI4KA szelektív gátlása sokáig nem volt megoldott, de nemrégiben kifejlesztettek egy erre az enzimre specifikus gátlószert, az A1 vegyületet, mely mind *in vitro* mind *in vivo* ígéretesnek tűnik [191, 201].

A PIKfyve enzim gátlására az apilimod és az YM201636 használatos [6]. Az apilimod adásakor a sejtekben megnő a PtdIns3P- és csökken a PtdIns(3,5)P₂-szint [202], míg az YM201636 alacsony koncentrációban (nM) a PtdIns5P, míg magasabb koncentrációban (μ M) a PtdIns(3,5)P₂ keletkezését képes megakadályozni [54]. Több kutatás is folyik, melyek az apilimod lehetséges klinikai felhasználását vizsgálják autoimmun kórképek terápiájában (rheumatoid arthritis, Crohn-betegség, psoriasis) [202].

Nemcsak kináz-, hanem PPIn-foszfataz gátlószer is elérhetőek. A PTEN inhibitor VO-OHPic vegyülettel kezelve a sejteket a PtdIns(3,4,5)P₃- [203], míg az OCRL-gátlószer YU142670 használatával a PtdIns(4,5)P₂-szint növekedését lehet elérni [204]. A SHIP1/2 5-foszfataznak mind gátlószerei (AS1949490, 3AC) mind aktivátorai (AQX-MN100; AQX-1125) elérhetőek [6]. A SHIP1/2 működését

befolyásoló szerek ígéretesek lehetnek a leukémia és egyes gyulladásos megbetegedések kezelésében [205].

Összességében elmondható, hogy az enziminhibitorok régóta elengedhetetlenek a PPI-n kutatások során, és egyre fontosabbá válnak a különböző kórképek kezelésében is. Bár számos szelektív inhibitor áll már rendelkezésre, egyes enzimek gátlása még nem megoldott (pl. PIPKI). Sok esetben megfigyelhető, hogy az *in vitro* körülmények között, tisztított fehérjéken végzett kezelések erős gátlóhatást képesek kiváltani, de *in vivo* nem használhatóak, például mert nem jutnak át a PM-on [206]. Felhasználásuknak az is gátat szabhat, hogy a legtöbb esetben hosszas inkubációra van szükség a hatások kiváltásához, így akut lipidszint-változtatásokra kevésbé alkalmasak. Terápiás potenciáljuk ugyanakkor előrevetíti, hogy a közeljövőben várhatóan újabb- és újabb, a különböző enzim izoformákra egyre specifikusabb, és kedvezőbb mellékhatás-spektrummal rendelkező vegyületek jelennek majd meg a piacon.

2.4.3. Foszfinozítid analógok

A sejtek PPI-n szintjének növelését membránpermeábilis foszfinozítid analógokkal történő inkubációval is el lehet érni. Az ilyen vegyületek sejtbe juttatásának fő nehézsége, hogy az inozitol fejrész negatív töltéssel rendelkezik, így nem megy át a PM-on. Megoldást jelent erre a problémára, ha a foszfátcsoportokat acetoximetilésztercsoporttal vagy butiráttal fedik el, bár az ilyen molekulák létrehozása bonyolult és hosszadalmas [207]. A negatív csoportjait elrejtett molekula már képes áthatolni a membránon, majd a sejten belül az endogén észterázok lehasítják az acetoximetilésztercsoportot, így a PPI-n szabaddá válik. Membránpermeábilis PtdIns(3,4,5,6) P_4 adásakor, a PI3K hatásához hasonlóan Akt, p70S6K, MAPK és PKC aktiváció mutatható ki [208]. Egy másik közleményben kívülről bejuttatott PtdIns(3,4,5) P_3 hatását vizsgálták a különböző receptorok endocitózisa során, és azt találták, hogy a lipid képes előidézni a RTK-ok ligandkötés nélküli internalizációját, de a GPCR-ok és a transzferrin receptor endocitózisa nem következik be [209]. Sőt, nemrégiben sikerült *Drosophila* lárvákba is PPI-n analógokat juttatni, ami a módszer szervezetszintű felhasználhatóságát mutatja [210].

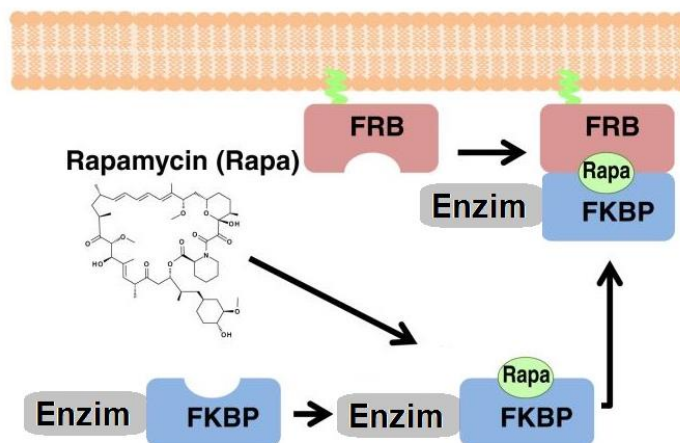
Az acetoximetilészter lehasítása az endogén észterázok által általában lassú folyamat, így a lipid szintjének változása elhúzódó. Az akut lipidszintváltozások létrehozására ma már elérhetőek fotoaktiválható membránpermeábilis PPI-n-analógok is.

Ezen vegyületeknél az acetoximetilészter lehasítását követően a PPI-n még inaktív marad, mert rajta egy olyan kumarin-csoport van, ami mintegy „kettrecbe zárja” a lipidet. Az aktiváláshoz 405 nm-es hullámhosszúságú fényvel kell megvilágítani a molekulát, melynek eredményeként a gátló csoport másodpercek alatt leválik a PPI-ről, így gyors lipidszint-emelkedést lehet elérni [211]. Az ilyen fotoaktiválható molekulák további előnye, hogy a megvilágítást csak egy kisebb területre fókuszálva nem a teljes sejtben, hanem csak annak kisebb mikrokörnyezetében emelkedik meg a lipid szintje.

A kívülről bejuttatott lipidek kapcsán fontos megemlíteni, hogy nemcsak a rendeltetésüknek megfelelő membránba, hanem bármelyikbe beépülhetnek. Ez felboríthatja a sejtek homeosztázisát és intracelluláris PPI-n-megoszlását, így az általuk megfigyelhető hatások nem minden esetben tükrözik hűen az endogén PPI-n-ek szerepét.

2.4.4. Kémiai indukált dimerizáció

A módszert szinte egy időben, egymástól függetlenül 3 munkacsoport dolgozta ki, és azóta széleskörűen használatos a lipidkutatókban [212-214]. A klasszikus rendszer működése az mTOR molekulakomplex két tagjának, az FK506 kötő fehérjének (FKBP) illetve az FKBP-rapamycin-kötő doménnek (FRB) a heterodimerizációján alapul, működésének elvét az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra – A rapamycin által kiváltott heterodimerizációs rendszer működési elve, forrás: [215] A heterodimerizáció az mTOR molekulakomplex két tagja, az FRB és FKBP domének között jöhet létre rapamycin adásakor. Az FRB domént a különböző sejtalkotókba lehet irányítani, ha egy rövid irányítószekvenciával látják el (zölddel jelölve az ábrán). Az FKBP illetve a hozzá kapcsolt enzim nyugalmi állapotban citoplazmatikus elhelyezkedésű, de rapamycin adását követően az FKBP-enzim az FRB-vel jelölt membránhoz kötődik. Az FRB irányítószekvenciáját változtatva szinte bármely sejtalkotóba lehet ily módon akutan irányítani enzimet.

Nyugvó sejtekben a két fehérje nem kapcsolódik egymáshoz, de rapamycin adását követően percek alatt kialakul közöttük egy irreverzibilis kötés. Amennyiben a komplex egyik tagját, mely jellemzően az FRB, olyan szekvenciával látják el, mely specifikusan egy sejtalkotóba irányítja, akkor meg lehet határozni, hogy a heterodimerizáció pontosan hol jöjjön létre. Megfelelő irányítószekvenciákkal a PM-től a lizoszómáig szinte bármely sejtalkotóban kiváltható ily módon a jelenség [216]. Az FKBP-hez PPI_n-foszfátáz vagy kináz enzimet kapcsolva elérhető, hogy rapamycin adását követően akutan és specifikusan a kiválasztott kompartmentben változzon meg a lipidek szintje.

A korábban említett 3 tanulmány FKBP-5-foszfátáz enzimet illetve PM-hoz horgonyzott FRB-t expresszáltatott élő sejtekben. Rapamycin adását követően az enzim gyorsan transzlokálódott a PM-ba, és ott szubsztrátját, a PtdIns(4,5) P_2 -ot lebontotta. A technika segítségével sikerült igazolni a PM PtdIns(4,5) P_2 szerepét az EGF- és transferrin receptorok internalizációjában, az ATP-indukálta Ca²⁺-jel fenntartásában, a TRPM8 csatorna működésében [212], valamint a klatrin-mediált endocitózis folyamatában [214] és a KCNQ kálium-csatorna permeabilitásában [213]. Kihasznlva azt, hogy kis túlzással az FRB bárhová irányítható, az FKBP-hez pedig bármilyen enzim kapcsolható, azóta számos vizsgálat kihasznlta a rendszer nyújtotta lehetőségeket. A PI3K p110 α katalitikus alegységének membrántranszlokációját például úgy érték el, hogy a p85 regulátoros alegységet kapcsolták az FKBP-doménhez, majd annak rapamycin-indukálta membránkötődése odavonzotta a p110 α alegységet is, mely végül a PtdIns(3,4,5) P_3 -szint növekedését eredményezte [217]. Egy ötletes kísérletsorozatban nem enzimet kapcsoltak az FKBP-hez, hanem a PLC δ 1-PH domént, mely nyugvó sejtekben a PM PtdIns(4,5) P_2 -hoz kötődött és szekvesztrálta a lipidet, míg az FRB-t egy mitokondriumhoz irányító szekvenciával látták el. Ebben az esetben rapamycin adását követően az FKBP-PLC δ 1-PH komplex a mitokondriumra helyeződött át, így a korábban elfedett PtdIns(4,5) P_2 elérhetővé vált az endogén fehérjék számára, a szabad lipid szintje megnőtt [218].

Az mTOR alapú rendszerek mellett ma már más molekulák kémiaailag indukálható heterodimerizációja is ismert. Az FKBP-FRB heterodimerizáció alternatívája lehet az S-(+)-abszcizinsav növényi hormon hatására létrejövő kötés a PYL1 és ABI1 között [219], vagy egy másik fitohormon, a gibberellinsav által kiváltott

kapcsolódás a GAI és GID1 fehérjék között [220]. Ezen rendszerek felhasználhatóak szimultán is, így egy időben több szignalizációs útvonal befolyásolására is lehetőséget nyújtanak, vagy ugyanazon enzimet egymást követően több sejtalkotóba is lehet irányítani, ezzel mintegy reverzibilissé téve a folyamatot [221]. További előnyük, hogy míg a rapamycin esetén számolni kell azzal, hogy a szer az endogén mTOR komplexhez is kötődik, és így annak működését befolyásolhatja, addig a fitohormonoknak nincsen célfehérjéje az állati sejtekben.

Mint minden eddig felsorolt technikának, így természetesen a kémiai indukálható dimerizáción alapuló módszereknek is vannak hátulütői. Az első nehézség, hogy a rendszer tagjait transzfektálni kell a sejtekbe, és lehetőleg a két konstrukció stabil expressziós arányát kell elérni. Ez több plazmid alkalmazásakor nem egyszerű feladat. Megoldást jelenthet ugyanakkor, ha a két konstrukciót sikerül egy plazmidba beépíteni, és közéjük egy olyan szekvenciát szerkeszteni, mely elősegíti mindkét fehérje translációját. Ilyen szekvencia például a virális T2A, melyet mi is sikeresen alkalmaztunk lipiddepléciós kísérleteinkben [111]. Gondot jelenthet, hogy a kémiai ágenseknek lehetnek nem várt hatásai. Ahogy korábban említettem, a rapamycin endogén molekulákhoz is képes kötődni, így azok aktivációjával is számolni kell. Mutáns FRB (T2098L), illetve egy csak ezt felismerni képes (de az endogén mTOR-hoz nem kötődő) rapamycin-analóg AP21967-tel (szokás rapalógnak is hívni) ez a nem várt hatás kivédhető [222], de a vegyület általános alkalmazásának gátját képezi magas ára. További probléma lehet, hogy az expresszálatott enzimeknek lehet háttéraktivitása. Ez főként abban az esetben merül fel, ha szabadon úszkálnak a citoplazmában és így dimerizáció indukálása nélkül is közel kerülhetnek a célmembránhoz és így szubsztrátjukhoz. Egy lehetséges megoldás lehet, ha az enzimet szekvesztráltatják valamilyen gyenge kölcsönhatás révén egy sejtalkotóban, majd az indukáló szer adását követően erősebb kötés alakul ki a heterodimerizációs rendszer tagjai között, így a fehérje elhagyja a sejtalkotót és a célmembránra tud áthelyeződni. Ezt a lehetőséget használták ki, mikor FAPP1-PH domént kötöttek az FKBP-enzim konstrukcióra, mely így Golgi lokalizációt vett fel, de rapamycin jelenlétében a fehérje a PM-hoz horgonyzott FRB-hez kötődött [223].

A technika már eddig is bizonyította alkalmazhatóságát a PPIIn-kutatások során, és vélhetően a jövőben is számos felfedezést fog elősegíteni. A rendszer

továbbfejlesztése és finomhangolása mind a mai napig tart, erre példa egy mostanában megjelent közlemény, melyben egy reverzibilis kötést eredményező kémiai indukálható heterodimerizációs rendszert mutattak be. Ennél a felállásnál a SNAP és az FKBP között lehet létrehozni gyenge kötést az rCD1 vegyület révén, majd FK506-ot adva az FKBP elereszti az rCD1-et és az FK506-tal lép kölcsönhatásba, így megszűnik a SNAP fehérjével alkotott dimerje. A fotoaktiválható PPI-n analógokhoz hasonlóan fotoaktiválható rapamycin-származékok fejlesztése is zajlik [224, 225]. Ezek felhasználásával lehetőség nyílik arra, hogy nem a teljes sejtet, hanem annak csak egy kicsi részletét megvilágítva lokálisan lehessen heterodimerizációt indukálni. Emellett arra vonatkozóan is vannak próbálkozások, hogy a rendszer tagjait expresszázó transzgenikus állatokat hozzanak létre, így lehetővé váljon az akut lipidszintváltozások szervezetszintű, vagy primer sejteken történő vizsgálata [226].

2.4.5. Fényindukált dimerizáció

A fényindukált dimerizáció nagyon hasonlít ahhoz, mint amit a fotoaktiválható rapamycin-származékokkal lehet kiváltani. Ebben az esetben is egy külső megvilágításra van szükség ahhoz, hogy két fehérjedomén között létrejöjjön az interakció, de itt a jelenséget nem egy vegyület hozza létre, hanem önmagában a fény képes bizonyos növényi eredetű molekulák egymáshoz történő kötődését előidézni. Az egyik ilyen ismert fehérjepár a PhyB és a PIF6, melyeket vörös fényel megvilágítva azok dimerizációját lehet megfigyelni [227]. Kék fény használatával a CRY2 és a CIBN domének között váltható ki párszáz ms alatt kötődés. A jelenség reverzibilis, a megvilágítást követően pár perc alatt szétválik a komplex. [228]. Utóbbi fehérjepárt illetve a hozzájuk kötött 5-foszfátáz és PI3K aktiváló doméneket több esetben is sikeresen alkalmazták a PtdIns(4,5) P_2 - és a PtdIns(3,4,5) P_3 -szintek akut befolyásolására élő sejtekben [229, 230]. Sőt, a rendszer tagjait sikerült expresszáltatni *Caenorhabditis elegans*-ban is, és így élő állatban tudták a PI3K szerepét tanulmányozni a tanult viselkedésformák kialakulása kapcsán [231].

Bár számos nehézséggel, amit a kémiai heterodimerizációnál már említettem, itt is számolni kell (a domének kotranszfekciója, az expresszáltatott enzimek háttéraktivációja stb.), a módszer rendelkezik jó néhány előnnyel. Ezek közé tartozik, hogy a dimerizáció gyorsabban jön létre, és a megvilágítás megszüntetését követően reverzibilitása révén felbomlik. Mivel nincs szükség kémiai ágens adására, így az

endogén fehérjéken kiváltott nem várt hatásokkal nem kell számolni ebben az esetben. Hasonlóan a fotoaktivált PPI-n analógokhoz vagy rapamycinszármazékokhoz itt is lehetőség van arra, hogy a reakciót ne az egész sejtben, hanem csak egy kis területen váltsák ki, így a lokális PPI-n-változások hatásai jobban nyomon követhetőek.

A technika nehézségei közé tartozik, hogy a kísérletek kivitelezése speciális lézereket és FP-eket igényel, mivel kerülni kell a dimerizációt kiváltani képes megvilágításhoz hasonló hullámhosszúságú fényt emittáló FP-eket a mérések során. További problémát jelenthet, hogy mivel a reakció fény hatására jön létre, ezért a kísérleteket megelőzően a transzfektált sejteket óvni kell a dimerizációt előidéző hullámhosszúságú fénytől.

2.4.6. Elektrogén manipuláció

Az elektrogén manipulációhoz egy feszültségérzékeny enzimet, a medúzák közé tartozó *Ciona intestinalis* fajból származó Ci-VSP 5-foszfátáz, vagy az ezzel homológ, zebraháliból származó Dr-VSP-t kell a sejtekben expresszálni [232, 233]. Az enzim a PM-hoz kötődik, és a membránpotenciál pozitívabbá válásakor aktiválódik. Szubsztrátja a $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ és a $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$, sőt egy tanulmányban úgy találták, hogy a membránpotenciál további növelésekor 3-foszfátáz aktivitása is lesz, és képes a $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ -ot is hasítani [234]. A módszer előnye, hogy gyors és reverzibilis lipidszintváltozásokat tesz lehetővé. Fő felhasználási területe elsősorban az ioncsatornák PPI-n-érzékenységének vizsgálata. A Ci-VSP segítségével sikerült igazolni többek között a KCNQ2/3 és a TRPM8-csatornák $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -függését [12, 235]. Bár az eredeti Ci-VSP szűk szubsztrátspecifitással rendelkezik, létre lehet hozni olyan genetikailag módosított feszültségérzékeny enzimeket, melyek más lipideket ismernek fel. Erre példa, hogy az 5-foszfátáz domént a PTEN katalitikus doménjére cserélve el lehetett érni, hogy a kiméra a $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ és a $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ 3-foszfátját hasítsa [236]. A módszer felhasználhatóságának fő limitációja, hogy kizárólag a PM PPI-n-szintek változtatását lehet vele elérni.

3. Célkitűzések

Ahogy azt dolgozatomban korábban bemutattam, bár sok módszer létezik a PPIIn-ek szintjének nyomon követésére, de a dinamikus változások detektálása problémákba ütközik, a létező módszerek sokszor nem elég érzékenyek, pontatlanok, bonyolultak. A mesterséges manipulációkkal végrehajtott, vagy a masszív hormonális stimulus eredményeként létrejövő változásokat jól érzékelhetik, de a fiziológiához közeli koncentrációjú hormonális ingerlés hatására bekövetkező változások kvantitatív mérése nem megoldott.

Elsődleges céljaink ezért az alábbiak voltak:

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

Az új molekuláris eszköztárral pedig az alábbiakat terveztük vizsgálni:

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

4. Módszerek

4.1. A kísérletek során használt anyagok

A molekuláris biológiai reagenseket a Fermentas cégtől (Vilnius, Litvánia) vásároltuk. A sejt kultúra edényeket és lemezeket a Greiner Bio-One GmbH-től (Kremsmünster, Ausztria) szereztük be. A sejtenyésztéshez használt DMEM és a főtális borjúsérum (FBS) a Lonza cég (Bázel, Svájc) terméke. A cölnenterazin *h* reagenst a Regis Technologies-től (Morton Grove, Illinois, USA) vásároltuk. A transzfektáláshoz használt Lipofectamine 2000 reagens és az Opti-MEM médiumoldat az Invitrogen (Carlsbad, Kalifornia, USA), a GeneCellin reagens pedig a BioCellChallenge vállalat terméke (Toulon, Franciaország). Az atropint az EGIS Gyógyszergyár Zrt.-től (Budapest, Magyarország), a rapamycint a Selleckchem-től (Houston, Texas, USA), az ionomycint az Abcam-től (Cambridge, UK) szereztük be. Az A1 vegyület Balla Tamás (NICHD, NIH, Bethesda, Maryland, USA) ajándéka volt. Amennyiben másképp nem jelöltem, a többi vegyületet és reagenst a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, Missouri, USA) rendeltük.

4.2. Plazmidkonstrukciók

A vad-típusú M_3 muszkarinos acetilkolin receptort (M_3R) (3xHA jelöléssel N-terminálisan) az S&T cDNS Resource Center-től (Rolla, Missouri, USA) vásároltuk. A vad típusú epidermális növekedési faktor receptort (EGFR) [166], és az 1-es típusú angiotenzinreceptor nem internalizálódó deléciós mutánsát ($AT_1R-\Delta 319$), melybe az Y319 pozícióban egy stopkodon lett beillesztve, munkacsoportunk már korábban is használta [237].

A foszfoinozítid-felismerő bioszenzorok elkészítése során először *AgeI* és *NotI* restriktív enzimekkel lecseréltük a már meglévő PLC δ 1-PH-GFP, a PPI α kötésre képtelen mutáns PLC δ 1(R40L)-PH-GFP [87] és Btk-PH-GFP konstrukciókban a GFP fluoreszcens fehérjét *Ceruleanra* (a konfokális mikroszkópos mérésekhez) illetve szuper *Renilla* luciferázra (Luc) (a BRET-mérésekhez). A GFP-OSH2-2xPH módosításakor a Luc-ot tartalmazó konstrukcióhoz *AgeI* és *BglII*, míg a *Cerulean*nal jelölt szenzor létrehozásához *AgeI* és *BspI407I* restriktív enzimeket használtuk. A GFP-SidM-P4M konstrukció Balla Tamás ajándéka volt [38]. A Luc-zal és *Cerulean*nal jelölt SidM-2xP4M elkészítéséhez először a kapott konstrukcióból PCR segítségével

felsokszoroztuk a P4M domént, majd a Ceruleannal ill. Luc-zal jelölt OSH2-2xPH konstrukciók OSH2-2xPH szekvenciáját *XhoI* és *BamHI* restrikciós enzimek segítségével lecseréltük a kapott PCR termékre. A domén tandem ismétlődéséhez a SidM-P4M szekvenciáját PCR-rel felsokszoroztuk, majd a korábban létrehozott Cerulean-SidM-P4M és Luc-SidM-P4M plazmidokat *XhoI* enzimmal megnyitottuk, és a PCR terméket behelyeztük a FP és a korábban már meglevő SidM-P4M szekvenciája közé. A kész konstrukcióban a tandem szekvenciák közé egy SSRE összekötőszakasz épül be.

Ahhoz, hogy specifikusan a PM lipidjeinek változását tudjuk mérni BRET módszerrel, az energiaakceptor Venus FP-t a PM-ba kell irányítani. Ehhez többféle PM irányítószekvenciával ellátott konstrukciót is készítettünk, melyek közül a dolgozatomban bemutatásra kerülő kísérletek során kettőt használtunk fel. Egyik az egér Lck fehérje N-terminális irányítószekvenciája (MGCVCSSNPENNNN; GenBank elérési szám: NM_001162433) melyre a továbbiakban L₁₀-ként fogok hivatkozni, míg a másik a humán c-Src fehérje N-terminális irányítószekvenciája (MGSSKSKPKDPSQRRNNNN; GenBank elérési szám: NP_005408), melyet S₁₅-ként fogok említeni. Ezen két szekvenciára azért esett a választás, mert több közlemény alapján az L₁₀ és S₁₅ az eltérő poszttranszlációs lipidmodifikációik következtében a PM eltérő mikrodoménjaiban helyezkedik el (L₁₀ esetén palmitoiláció és 2x mirisztoiláció történik, míg S₁₅ esetén a mirisztoiláció illetve a bázikus aminosavak jelenléte fontos a lokalizációban) [238, 239]. A konstrukciók elkészítéséhez egy olyan oligót terveztünk, mely a leírt peptideket kódolja, és a két végén megtalálható egy *NheI* és egy *BamHI* hasítási hely. Első lépésben *NheI* és *BamHI* restrikciós enzimekkel megvagtuk a pmRFP-N1 plazmidot (Clontech Laboratories, Mountain View, Kalifornia, USA), majd a leírt oligókat beillesztettük a vágási helyek közé. Ezt követően *AgeI* és *NotI* restrikciós enzimek segítségével lecseréltük az mRFP-t Venus-ra.

Annak biztosítása végett, hogy az intermolekuláris szenzoraink mindkét tagja biztosan kifejeződjön a transzfektált sejtekben, a T2A szekvenciát alkalmaztuk [240], melyet munkacsoportunk már korábban is használt kísérletei során [111]. Az L₁₀-Venus és S₁₅-Venus konstrukciók C-terminális végéhez fuzionáltuk a T2A peptidszekvenciát, majd ezen konstrukciókat a Cerulean-nal vagy Luc-zal jelölt PLCδ1-PH és BTK-PH plazmidokba illesztettük *NheI* és *EcoRI*, az OSH2-2xPH és SidM-2xP4M plazmidok

esetén pedig *NheI* és *AgeI* enzimek segítségével. Az így létrejött konstrukciók felépítése a PM-Venus-linker1-T2A-linker2-(FP)-PBD(x2)-(FP) szerkezetet követi, ahol a linker1 a VDSGS, míg a linker 2, ha a FP N-terminálisan helyezkedett el, akkor az RSRE (Cerulean) vagy SGLRSRE (Luc), ha C-terminálisan, akkor pedig a DPVVAT szekvenciáknak felel meg.

Az intramolekuláris $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szondák alapját a munkacsoportunk által már korábban is használt mRFP- $\text{Ins}P_3$ R-LBD konstrukció (a humán 1-es típusú $\text{Ins}P_3$ receptor 224-605 szakaszának szekvenciája) képezte [241], amelybe irányított mutagenézissel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) vittük be az alábbi mutációkat: R265K, R269K, R568K, R504K és dupla R265K,269K, hogy ezáltal csökkent $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ affinitású fehérjékhez jussunk. A szenzorok készítése során első lépésben egy általános FRET plazmidot hoztunk létre. Ennek alapja egy pEYFP-C1 vektor (Clontech Laboratories), melyben a YFP-t már korábban Cerulean-ra cserélték, majd ebbe a plazmidba klónoztuk a Venus szekvenciáját *EcoRI* és *NotI* enzimek segítségével. Az így nyert FRET plazmid két fluoreszcens fehérje közé illesztettük be a vad típusú vagy mutáns $\text{Ins}P_3$ R-LBD szekvenciákat (két végén egy NEQRSR ill. NS összekötő szakasszal) *XhoI* és *EcoRI* felhasználásával. A FRET szenzorok Cerulean FP-jét *NdeI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel cseréltük le Luc-ra, így jutottunk el a BRET-méréseknél használható szondákhoz. Végül az optikai paraméterek javítása érdekében, kiindulva az Epac cAMP-szenzorból [242] a Venust lecseréltük a cirkulárisan permutált (cp173) Venus-Venus tandemre *EcoRI* és *NotI* enzimekkel. A cirkulárisan permutált FP lényege, hogy a fehérjét kódoló plazmid átalakítása révén a 173-as pozícióban lévő aszparaginsav kerül N-terminális pozícióba, míg az eredetileg N-terminálisan elhelyezkedő rész a C-terminális végére illesződik egy GGSGG linkerrel. A cp173-Venust leíró cikkben azt találták, hogy ez a változtatás nem akadályozza meg a a fehérje érését és a pH változásokra továbbra sem lesz érzékeny [243].

Az intramolekuláris Ca^{2+} -szenzor elkészítéséhez elsőként a kalciummérésekhez széleskörűen alkalmazott Cameleon D3 fúziós fehérje [244] megfelelő szekvenciáját PCR-rel felszorzoztuk, majd az így nyert szakaszt *XhoI* és *EcoRI* enzimekkel beillesztettük a fentebb leírt vad típusú $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ szenzorunkba az $\text{Ins}P_3$ R-LBD helyére.

A lipiddepléciós rendszert alkotó fehérjekonstrukciók egy részét munkacsoportunk már korábban többször használta kutatásaihoz [111, 212]. A kísérleteink során használt konstrukciók lényegében a korábbi plazmidokon alapultak, de a szenzoroknál leírtakhoz hasonlóan az FRB-domént a PM-ba irányító korábbi szekvenciát (GAP43 vagy Lyn) az Lck és a c-Src fehérjék N-terminális aminosavaira cseréltük le. Az mRFP-FKBP-Sac1-5ptase vagy más néven mRFP-FKBP-Pseudojanin (mRFP-FKBP-PJ), az mRFP-FKBP-Sac1dead-5ptase (mRFP-FKBP-PJ-5ptase) és mRFP-FKBP-Sac1-5ptasedead (mRFP-FKBP-PJ-Sac1) konstrukciókat [42] Gerald R.V. Hammond (NICHD, NIH, Bethesda, Maryland, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. Utóbbi konstrukciót felhasználva elkészítettünk egy csak Sac1 enzimet tartalmazó változatot is (elhagyva a működésképtelen 5-foszfátot a C-terminálisról). Ehhez a plazmidot *KpnI* és *BamHI* enzimekkel megvágtuk, melynek eredményeként az 5-foszfát nagy része eltávolításra került, majd az így kapott plazmid egyszálú végeit Klenow fragment segítségével feltöltöttük, és a plazmidot ligáltuk. Így egy olyan konstrukcióhoz jutottunk, melyben a Sac1 végén még néhány aminosav (GGSTGSR) található a stop kodon előtt. A rendelkezésünkre álló összes enzim esetén elkészítettük a lipiddeplécióhoz szükséges mindkét fehérjét kifejező T2A virális szekvenciát tartalmazó plazmidokat is, a korábbiaknak megfelelő módon [111]. Az így létrejövő konstrukciók felépítése a PM-FRB-linker1-T2A-linker2-mRFP-FKBP-enzim szerkezetet követi, ahol linker 1 a VDSGS míg a linker 2 a PVAT szekvenciának felel meg.

A lipidszintváltozások endocitózisra kifejtett hatásának vizsgálatához használt β_2 AR-luc, Venus-Rab5 és β -arresztin2-mRFP konstrukciókat munkacsoportunk már korábban is használta kísérletei során [111, 245].

4.3. Sejtvonalak, tranziens transzfekció

A méréseket HEK 293T és COS-7 sejteken végeztük, melyek az ATCC (Manassas, Virginia, USA) cégtől származtak. A sejteket 10cm-es petricsészében tenyésztettük 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomocint (50 μ g/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM – Lonza 12-604), egy 37°C-os, 5% CO₂-os párás levegőt biztosító inkubátorban.

A BRET-méréseket HEK 293T sejteken végeztük. A tranziens transzfekcióhoz a 10cm-es petricsészében növesztett sejteket tripszinnel felszedtük, majd polilizinnel előkezelt (0,001%, 45-60 perc) 96-lyukú lemezekre helyeztük őket 10⁵ sejt/lyuk

mennyiségben, 100 μ l Opti-MEM oldatban szuszpendálva. Ehhez 50 μ l transzfekciós elegyet adtunk, mely 1,5 μ l/lyuk GeneCellin reagenst és 0,24-0,3 μ g/lyuk DNS-konstrukciót tartalmazott. Hat órával a transzfekciót követően a korábban leírt szérumot és antibiotikumokat tartalmazó DMEM-et adtuk a sejtekhez (100 μ l/lyuk). A kísérleteket 25 órával a transzfekciót követően kezdtük el.

Mikroszkópos mérésekhez és a Western blot analízishez a HEK 293T vagy a COS7 sejteket polilizinnel előkezelt (0,001%, 45-60 perc) 35 mm átmérőjű, 1,5-ös vastagságú üveg fedőlemezre helyeztünk $2-3 \times 10^5$ sejt/fedőlemez sűrűségben, a transzfekciót megelőző napon. A transzfekció során a sejtek médiumát Opti-MEM-re cseréltük (1 ml/fedőlemez) és ehhez adtuk hozzá 200 μ l végtérfogatban a 2 μ l Lipofectamine 2000-t és méréstől függően 0,5-2 μ g DNS-konstrukciót tartalmazó transzfekciós elegyet (Opti-MEM-ben oldva). Hat órával a transzfekciót követően a korábban leírt szérumot és antibiotikumokat tartalmazó DMEM-et adtuk a sejtekhez (1 ml/fedőlemez). A kísérleteket 24 órával a transzfekciót követően kezdtük el.

4.4. Western blot

A 4.3. fejezetben részletezett módon növesztett és transzfektált sejteket (35mm-es átmérőjű, 1,5-ös fedőlemezen) 24h-val a tranziens transzfekciót követően proteáz- és foszfatazinhibitorokat tartalmazó SDS-mintapufferbe vettük fel, szonikáltuk, 5 percen át 95°C-on főztük, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Ezt követően a fehérjéket polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra vittük át. Az antitestek nem specifikus kötődésének blokkolását 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-oldatba (PBST) kevert tejpórral (5%) végeztük (30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubálva). Az antitesteket tejpóros PBST oldatban adtuk a mintához, az elsődleges antitestek esetén 500-szoros (nyúl eredetű anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornia, USA; egérből származó anti- β aktin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), a másodlagosaknál 5000-szeres (anti-nyúl- vagy anti-egér-tormaperoxidáz, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) hígításban. Az antitestek láthatóvá tételéhez kemilumineszcens Immobilion Western HRP szubsztrát reagenst (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) használtunk.

4.5. Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópos méréseket HEK 293T és COS-7 sejteken végeztük, a sejtek tenyésztését és transzfektálását a 4.3. fejezetben leírtaknak megfelelően hajtottuk végre. Közvetlenül a mérés előtt a fedőlemezeket, egy AttoFluor (Invitrogen) kamrába helyeztük, majd egyszeri mosást követően 800 µl korábban leírt módosított Krebs-Ringer pufferoldatot pipettáztunk a kamrába. A mérést 35°C-on hajtottuk végre, az alkalmazott ingereket 200 µl térfogatban adtuk a kamrában lévő mérőoldatba. A felvételeket Zeiss LSM 710 típusú pásztázó konfokális mikroszkóppal, 63-szoros nagyítású, 1,4-es numerikus apertúrájú Plan-Apochromat immerziós olajos objektívvel, multi-track frame-scan módban, 1 µm-es optikai szeletvastagsággal készítettük. A gerjesztéshez 458 nm (Cerulean FP esetén) és 514 nm (YFP ill. Venus esetén) hullámhosszúságú argonlézert illetve 543 nm-en emittáló hélium-neon lézert használtunk. A különböző fluoreszcens fehérjék emissziójának detektálása az alábbi hullámhossz-tartományokon történt: Cerulean: 467-486 nm; YFP és Venus: 515-573 nm; mRFP: 612-728 nm. Az elkészült képek utólagos feldolgozását Adobe Photoshop CS3 (San Jose, Kalifornia, USA) programmal végeztük.

4.6. Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések kivitelezése

A FRET-méréseket HEK 293T sejteken hajtottuk végre, a 4.5. fejezetben leírtaknak megfelelő módon Attofluor kamrába helyezett fedőlemezeken, módosított Krebs-Ringer oldatban (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,7 mM MgSO₄, 10 mM glükóz és 10 mM Na-HEPES, 7,4-es pH). A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük, egy 40-szeres nagyítású, 1,3-as numerikus apertúrájú Plan-Apochromat immerziós olajos objektívvel felszerelt inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Axio Observer D1, Zeiss, Németország), a felvételeket Cascade II kamerával (Photometrics, Tucson, Arizona, USA) készítettük. A megfelelő hullámhosszúságú (435 nm és 500 nm) gerjesztő fényt egy 75 wattos Xenon lámpához (DeltaRam, Photon Technology International, Birmingham, New Jersey, USA) kapcsolt monokromátor biztosította. Az emittált fényt Chroma 69008bs dikroikus sugárosztóval (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, Vermont, USA) választottuk szét, majd a detektáláshoz Cerulean esetén 470/24 nm-es, míg Venusnál 530/30 nm-es filtereket használtunk. A képek 5 másodpercenként

készültek. Az adatok gyűjtése MetaFluor programmal történt (Molecular Devices, Downington, Pennsylvania, USA). Az eredmények további kiértékelésére, a háttérzaj kivonására, az átbeszélések korrigálására és az 530/470 emissziós hányados számolására a MetaMorph (Molecular Devices) szoftvert vettük igénybe.

4.7. A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérés kivitelezése szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel

A 4.3. fejezetben leírtaknak megfelelően 96-lyukú lemezre tapasztott transzfektált sejtek médiumát 24h-val a tranziens transzfekciót követően lecseréltük 50 µl módosított Krebs-Ringer pufferra, majd fél órát 37°C-on inkubáltuk a sejteket. A méréseket Mithras LB 940 szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Németország) 37°C-on végeztük. A mérés kezdetén sejtpermeábilis luciferáz szubsztrátot, cölaterazin *h-t* adtunk a sejtekhez (40 µl, végkoncentrációja 5 µM). A donor- és akceptorintenzitások méréséhez 485 nm-es illetve 530 nm-es emmissziós filtereket alkalmaztunk, egy hullámhossz 0,5 másodpercig volt detektálva pontonként. A kísérletekhez használt vegyületeket szintén a módosított Krebs-Ringer pufferba keverve, 10 µl térfogatban adtuk a sejtekhez. Minden kísérleti felállást egy időben 3 párhuzamos ponton mértük.

A BRET hányadosot úgy kaptuk meg, hogy az 530 nm-en mért intenzitást elosztottuk a 485 nm-en mért értékkel. Mivel ahogy telik az idő, a nyers BRET hányados gyakran mutat egy spontán emelkedést, ezt kivédendő a mérések során mindig beiktattunk olyan pontokat is, melyeket nem ingereltünk, majd ezeket kontrollként felhasználva korrigáltuk az alapvonalra a kapott BRET értékeket. Intramolekuláris BRET-szenzorok esetén az I/I_0 érték reciprokát számoltuk, és ezeket ábráztuk a görbéken. A reciprok érték képzésére az eredmények értelmezhetőségének megkönnyítése céljából volt szükség, hogy így az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szint emelkedése egyben BRET-jel növekedésnek adódjon. Mivel az intermolekuláris szenzorok használatakor az abszolút hányados nagymértékben függ a szenzorok expressziójának szintjétől, esetükben máshogy végeztük a jel normalizálását. Minden esetben 100%-nak tekintettük a kiindulási állapotot, 0%-nak pedig azt a BRET hányados értéket vettük, mely olyan sejtekben mérhető, melyek kizárólag a citoplazmatikus szuper *Renilla* luciferázt expresszálják. Az ábrázolt görbék mindig 3 független kísérlet eredményének átlagát mutatják, szórásként a standard hibát tüntettük fel.

4.8. Fehérje mennyiségi meghatározás SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel

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

4.9. Statisztikai analízis

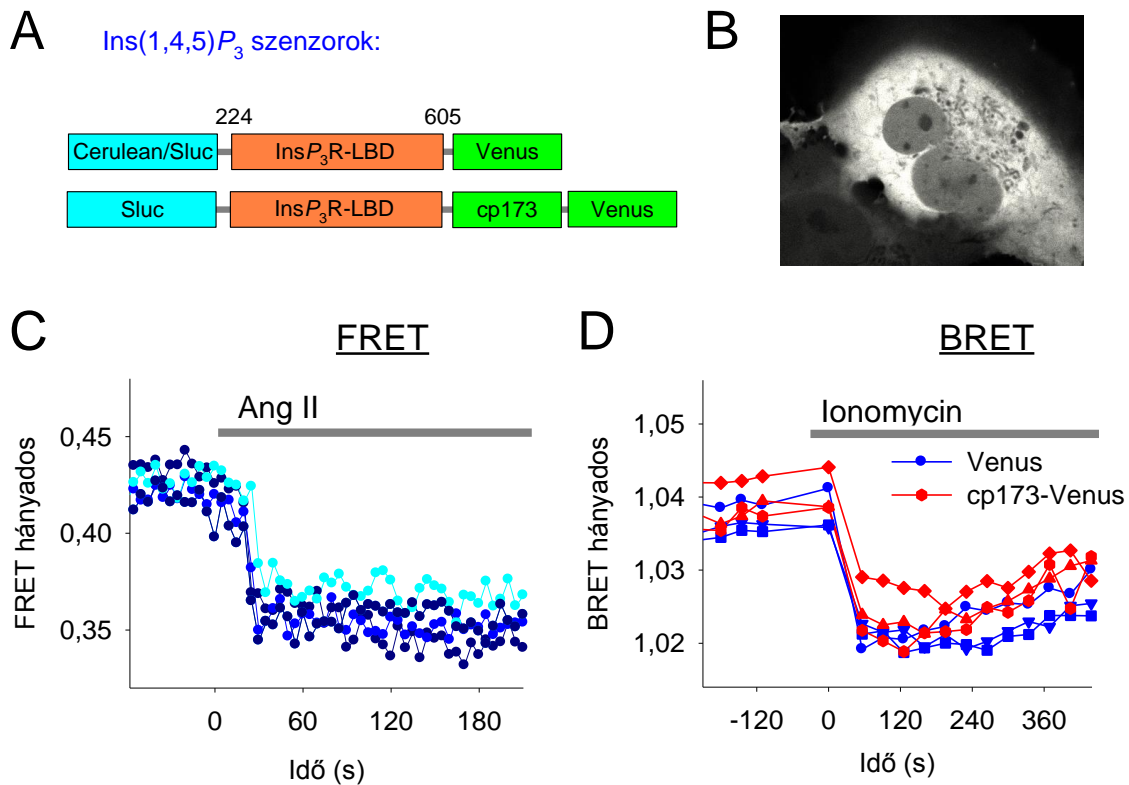
Az adatok elemzéséhez és az ábrák készítéséhez a Sigmaplot 10.0 programot használtuk (Systat Software Inc, Chicago, Illinois, USA). A statisztikai számításokhoz a SigmaStat 3.5 (Systat Software) programot vettük igénybe. Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzorok karakterizálása során a csökkenő fázis féléletidejének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

5. Eredmények

5.1. Egysejtes és sejtpopulációs méréseknél egyaránt alkalmazható intramolekuláris $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzor fejlesztése

A receptorok ingerlése PLC enzimek aktiválódásához, és így $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ keletkezéséhez vezethet, mely lipid központi szerepet tölt be a kalcium-jelpályában. Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel kinetikájának követésére sokáig izotópos jelölést követő lipidextrakciót és HPLC-t alkalmaztak [246], majd a későbbiekben tömegmérések történtek radio-receptor eljárással [247]. Ezen módszerekre általánosságban jellemző, hogy csak sejtpopulációs jel detektálására alkalmasak, kivitelezésük nehézkes, és nem mutatnak megfelelő időbeli és térbeli felbontást. Az elmúlt időszakban több munkacsoport is kifejlesztett olyan szenzorokat, melyek a FRET technikán alapulnak, lehetővé téve egysejtes méréseket is [179-185].

Akárcsak a felsorolt munkacsoportok közül néhányan, úgy mi is az 1-es típusú $\text{Ins}P_3R$ ligandkötő doménjából (LBD) indultunk ki. A fehérje szerkezetének tanulmányozása alapján az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ bekötődése a receptor konformációváltozását idézi elő, mely kellően nagymértékű ahhoz, hogy FRET-jelet generáljon, ha a két végére megfelelő FP-eket helyezünk. Korábbról ismert, hogy az intakt receptorban N-terminálisan elhelyezkedő 223 aminosav csökkenti az $\text{Ins}P_3R$ ligandaffinitását [248]. Ezeket elhagyva, a 224-605 pozíciójú aminosavakból felépülő, nagy affinitású LBD-t használtuk fel szenzorainkhoz. Egysejtes FRET-mérésekhez, a módszertani fejezetben leírtaknak megfelelően (4.2. fejezet) N-terminálisan Cerulean FP-t, C-terminálisan pedig Venust kapcsoltunk az $\text{Ins}P_3R$ -LBD-hez. Ahhoz, hogy sejtpopulációs jelet is tudjunk mérni, létrehoztunk BRET-mérésre alkalmas szenzorokat is, melyeknél N-terminálisan luciferáz, míg C-terminálisan Venus helyezkedik el. Ennek továbbfejlesztéseként a Venus elé egy cp173, ún. cirkulárisan permutált Venust is beillesztettünk, mely által a mérhető BRET-jel változás növekedését reméltük, ahogy azt korábban az Epac cAMP-szondánál tapasztalták [242]. A létrehozott konstrukciók sematikus felépítését a 6.A. ábrán mutatom be. A szenzorokat COS-7 sejtekbe transzfektálva, megfigyelhető azok homogén citoplazmatikus, és kismértékű magi elhelyezkedése (6.B. ábra).



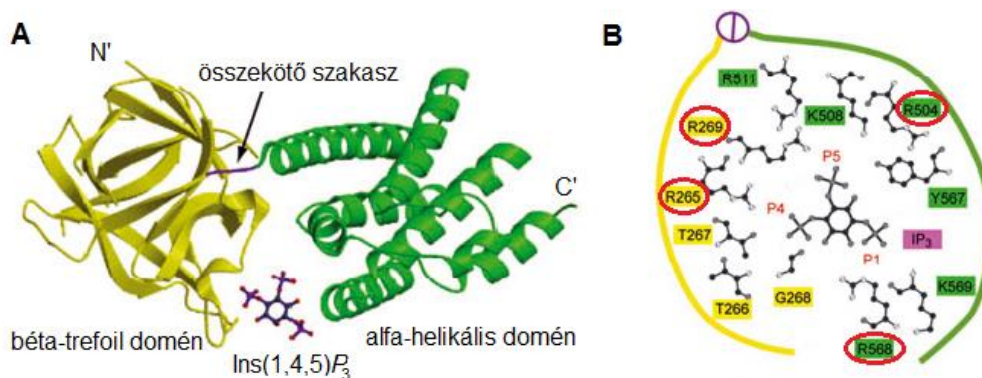
6. ábra – A vad-típusú $\text{Ins}P_3\text{R-LBD}$ -en alapuló szenzor tesztelése FRET és BRET eljárásokkal. **(A)** Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szondák szerkezetének sematikus ábrája. **(B)** Konfokális mikroszkóppal készült reprezentatív felvétel, mely a FRET-szenzor citoplazmatikus elhelyezkedését mutatja COS7 sejtekben (Venus csatornában). **(C)** Vad típusú AT_1R -t és a vad típusú $\text{Ins}P_3$ -szenzor FRET változatát expresszáló HEK 293T sejtekben detektálható FRET-jelváltozás $1 \mu\text{M}$ Ang II hatására. A különböző árnyalatú kék görbék egyedi sejtekben mért FRET-jel változásokat mutatnak. **(D)** A csak Venusszal (kék görbék) illetve a cp173-Venusszal jelölt $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -BRET-szenzort expresszáló HEK 293T sejtekben, $10 \mu\text{M}$ ionomycin hatására bekövetkező jelváltozások. A különálló görbék a 96-lyukú szövetkultúra-edények különböző lyukaiban (kb. 100.000 sejt/lyuk) mérhető sejtpopulációs jelváltozásokat mutatják.

A szenzorok teszteléséhez HEK 293T sejteket transzfektáltunk a szenzorral és 1-es típusú angiotenzinreceptorral (AT_1R), majd a sejteket $1 \mu\text{M}$ angiotenzin II-vel (Ang II) ingereltük, miközben mértük a FRET-jel változását. Ahogy az a 6.C. ábrán látható, az agonista stimulus egy egyértelmű jelváltozást okozott a szenzorunkon, jelen esetben egy csökkenést, mely megfelel az emelkedő $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szintnek. A szenzor BRET mérési körülmények közötti alkalmazhatóságát is megvizsgáltuk (6.D. ábra), ebben az esetben viszont nem receptort aktiváltunk, hanem ionomycint adtunk a szenzorral transzfektált HEK 293T sejteknek. Az ionomycin hatására Ca^{2+} áramlik a sejtekbe, mely aktiválja a PLC enzimeket és így következményesen $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jelet tud létrehozni [87]. A 6.D. panel görbéi egy 96-lyukú szövetkultúra-edény egy adott lyukában található hozzávetőlegesen százezer sejtben detektálható nyers BRET hányados változását mutatják. A kék görbék a C-terminálisan csak Venust tartalmazó, míg a piros görbék a

cp173-Venus FP-kkel jelölt szenzorral regisztrált jeleket mutatják. Érdekes módon a tandem FP alkalmazása nem növelte a BRET-jel változás nagyságát.

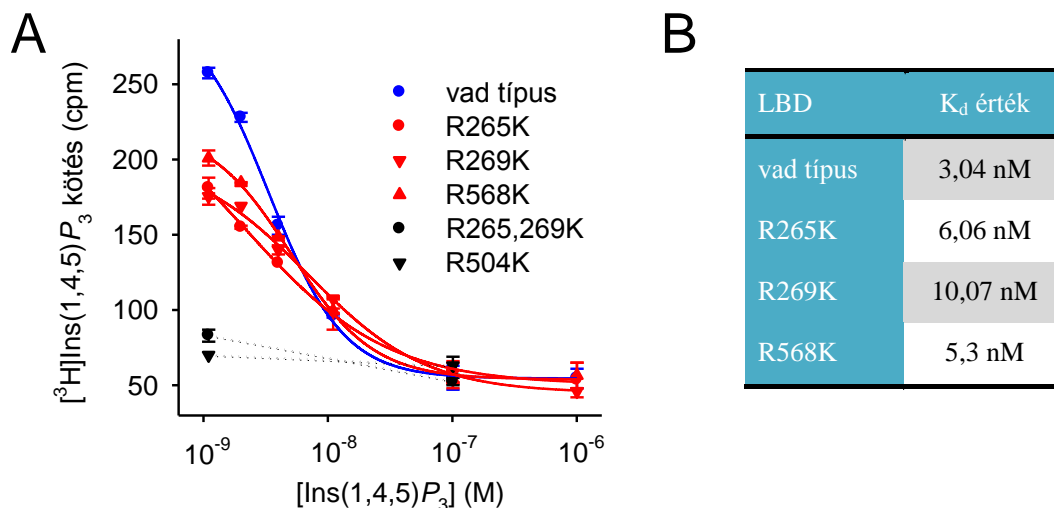
A szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel mérhető BRET-jel detektálásakor sokszor lehet egy spontán emelkedést megfigyelni, mely nem a mért molekula szintjének változása következtében lép fel, hiszen a nem stimulált sejtekben is jelentkezik. A jelenség zavaró hatásának kiküszöbölésére minden kísérletnél nem ingerelt sejtekben is mértük a jel változását, majd a nyers adatok feldolgozásakor ezt a spontán emelkedést kivontuk a stimulált sejteken regisztrált adatokból. Hogy a kapott jel ne függjön az expressziós szintektől, az adatok kiértékelésekor következő lépésként I/I_0 értéket képeztünk, ahol I_0 a stimulálást megelőző 2 perc mérési pontjainak átlaga, I pedig az adott időpontban mérhető BRET-hányados. Mivel az így kapott értékek az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szint emelkedésekor csökkenést mutatnak, a könnyebb értelmezhetőség kedvéért a továbbiakban az I/I_0 helyett annak reciprokát, vagyis az I_0/I értéket fogom ábrázolni, így a koncentrációnövekedés egyben jelemelkedéssel is fog járni.

A létrehozott szenzor, mivel nem tartalmazza az intakt 1-es típusú $\text{Ins}P_3R$ N-terminális szupresszor doménját, ezért a vad típusnál lényegesen nagyobb affinitással képes kötni ligandját (a szupresszor domént is tartalmazó 1-es típusú $\text{Ins}P_3R$ K_d értéke irodalmi adatok alapján $49,5 \pm 10,5$ nM, míg a 224-604 aminosavakból álló LBD K_d -ja $1,78 \pm 0,63$ nM [249]). A szondánk továbbfejlesztéséhez olyan mutációkat terveztünk bevinni az $\text{Ins}P_3R$ -LBD-be, melynek révén egy köztes K_d -értékű szenzorhoz jutunk, mely amellet, hogy jelzi a növekvő $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jelet, képes a válasz lecsengésekor elereszteni ligandját, így az off-válasz során is hűen tükrözi az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ koncentrációját. A mutációk tervezésekor a LBD kristályszerkezetéből indultunk ki, melynek sematikus rajzát a 7.A. ábrán mutatom be. Az aszimmetrikus „bumeráng”-alakú szerkezet egy N-terminális béta-trefoil és egy C-terminális alfa-helikális doménból áll. Korábbi adatok alapján 11 aminosav felelős az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ felismeréséért, melyeket a 7.B. ábrán tüntettem fel [250].



7. ábra – Az 1-es típusú InsP_3R ligand-kötő doménjának szerkezete, forrás: [250]. (A) Ribbon diagram az InsP_3R LBD-jának szerkezetéről. Sárga színnel az N-terminális béta-trefoil domén, zölddel a C-terminális alfa-helikális domén, lilával pedig az összekötő szakasz van feltüntetve. Aktiválódáskor az $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ a két domén közti árokban helyezkedik el. (B) A receptor ligandkötéséért felelős 11 aminosav és az $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ elhelyezkedésének sematikus ábrája. Piros karikával jelöltem be azokat az arginin aminosavakat, melyeket a szenzorainkban lizinre cseréltünk, hogy ezáltal kisebb affinitású LBD-hez jussunk.

A mutáns LBD-ek létrehozásakor kiválasztottunk 4 arginin aminosavat: az R265, R269, R504 és R568 pozícióban találhatóakat, és ezeket lizinre cseréltük. Mivel a lizin oldallánca rövidebb az argininénél, és egyben kevésbé bázikus (a lizin pI értéke 9,74 míg az argininé 10,76), ezért azt vártuk, hogy a mutáns fehérjék interakciója az $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ negatív töltésű foszfát-csoportjaival gyengébb lesz, mint a vad típusúé. Ahhoz, hogy ezt igazoljuk, a baktériumokkal termeltetett mRFP-vel és 6xHis-jelöléssel ellátott LBD-eket Ni^{2+} -oszlopokon tisztítottunk meg, majd *in vitro* kötési vizsgálatot végeztünk [^3H]- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ felhasználásával, melynek eredményeit a 8. ábrán tüntettem fel (az *in vitro* kötési vizsgálatokat témavezetőm, Dr. Várnai Péter végezte az NIH-ben, Bethesda, Maryland, USA). Az R504K és az R265,269K dupla mutáns nagyon gyengén kötötte az $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -ot (gyengébben, mint a szupresszor domént is tartalmazó 1-es típusú InsP_3R), míg az R265K, R269K és R568K mutáns domének a vártak megfelelően a vad típusú LBD-nél (224-605) gyengébben, de a szupresszor doménnel is rendelkező intakt LBD-nél (1-605) nagyobb affinitással kötötték ligandjukat. A kapott eredmények alapján a vad típusú szenzorhoz hasonlóan elkészítettük az R265K mutációt hordozó szondát is, és az 5.3. fejezetben részletezésre kerülő további karakterizálást mindkét konstrukción elvégeztük.

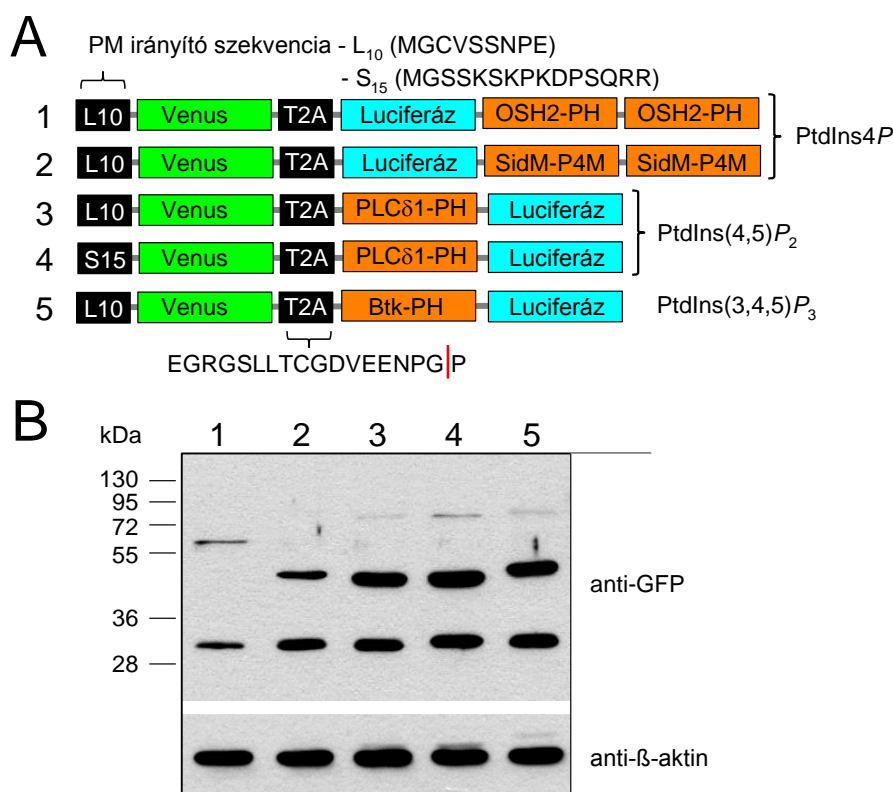


8. ábra – A mutáns LBD-ek $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ affinitásának vizsgálata. (A) A feltüntetett mutációkat hordozó rekombináns mRFP-vel jelölt LBD-ek (a szuppresszor domént nem tartalmazó konstrukciók) *in vitro* ligandkötésének vizsgálata. A kísérleteket $[^3\text{H}]\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -tal, és az x-tengelyen feltüntetett mennyiségű jelöletlen liganddal végeztük. Az ábrán két, triplikátumban végzett független kísérlet átlaga látható. (B) A mutáns LBD-ek K_d értékei, a görbék Scatchard-analízise alapján.

5.2. Intermolekuláris PPIIn-szenzorok tervezése

Ahogy azt a 2.3.fejezetben bemutattam, számos módszer áll rendelkezésre, melyekkel a PPIIn-ek szintjét detektálni lehet, de egyiket sem tekinthetjük igazán tökéletesnek. A legelterjedtebb technika a részletesebben is jellemzett fluoreszcensen jelölt PBD-ek alkalmazása mikroszkópos mérések során. Az így végzett kísérletek egyik nagy hátulütője, hogy a számszerűsíthetőségük nehézkes, kismértékű változások szinte kimutathatatlanok, és a statisztikailag megbízható elemszám elérése dubiózus munkát igényel. Hogy áthidaljuk ezen problémákat, ezért BRET-szenzorokat készítettünk, melyek a PM PPIIn-szintekben bekövetkező változásokat nagy érzékenységgel képesek detektálni. Míg a korábban bemutatott $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szonda intramolekuláris mérést tett lehetővé, a PPIIn-ek detektálásához intermolekuláris szenzorokat készítettünk, melyek sematikus rajza a 9.A. ábrán látható. A különböző PPIIn-ek specifikus felismerését a széles körben alkalmazott PBD-ek révén értük el. A $\text{PtdIns}4P$ mérésekhez két különböző, az irodalomban használt $\text{PtdIns}4P$ -kötő domént tartalmazó szenzort is elkészítettünk, majd ezeket összehasonlítottuk. Az egyik az OSH2 fehérje PH-doménjét tartalmazta [39], míg a másik a *Legionella* SidM fehérje P4M doménjét [251]. Hogy növeljük ezen szenzorok lipidaffinitását, mindkét szenzor esetén tandem építettük be a doméneket. A $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ méréséhez a PLC δ 1 enzim

[87], míg a $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ detektálásához a Btk PH-doménjét [252] használtuk fel. A felsorolt PBD-ekhez kapcsoltuk a BRET-mérésekhez elengedhetetlen luciferáz enzimet, illetve készítettünk olyan verziókat is, melyekben Ceruleant kötöttünk hozzájuk, így lehetővé téve azt, hogy a szenzorokat mikroszkópos mérésekhez is fel tudjuk használni. Ahhoz, hogy az energiatranszfer-mérések során kapott jel PM-specifitását biztosítsuk, az energiaakceptor Venus FP-t rövid PM irányító szekvenciával láttuk el. Kétféle szekvenciát is használtunk, egyrészt az Lck fehérje első 10 aminosavát (L_{10}), másrészt a c-Src első 15 aminosavát, melyek ezen fehérjék PM lokalizációjáért felelősek [238].

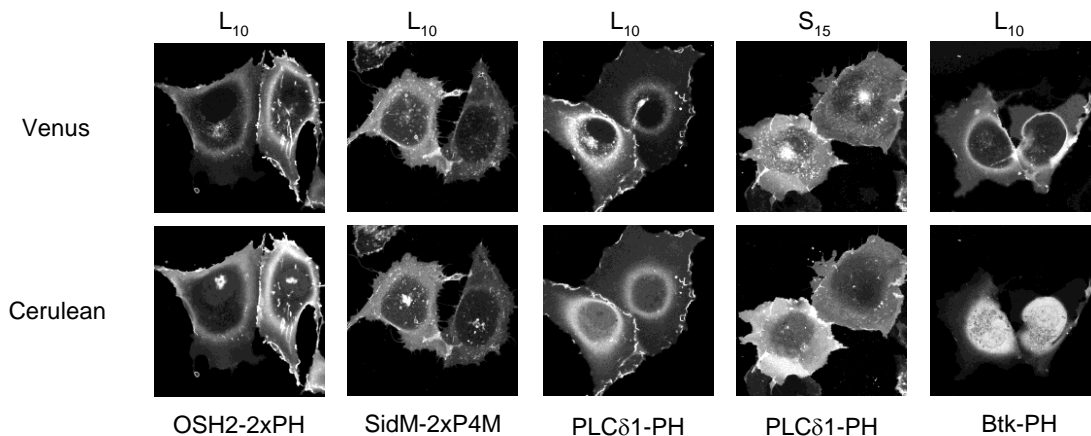


9. ábra – Az intermolekuláris PPIIn szenzorok felépítése (A) Szenzoraink felépítésének sematikusan rajza. Az L_{10} és S_{15} peptidek az Lck ill. c-Src fehérjék PM irányító szekvenciájának felelnek meg, míg a T2A egy virális protein, mely egyetlen mRNS-ként íródik át, de a transzláció során egy intramolekuláris hasadás lép fel benne (melynek pontos elhelyezkedését a szagotott piros vonal jelzi), melynek végeredményeként egy plazmidról két különálló polipeptidlánc szintetizálódik. A különféle PPIIn-ek specifikus felismerését az ábrán narancssárga színnel jelölt széles körben használt PBD-k biztosítják. **(B)** A luciferáz helyett Ceruleant tartalmazó bioszenzorokat expresszáló HEK 293T sejtek SDS-PAGE elektroforézist követő Western blot analízise, a Ceruleant és Venust egyaránt felismerő anti-GFP segítségével. Kontrollként anti-β-aktin szerepel. A molekulaméret-markerek a Western blot bal oldalán kerültek feltüntetésre. A blot felett szereplő számok az 9.A. panelnek megfelelő sorrendben jelzik a különböző konstrukciókat.

Az intermolekuláris BRET-mérések kivitelezése úgy optimális, ha a sejtek a szenzorok mindkét tagját expresszálják (a luciferázhoz és a Venushoz kapcsolt fúziós fehérjéket), és a konstrukciók aránya közel állandó. A két plazmid egyidejű

transzfekciójával bár elérhető ilyen konstans expresszió a sejtek egy részében, de egy ilyen protokoll beállítása rendkívül nehézkes, és kivitelezése meglehetősen körülményes. Hogy áthidaljuk ezt a problémát, egy olyan plazmidot hoztunk létre, mely az energiatranszferhez szükséges mindkét molekulát külön-külön kódolja, a kettő között pedig a virális eredetű T2A szekvencia található meg. A transzláció folyamata során, a T2A szekvencia prolin-glicin-prolin régiójában egy molekuláris hasadás lép fel, de a fehérjeszintézis folytatódik, így mindkét fehérje megszintetizálódik, méghozzá ekvimoláris mennyiségben [240]. Ahhoz, hogy a fehérjék hasadását és a konstrukciók arányát ellenőrizzük, HEK 293T sejteket transzfektáltunk a szenzoraink fluoreszcens változatával (amelyek Ceruleant tartalmaznak a Luc helyett), majd SDS-PAGE gélelektroforézist követően Western blot analízist végeztünk anti-GFP ellenanyag felhasználásával, mely képes mind a Cerulean, mind a Venus FP-khez kötődni. Egy ilyen reprezentatív mérés eredményét mutatja be a 9.B. ábra. Látható, hogy a sejtekben külön-külön kimutathatóak voltak a szenzoraink tagjai (a PM-Venus 32 kDa magasságban és a PBD-Cerulean konstrukciók 48 kDa ill. az OSH2-2xPH esetén 67 kDa magasságban), és csak egy nagyon kis hányaduk expresszáldott vágatlan formában (nehezen látható halvány sáv 80 kDa ill. 99 kDa magasságban).

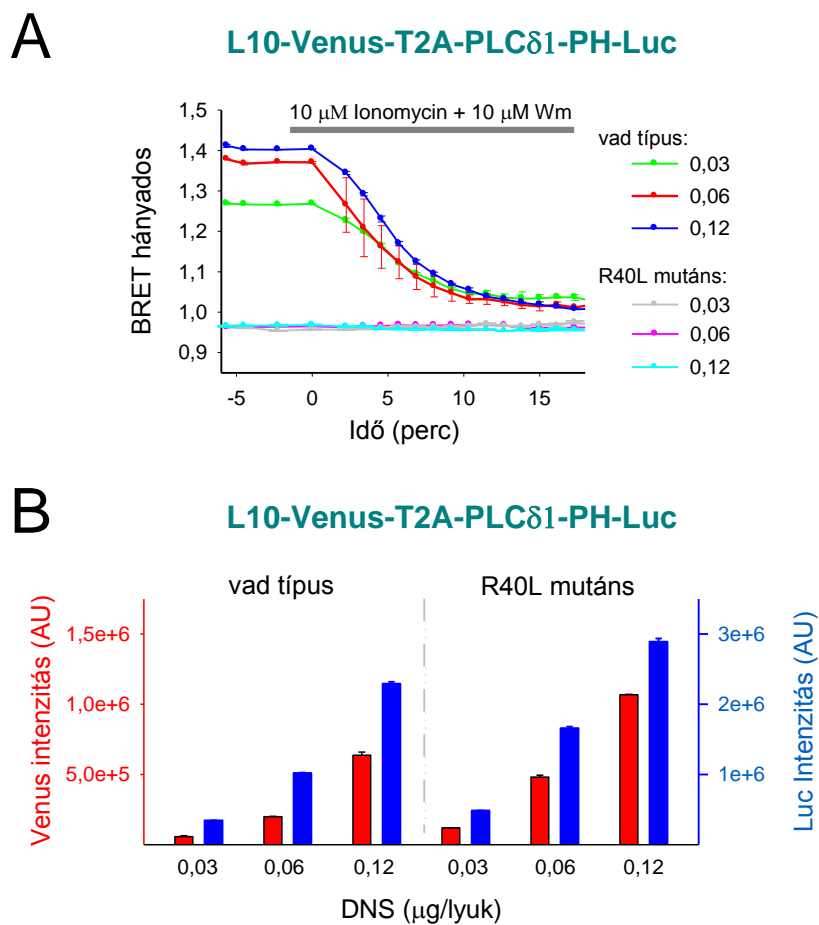
A szenzorok intracelluláris elhelyezkedését is szeretnénk volna ellenőrizni, ezért plazmidjaikat COS-7 sejtekbe transzfektáltuk, majd konfokális mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Ahogy az a 10. ábrán látható, a korábban leírtakkal egybehangzóan a PLC δ 1-PH és az OSH2-2xPH egyértelmű PM elhelyezkedést mutatott nyugvó sejtekben [87, 253], míg a SidM-2xP4M a PM mellett a PtdIns4P-ban szintén gazdag Golgiban is megtalálható volt [38]. Mivel nyugvó sejtekben a PtdIns(3,4,5) P_3 szintje alacsony [116], ezért a Btk-PH citoplazmatikusan helyezkedett el. A vártnak megfelelően mind a Venussal jelölt L₁₀, mind az S₁₅ fehérjék főként a PM-ba lokalizálódtak. A bemutatott konfokális képek helyes elemzésekor mindenképpen figyelembe veendő, hogy a COS-7 sejtek nagyon laposak, és így tévesen könnyen citoplazmatikusnak, vagy magmembránnak tűnhet első ránézésre a PM lokalizáció. Az ilyen sejtekben megfigyelhető citoplazma és PM közötti különbség legszebben talán az utolsó oszlopban látható, ahol jól elkülönül a PM-on található Venusszal jelölt L₁₀ (felső ábra) és a sejtplazmában elhelyezkedő Ceruleannal jelölt Btk-PH (alsó ábra).



10. ábra – A konstrukciók intracelluláris elhelyezkedése. A PPI_n felimerő bioszenzorokat expresszáló COS-7 sejtekről készült reprezentatív konfokális felvételek. A felső sorban található képek a Venus, az alsók a Cerulean csatornában kerültek rögzítésre. Mivel a COS-7 sejtek laposak, ezért a mag körüli PM görbület hasonlít a magmembránra és a citoplazmát könnyen PM-nak lehet vélni. A kettő közötti éles különbség az utolsó oszlop képei esetén a legszembetűnőbb.

Miután meggyőződünk a T2A szekvencia működéséről, és a konstrukcióink intracelluláris elhelyezkedéséről, megvizsgáltuk a szenzoraink alkalmazhatóságát a BRET-mérés körülményei között. HEK 293T sejteket transzfektáltunk különböző dózisu (0,03-0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{lyuk}$) L₁₀-Venus-T2A-PLC δ 1-PH-Luc, illetve az R40L mutáns, PtdIns(4,5) P_2 -ot nem kötő PLC δ 1-PH domént tartalmazó plazmiddal [87], majd BRET-méréseket végeztünk. A többféle DNS koncentrációra egyésszt a transzfekciós protokoll beállítása szempontjából volt szükség, másrészt szeretttük volna megvizsgálni, hogy az intermolekuláris PPI_n-szenzorainkkal mérhető BRET-jel milyen mértékben függ az expressziós szintektől [254]. A PtdIns(4,5) P_2 teljes degradációjához egy kombinált kezelést alkalmaztunk, egyrésztől gátoltuk a lipid reszintézisét PI4K inhibitor 10 μM Wm-nal, a lebontását pedig egyidejűleg 10 μM ionomycin hozzáadásával idéztük elő. Ahogy az a 11.A. ábrán látható, a két szer együttes hatásának eredményeként egy nagymértékű BRET-jelcsökkenést tapasztaltunk. Az így kapott minimális BRET hányados, expressziós szinttől függetlenül ugyanazon értékre állt be, mely közel megegyező volt a lipidet nem kötő mutáns szenzorral mérhető jelekkel, ami jelzi a szenzor nagyfokú érzékenységét még alacsony lipid koncentráció esetén is. Jól látszik ugyanakkor, hogy a kiindulási értékek a lipidet kötő szenzorok esetén nagymértékben függtek az expressziós szinttől (a mérhető Venus és luciferáz intenzitások a 11.B. ábrán kerültek feltüntetésre). Éppen ezért a továbbiakban minden esetben egy normalizált BRET (nBRET) értéket számoltunk (és az ábrákon is ezek szerepelnek) a PPI_n-

szenzorok esetén, ahol 100%-nak tekintettük a kiindulási értéket, 0%-nak pedig a szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel mérhető legalacsonyabb BRET hányadosot (0,874 – a csak citoplazmatikus luciferázt expresszáló sejtekben mérhető érték). Fontos megemlíteni, hogy az ábrákon szereplő százalékos nBRET hányadosok nem jelentik egy az egyben a lipid szintjének százalékát is, hiszen még a kombinált PPIIn-bontó kezelés ellenére sem tudtuk elérni az elvi 0%-nak megfelelő BRET értéket. Ennek hátterében feltehetően a citoplazmatikus donor és akceptor fehérjék között fellépő kismértékű interakció vagy a 9.B. ábrán látható kevés vágatlan T2A-s szenzor állhat.

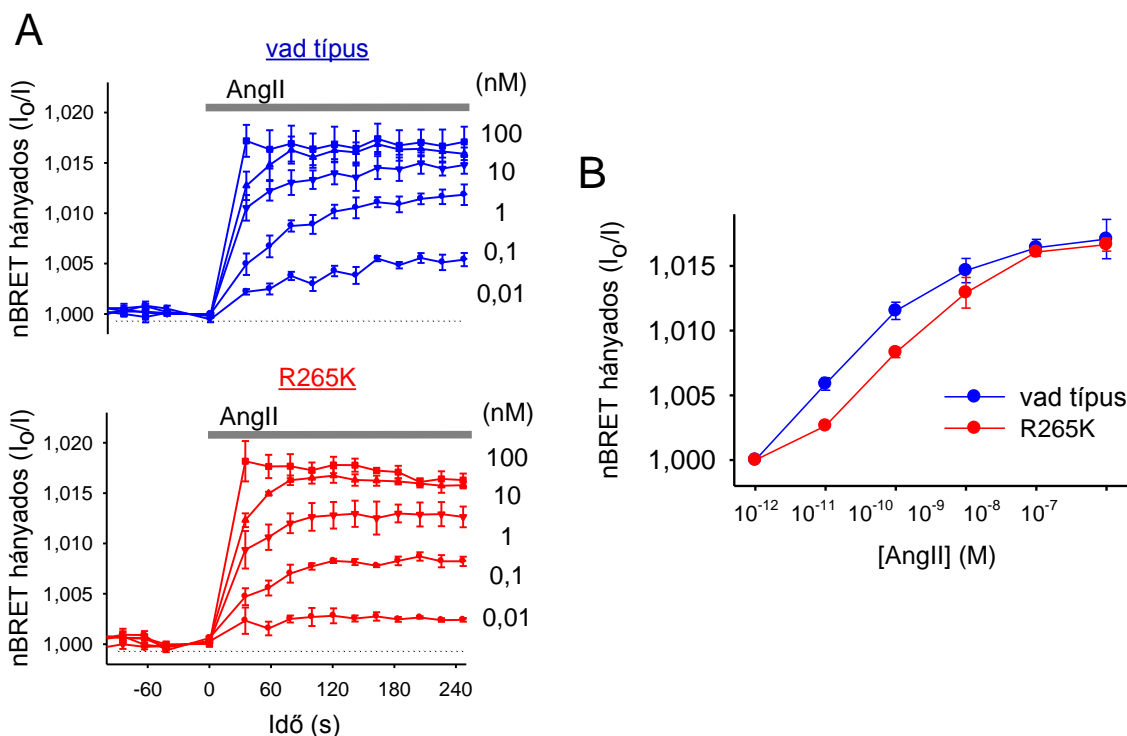


11. ábra – A PM PPIIn-ek teljes degradációjának hatása az újonnan fejlesztett PtdIns(4,5) P_2 szenzor által mérhető BRET hányadosra, különböző expressziós szintek esetén. HEK 293T sejteket eltérő mennyiségű (0,03-0,12 μ g/lyuk, egy 96 lyukú szövetkultúra-edényen) L₁₀-Venus-T2A-PLC δ 1-PH-Luc, illetve R40L mutációt hordozó, lipidet nem kötő L₁₀-Venus-T2A-PLC δ 1(R40L)-PH-Luc plazmiddal transzfektáltunk. **(A)** A PM PPIIn teljes deplécióját előidéző 10 μ M ionomycin és 10 μ M Wm kezelés hatására mérhető BRET jel változások. Az eltérő színű görbék a különböző expressziós szinteknek felelnek meg. Az „y” tengely 0,874-nél kezdődik, mivel ez az érték felel meg a szövetkultúra-edény leolvasó luminométerrel mérhető legalacsonyabb BRET hányadosnak, melyet a csak citoplazmatikus luciferáz konstrukciót tartalmazó sejtekben lehet detektálni. **(B)** Az „A” panelen bemutatott mérések során mérhető Venus (piros oszlopok) és luciferáz intenzitások (kék oszlopok). A diagramok egy reprezentatív, duplikátumban mért kísérlet eredményét mutatják, szórásként a sztenderd hiba került feltüntetésre.

5.3. A BRET-szenzorok karakterizálása

5.3.1. A vad típusú és mutáns $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzorok dinamikus tartományának és reverzibilitásának összehasonlítása

Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzoraink affinitásának meghatározását követően (ld. 5.1. fejezet) összehasonlítottuk a vad típusú és az alacsony affinitású mutáns szenzor esetén kapott $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -indukálta jeleket. Ehhez HEK 293T sejteket transzfektáltunk a szondáink cDNS-ével és az 1-es típusú angiotenzinreceptor nem internalizálódó deléciós mutánsával ($\text{AT}_1\text{R}-\Delta 319$) [237]. A receptor kiválasztásakor az volt a fő szempont, hogy olyanl végezzük el a kísérleteket, amelyik fenntartott jelet hoz létre. Mivel az $\text{AT}_1\text{R}-\Delta 319$ nem képes internalizálódni, a deszenzitizáció okozta jelcsökkenés zavaró hatásával nem kell számolni, így megfelel a fenti kritériumnak.

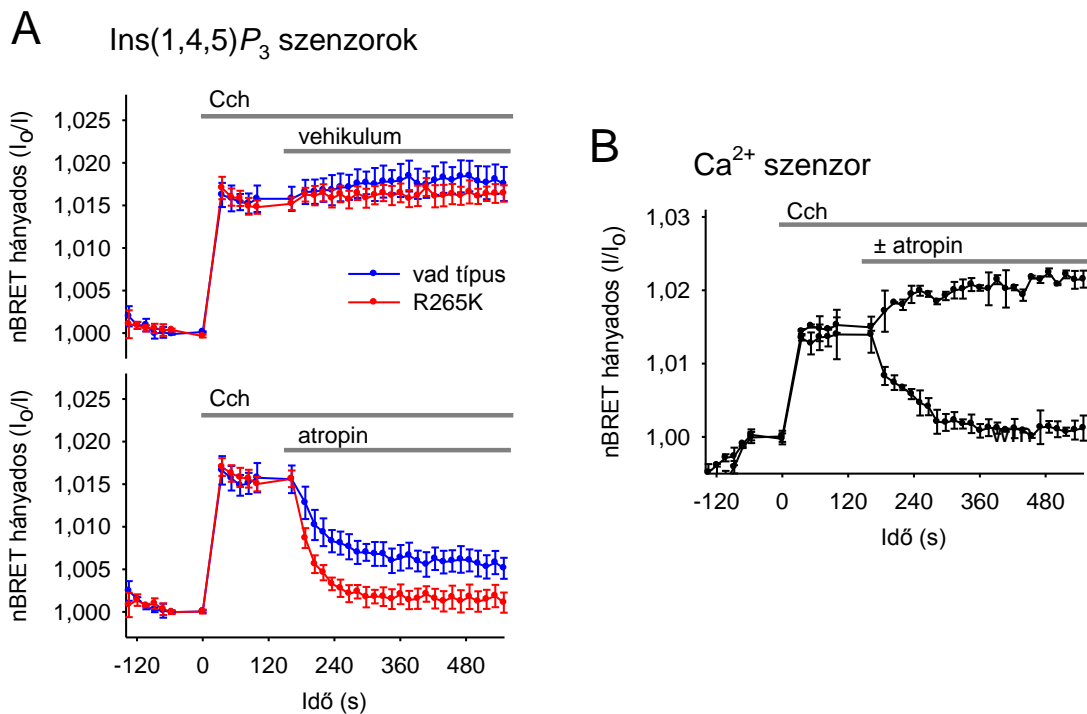


12. ábra – A vad típusú és a csökkent affinitású szenzorok aktiválódási tulajdonágainak összehasonlítása. (A) A nem internalizálódó $\text{AT}_1\text{R}-\Delta 319$ receptort és a vad típusú vagy mutáns $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzort transziensen kifejező HEK 293T sejtekben, növekvő koncentrációjú Ang II (10^{-12} – 10^{-7} M) ingerlés hatására mérhető normalizált BRET hányadosok. A görbék három független, triplikátumban mért kísérlet átlagát mutatják, szórásként a sztenderd hiba került feltüntetésre. **(B)** A vad típusú és az R265K mutáns $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzorokkal végzett mérések során, 5 perccel az ingerlést követően tapasztalható normalizált BRET hányados változások, az Ang II koncentráció függvényében ábrázolva. Az R265K mutációt hordozó szenzor esetén látható jobbra tolódás a csökkent affinitással függ össze.

Ahogy az a 12.A. ábrán látható, az Ang II 10^{-12} – 10^{-7} M koncentrációtartományban növekvő BRET-jelet hoz létre mindkettő szenzor esetén. Megfigyelhető ugyanakkor

egy kinetikai különbség a két szenzor összehasonlításakor. Míg a maximális válaszuk megegyezett, a vad típusúhoz képest egy enyhe jobbrtolódás figyelhető meg az R265K mutációt hordozó szenzor dózis-hatás görbéjén (12.B. ábra), mely szintén az alacsonyabb affinitás számlájára írható.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a két szenzor mennyire reverzibilis, azaz a ligandkoncentráció csökkenésekor mennyire, és milyen kinetikával cseng le az általuk mutatott jel. Ehhez első lépésként vad típusú M_3 muszkarinos acetilkolin-receptort (M_3R) tranziensen kifejező HEK 293T sejteket $10 \mu\text{M}$ karbakollal (Cch) ingereltünk, mely a Gq-útvonal aktiválása révén növeli a citoplazma $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ - és Ca^{2+} -szintjét. Ezen válaszok gyorsan megszüntethetőek, ha a receptor kompetitív antagonistáját, atropint ($10 \mu\text{M}$) adunk a sejteknek.



13. ábra – A vad típusú és az R265K mutációt hordozó $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzorok reverzibilitásának összehasonlítása BRET-módszerrel (A) Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel kiváltása érdekében M_3R -t tranziensen expresszáló HEK 293T sejteket $10 \mu\text{M}$ karbakollal ingereltük, mely maximális választ okoz és fenntartott marad, mind a vad típusú, mind az R265K szenzor esetében (felső panel görbéi). Hogy megvizsgáljuk, a szenzorok mennyire képesek az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel csökkenését is nyomon követni, az ingerlést követő 3. percben a receptor aktivációját kompetitív antagonistá atropinnal ($10 \mu\text{M}$) gátoltuk, mely a vad típusú és az R265K-val mért nbRET hányados értékeket mutató görbék széttérését okozta (alsó panel). (B) Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -mérésekkel párhuzamosan a módosított Cameleon D3 BRET-szenzorral nyomon követtük a citoplazmatikus Ca^{2+} -jelben bekövetkező változásokat. A mérések párhuzamosan hajtottuk végre, egyazon 96-lyukú szövetkultúra-edényben, megegyező mérési protokollal, csak ebben az esetben a Ca^{2+} -szenzort transzfektáltuk a sejtekbe az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -bioszenzorok helyett. Az ábrázolt eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Ahogy az a 13.A. ábrán látható, az alkalmazott időbeli felbontással (3 mért pont percenként) a jelek emelkedő fázisa, mely az agonista hatására kiváltott $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ koncentráció emelkedésének felel meg, szinte teljesen megegyezik a vad típusú és a mutáns szenzorok esetén. Ezzel ellentétben az alacsony affinitású szenzor off-válasza szignifikánsan gyorsabb volt ($\tau = 23,0 \pm 2,3$ másodperc), mint a vad típusúé ($\tau = 44,9 \pm 7,5$ másodperc) (átlag \pm sztenderd hiba, $n=5$; $p=0,024$), és a jel lecsengésekor teljesen visszatért az alapértékre. A vad típusú szondával mért $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jel az antagonistá adását követően nem tért vissza a kiindulási értékre, mely egyrészt fakadhat abból, hogy a magas affinitás miatt az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ nem tud teljes mértékben disszociálni az LBD-ről, de az is lehet, hogy a kompetitív antagonistá ilyen dózisban még nem szüntette meg teljesen a G_q -jelátvitelt.

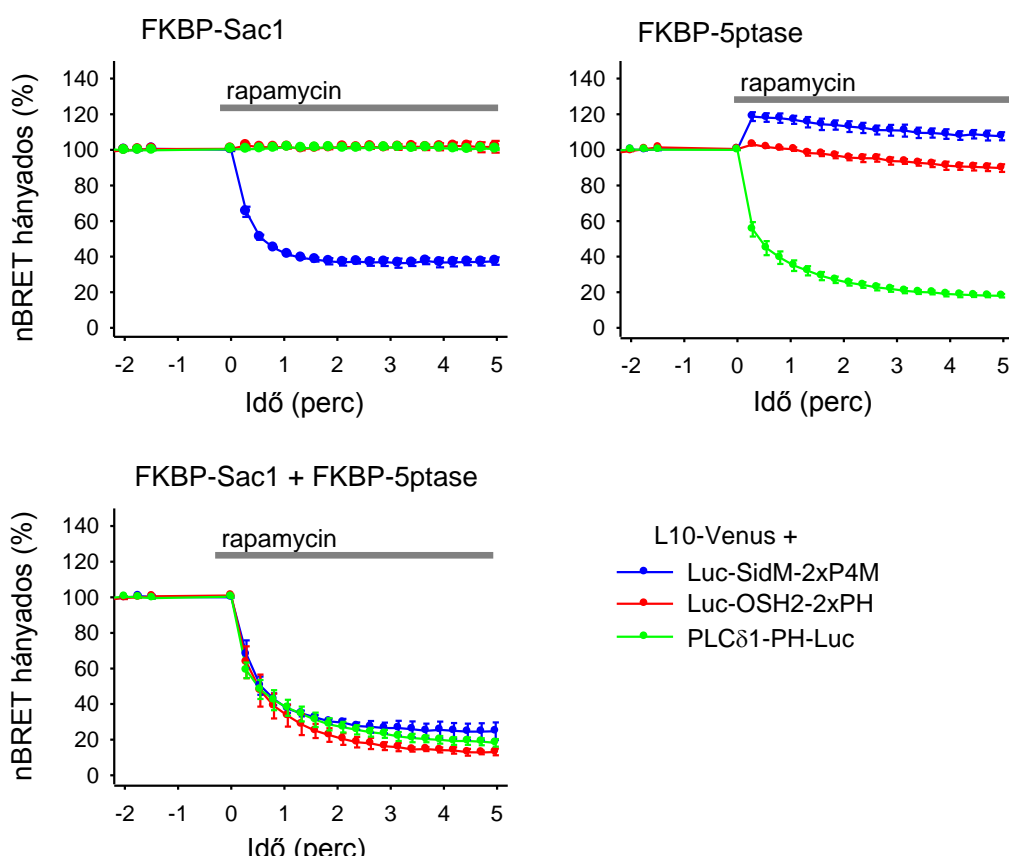
Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -méréssel párhuzamosan nyomon követtük a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentrációban bekövetkező változásokat is. Ennek kivitelezéséhez elkészítettünk egy korábban publikált alacsony affinitású Ca^{2+} -szenzornak, a Cameleon D3-nak [244] a BRET-mérési körülmények között alkalmazható verzióját (ld. 4.3. fejezet). Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -jelnél is alkalmazott mérési protokollal azt kaptuk, hogy a Ca^{2+} -jel teljes mértékben lecseng az atropin adását követően, mégpedig a mutáns $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzorral kapott jellel megegyező kinetikával (13.B. ábra). Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy a további $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -mérések során az R265K mutációt hordozó szenzort használjuk [a későbbi ábrákon, ahol $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ szerepel feliratként, ott minden esetben a mutáns szenzorral kapott eredményeket mutatom be].

5.3.2. A PPI_n-szenzorok lipidszelektivitásának és gátlószer-érzékenységének vizsgálata

Ahogy azt korábban említettem, két különféle $\text{PtdIns}4P$ -kötő domént tartalmazó bioszenzort is létrehoztunk, melyekben a lipid felismeréséért az egyik esetben a széles körben alkalmazott OSH2-2xPH, a másik esetben a nemrégiben leírt SidM-2xP4M felel. Mivel több közlemény is felveti annak lehetőségét, hogy az OSH2-2xPH nem kizárólag a $\text{PtdIns}4P$ -t köti [42, 253], ezért szerettük volna összehasonlítani őket, illetve kiválasztani kettejük közül azt, amelyik a mi mérési körülményeink között megbízhatóbban mutatja a lipid szintjét a PM-ban.

Ennek vizsgálatához első körben a korábban ismertetett rapamycin-indukálta heterodimerizáció elvén működő lipiddepléciós rendszert hívtuk segítségül, melynek

révén lehetőség nyílik szelektíven befolyásolni a PPIIn-ek szintjét. HEK 293T sejteket transzfektáltunk egyrészt a lipiddepléciós rendszer tagjaival, melyben az FRB domént az L₁₀ irányítószekvenciával láttuk el, míg az FKBP-hez különféle PPIIn-bontó enzimeket kapcsolunk, másrészt az OSH2-2xPH és SidM-2xP4M, illetve kontrollként a PLC δ 1-PH doméneket tartalmazó BRET-szenzorokkal. A szelektív PPIIn-bontást úgy értük el, hogy az FKBP-hez a PtdIns4P 4-es pozíciójú foszfátcsoportját hasítani képes Sac1 enzimet, vagy a PtdIns(4,5)P₂ 5-ös pozíciójú foszfátjának bontását végző INPP5E 5-foszfátázt (5ptase) kapcsolunk, illetve a kísérleteket elvégeztük úgy is, hogy mindkét konstrukciót kifejezték a sejtek, így mindkét lipid szintjét egyidejűleg csökkentettük.

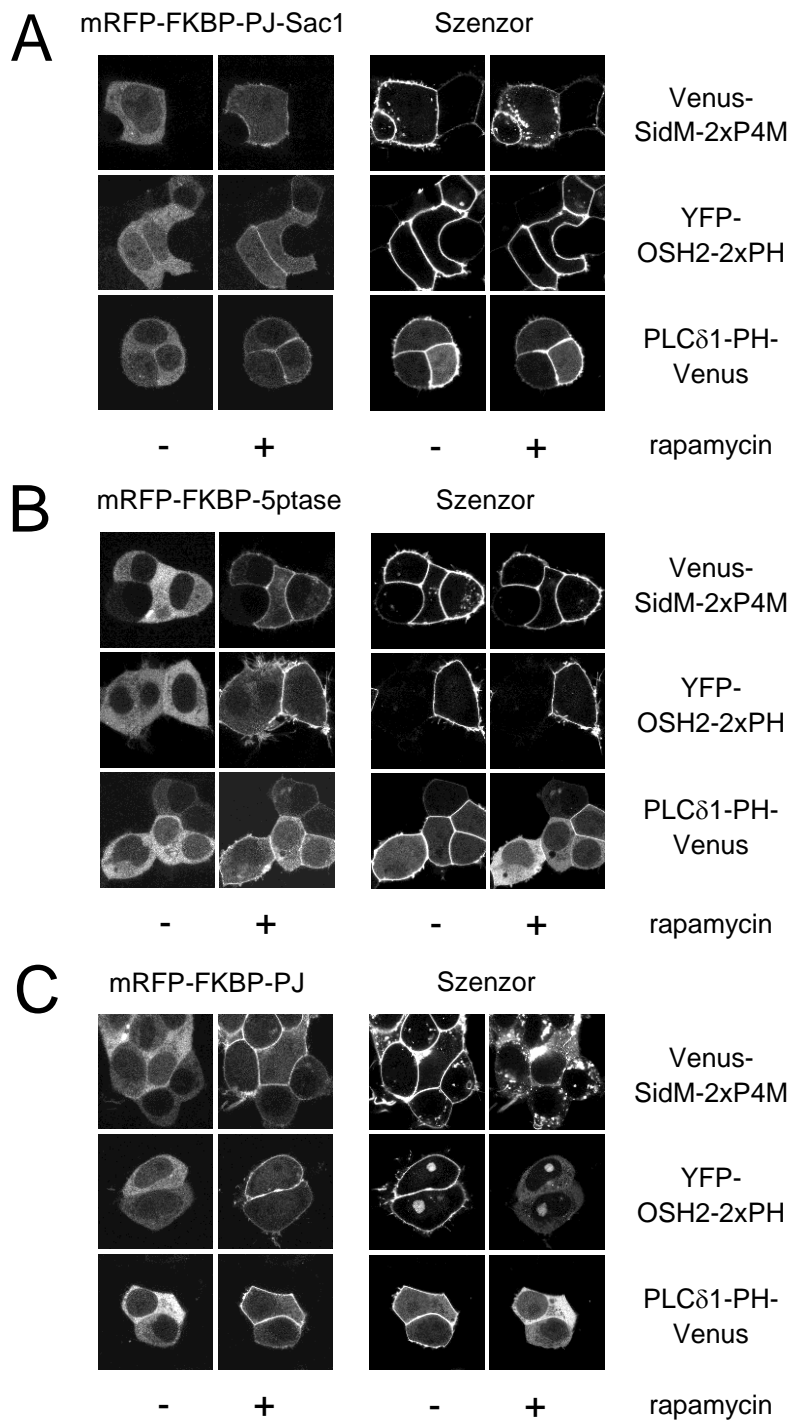


14. ábra – A PM PtdIns4P- és PtdIns(4,5)P₂-szintek mesterséges változtatásának hatása a szenzorokkal mért BRET értékekre. A PM PtdIns4P- és PtdIns(4,5)P₂-szintjei szelektíven befolyásolhatóak a rapamycin-indukálta heterodimerizációs rendszer segítségével [212]. Az FKBP-hez Sac1 enzimet kapcsolva az inozitol gyűrű 4-es, míg 5ptase esetén 5-ös pozíciójú foszfátjának enzimátikus hasítását lehet előidézni. Az ábrázolt görbék az ábra jobb oldalán jelölt szenzorok által mért nBRET hányados változását mutatják a feltüntetett különböző enzimek PM transzlokációját (L₁₀-FRB kompartmentbe) előidéző 300 nM rapamycin adását követően. Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Ahogy az várható volt, a PtdIns(4,5)P₂-szint és így a PLC δ 1-PH BRET-szenzor által mutatott jel (zöld görbék) azokban a sejtekben csökkent gyorsan, amelyek expresszálták az 5ptase enzimet, de a Sac1 enzim önmagában, vagyis a PtdIns4P-szint

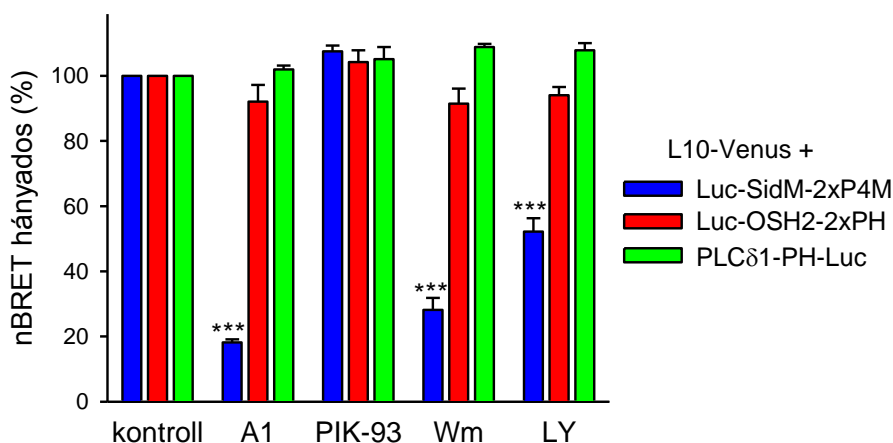
egyedüli csökkentése nem okozott jelváltozást. A SidM-2xP4M bioszenzort kifejező sejtekben (kék görbék) a Sac1-aktiváció hatására egy jelentős BRET-jel csökkenés következett be. Abban az esetben, ha csak az 5ptase-t irányítottuk a PM-hoz, akkor egy kismértékű növekedést figyeltünk meg ezen bioszenzorral, mely összhangban áll azzal, hogy az 5ptase a PtdIns(4,5) P_2 -ot PtdIns4P-tá bontja, így növelve utóbbi lipid szintjét. Elvégezve ugyanezen kísérleteket az OSH2-2xPH szondákkal azt kaptuk (piros görbék), hogy meglepő módon önállóan sem a Sac1, sem az 5ptase nem okozott BRET-jel változást, hanem kizárólag a két enzim együttes aktiválása, vagyis a PtdIns4P és PtdIns(4,5) P_2 egyidejű bontása eredményezte azt. Ez megerősítette azon korábbi felvetéseket [42], hogy az OSH2-PH domén nem, vagy csak kis mértékben képes megkülönböztetni a két PPI-n-et.

Hogy ezt megerősítsük másik technikával is, HEK 293T sejteket transzfektáltunk fluoreszcensen jelölt OSH2-2xPH, SidM-2xP4M és PLC δ 1-PH doménnel illetve a lipiddepléciós rendszerünk T2A-s verziójával, majd konfokális mikroszkópos méréseket végeztünk (15. ábra). A BRET-mérés eredményeivel összhangban itt is azt tapasztaltuk, hogy a 4-foszfátáz aktivitású Sac1 PM transzlokációja eredményeként a SidM-2xP4M a PM-ről eltűnik (megjelenik a citoplazmában illetve intracelluláris organelumokon – feltehetően a Golgin), de az OSH2-2xPH és PLC δ 1-PH konstrukciók PM elhelyezkedését a PtdIns4P bontása nem befolyásolja (15.A. ábra). 5ptase aktiváció hatására a PLC δ 1-PH vált citoplazmatikussá, az OSH2-2xPH és a SidM-2xP4M viszont maradt a PM-on, sőt utóbbi esetében még kismértékű intracelluláris jelcsökkenés és PM-jelnövekedés is megfigyelhető volt (15.B. ábra). Amennyiben a sejtek a mind Sac1 mind 5ptase aktivitással rendelkező Pseudojanin (PJ) enzimet expresszálták, akkor rapamycin adását követően mindhárom PBD citoplazmatikus transzlokációja megfigyelhető volt (15.C. ábra). Így tehát a mikroszkópos mérések is azt mutatták, hogy a SidM-2xP4M érzékeny a PM PtdIns4P, a PLC δ 1-PH pedig a PM PtdIns(4,5) P_2 szintjének változására, ugyanakkor az OSH2-2xPH csak mindkét lipid egyidejű csökkenése esetén veszíti el PM-lokalizációját.



15. ábra – A PM PtdIns4P- és PtdIns(4,5)P₂-szintek mesterséges változtatásának hatása a fluoreszcensen jelölt PBD-ek intracelluláris lokalizációjára HEK 293T sejtekben. A lipiddepletáló heterodimerizációs rendszer tagjainak T2A-s verzióját (egysejtes mérésnél minden esetben T2A-s verziót használtunk a lipiddepleció előidézésére, hogy biztosítsuk a heterodimerizációs rendszer mindkét tagjának expresszióját) és fluoreszcensen jelölt PBD-eket expresszáló HEK 293T sejtekről készült reprezentatív felvételek 300 nM rapamycin adása előtt (bal oldali oszlopok) és után (jobb oldali oszlopok). Az „**A**” panelen látható sejtekben szelektív PtdIns4P-depleciót (mRFP-FKBP-PJ-Sac1), a „**B**” panel esetén PtdIns(4,5)P₂-depleciót (mRFP-FKBP-5ptase) a „**C**” panelen bemutatott sejtekben pedig a két lipid együttes bontását idéztük elő (mRFP-FKBP-PJ). PM-irányítóként minden esetben az L₁₀-FRB konstrukció szerepelt.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a vizsgált BRET-szenzorainkat, ha különböző PI4K-inhibitorokkal kezeljük az őket expresszáló HEK 293T sejteket. A 16. ábrán látható, hogy 10 perc gátlószeres kezelés miként befolyásolja a bioszenzorok nBRET hányadosát. Amennyiben a III-as típusú PI4K-okat gátló széles szubsztrátspecificitású 10 μM Wm, vagy 100 μM LY294002 (LY) vegyülettel inkubáltuk a sejteket [255], a SidM-2xP4M szenzor (kék oszlopok) egy szignifikáns jelcsökkenést mutatott a kontroll, DMSO-val kezeltékhez képest ($p < 0,001$, egyutas ANOVA analízis, majd azt követően Bonferroni t-teszt; ahol a vizsgált faktor a különböző inhibitorok hatása a kontroll, csak oldószert kapott sejtekhez képest; majd a post hoc teszt segítségével a páronkénti átlagok különbsége került összehasonlításra). Ugyanakkor az OSH2-2xPH (piros oszlopok) és a PLC δ 1-PH (zöld oszlopok) szondák által mért nBRET hányados nem változott számottevően ($p > 0,05$) a kezelés hatására. Ahogy a bevezető fejezetben részletesen bemutattam, míg a PM PtdIns4P-szintézisét a PI4KA végzi [39, 49], a PI4KB főként a Golgi PtdIns4P-tartalmáért felel [46]. Amennyiben egy szűk szubsztrátspecificitású, az alkalmazott koncentrációban kizárólag a PI4KA-t gátló vegyületet [191], 10 nM A1-et adtunk a sejteknek, akkor a Wm-hoz és LY294002-höz hasonlóan egy szignifikáns jelcsökkenést figyelhettünk meg a SidM-2xP4M szenzorral, de a PI4KB gátló 250 nM PIK-93 [199] nem okozott érdemi nBRET hányados változást, és egyik vegyület sem befolyásolta az OSH2-2xPH és a PLC δ 1-PH doméneket tartalmazó szenzorok által mért jelet.



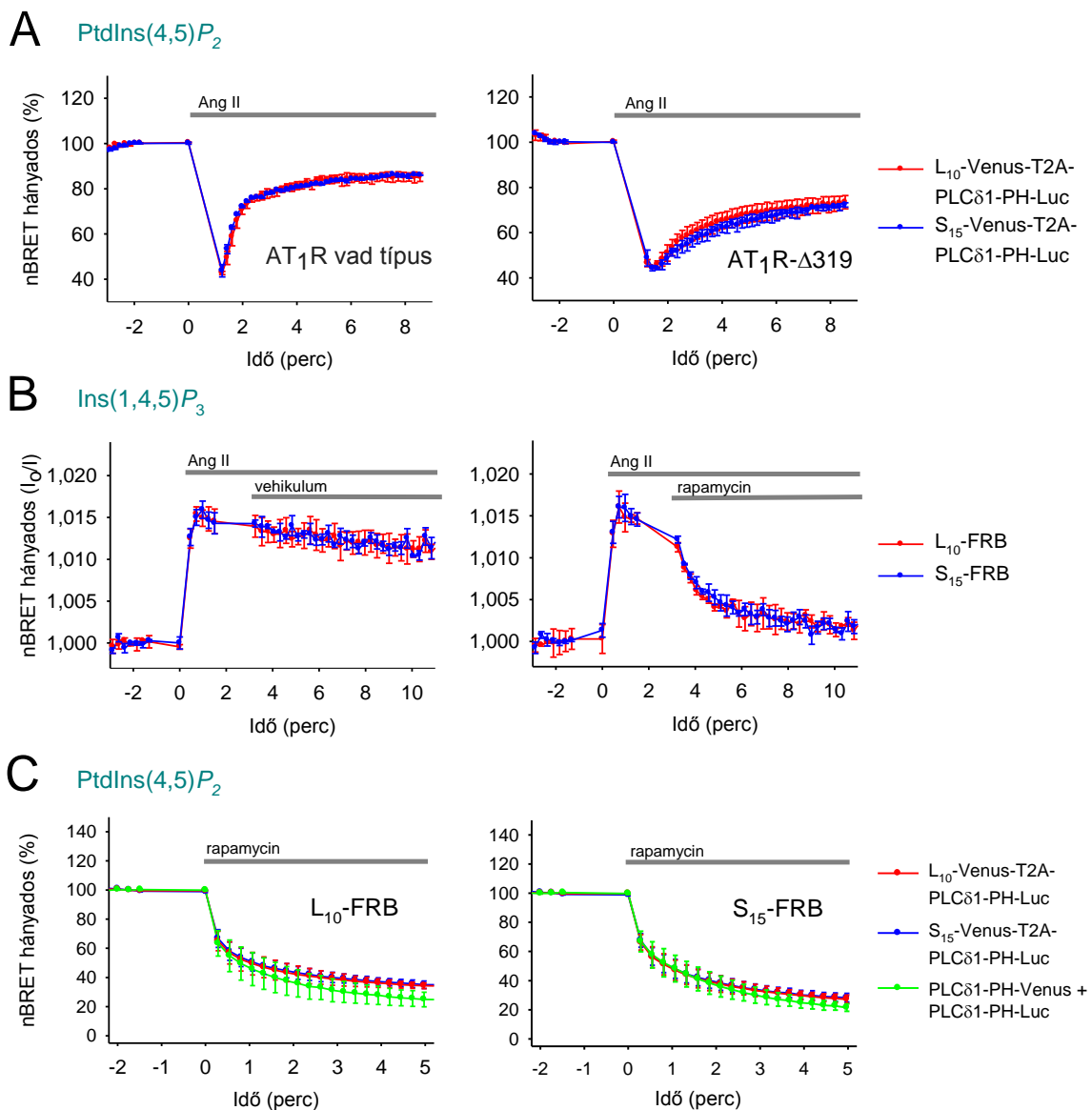
16. ábra – A PI4K-gátló vegyületekkel történő kezelés hatása a PM PPIIn-ekre. A feltüntetett gátlószerekkel történő 10 perc inkubáció hatása a vizsgált bioszenzorok által mért nBRET hányadosra. 10 μM Wortmannin (Wm) és 100 μM LY294002 (LY) mindkét III-as típusú PI4K-t képes gátolni, ugyanakkor 10 nM A1 csak a PM PtdIns4P szintéziséért felelős PI4KA, 250 nM PIK-93 pedig a Golgi PtdIns4P képzésében részt vevő PI4KB gátlószere. Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be. Statisztikai analízisként egyutas ANOVA-t, majd Bonferroni t-teszt vizsgálatot végeztünk, *** $p < 0,001$.

Összeségében tehát mindezen adatok alapján azt a konklúziót vontuk le, hogy a SidM-2xP4M doménnel rendelkező szenzor megbízhatóan képes nyomon követni a PM PtdIns4*P*-szintjében beállt változásokat, és az OSH2-2xPH ilyen célból történő felhasználását mindenféleképpen fenntartásokkal kell kezelni. A továbbiakban ennek megfelelően a SidM-2xP4M alapú szenzort használtuk a PtdIns4*P* detektálására.

5.4. A PM-on belüli, PtdIns(4,5)*P*₂-ban gazdag területek vizsgálata

A PM szerkezete heterogén, elkülöníthetőek benne koleszterinben és glikolipidekben gazdag, úgy nevezett rendezett vagy „raft”, és ezen lipidekben szegényebb, rendezetlen vagy más néven „non-raft” régiók [256]. Felmerült bennünk ezért annak lehetősége, hogy nem mindegy, a PM-on belül pontosan hova, mely mikrokompartmentbe irányítjuk szenzorunk akceptor FP-jét. Ennek vizsgálatához két már korábban is említett szekvenciát hasonlítottunk össze. Egyrészt az Lck első 10 aminosavát (L₁₀), mely poszttranszlációs módosulással palmitoilálódik és kétszeresen mirisztoilálódik, és ennek eredményeként a fehérje raft régióba történő irányítását okozza, másrészt a c-Src első 15 aminosavát (S₁₅), mely mirisztoilálódás mellett számos bázikus aminosavval rendelkezik, és így non-raft lokalizációt eredményez [239]. Ebből kiindulva a PLCδ1-PH domént tartalmazó PtdIns(4,5)*P*₂-szenzornak elkészítettük két változatát is, melyek abban különböztek tehát, hogy az energiatranszfer akceptorfehérjéket (Venus) eltérő mikrokompartmentekbe irányítottuk.

Ezek összehasonlításához HEK 293T sejteket transzfektáltunk a PtdIns(4,5)*P*₂-szenzorokkal, illetve vad típusú vagy nem internalizálódó (Δ319) AT₁R-ral, majd a sejteket 100 nM Ang II-vel ingereltük. Ahogy az a 17.A. ábrán látható, sem kinetikai, sem pedig amplitúdóbeli különbség nem volt kimutatható egyik receptor esetén sem (a bal panel a vad típusú, míg a jobboldali az AT₁R-Δ319 receptort expresszáló sejtekben mért változásokat mutatják), függetlenül attól, hogy az L₁₀-zel (kék görbék) vagy az S₁₅-tel (piros görbék) jelölt mikrokompartmentben detektáljuk-e a jelet.



17. ábra – A bioszenzorok és a PtdIns(4,5) P_2 -depletáló rendszer eltérő PM-on belüli mikrodoménekbe történő irányításának hatása a mért energiatranszferre HEK 293T sejteken. **(A)** Vad típusú AT $_1$ R-t (bal panel) vagy AT $_1$ R- Δ 319-et transziensen kifejező HEK 293T sejtekben 100 nM Ang II stimulusra, az L $_{10}$ -zel jelölt rendezett (piros görbék) vagy S $_{15}$ -tel jelölt rendezetlen PM régiókban (kék görbék) detektálható nBRET-jel változások. **(B)** A rendezett- (piros görbék), ill. rendezetlen (kék görbék) régióban létrehozott PtdIns(4,5) P_2 -depléció hatása az AT $_1$ R- Δ 319-et transziensen kifejező HEK 293T sejtekben 100 nM Ang II stimulust követően mérhető Ins(1,4,5) P_3 -jelre. A bal panel a kontroll, hormonális ingerlést követően csak DMSO vehikulumot, míg a jobb panel a 300 nM rapamycint kapó sejtek nBRET hányadosát mutatják. **(C)** A bal oldali panel görbéi a különféle PtdIns(4,5) P_2 -szenzorokkal mérhető normalizált BRET-jel változást mutatják, amennyiben az Sptase-t a rendezett, míg a jobb oldali panel görbéi ha az enzimet a rendezetlen PM régiókba irányítjuk. Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy okoz-e mérhető funkcionális eltérést, ha ugyanazon szenzort használjuk, de eltérő PM mikrodoménben váltunk ki akut PtdIns(4,5) P_2 -depléciót. Utóbbi eléréséhez a már korábban bemutatott heterodimerizációs rendszerünket hívtuk segítségül, melyből a szenzorokhoz hasonló

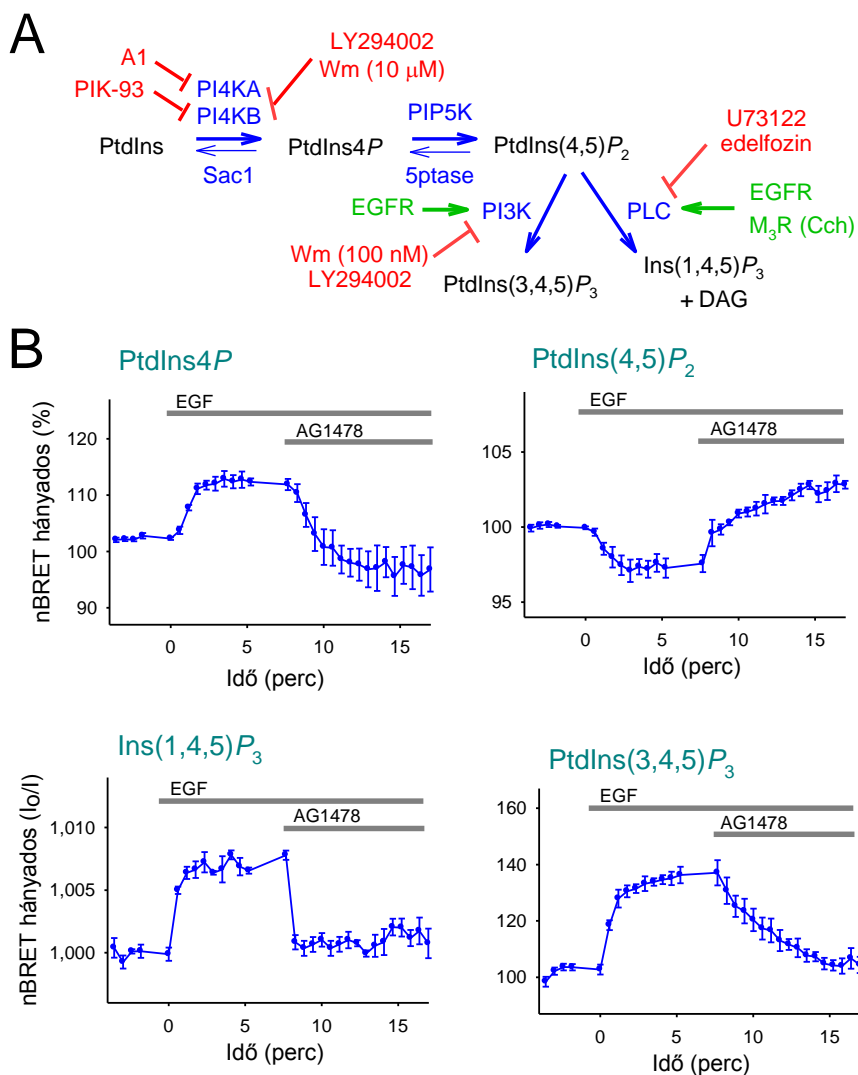
módon szintén két verziót hoztunk létre. A vizsgált sejtelettani folyamat az AT₁R-Δ319-et expresszáló HEK 293T sejteken 100 nM Ang II hatására bekövetkező Ins(1,4,5)*P*₃-jel volt (a korábban bemutatott R265K mutáns szenzorral mérve). A 17.B. ábra görbéin jól látható, hogy a 300 nM rapamycin adását követően létrejövő heterodimerizáció, következményes 5ptase PM-kihelyeződés és akut PtdIns(4,5)*P*₂-szintcsökkenés, függetlenül attól, hogy az 5ptase enzimet az L₁₀-FRB konstrukcióval a rendezett (kék görbék) vagy az S₁₅-FRB révén a rendezetlen PM régiókba juttatjuk (piros görbék), ugyanolyan mértékben gátolta az Ins(1,4,5)*P*₃-jelet.

Következő lépésként összehasonlítottuk, hogy mi történik akkor, ha a különböző mikrodoménekben váltjuk ki a PtdIns(4,5)*P*₂-depléciót, és az L₁₀-es vagy az S₁₅-ös PtdIns(4,5)*P*₂-szenzorunkkal detektáljuk a jelváltozásokat. Ahogy az a 17.C. ábrán látható, nem volt különbség attól függően, hogy a szenzorunk akceptor tagja az L₁₀-zel jelölt rendezett (piros görbék) vagy az S₁₅-tel (kék görbék) jelölt rendezetlen PM régióban helyezkedett el. További kontrollként megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a szignál abban az esetben, ha nem egy PM-marker és a PLCδ1-PH között mérünk energiáttranszfert, hanem két PBD között, melyek egyike luciferázzal, míg a másik Venusszal van megjelölve (zöld görbe), de ebben az esetben is, a korábbiakkal szinte teljesen megegyező lefutású BRET hányadosokat kaptunk. Felmerült bennünk, hogy a különféle konstrukciók között azért nem látunk különbséget, mert az overexpressziójuk miatt esetleg elveszítik mikrodomén-specifitásukat. Ennek kiküszöbölésére a detektálási limit közeléig csökkentettük az expresszió szintjét a sejtekben, illetve a jelenséget megvizsgáltuk más sejtvonalakban is (COS-7, HeLa), de minden esetben ugyanezt tapasztaltuk (ezen adatok nem kerülnek a dolgozatban bemutatásra), a szenzorok között nem mutatkozott különbség.

Összességében a mikrodomén-specifikus lipidkimutatás és depléció kapcsán azt a konklúziót vontuk le, hogy a mi mérési körülményeink között nem számít, hogy az 5ptase enzimet pontosan hova irányítjuk a PM-on belül, vagy hogy az energiáttranszfert két PLCδ1-PH domén, avagy egy PM mikrodomén és egy PBD között mérjük. A továbbiakban így PtdIns(4,5)*P*₂-szenzorként az L₁₀-Venus-T2A-PLCδ1-PH-Luc konstrukciót használtuk.

5.5. Az EGF és M₃ receptorok aktivációját követő PPI_n-változások kimutatása

Miután megtörtént szenzoraink karakterizálása, megvizsgáltuk, hogy különböző PM-receptorok aktiválódása során milyen dinamikus változások következnek be a PPI_n-ek szintjében. Kísérleteinkhez egyrészt egy RTK családba tartozó receptort, az epidermális növekedési faktor receptorát (EGFR) választottuk, mely mind a PI3K útvonalat, mind a PLC γ -t aktiválja, másrészt a GPCR-ok közé sorolható M₃R receptort, mely a PLC β aktiválása révén képes a PPI_n-homeosztázist megbolygatni (18.A. ábra).

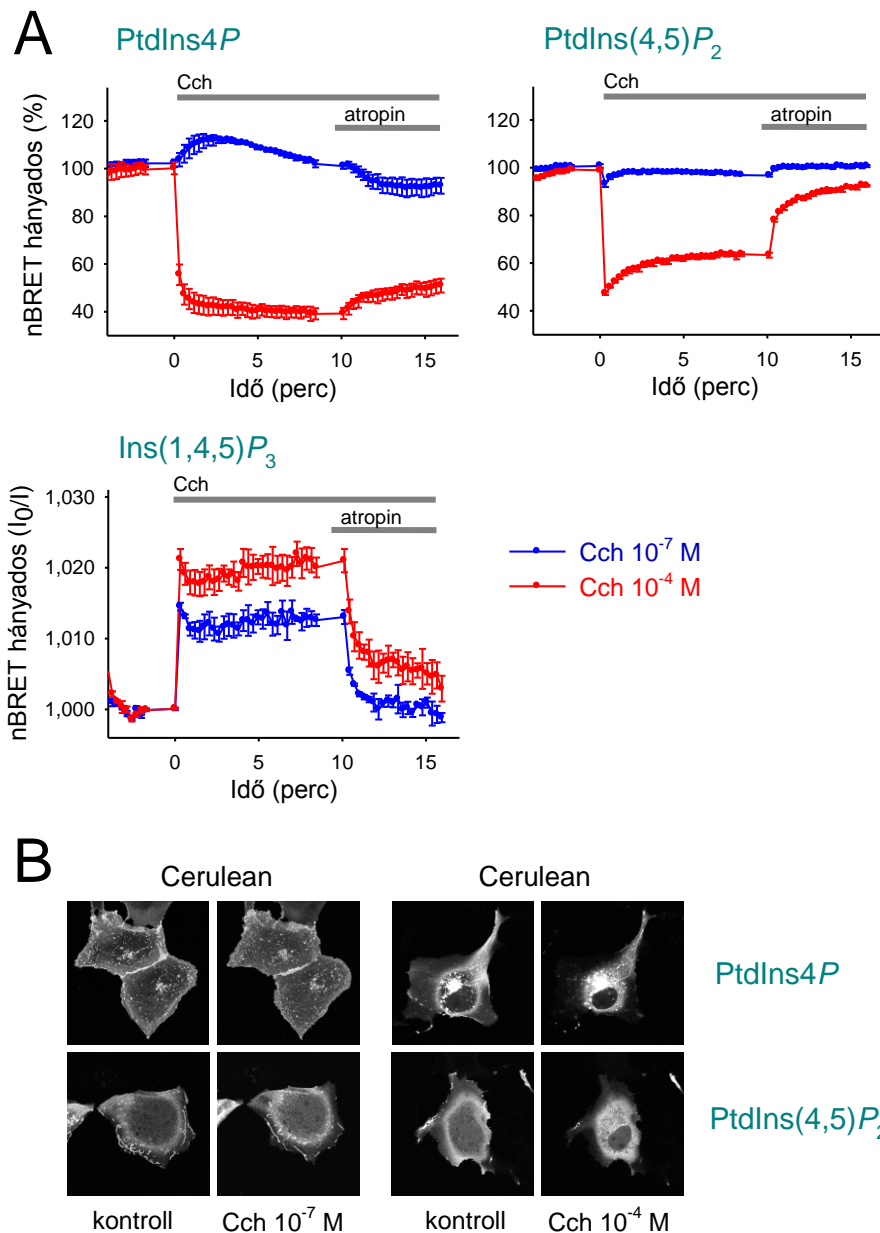


18. ábra – A PPI_n-szintek receptoraktivációt követő változása (A) A PtdIns(4,5)P₂ szintézise két egymást követő foszforiláció révén történik, melyben elsőként a PI4K, majd a PIP5K vesz részt. A PtdIns(4,5)P₂ továbbalakulhat a PI3K révén PtdIns(3,4,5)P₃-tá, melyet RTK-ok, például az EGFR aktivál, vagy PLC aktiváció hatására Ins(1,4,5)P₃ és DAG keletkezhet belőle, mely folyamatot mind Gq-kapcsolt receptorok (pl. M₃R), mind RTK-ok képesek kiváltani. Az ábrán kék színnel az enzimeket, pirossal az alkalmazott gátlószereket, zölddel pedig a receptorokat tüntettem fel. **(B)** Az EGFR-t és a PPI_n-érzékelő bioszenzorokat transziensen expresszáló HEK 293T sejtekben, 100 ng/ml EGF stimulusra bekövetkező nBRET-változások. 8 perccel az ingerlést követően EGFR inhibitor AG1478-at (10 μM) adtunk a sejteknek. Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

A kísérletekhez a receptorokat és a bioszenzorokat tranziensen transzfektáltuk HEK 293T sejtekbe. Ahogy az a 18.B ábrán látható, az EGFR szupramaximális [257], 100 ng/ml EGF agonistával történő ingerlése, a vártak megfelelően a PI3K aktiválása révén emelte a PM PtdIns(3,4,5) P_3 -szintjét (jobb alsó panel), valamint a PLC aktiválódása eredményeként kismértékű Ins(1,4,5) P_3 -szintnövekedést is létrehozott (bal alsó panel). Mivel mindkét enzim szubsztrátja a PtdIns(4,5) P_2 , ezért nem volt meglepő, hogy ezen lipid mennyisége az előzőekkel párhuzamosan csökkent (jobb felső panel). Meglepőde tapasztaltuk ugyanakkor, hogy a PM PtdIns4 P a várttal ellentétben nem csökkent, hanem kismértékben ugyan, de nőtt (bal felső panel). Mindezen hatások reverzibilisnek bizonyultak, ha 10 μ M AG1478 tirozin-kináz inhibitorral kezeltük a sejteket [258].

Hasonló kísérleteket végeztünk M_3R -t tranziensen expresszáló sejteken is. Amennyiben az irodalomban széleskörűen alkalmazott koncentrációjú [259], 10^{-4} M Cch-lal ingereltük ezen sejteket, egy gyors és jelentős Ins(1,4,5) P_3 -emelkedést kaptunk, mely együtt járt a PM PtdIns(4,5) P_2 - és PtdIns4 P -szintjének nagymértékű csökkenésével (19.A. ábra, piros görbék). Ha az ingerlést követően a receptor kompetitív antagonistáját, 10 μ M atropint adtunk a sejteknek, akkor azt tapasztaltuk, hogy az Ins(1,4,5) P_3 gyorsan visszatért az alapértékhez közeli szintre, és a PM PtdIns(4,5) P_2 is gyorsan reszintetizálódott. Érdekes módon a PtdIns4 P szintje a PM-ban, a Gq jelátvitel terminálását követően csak lassan kezdett emelkedni, melynek hátterében feltehetően a PIP5K enzimek fokozott aktivitása, és így a PtdIns4 P azonnali PtdIns(4,5) P_2 -tá történő átalakulása állhat.

Mivel a 10^{-4} M Cch-lal történő M_3R -ingerlés egy, az EGFR-énál lényegesen nagyobb mértékű PLC-aktiválódást eredményezett, a két receptor PM PPIIn-szintekre kifejtett hatásának összehasonlítása problémába ütközött. Hogy az eredményeket összemérhetőbbé tegyük, megvizsgáltuk, hogy milyen PPIIn-szintváltozások következnek be abban az esetben, ha alacsonyabb Cch-dózist alkalmazunk és így csak az EGFR-nál látotthoz hasonló mértékű PLC-aktiválódást váltunk ki. 10^{-7} M Cch-ingerlés esetén az EGFR-stimulációval megegyező nagyságú Ins(1,4,5) P_3 -jelemelkedést és PtdIns(4,5) P_2 -szintcsökkenést kaptunk, és érdekes módon ebben az esetben is azt láttuk, hogy a receptor aktivációja PtdIns4 P -növekedést eredményezett (19.A. ábra, kék görbék).



19. ábra – A különböző koncentrációjú CCh-ingerlés hatására bekövetkező PPIIn-szintváltozások (A) A M₃R-t és a PPIIn-érzékelő bioszenzorokat tranziensen expresszáló HEK 293T sejtekben, 10⁻⁷ M (kék görbék) illetve 10⁻⁴ M (piros görbék) Cch-stimulusra bekövetkező nBRET-változások. 10 perccel az ingerlést követően M₃R kompetitív antagonistát atropint (10 μM) adtuk a sejteknek. Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a szternd hibát mutatják be. **(B)** M₃R-t és a PtdIns4P- (felső sor) illetve PtdIns(4,5)P₂- (alsó sor) bioszenzorok Ceruleanos verzióját expresszáló COS-7 sejtekről készült reprezentatív, konfokális mikroszkóppal készült felvételek. A felvételek nyugalmi állapotban (bal oldali oszlopok), illetve 5 perces Cch- (10⁻⁷ vagy 10⁻⁴ M) ingerlést követően (jobb oldali oszlopok) készültek.

Az M₃R-ral kapott eredményeket szerettük volna konfokális mikroszkópos mérésekkel is megerősíteni. Ehhez COS-7 sejteket transzfektáltunk a Ceruleannal jelölt PPIIn-szenzorokkal (ugyanazokkal, melyek a 10. ábra konfokális felvételein is láthatóak). A 19.B. ábra mutatja a szenzorok sejten belüli elhelyezkedést nyugalmi

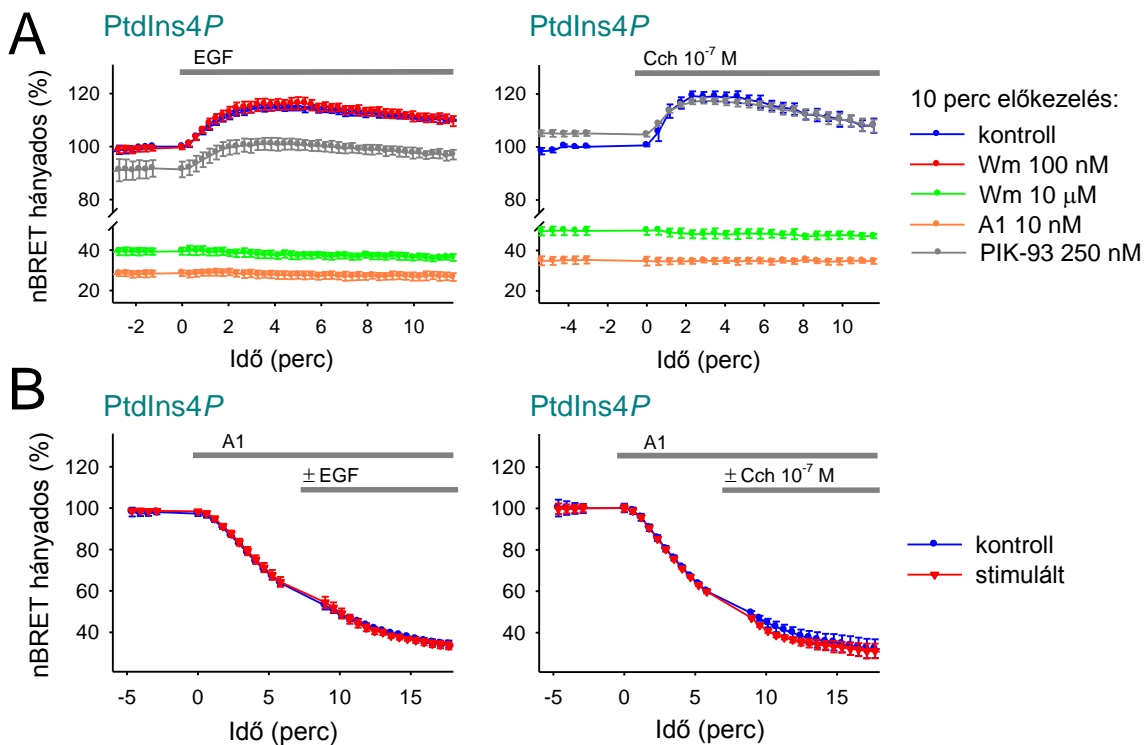
körülmények között, illetve 5 perccel a feltüntetett dózisu Cch-ingerlést követően (az ábrán csak a Ceruleannal jelölt PBD-ek kerülnek feltüntetésre, mivel a Venusszal jelölt PM markerek az ingerlés hatására nem változtatják intracelluláris lokalizációjukat). Ha a sejteket alacsony dózisu, 10^{-7} M Cch-lal stimuláltuk, a Cerulean-SidM-2xP4M és Cerulean-PLC δ 1-PH fehérjék mozgását nem lehetett megítélni, de a masszív hormonális stimulus (10^{-4} M Cch) egy egyértelmű, jól nyomon követhető PBD-transzlokációt eredményezett. Látható tehát, hogy az általunk kifejlesztett BRET-szenzorok jelentős segítséget tudnak nyújtani a receptoringerlést követően kialakuló dinamikus PPIIn-szintváltozások vizsgálatához. Segítségükkel már olyan kismértékű PPIIn-szintváltozásokat is ki tudunk mutatni, melyek mérése a klasszikus mikroszkópos technikákkal kivitelezhetetlen, de legalábbis megbízhatóan nagyon nehezen vizsgálható.

5.6. A receptoringerlést követő PtdIns4P-szintemelkedés enzimatis háterének vizsgálata

Az eddig bemutatott eredmények arra utalnak, hogy receptoringerlést követően nemcsak beindul a PtdIns4P-reszintézis, hanem ennek mértéke még nagyobb is lehet, mint a felhasználásé, így megfelelő, a fiziológias koncentrációtartományhoz közeli dózist alkalmazva a lipid szintje a bazális érték fölé emelkedhet. Hogy megvizsgáljuk, mely PI4K enzim felelős ezért a növekedésért, EGFR-t ill. M₃R-t tranziensen kifejező sejteket PI4K-inhibitorokkal kezeltünk elő, majd 100 ng/ml EGF-ral ill. 10^{-7} M Cch-lal aktiváltuk a receptorokat. Ahogy az a 20.A. ábrán látható, 10 perc előkezelés alacsony koncentrációjú Wm-nal (100 nM), mely a PI3K-okat már gátolja, de a PI4K-okat még nem [193], illetve a PI4KB-gátló PIK-93-mal (250 nM) nem befolyásolta az alacsony dózisu Cch illetve EGF által kiváltott PtdIns4P-emelkedést (az ábrán piros és szürke színnel fetüntetve). Ezzel szemben, ha PI4KA-specifikus inhibitor A1-et (10 nM) vagy a PI4- és PI3K-okat egyaránt gátolni képes 10 μ M Wm-t adtunk a sejteknek, akkor egyrésztől egy nagymértékű bazális PtdIns4P-szintcsökkenést kaptunk (ami megfelel a 15.B. ábrán látott hatásnak), másrésztől elmaradt a korábban látott EGFR- és M₃R-stimuláció hatására létrejövő BRET-jelemelkedés is (narancssárga illetve zöld görbék).

Mivel az A1 előkezelés nagymértékben befolyásolta a nyugalmi PtdIns4P-szintet, és így felmerült annak gyanúja, hogy a szenzorunkkal azért nem látunk egy jelnövekedést, mert már kívül vagyunk a dinamikus tartományon, ezért megvizsgáltuk azt is, hogy mi történik abban az esetben, ha olyankor stimuláljuk a sejteket, mikor még nem csökkent

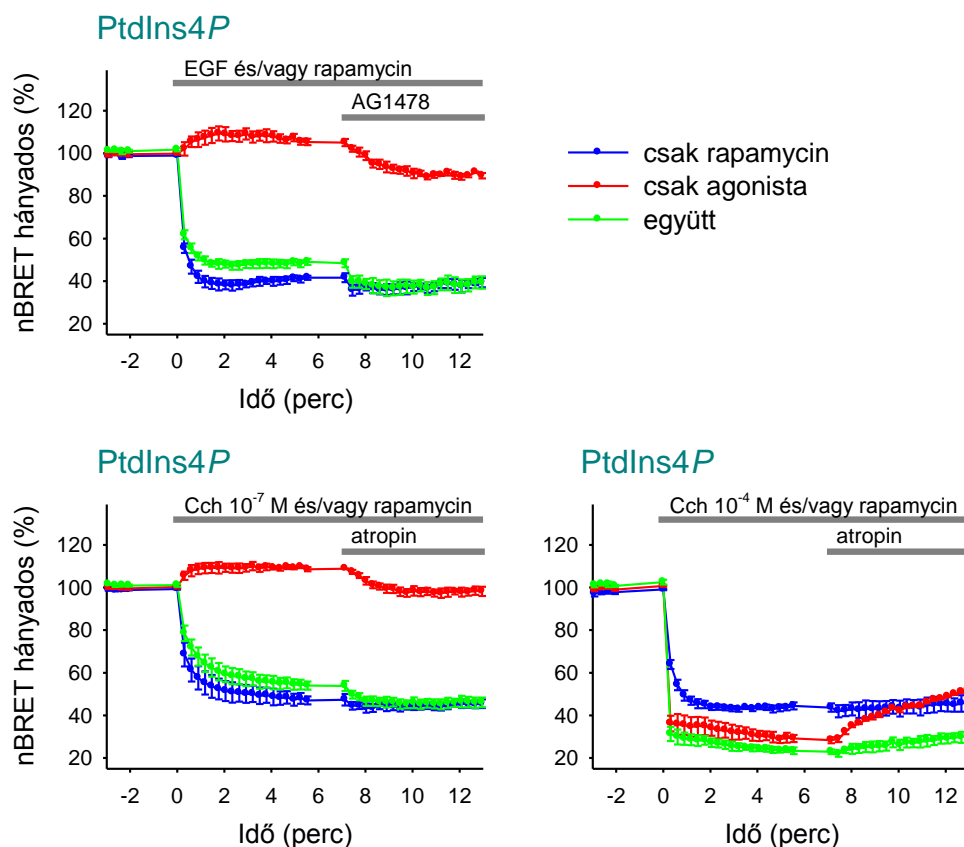
le teljes mértékben a lipid szintje a PM-ban. Ahogy az a 20.B. ábrán megfigyelhető, ilyenkor sem lehetett kimutatni a receptoringerlésre korábban tapasztalt jelemelkedést. Ezen eredmények arra utalnak, hogy nemcsak a nyugalmi PM PtdIns4*P*-szint fenntartásában [39, 49], hanem a hormon által indukált PtdIns4*P*-növekedés hátterében is a PI4KA enzim áll.



20. ábra – A receptoringerlés hatására bekövetkező PM PtdIns4*P*-emelkedés enzimatisuk hátterének vizsgálata (A) Az EGFR-t vagy M₃R-t expresszáló HEK 293T sejteket 10 percig inkubáltuk a felsorolt gátlószerekkel, majd 100 ng/ml EGF-ral illetve 10⁻⁷ M Cch-lal stimuláltuk őket. Az ábrán a PtdIns4*P*-szenzorral (SidM-2xP4M) kapott nBRET értékek láthatóak. (B) Az „A” panelhez hasonlóan transzfektált sejteket 5 percig A1-gyel kezeltük, majd 100 ng/ml EGF illetve 10⁻⁷ M Cch hozzáadásával váltottuk ki a receptorok aktivációját, miközben a BRET-szenzorral monitoroztuk a PM PtdIns4*P*-szintjét. Az eredmények mindkét panel esetén három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Következő lépésként annak szeretnénk volna utánajárni, hogy mi vezet a PI4KA aktiválásához. Felmerült, hogy maga a receptor aktivációja a szignál transzdukciós útvonalak révén eredményezi ezt. Egy másik lehetőség, hogy a PLC és PI3K enzimek által okozott PtdIns(4,5)*P*₂- illetve PtdIns4*P*-fogyást érzékeli valahogyan a sejt, és maga a lipid szintjének csökkenése indítja be a PtdIns4*P*-szintézist. Hogy ezt eldöntsük, HEK 293T sejteket transzfektáltunk a vizsgált receptorokkal, a PtdIns4*P*-bioszenzorral illetve a korábban bemutatott rapamycin-indukált heterodimerizációs lipiddepletáló rendszerünk Sac1-es verziójával, melynek segítségével akut PM PtdIns4*P*-csökkenést

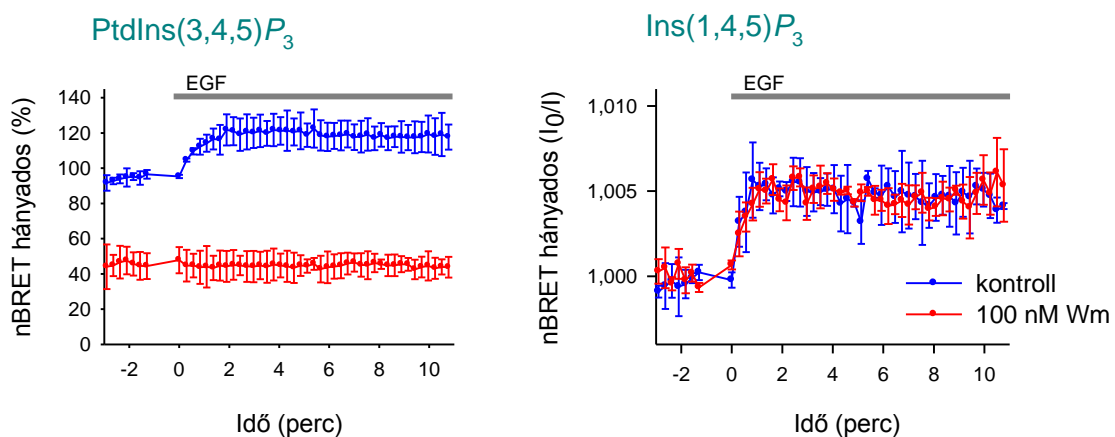
tudunk kiváltani. Ahogy az a 21. ábrán jól látható, a Sac1 PM-kihelyeződése egy nagymértékű PtdIns4P-csökkenést eredményezett (kék görbék), viszont ha egyidejűleg az EGFR-t vagy alacsony Cch dózissal (10^{-7} M) az M_3R -t is aktiváltuk (bal ill. középső panel zöld görbéi), akkor ez a csökkenés kisebbnek bizonyult. Ha ezt követően AG1478-cal illetve atropinnal gátoltuk a receptorokat, akkor a PtdIns4P szintje mindkét esetben ugyanazon alacsony értékre állt be. Amennyiben nagy koncentrációjú Cch-lal (10^{-4} M) ingereltük a sejteket, akkor azt tapasztaltuk, hogy a PLC-aktiváció önmagában már nagyobb PtdIns4P-fogyást eredményezett, mint a Sac1 által létrehozott, a kettő együttes hatása pedig még ennél is nagyobbak bizonyult (jobb panel). Ilyen körülmények között tehát az agonista PtdIns4P-szintézist stimuláló hatása már nem mutatható ki, mivel a PtdIns(4,5)P₂ utánpótlásra történő felhasználódása ennél lényegesen nagyobb mértékű, a reszintézis nem tud ezzel lépést tartani.



21. ábra – A receptoraktiváció és a direkt lipidbontás együttes hatása a PM PtdIns4P-szintjére. HEK 293T sejteket transzfektáltunk EGFR- ill. M_3R -ral, a PtdIns4P-bioszenzorral és a rapamycinnel indukálható PtdIns4P-bontó rendszerrel. 0 percnél a sejteket 300 nM rapamycinnel (kék görbék), agonistával (100 ng/ml EGF vagy 10^{-7} M Cch vagy 10^{-4} M Cch; piros görbék), vagy egyidejűleg mindkettővel (zöld görbék) ingereltük. Az ábrán az így kapott nBRET változások láthatóak. Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a mérsékelt agonistastimulus még a fokozott felhasználás (hiszen ilyenkor mind a Sac1 bontja a lipidet, mind a PLC- ill. PI3K szubsztrát PtdIns(4,5) P_2 pótlására is fordítódik) ellenére is képes növelni a PtdIns4 P -képződést, ami arra utal, hogy nem, vagy legalább is nem kizárólag a lipid szintjének csökkenése révén indul be a PtdIns4 P -reszintézis, hanem maga a receptor, illetve az általa beindított szignáltranszdukciós útvonalak képesek aktiválni a PI4KA-t.

Következő lépésként azt szeretnénk volna kideríteni, hogy milyen jelátvitellel jön létre ez az aktiváció. Az EGFR esetén egyrészt a PI3K-Akt, másrészt a PLC-PKC útvonal jött szóba. Előbbit hamar kizártuk, mivel ahogy az a 20.A. ábra bal paneljén látható, 100 nM Wm-kezelés nem befolyásolta az EGF-indukálta PtdIns4 P -növekedést. Kontrollként megnéztük, hogy ugyanezen előkezelés hogyan befolyásolja a PtdIns(3,4,5) P_3 - illetve az Ins(1,4,5) P_3 -válaszokat (ld. 22. ábra). Ahogy az várható volt, a PI3K-okat az inhibitor gátolta, nem lehetett kimutatni a PtdIns(3,4,5) P_3 növekedését a PM-ban az RTK-aktiváció hatására (sőt az alapállapotban is már alacsony szintet a PI3K-gáto még jobban csökkentette), ugyanakkor mindez nem befolyásolta az Ins(1,4,5) P_3 képződését.

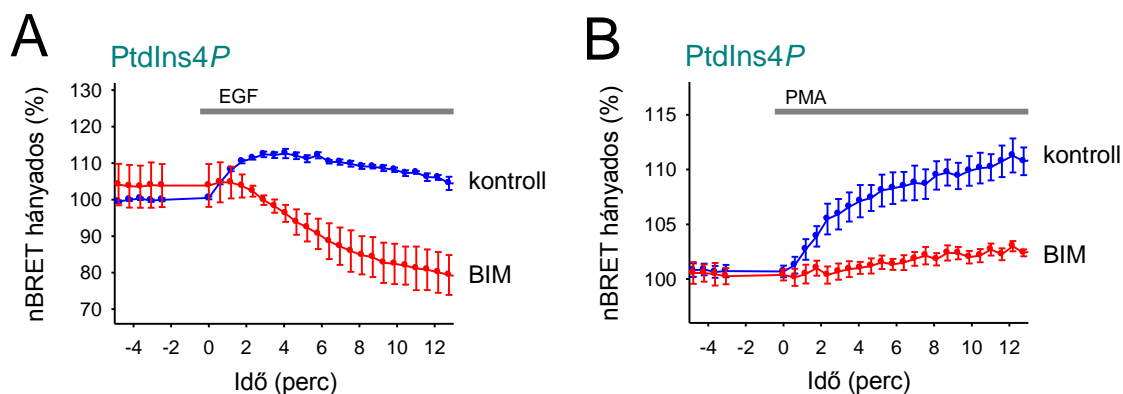


22. ábra – 100 nM Wm hatása az EGF által kiváltott PtdIns(3,4,5) P_3 - és Ins(1,4,5) P_3 -képződésre. EGFR-ral és PtdIns(3,4,5) P_3 - (bal panel) illetve Ins(1,4,5) P_3 - (jobb panel) szenzorral transzfektált HEK 293T sejteket 100 ng/ml EGF-ral stimuláltuk kontroll körülmények között (kék görbék) illetve PI3K-gátlást előidéző 10 perc 100 nM Wm-előkezelést követően. A görbéken az nBRET-változások kerültek feltüntetésre, az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Az eredmények birtokában a PtdIns4 P -szintemelkedés létrehozásában a PLC-PKC útvonal vált a fő gyanúsítottá, mely ráadásul mind a RTK-ok, mind a GPCR-ok stimulációja során aktiválódik. Ennek alátámasztására megkíséreltük gátolni a PLC enzimeket, de sajnos sem az U73122, sem az edelfozin alkalmazása nem bizonyult

sikeresnek. Hiába kezeltük a HEK 293T sejteket az irodalomban ismertetett módon 10 percig 10 μM U73122 vegyülettel [260], nem sikerült gátolni az agonista indukált $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -választ. Az edelfozin használata (10 μM , 30 perc) toxikusnak mutatkozott, konfokális mikroszkópos vizsgálatkor ugyanis azt kaptuk, hogy a sejtek legömbölyödtek (hasonló hatást már mások is leírtak: [261]), a BRET-mérések pedig egy jelentős bazális PM $\text{PtdIns}4\text{P}$ - és $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -csökkenésre utaltak (ezen kísérletek adatai nem kerülnek bemutatásra dolgozatomban).

Mivel a PLC-inhibitorokkal nem jártunk sikerrel, ezért megnéztük, hogy milyen hatást vált ki, ha a jelátvitel következő kulcsenzimét, a PKC-t gátoljuk. Ahogy az a 23.A. ábrán látható, 10 perc előkezelés 2 μM biszindolilmaleimid I (BIM) pan-PKC inhibitorral [262] nem befolyásolta a PM nyugalmi $\text{PtdIns}4\text{P}$ tartalmát, de az EGF-indukálta $\text{PtdIns}4\text{P}$ -emelkedést teljes mértékben megakadályozta, a hormonális ingerre egy csökkenést kaptunk, mely megfelel a lipid felhasználódásának a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pótlására. Amennyiben egy másik PKC-gátlószert, az RO318425 vegyületet alkalmaztunk, a BIM-mel teljes mértékben megegyező eredményeket kaptunk (az adatok nem kerülnek bemutatásra).

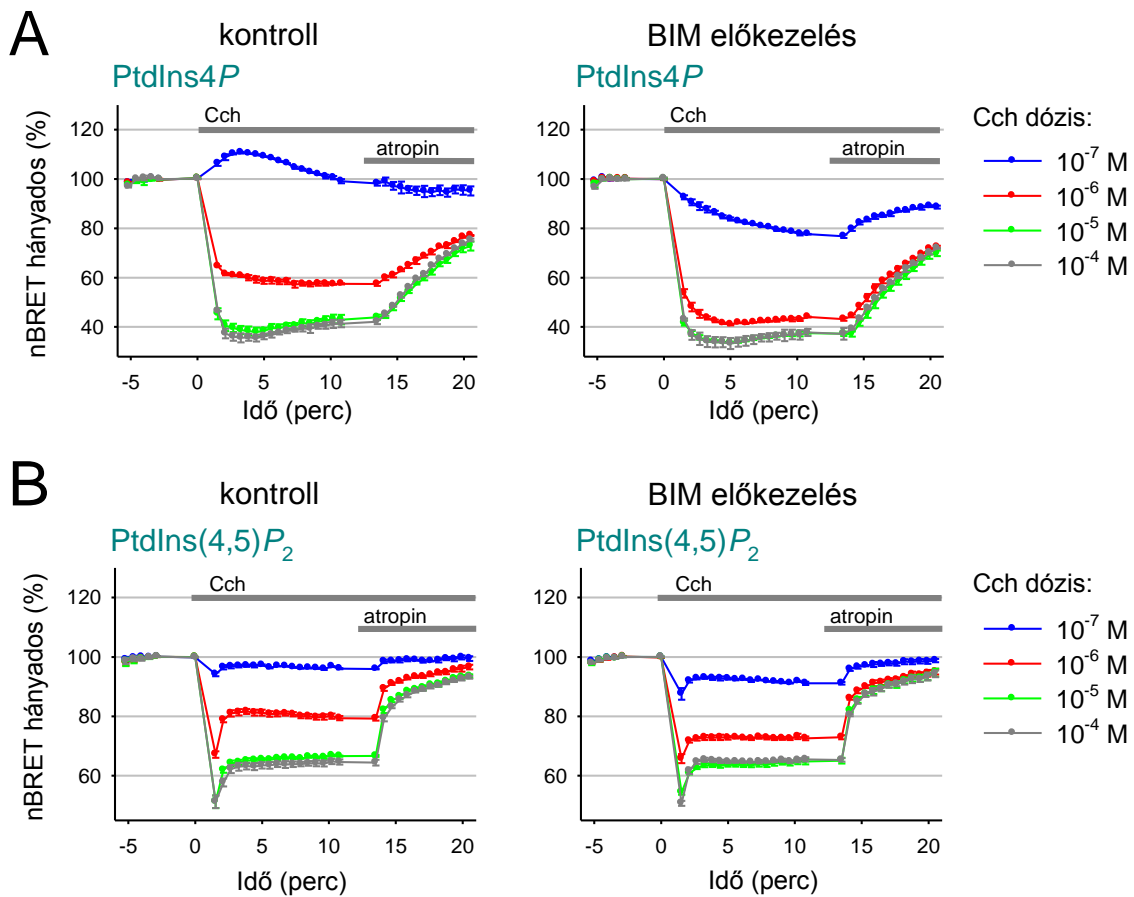


23. ábra – A PKC szerepének vizsgálata az EGFR aktivációját követő PM $\text{PtdIns}4\text{P}$ -emelkedésben. (A) Az EGFR-t és a $\text{PtdIns}4\text{P}$ -szenzort tranziensen kifejező HEK 293T sejteken 100 ng/ml EGF stimulusra mérhető nBRET változások kontroll körülmények között (kék görbék), illetve ha a sejteket előzetesen 10 percig PKC-gátló 2 μM BIM vegyülettel kezeltük (piros görbék). **(B)** Egy az előzőhöz hasonló kísérletben a sejtek hormonális ingerlés helyett direkt PKC-aktivátor 1 μM PMA-t kaptak, miközben monitoroztuk a PM $\text{PtdIns}4\text{P}$ -szintjét. Az eredmények mindkét panel esetén három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Hogy a PKC $\text{PtdIns}4\text{P}$ -növelésben szerepet játszó hatását megerősítsük, megvizsgáltuk, hogy mi történik, ha nem receptoringerlés révén aktiváljuk a PKC-t, hanem 100 nM forbol-mirisztát-acetát (PMA) direkt aktivátorral. Ebben az esetben is egy $\text{PtdIns}4\text{P}$ -emelkedést figyelhettünk meg (23.B. ábra), ami tehát arra utal, hogy a

PKC-nek egyértelmű szerepe van a RTK-aktiváció során megfigyelhető PM PtdIns4*P*-szintnövekedésben.

Az EGFR-hoz hasonlóan megvizsgáltuk azt is, hogy miként befolyásolja a PKC-gátlás az M₃R stimulációkor bekövetkező PtdIns4*P*-válaszokat. Ahogy az a 24.A. ábrán látható, a BIM előkezelés ebben az esetben is eltüntette az alacsony koncentrációjú (10⁻⁷ M Cch, kék görbék) agonista alkalmazása esetén tapasztalható PtdIns4*P*-emelkedést. Magasabb agonistakonzentráció esetén már kontroll sejtekben is a BRET-jel csökkenését lehetett tapasztalni (10⁻⁶ M, piros görbék), ám a PKC-gátlás folyamányaként ennek mértéke megnőtt, ami egyértelműen jelzi, hogy a PKC-indukálta PI4KA-aktivációnak szerepe van a hormonális ingerlést követő PPI_n-reszintézisben.



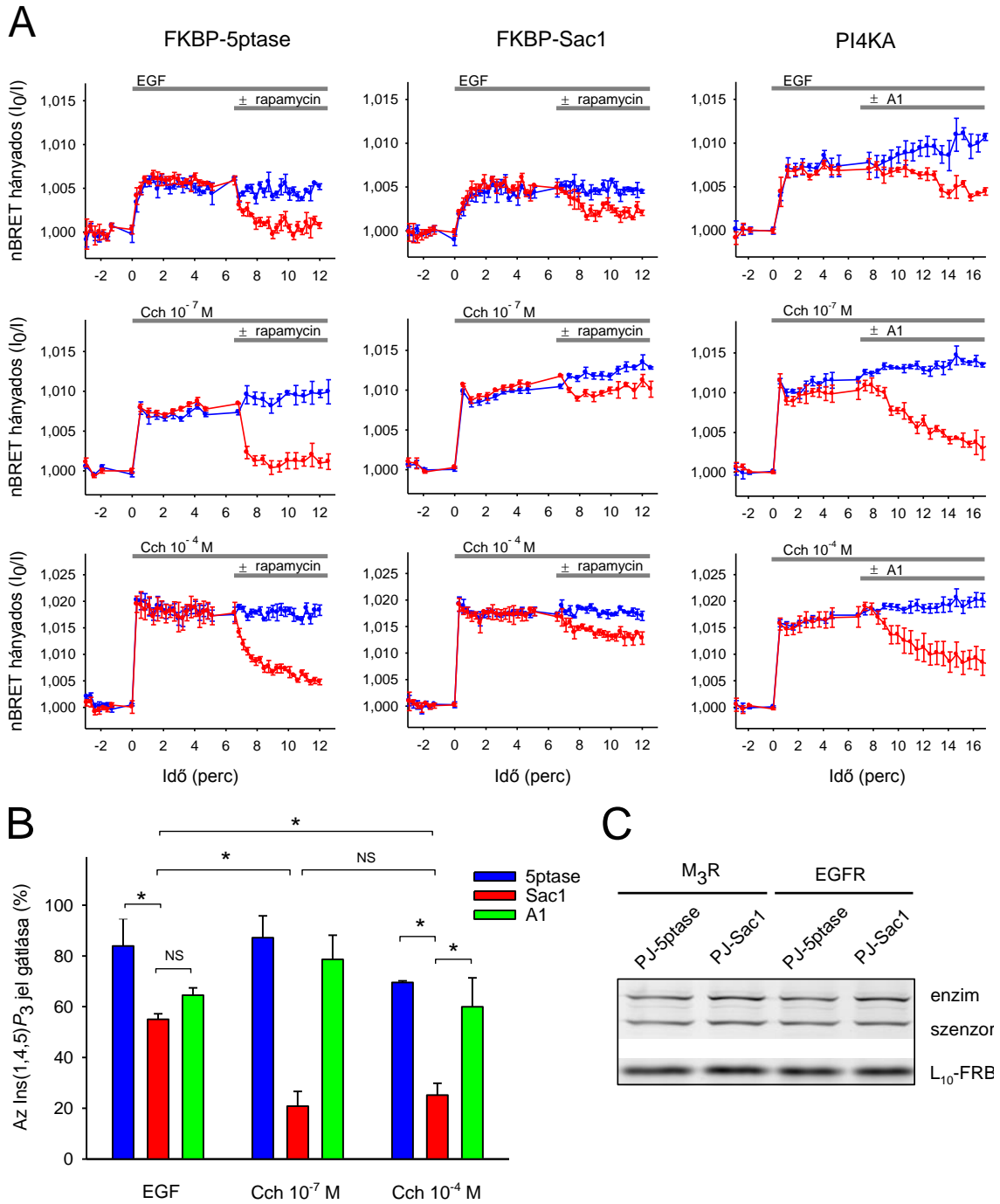
24. ábra – A PKC szerepének vizsgálata az M₃R aktivációját követő PM PtdIns4*P*- és PtdIns(4,5)*P*₂-szintek változásaiban. **(A)** Az M₃R-t és a PtdIns4*P*-szenzort transziensen kifejező HEK 293T sejteken emelkedő koncentrációjú (10⁻⁷ - 10⁻⁴ M tartományban) Cch stimulusra mérhető nBRET-változások kontroll körülmények között (bal panel), illetve ha a sejteket előzetesen 10 percig PKC-gátló 2 μM BIM vegyülettel kezeltük (jobb panel). **(B)** Egy az előzőhöz hasonló kísérlet, melyben a hormonális ingerlésre bekövetkező PtdIns(4,5)*P*₂-változások voltak nyomon követhetőek. Az eredmények mindkét panel esetén három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be.

Ennél magasabb dózisú Cch alkalmazásakor (10^{-5} M Cch, zöld görbék ill. 10^{-4} M Cch szürke görbék) már BIM nélkül is egy hatalmas BRET-jel esést kapunk, amelynek mértékét a gátószeres előkezelés érdemben már nem befolyásolta. A PtdIns4P monitorozásával párhuzamosan megvizsgáltuk, hogyan érinti a PKC gátlás a PM PtdIns(4,5) P_2 -szintjét. A 24.B. ábrán feltüntetett eredmények azt mutatják, hogy ha kiiktatjuk a PKC-indukálta PI4KA aktiválódást, akkor mindez a hormonális stimulusra létrejövő PtdIns(4,5) P_2 -csökkenés mértékében is megmutatkozik, a kontrollnál nagyobb lesz a lipid szintjében beálló változás. Említésre méltó még, hogy 10 μ M atropin kezelést követően a kontroll és a BIM-mel inkubált sejtekben a görbék lefutása lényegében megegyező volt, vagyis a PKC gátlása nem befolyásolta a jelátvitel terminálását követően fellépő PtdIns4P- és PtdIns(4,5) P_2 -reszintézist.

5.7. A PtdIns4P-reszintézis szerepe a receptorok jelátvitelében

Miután megvizsgáltuk, hogy a receptoringerlés mely jelátviteli útvonalon vezet a PtdIns4P szintéziséhez, kíváncsiak voltunk, hogy a PtdIns4P és PtdIns(4,5) P_2 milyen szerepet töltenek be az EGFR és M₃R szignáltranszdukációjában, elősorban a PLC-aktiváció hatására létrejövő Ins(1,4,5) P_3 -jel fenntartásában. Ehhez olyan kísérleteket terveztünk, melyekben EGF (100 ng/ml) vagy Cch ingerlést követően (10^{-7} M és 10^{-4} M) monitoroztuk az Ins(1,4,5) P_3 -szinteket, majd szelektív PtdIns4P- vagy PtdIns(4,5) P_2 -depléciót hoztunk létre a rapamycin-indukálta heterodimerizációs rendszerünk segítségével (Sac1 ill. 5ptase révén), vagy 10 nM A1 adásával gátoltuk a PI4KA enzimet. A mérések során kapott Ins(1,4,5) P_3 -jel kinetikai görbéit a 25.A. ábrán mutatom be.

A vártnak megfelelően a PtdIns(4,5) P_2 szintjének mesterséges lecsökkentése szinte teljes mértékben megszünteti az agonista indukálta Ins(1,4,5) P_3 -jelet, mind az EGFR, mind az M₃R esetében (bal oldali görbék). Amennyiben Sac1 enzimmel hozunk létre PtdIns4P-depléciót, akkor az csak kis mértékben képes lecsökkenteni az Ins(1,4,5) P_3 szintjét (középső görbék), ugyanakkor a PtdIns4P-reszintézis gátlásának eredményeként (jobb oldali görbék) az Ins(1,4,5) P_3 -termelődés jelentősen mérséklődött.



25. ábra – A PM PtdIns4P és PtdIns(4,5)P₂ szerepe a hormonális hatásra létrejövő Ins(1,4,5)P₃-jel fenntartásában (A) Az EGFR-t vagy M₃R-t, illetve a lipiddepletáló rendszer 5ptase-os vagy Sac1-es verzióját expresszáló HEK 293T sejtekben az Ins(1,4,5)P₃-szennozorral mérhető nBRET-változások. 0 időpillanatban a sejteket hormonálisan ingereltük (100 ng/ml EGF; 10⁻⁷ M Cch; 10⁻⁴ M Cch), majd 6 perccel később 300 nM rapamycin ill. 10 nM A1 adásával váltottuk ki a lipiddepleciót (piros görbék), míg a kontroll sejtek DMSO vehikulumot kaptak (kék görbék). Az eredmények három független, triplikátumban végzett kísérlet átlagát és a sztenderd hibát mutatják be. (B) A lipiddepleció Ins(1,4,5)P₃-jelre kifejtett gátló hatásának mértéke az „A” panel görbének megfelelően. Az ábrázolt értékek 5ptase (kék oszlopok) és Sac1 (piros oszlopok) esetén a rapamycin adását követő 5. perc, míg A1 (zöld oszlopok) esetén a 10. perc mérési eredményeinek felelnek meg. A statisztikai analízis kétutas ANOVA és Holm-Sidak posthoc teszt felhasználásával történt (*p<0,05). (C) A fent leírt kísérletet követően a fluoreszcens fehérjék mennyiségi meghatározása SDS-PAGE gélelektroforézissel (representatív ábra).

A könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért a kísérletek eredményét egy oszlopdiaqram formájában is feltüntettem, mely a 25.B. ábrán látható. Az oszlopdiaqramon ábrázolt adatokat úgy képeztük, hogy 0%-nak tekintettük a kiindulási értéket, 100%-nak az agonistával stimulált, de azt követően csak vehikulumot kapó sejtekben mérhető jelet (25.A. ábra kék görbéi), míg a gátlás mértékét azokban a sejtekben határoztuk meg, melyek agonista stimulust követően rapamycint vagy A1-et kaptak (25.A. ábra piros görbéi). Az ábrázolt értékek a rapamycin adását követő 5. percben, A1 esetén pedig az inhibitorral történő kezelést követő 10. percben mérhető jelek alapján kerültek meghatározásra. Kétutas varianciaanalízist (ahol az egyik szempont a hormonális stimulus, a másik pedig a gátlás módja), majd minden értéket párbaállítva többszörös összehasonlítást végeztünk Holm-Sidak eljárással, hogy a kapott mérési eredmények közötti szignifikáns különbségeket megvizsgáljuk. Ezek meghatározásakor azt kaptuk, hogy M_3R esetén a PM $PtdIns(4,5)P_2$ -tartalmának depléciója, vagy a $PtdIns4P$ -szintézis kulcsenzimének, a PI4KA-nak a gátlása szignifikánsan nagyobb mértékben gátolja az $Ins(1,4,5)P_3$ keletkezését, mint a $PtdIns4P$ Sac1 általi hasítása. Ez összhangban áll egy korábbi közleménnyel, melyben leírják, hogy a PM $PtdIns(4,5)P_2$ -tartalma fenntartható csökkent $PtdIns4P$ -szint esetén mindaddig, amíg a PI4KA képes $PtdIns4P$ -t szintetizálni a PM-ban [42]. Az EGFR esetén ugyanakkor azt tapasztaltuk a statisztikai kiértékeléskor, hogy nincs szignifikáns különbség az A1 kezelés és a rapamycin indukálta $PtdIns4P$ -depléció $Ins(1,4,5)P_3$ -jelre kifejtett hatásában. Ez egyben azt is jelenti (és statisztikailag is igazolható), hogy az EGFR jelátvittele lényegesen érzékenyebb a PM Sac1 általi $PtdIns4P$ -depléciójára, mint az M_3R -é.

Hogy megvizsgáljuk, a Sac1- és 5ptase-érzékenység közötti eltérés nem az expressziós különbségekből adódik-e, a BRET-méréseket követően a sejteket SDS-PAGE gélelektroforézisnek vetettük alá, majd detektáltuk a fluoreszcens fehérjék intenzitását. Egy ilyen mérésről készült reprezentatív felvételt mutat a 25.C. ábra, melyen látható, hogy az enzimek sejten belüli kifejeződése közel megegyező volt [az ábrán egy olyan mérés került bemutatásra, melyben a sejtek PJ-Sac1 és PJ-5ptase-t expresszálnak, melyek agonista indukált $Ins(1,4,5)P_3$ -jelre kifejtett hatásai megegyeznek a Sac1 ill. 5ptase enzimeknél látottakkal].

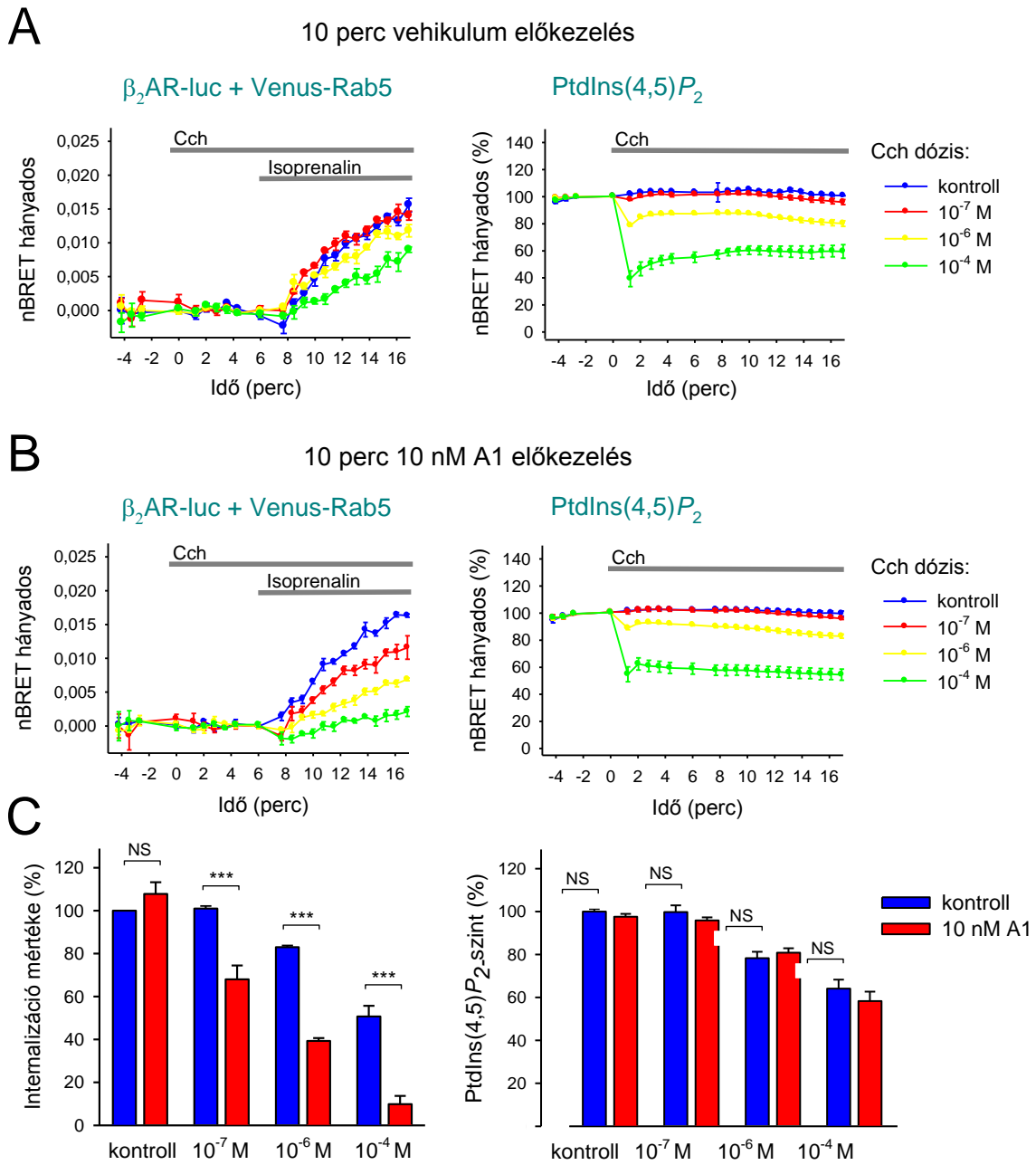
5.8. A PtdIns4P-reszintézis szerepe a receptorok internalizációjában

Ahogy azt a bevezető fejezetben leírtam, az elmúlt években számos sejtélettani jelenségről bebizonyosodott, hogy a PPI-n-ek által regulált. Az egyik ilyen sokat vizsgált folyamat a klatrin-mediált endocitózis, melynek szabályozásában elsősorban a PtdIns(4,5) P_2 -nak tulajdonítanak jelentős szerepet [214, 263, 264], de a PtdIns(3,4) P_2 -ről is jelent már meg hasonló tárgyú közlemény [14]. Tudományos diákköri munkám során kimutattuk, hogy a rapamcyin-indukált, 5ptase-t tartalmazó konstrukcióval végzett PtdIns(4,5) P_2 -depléción a GPCR-ok ingerlést követő endocitózisát, a receptor korai endoszómában történő megjelenését gátolja [111]. A folyamatot tovább vizsgálva azt találtuk, hogy amennyiben Sac1-gyel a PM PtdIns4P-szintjét csökkentjük akután, akkor az nem befolyásolja az AT₁R internalizációját [265].

Utóbbi folyamatot tovább kívántam vizsgálni, elsősorban annak megítélésére, hogy az Ins(1,4,5) P_3 -jel fenntartásához hasonlóan (ld. 5.7. fejezet) szükséges-e a $G\alpha_q$ -kapcsolt receptorok ingerlése során bekövetkező de novo PtdIns4P-szintézis az internalizációhoz. A kísérletek során a $G\alpha_s$ -kapcsolt, így hormonális stimulus során PLC-aktivációhoz nem vezető β_2 AR endocitózisát kívántuk nyomon követni. Ehhez HEK 293T sejteket transzfektáltunk β_2 AR-luc-zal illetve egy a korai endoszómára jellemző fehérjére, a Rab5 Venusszal jelölt változatával, mely molekulák közötti BRET-jel növekedés a receptor endocitózisára utal [111]. Emellett a kísérletek kivitelezéséhez még további két konstrukció kifejeződésére volt szükség, egyrészt, hogy az internalizáció mértékét megnöveljük, a β -arresztin2-mRFP-t, másrészt, hogy jelentős PLC β aktivációt tudjunk kiváltani, a vad típusú M₃R-t transzfektáltuk a sejtekbe. Utóbbi receptorra azért esett a választásunk, mert nagyon lassú deszenzitizációt mutat [266], így az endocitózis létrejöttéhez szükséges fehérjékért nem alakul ki versengés közte és a β_2 AR között.

A 26.A. ábra bal oldali panelje mutatja be, hogy milyen mértékű nBRET hányados növekedést tudunk detektálni a β_2 AR-luc és a Venus-Rab5 konstrukciók között 1 μ M isoprenalin kezelést követően kontroll esetben (kék görbék), illetve ha 5 perccel a β_2 AR agonista adását megelőzően 10⁻⁷ M (piros görbék), 10⁻⁶ M (sárga görbék) illetve 10⁻⁴ M (zöld görbék) Cch-lal ingereljük a sejteket. Az nBRET hányadost ebben az

esetben úgy képeztük, hogy a csak cölienterazint kapó sejtekben mérhető BRET hanyados értéket kivontuk az ingerelt sejtekben mérhető jeltől.



26. ábra – A PLC-aktiváció és következményes PtdIns(4,5)P₂-depléció hatása a β_2 AR internalizációjára A hormonálisan kiváltott PtdIns(4,5)P₂-depléció kiváltásához és a β_2 AR internalizációjának nyomon követéséhez HEK 293T sejteket M₃R, β -arresztin2-mRFP, β_2 AR-luc valamint a korai endoszómára jellemző Venus-Rab5 fehérjék plazmidjával transzfektáltuk (bal panel). A lipiddepléció mértékének megítéléséhez a sejtekkel a Rab5 és β_2 AR konstrukciók helyett az L₁₀-Venus-T2A-PLC δ 1-PH-luc szenzort expresszáztattuk. 0 időpontban a sejtek Cch ingerlésen estek át, majd 6 perccel ezt követően 1 μ M isoprenalint kaptak. (jobb panel) A méréseket elvégeztük (A) kontroll körülmények között illetve (B) 10 perc 10 nM A1 előkezelést követően is. Az alkalmazott Cch koncentrációk az ábra jobb oldalán kerültek feltüntetésre. A görbék n=3 független, egyenként három párhuzamos mérési ponttal végzett kísérlet átlagát \pm SEM értékeit mutatják. (C) Az „A” (kék oszlopok) és „B” panelen (piros oszlopok) feltüntetett görbék utolsó 5 pontjának átlaga a kontrollra normalizálva, százalékosan ábrázolva. A statisztikai analízis kétutas ANOVA és Holm-Sidak posthoc teszt felhasználásával történt (*p<0,001). NS jelentése: nem szignifikáns.

Az internalizációs mérésekkel párhuzamosan azt is megnéztük, hogy az alkalmazott Cch kezelés mekkora PtdIns(4,5) P_2 -szint csökkenést eredményez a sejtekben, melyhez a korábban bemutatott L₁₀-Venus-T2A-PLC δ 1-PH-Luc szenzort használtuk fel (az így kapott eredmények a 26.A. ábra jobb paneljén kerülnek feltüntetésre). A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy csak masszív PLC-aktiváció (10^{-4} M Cch-lal kiváltott) és így jelentős mértékű PtdIns(4,5) P_2 -depléciónak gátolja érdemben a β_2 AR internalizációját.

Ugyanezen kísérleteket elvégeztük úgy is, hogy a mérést megelőzően 10 percig 10 nM A1 előkezelésnek vetettük alá a sejteket, hogy a PI4KA enzimet gátoljuk. Az így kapott eredményeket mutatja be a 26.B. ábra. Jól látható, hogy ebben az esetben már 10^{-7} M Cch ingerlés is csökkentette a β_2 AR endocitózist, a gátlás mértéke pedig az alkalmazott Cch-koncentráció növekedésével párhuzamosan emelkedett. Az eredmények könnyebb összehasonlíthatósága végett oszlopdiagramon, százalékos értékben kifejezve is ábrázolom őket (26.C. ábra, késsel jelölve a kontroll, pirossal az A1 előkezelést követően kapott eredmények). Az internalizáció mértékét az isoprenalinnal történő ingerlést követő 9-11. percben mérhető értékek alapján határoztam meg, 100%-nak véve a kontroll sejtekben ebben az időintervallumban mérhető, míg 0%-nak a kiindulási (0. percben mérhető) nBRET-jelet. A PtdIns(4,5) P_2 -szint meghatározása szintén a 9-11. percek értékei alapján történt. Jól látható, hogy az A1 előkezelés önmagában sem az internalizációt, sem a PtdIns(4,5) P_2 -szintet nem csökkentette. Amennyiben viszont Cch-lal ingereltük a sejteket, akkor a PI4KA-gátolt sejtekben jeletősen csökkent a β_2 AR endocitózisának mértéke, viszont a lipid depléciójának mértékét az előkezelés nem befolyásolta érdemben (a lipid csökkenésének kinetikája ugyanakkor megváltozott, ld. 26.A. és 26.B. ábrák). A különbségek statisztikai jelentőségének kimutatására kétutas ANOVA analízist (ahol az egyik szempont a hormonális stimulus, a másik pedig a az A1 előkezelés), majd az értékeket párbaállítva többszörös összehasonlítást végeztünk Holm-Sidak eljárással. Elvégezve a számításokat azt kaptuk, hogy a Cch-ingerlés az alkalmazott koncentrációtól függetlenül (a vizsgált koncentrációtartományban) szignifikánsan nagyobb gátló hatást fejtett ki a β_2 AR internalizációjára, amennyiben a sejteket A1 előkezelésnek vetettük alá, mint ha csak kontroll, vehikulum oldattal inkubáltuk őket a mérést megelőzően ($p < 0.001$). A lipiddepléciónak mértékében ugyanakkor nincs

kimutatható szignifikáns különbség az A1 előkezelt és a kontroll sejtek között egyik alkalmazott Cch-inger esetén sem.

6. Megbeszélés

Az inozitolgyűrű 3',4' vagy 5' pozícióban történő, reverzibilis foszforilációján keresztül hét különféle PPIIn szintetizálódhat. Az ily módon keletkezett lipidek szintje eltérő a különböző endomembránokban, a plazamembránban és a citoplazmában. Mára világossá vált, hogy a PPIIn-ek nem csak strukturális elemként vannak jelen a membránokban, hanem számos sejtleletani folyamatban is fontos szabályozó szerepet töltenek be, így szintjüknek mérése hozzásegíthet minket ahhoz, hogy funkciójukról pontosabb képet kapjunk.

Az elmúlt 3 évtizedben számos a PPIIn-ek szintjének mérésére hivatott technika került kidolgozásra. Az egyik első ilyen módszernél a sejteket metabolikusan kellett megjelölni *myo*-[³H]-inozitollal vagy ³²P-foszfáttal, majd ezt követően lipidextrakciót végeztek és vékonyréteg-kromatográfiával szeparálták a különböző lipideket [1, 95, 145, 267]. Bár az inozitollipid-kutatásnak megteremtették az alapjait ezek a kísérletek, a kivitelezésük és értékelésük számos nehézségbe ütközött, a megfelelő jel detektálásához sejtek millióira volt szükség, a kinetikai mérések rendkívül körülményesek voltak, és a PPIIn-ek intracelluláris lokalizációjáról semmilyen információval nem szolgáltak, emellett az izomereket sem tudták megkülönböztetni. Jelentős továbblépés volt a lipidek mennyiségének tömegspektroszkópos elemzése, mely nagy érzékenységgel bír, ugyanakkor ez a technika sem képes megfelelő szubcelluláris felbontást biztosítani, illetve nem megoldott a különböző izomerek elkülönítése sem [9, 147, 148]. Más kutatócsoportok fluoreszcensen jelölt lipideket fejlesztettek, melyeknek mindenképp megvan az az előnye, hogy segítségével jól nyomon lehet követni a lipidek sejten belüli elhelyezkedését, mozgását, de az endogén lipidekhez képest megváltozott hidrofobicitásuk jelentősen befolyásolja megoszlásukat [268]. További alternatíva lehet a különböző PPIIn izomerek ellen kifejlesztett antitestek alkalmazása, ugyanakkor ezek csak fixált sejteken használhatóak, így a dinamikus lipidváltozások nyomon követésére nem alkalmasak.

Az igazi nagy áttörést a fluoreszcensen jelölt, specifikus PPIIn-kötésre képes fehérjedomének felismerése és alkalmazása hozta meg. Bár ezen technikának is vannak limitáló tényezői [269], segítségével az elmúlt bő évtizedben rengeteg információt sikerült nyerni a PPIIn-ek sejten belüli megoszlásáról, szintjük dinamikus változásáról

[270]. A módszer legnagyobb nehézsége az eredmények számszerűsíthetősége. Ennek megoldására már történtek próbálkozások, például egy kutatócsoport ortogonális lipidszenzorokat fejlesztett, melyek segítségével élő sejtekben in situ képesek a lipidraktárakról kvantitatív adatokhoz jutni [171, 271]. Mi egy másik megközelítést választottunk. Luciferázhoz kötött PBD-ek és Venusszal jelölt PM-markerek felhasználásával létrehoztunk egy BRET-mérésre alkalmas molekuláris eszköztárat, melynek segítségével nagy időbeli felbontással képesek voltunk nyomon követni a PPIIn-ek dinamikus változását a PM-ban. Emellett, hogy a PPIIn jelátvitel további lépéseit is vizsgálni tudjuk, a PPIIn-szondákhoz hasonló módon kifejlesztettünk egy $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzort is, mely mind egysejtes (FRET), mind sejtpopulációs (BRET) mérések kivitelezését lehetővé tette.

A BRET-szondák működésüket tekintve alapvetően két csoportba, az intramolekuláris és az intermolekuláris szenzorok közé sorolhatóak. Az intramolekuláris szenzoroknál az energiadonor és akceptor fehérjék ugyanazon molekulához vannak kapcsolva, és az összekötő szakasz konformációváltozásának eredményeként tudunk jelmódosulást detektálni. Az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ kimutatására egy ilyen szenzort fejlesztettünk, melynek alapja a humán 1-es típusú $\text{Ins}P_3R$ ligandkötő doménja. Az LBD-hez C-terminálisan Venust, N-terminálisan pedig Cerulean FP-t vagy luciferáz enzimet kapcsolva sikerült mind FRET, mind BRET technika segítségével energiatranszfer-változást detektálni az $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -koncentráció emelkedésekor. Hasonló FRET-mérésre alkalmas szenzorokat korábban már más kutatócsoportok is létrehoztak [179-185].

A BRET-szondák másik csoportjánál, az intermolekuláris szenzoroknál az energiadonor és akceptor fehérjék külön-külön molekulán helyezkednek el. Ebben az esetben a jel változását akkor figyelhetjük meg, ha a két molekula egymáshoz viszonyított távolsága nő vagy csökken. A PPIIn-ek kimutatásakor nagyobb jelet várhatunk ilyen molekulapár alkalmazásakor, mint ha egy polipeptid tartalmazná mindkét jelölést, mivel a PBD-k ligandkötése nem eredményez jelentős mértékű konformációváltozást [130]. A technikát munkacsoportunk már korábban is alkalmazta a PPIIn-ek kimutatására FRET- [177] ill. BRET- [111] mérések során. Ahhoz, hogy specifikusan a PM PPIIn-ek változását tudjuk nyomon követni, az akceptor Venus fehérjét egy rövid szekvencia segítségével a PM-ba irányítottuk, azon belül is az L_{10}

szekvencia segítségével a rendezett, az S_{15} -tel pedig a rendezetlen régiókba, míg a luciferázt a különféle lipidek felismeréséért felelős PBD-ekhez kapcsoltuk. Amennyiben megváltozott valamely lipidnek a szintje a PM-ban, akkor a luciferázzal jelölt PBD vagy áthelyeződött a PM-ra, vagy eltávolodott attól, melynek eredményeként nem-specifikus BRET-jelet tudtunk detektálni. Hasonló megközelítést korábban már egy másik kutatócsoport is használt, mellyel a PM $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -tartalmát kívánták mérni [178].

Az intermolekuláris BRET-szenzorok megalkotásának egyik fő kihívása, hogy biztosítani kell mind a donor, mind az akceptor egyidejű sejten belüli kifejeződését, lehetőleg stabil expressziós aránnyal. Az említett kutatócsoport ezt úgy érte el, hogy létrehozott egy MCF-7 sejt kolóniát, mely stabilan expresszálta mind a fluoreszcensen jelölt PM markert, mind a luciferázzal jelölt Akt-PH-t. Ilyen dupla stabil sejt vonal segítségével bár számos értékes információhoz lehet jutni, de több lipid egyidejű párhuzamos mérése ezzel a megközelítéssel nem, vagy legalább is rendkívül nehezen kivitelezhető. A két konstrukció egyidejű kifejeződésére mi egy másik módszert választottunk. A rendszer működéséhez szükséges két kódoló szakaszt a virális eredetű T2A szekvenciával kötöttük össze. Ezen szekvencia transzlációja során egy molekuláris hasadás lép fel, mely biztosítja, hogy egyetlen plazmidról két különálló, ekvimoláris mennyiségű fehérje termelődjön [240]. A technika felhasználásával egy olyan molekuláris eszköztárat hoztunk létre, mellyel tökéletes kotranszfekciót tudtunk elérni a vizsgált sejtekben, a korábbiaknál lényegesen egyszerűbb módon. A rendszerünk további előnye egy stabil sejt vonallal szemben, hogy a transzfekciós protokoll finomításával különböző expressziós szintek mellett illetve különböző sejt típusokban is lehetővé teszi a PPIn-ek szintjének detektálását.

A PBD alapú szenzorok fejlesztésénél kulcskérdés, hogy mennyire specifikusan képesek felismerni a különböző PPIn-eket. Az Akt-PH kapcsán például már korábban is említettem, hogy bár alkalmazzák $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -szenzornak [178], de közismert, hogy mind a $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -ot mind a $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ -ot képes kötni [135, 272]. Az általunk választott PBD-k közül elsősorban az OSH2-PH kapcsán merült fel korábban, hogy a $\text{PtdIns}4P$ mellett más PPIn-ekhez is képes kötődni [42]. Éppen ezért ezen lipid monitorozására két szenzort is elkészítettünk, hogy azokat összehasonlítva ki tudjuk választani azt, amelyik megbízhatóan képes detektálni a PM $\text{PtdIns}4P$ -ot. A $\text{PtdIns}4P$

és a PtdIns(4,5) P_2 szelektív, vagy együttes deplécióját előidézve azt találtuk, hogy a SidM-P4M domén sokkal érzékenyebb a PM PtdIns4 P -szintjében bekövetkező változásokra, mint az OSH2-PH, mely utóbbi képes a PtdIns(4,5) P_2 -hoz is kötődni.

A szenzorok fejlesztésénél további fontos szempont, hogy a LBD milyen affinitással köti a ligandját. Amennyiben túl nagy az affinitás, akkor a szenzor nagyon érzékeny lesz a szubsztrátjára, mely egyben azzal is jár, hogy jelentős lesz a pufferoló hatása, és nehezebben engedi el ligandját. Ez utóbbi hatás főként az off-válaszok kimutatásánál okoz problémát. Ha viszont túl kicsi az affinitás, akkor pedig csak magas szubsztrátkoncentráció esetén tudunk jelváltozást detektálni. Ahogy azt dolgozatomban elején az irodalmi áttekintés során bemutattam, az Ins(1,4,5) P_3 -kimutatási eljárások fejlesztése kapcsán több kísérlet történt megfelelő affinitású szenzor létrehozására [179-185]. Egyes munkacsoportok az Ins P_3 R LBD N-terminális gátló doménjának meghagyásával, míg mások a LBD C-terminális szakaszának megrövidítésével érték el az affinitás csökkenését. További lehetőséget jelent, ha az LBD megfelelő aminosavait elmutáljuk. Az ilyen jellegű beavatkozások csökkenthetik vagy növelhetik a ligandaffinitást, gyakran olyan drasztikus változásokhoz is vezethetnek, mely gyakorlatilag használhatatlanná teszi a szenzorokat. Kiindulásként mi az 1-es típusú Ins P_3 R LBD-ját vettük (224-605-ös aminosavak), melyet munkacsoportunk már korábban is használt Ins(1,4,5) P_3 -pufferolás céljából [273]. Az mRFP-vel jelölt LBD-ünk ligandaffinitásának meghatározása kapcsán triciált Ins(1,4,5) P_3 -tal végzett *in vitro* kötési vizsgálatokkal és Scatchard-analízissel egy 3 nM-os IC₅₀ értéket kaptunk, mely közel megegyezik a korábban leírt, GFP-hez kötött LBD-nel kimért 4 nM-os értékkel [241]. Az alacsonyabb affinitás elérése érdekében az Ins(1,4,5) P_3 -kötésben fontosnak tűnő arginin molekulákat lizinre cseréltük. A számos konstrukció tesztelése során azt kaptuk, hogy az R265K és az R269K mutációk vezetnek olyan ligandaffinitáshoz, melyek alapját képezhetik egy megfelelő Ins(1,4,5) P_3 -szenzor létrehozásának [bár mindkét mutációt hordozó szenzort elkészítettük, a dolgozatomban csak az R265K karakterizálása került bemutatásra, mivel a továbbiakban ezt használtuk az Ins(1,4,5) P_3 mérésekhez]. A vad típusú és az R265K mutációt hordozó BRET-szondák vizsgálatokor azt kaptuk, hogy a mutáns szenzornak bár kis mértékben csökkent az affinitása, de még mindig megfelelően érzékeny volt az agonista stimulusra, és a vad típusúnál sokkal pontosabban tudta az Ins(1,4,5) P_3 -válasz lecsengését jelezni.

Az intermolekuláris szenzorok fejlesztésénél nem csak a megfelelő PBD kiválasztására fordítottunk figyelmet, de azt is megvizsgáltuk, hogy a PM-marker milyen mértékben befolyásolja a mérhető BRET-jelet. Mivel számos cikk felveti annak lehetőséget, hogy a membránban vannak PPIIn-ekben gazdag mikrodomének [42, 87, 91, 153], ezért megvizsgáltuk, hogy mi történik, ha az energiaakceptor Venus FP-t különböző mikrodoménekbe irányítjuk. A PM-elhelyezkedés eléréséhez egyrészt az Lck fehérje rövid szakaszát (L_{10}), másrészt a c-Src rövid részletét (S_{15}) használtuk fel, melyek közül előbbi a PM rendezett, utóbbi pedig a PM rendezetlen régióiba juttatja el a fehérjét. Ezen irányító szekvenciákról korábban már kimutatták, hogy amennyiben hozzájuk 5ptase-t kapcsolnak, akkor az eltérő lokalizáció eredményeként különbözően képesek befolyásolni a PM $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -szintjét [239]. Kísérleteink során ugyanakkor mi nem találtunk sem kinetikai, sem amplitúdóbeli különbséget, függetlenül attól, hogy mely $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -szenzort használtuk, és hogy mely kompartmentbe vittük ki a heterodimerizációs rendszerünk segítségével az 5ptase enzimet. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a túlzottan magas expressziós szintek miatt az irányító szekvenciák elveszítik mikrokompartment-specifitásukat. Ezt kiküszöbölendő az expressziós szintet a detektálási érzékenység határáig csökkentettük, de ebben az esetben sem mutatkozott különbség. Megvizsgáltuk továbbá, hogy különböző sejtípusokban (HEK 293T, HeLa, COS-7) van-e kimutatható eltérés a két szenzor között, de egyikben sem jelentkezett ilyen hatás. Ezek alapján azt a konklúziót vontuk le, hogy ha alaphelyzetben vannak is $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -ban gazdag PM-területek, a laterális diffúzió és a mikrodomének közötti gyors lipidkicserélődés eredményeként nem tudunk különbséget kimutatni a mikrodomén-specifikus PPIIn-detektálás során, függetlenül attól, hogy hova targetáljuk a lipid bontásáért felelős enzimet, illetve hogy pontosan hol monitorozzuk a $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -ot.

A BRET technika legnagyobb előnye a nagymértékű érzékenysége, melynek révén olyan kis változások is felismerhetőek, melyek felett képalkotó eljárásokkal könnyen át lehet siklani. Ezt kihasználva sikerült élő sejtekben kimutatni egy kicsi, de minden esetben fellépő PM $\text{PtdIns}4P$ -emelkedést EGF- és alacsony koncentrációjú Cch-ingerlést követően. A nagy koncentrációjú hormonnal stimulált GPCR- és következményes robosztus PLC-aktiváció kapcsán korábban $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ - és $\text{PtdIns}4P$ -csökkenést mutattak ki [95], melyek alapján az volt az általános álláspont,

hogy a PtdIns4*P* - mint prekursor - passzívan követi a PtdIns(4,5)*P*₂ szintjében beállt változásokat. A BRET-szenzorunkkal kimért, GPCR- és RTK-aktiváció kapcsán is fellépő PtdIns4*P*-szintemelkedés ugyanakkor arra utal, hogy a PtdIns4*P* szintézise valamilyen módon aktívan regulálva van a PM-ban. Számos régi tanulmányban leírták már, hogy az EGFR ingerlése PPIIn-kinázok aktivációjához vezet [274, 275], mely enzimek egy részéről később kiderült, hogy főként PI3K aktivitással rendelkeznek, míg mások a II-es típusú PI4K-ok családjába sorolhatóak [276]. Specifikus PI4K-gátlószereket felhasználva mi a kísérleteink során azt találtuk, hogy mind az EGFR, mind az M₃R ingerlése során a III-as típusú PI4K-ok családjába tartozó PI4KA aktivációja tehető felelőssé a PM PtdIns4*P*-szintjének emelkedéséért. Ezt az agonista-indukált lipidszintemelő hatást abban az esetben is sikerült kimutatni, ha Sac1 enzim segítségével a PtdIns4*P*-szintet drasztikusan csökkentettük a PM-ban.

Az a tény, hogy mind GPCR-, mind RTK-aktiváció során létrejön a PtdIns4*P*-szint emelkedése, arra engedett következtetni, hogy a két receptor jelátvitelének közös szereplője, a PLC-PKC jelpálya lehet felelős a PI4KA aktiválásáért. Ezen feltételezésünket megerősítette, hogy két különböző pan-PKC inhibitorral történő előkezelés is a korábban látott agonista-indukált PtdIns4*P*-emelkedés eltűnéséhez vezetett, míg a PKC direkt aktiválása révén a PtdIns4*P*-szint nőtt. Fontos megemlíteni, hogy a PKC-gátlószerekkel végzett előkezelések, a specifikus PI4KA-gátlószernél látottakkal szemben nem eredményeztek bazális PtdIns4*P*-szintcsökkenést. Ugyancsak nem gátolta a BIM előkezelés a Cch-lal kiváltott PLC-aktiváció atropin általi terminálását követő lipidreszintézist. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PKC-gátlás nem befolyásolja a PI4KA bazális aktivációját, de a PKC jelentős szerepet tölt be az agonista-indukált fokozott PtdIns4*P*-szintézisben, mely a PM PPIIn-ek szintjének fenntartása szempontjából lehet fontos.

A szakirodalomban fellelhető néhány közlemény, melyben a szerzők a PKC szerepét valószínűsítik egyes PI4K-ok aktivációjában. Egy közelmúltban megjelent tanulmányban vékonyréteg-kromatográfiával azt találták, hogy hosszantartó (2-24 óra) hormonális ingerlés hatására a Gq-aktiváció nemcsak a PtdIns(4,5)*P*₂ hidrolízisét, hanem azzal párhuzamosan a lipid reszintézisét is fokozza, mely folyamatban szerepe lehet a PKC és PI4KB enzimeknek [277]. Bár vannak arra vonatkozó elképzelések, hogy a PI4KB által a Golgiban szintetizált PtdIns4*P* részt vehet a PM PtdIns(4,5)*P*₂-

képzésében [96, 278], munkacsoportunk jelenlegi és korábbi kísérletei [39, 191] sem támasztják alá a PI4KB szerepét a PM PtdIns4*P*- és PtdIns(4,5)*P*₂-szintjeinek fenntartásában. Egy másik közleményben a miénkhez nagyon hasonló konklúziót vontak le. A szerzők az OSBP-PH és FAPP1-PH doméneket mint PtdIns4*P*-szenzorokat felhasználva azt találták β -sejtekben, hogy a GPCR-aktiváció emeli a PM PtdIns4*P*-szintjét, mely folyamatban kulcsszerepet töltenek be a PKC és PI4KA enzimek [259]. Meg kell ugyanakkor említeni, hogy az általuk leírtak nem mindenben egyeznek meg a mi méréseink eredményeivel és az azokból levont következtetésekkel, hiszen például ők RTK-aktivációt követően nem tudták kimutatni ugyanezen jelenséget (inzulinnal stimulálva az RTK-t). Ráadásul az általuk használt 100 μ M Cch-lal ingerelve az M₃R-t mi nem PtdIns4*P*-növekedést, hanem éppen ellenkezőleg, a lipid szintjének csökkenését találtuk, és csak alacsony - feltehetően a fiziológiához közelebbi koncentrációjú - 100 nM Cch-stimulus esetén tudtunk jelemelkedést detektálni. Ezen eltérések egyik lehetséges magyarázata, hogy az általuk PtdIns4*P*-szenzornak használt PBD-ek főként a Golgiban helyezkednek el, mivel a lipid kötéséhez és így a membránlokalizációhoz szükségük van a Golgiban található Arf1 jelenlétére is [140]. Ebből kifolyólag csak egy elenyésző hányaduk mutat PM-elhelyezkedést [49]. Éppen ezért, bár TIRF mikroszkóppal ezen kis frakciót ki lehet mutatni, de az OSBP-PH és FAPP1-PH domének PM PtdIns4*P*-szenzorként való felhasználhatósága igencsak megkérdőjelezhető. Elképzelhető, hogy a maximális agonistakonzentrációval történő receptoringerlést követően a Golgiban bekövetkező lipidszintváltozások kihatnak a bioszenzoraik elhelyezkedésére, és a PBD-ek PM-on való megjelenése nem a PM PtdIns4*P*-növekedésnek tudható be, hanem a lipidszint csökkenésének a Golgiban. Ezt a problémakört át lehet hidalni, ha olyan PBD-eket választunk, melyek kiváló szubsztrátspecificitással és affinitással rendelkeznek, mint például a PtdIns4*P*-ra szelektív SidM-P4M [10]. Ilyen szenzorokat felhasználva akár már olyan kismértékű lipidszintváltozásokat is ki tudunk mutatni a PM-on, mint amilyeneket 100 ng/ml EGF-, vagy 100 nM Cch-ingerlés tud kiváltani.

Szerettük volna megvizsgálni a PM PtdIns4*P*-készletének jelentőségét a PtdIns(4,5)*P*₂-szint fenntartásában és a PLC-aktivációra létrejövő Ins(1,4,5)*P*₃-produkciónban. Korábban kimutatták, hogy még jelentősen csökkent PM PtdIns4*P*-szintek mellett is képesek lehetnek a sejtek a PtdIns(4,5)*P*₂ utánpótlásukat biztosítani [42]. Mi a

kísérleteink során azt kaptuk, hogy a PI4KA farmakológiai gátlása vagy a PM PtdIns(4,5) P_2 -szintjének mesterséges, 5ptase általi csökkentése egyenlő mértékben csökkentette az M₃R agonista-indukált Ins(1,4,5) P_3 -termelődést, ugyanakkor a Sac1 általi mesterséges PtdIns4*P*-depléció csak mérsékelten gátolta azt. Ezen adatok arra utalnak, hogy GPCR-aktivációt követően a PM PtdIns4*P*-szintézise kritikus fontosságú a PM PtdIns(4,5) P_2 -szintjének fenntartásában, mely ugyanakkor még csökkent PtdIns4*P*-szint mellett is meg tud valósulni. Az EGFR ingerlése által kiváltott Ins(1,4,5) P_3 -jel ugyanakkor lényegesen érzékenyebb volt a Sac1 általi lipiddeplécióra. Ez arra utalhat, hogy az eltérő családba tartozó receptorok PPIIn-igénye, -érzékenysége eltérő lehet, vagy esetleg a PM funkcionálisan elkülönülő PPIIn-készleteit igénylik, bár ennek pontos feltérképezése további vizsgálatokat igényel.

Végezetül egy másik ismert PPIIn-ek által regulált folyamatot, a receptorok internalizációját, elsősorban annak PtdIns4*P*- és PtdIns(4,5) P_2 -érzékenységét vizsgáltuk. Korábbi kutatásaink során azt találtuk, hogy a β_2 AR endocitózisa PtdIns(4,5) P_2 -függő, a lipid hiányában a receptor nem távolodik el a PM-ről, de ingerlést követően klaszterekbe rendeződik a PM-ban [111]. A dolgozatomban bemutatott kísérletekkel annak kívántunk utánajárni, hogy ha M₃R ingerléssel és következményes PLC-aktivációval váltunk ki PtdIns(4,5) P_2 -depléciót, akkor az hasonló gátló hatást vált-e ki, mint amit korábban a heterodimerizációs mesterséges rendszerrel tapasztaltunk, illetve hogy a PI4KA-aktiváció mennyiben játszik szerepet az internalizáció fenntartásában. Hasonló vizsgálatot végzett korábban egy másik munkacsoport is, melyben a lipiddepléciót [³H]-inozitol izotópos mérésekkel, az internalizációt pedig radioaktív ligandkötéssel és sejtfractionálással mutatták ki [279]. Az idézett cikkben arról számolnak be, hogy a Wm-nal kiváltott PI4K-gátlás kis mértékben csökkenti a β_2 AR internalizációját, viszont ha 1 mM Oxo-M M₃R agonistával kezelik a sejteket, akkor az lényegesen nagyobb gátló hatást fejt ki az endocitózisra. Mi kísérleteinkben egy specifikus PI4KA-inhibitort alkalmazva azt találtuk, hogy önmagában az enzim gátlása nem befolyásolja még kis mértékben sem a β_2 AR internalizációját, viszont ha PtdIns(4,5) P_2 -depléciót is kiváltunk egyidejűleg, akkor a két hatás eredőjeként egy jelentős gátlást tapasztalunk. Az eredmények közötti eltérés hátterében feltehetően az állhat, hogy a Wm nem specifikusan csak a PM PtdIns4*P*-képzéséért felelős PI4KA enzimet, hanem számos másikat is gátol (pl. PI4KB,

PI3K-ok stb.) [6], melyek szerepe szintén felvetődik az endocitózis nagyon komplex folyamatában [110]. Fontos megemlíteni, hogy az általunk tapasztalt gátló hatás nem írható kizárólag a PM össz-PtdIns(4,5) P_2 -fogyásának számlájára, hiszen az A1 háttér nem növelte szignifikánsan a lipiddepléciót, mégis jelentősen csökkentette az internalizáció mértékét. Ez arra utalhat, hogy ha térben jelentősen nem is különülnek el, de a PM-on belül funkcionálisan elkülönülő PPIIn-készletek vannak jelen. Emellett a kapott eredmények, akárcsak az Ins(1,4,5) P_3 -jel fenntartásában, úgy az internalizáció folyamatában is egyértelműen jelzik a receptoringerlésre bekövetkező PI4KA-aktiváció jelentőségét.

Összességében doktoranduszi kutatómunkám során egy olyan BRET-alapú molekuláris eszköztárat sikerült létrehozni, melynek segítségével nagy érzékenységgel, megbízhatóan és viszonylag egyszerű módon tudjuk monitorozni a PPIIn-ek szintjének dinamikus változását a PM-ban, és az Ins(1,4,5) P_3 -koncentráció növekedését és csökkenését a citoplazmában. Ezen szenzorok felhasználásával nyomon követtük az RTK-családba sorolható EGFR és a GPCR M_3R aktivációra létrejövő lipidszintváltozásokat, kimutattuk, hogy receptoringerlést követően nő a PI4KA aktivitása, mely a PM PtdIns4 P -szintjének növekedéséhez vezethet. Utóbbi folyamat háttérében egy ezidáig nem ismert mechanizmust tártunk fel, miszerint a PLC-aktiváció PKC révén vezet a PI4KA fokozott működéséhez. Végezetül kimutattuk, hogy a PI4KA aktiválódásának jelentős szerepe van az Ins(1,4,5) P_3 -jel fenntartásában, és a receptorok internalizációjának létrejöttében.

7. Következtetések

Munkám során a PPIIn-ek metabolizmusának nyomon követésére alkalmas szenzorokat fejlesztettem, illetve segítségükkel vizsgáltam az EGFR- és M₃R-aktiváció során létrejövő PPIIn-szintváltozásokat, a receptoringerlést követő PPIIn-reszintézis molekuláris hátterét, a PM PPIIn-ek szerepét az Ins(1,4,5)P₃-jel fenntartásában valamint a β₂AR internalizációjában. Eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- Létrehoztunk egy olyan szenzort, mellyel mind az Ins(1,4,5)P₃-jel növekedését, mind a csökkenését detektálni tudjuk élő sejtekben. Kimutattuk, hogy az 1-es típusú InsP₃R LBD-jában elhelyezkedő, az Ins(1,4,5)P₃-kötésben részt vevő argininek lizinre történő cserélése a ligandaffinitás csökkenésével jár.
- Kialakítottunk egy olyan rendszert, amellyel élő sejtekben, nagy érzékenységgel és időbeli felbontással képesek vagyunk nyomon követni a PM PtdIns4P-, PtdIns(4,5)P₂- és PtdIns(3,4,5)P₃-szintjének változását. Megállapítottuk, hogy a SidM-2xP4M domén alkalmasabb a PM PtdIns4P-szintjének vizsgálatára, mint a széles körben használt OSH2-2xPH. Kísérleteink során nem találtunk különbséget a PM rendezett és rendezetlen struktúráinak inozitollipid-összetételében.
- EGFR- és M₃R-stimulációkor egyaránt azt találtuk, hogy a PM PtdIns4P-szintje nő, mely folyamatban központi szerepe van a PI4KA és PKC enzimeknek.
- Megállapítottuk, hogy az Ins(1,4,5)P₃-jel és a receptorendocitózis fenntartásához szükség van arra, hogy a PtdIns(4,5)P₂ fogyásával párhuzamosan aktiválódjon a PI4KA enzim, ugyanakkor a folyamatok a mesterséges PtdIns4P-szintcsökkenésre alig érzékenyek. Ez a jelenség arra utalhat, hogy a PM-ban funkcionálisan elkülönülő PPIIn-készletek vannak jelen.

8. Összefoglalás

Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján ma már a foszfoinozitideket (PPI_n) nem csak strukturális membránalkotó lipideknek tekintjük, hanem egyre több sejtélettani folyamatban ismerjük meg szerepüket, kezdve a jelátviteli útvonalak szabályozásától az ioncsatornák működésén át a sejtmozgásokig. Hormonális ingerlésre dinamikusán változik szintjük a különböző sejkompartmentekben, mely befolyásolhatja mindezen folyamatokat. Szintjük mérése éppen ezért hozzásegíthet minket ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk funkcióikról.

Célunk az volt, hogy egy olyan módszert dolgozzunk ki, melyekkel képesek vagyunk élő sejtekben nagy érzékenységgel, szubcelluláris felbontással nyomon követni a PPI_n-ek szintjének dinamikus változását. Ennek eléréséhez biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) méréseket végeztünk luciferázzal jelölt PPI_n-kötő fehérjedoménnyel és plazmamembránba irányított Venus fluoreszcens fehérjével, illetve a citoplazmatikus Ins(1,4,5)*P*₃ meghatározásához egy, az 1-es típusú Ins(1,4,5)*P*₃ receptor ligandkötő doménjén alapuló intramolekuláris BRET-szondát is létrehoztunk.

Dolgozatomban bemutattam, hogy az általunk fejlesztett nagy érzékenységgű szenzorok révén akár már kis PPI_n-változásokat is tudunk detektálni. Kísérleteink során élő, HEK 293T sejtekben követtük nyomon a PtdIns4*P*-, PtdIns(4,5)*P*₂-, PtdIns(3,4,5)*P*₃- és Ins(1,4,5)*P*₃-változásokat. A lipidszintek változását vagy egy mesterséges rendszerrel értük el, vagy a PI3K- és PLC-mediált jelátviteli utak aktiválásával. A szenzorok segítségével bebizonyítottuk, hogy a mérsékelt PLC-aktiváció PtdIns4*P*-szintemelkedéshez vezet mind EGF, mind M₃ receptor ingerlésekor. Kimutattuk, hogy ezen jelátvitel-aktivált PtdIns4*P*-növekedés hátterében a PI4KA és a PKC enzimek állnak. Ez az eddig ismeretlen jelenség egy új visszacsatolási mechanizmust jelent a PPI_n-ek metabolizmusának szabályozásában a szignáltranszdukció során. Emellett azt találtuk, hogy PLC révén csökkent PtdIns(4,5)*P*₂-szint esetén, az Ins(1,4,5)*P*₃-jel fenntartásában és a receptorok endocitózisának létrejöttében elengedhetetlen a PI4KA aktiválódása. Bár méréseinkkel nem sikerült megkülönböztetni strukturálisan elkülönülő lipidkészleteket, eredményeink funkcionálisan eltérő PPI_n-készletek jelenlétét valószínűsítik a plazmamembránon belül.

9. Summary

In recent years it became clear that phosphoinositides (PPIIn) are not only structural lipids in membranes, but they also have important roles in several cellular functions ranging from mediating signaling cascades in the cell by binding to effector proteins, through regulation of ion channels to cell movements. Their levels in the plasma membrane, endomembranes and in the cytoplasm can dynamically change upon hormonal stimulation which can influence these cellular processes thus measuring the level of PPIIns can help us to better understand their distinct functions.

Our aim was to develop a method which enables us to follow the dynamic change of these lipids in live cells with both high sensitivity and subcellular resolution in a single, convenient assay. For this we performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) measurements between various luciferase-labeled PPIIn-binding domains and a plasma membrane-targeted Venus, and for measuring cytoplasmic Ins(1,4,5) P_3 levels we also created an intramolecular BRET sensor based on the ligand binding domain of the type-1 Ins(1,4,5) P_3 receptor.

In the thesis I introduced that the improved lipid sensors are highly sensitive, easy to quantify and therefore can be used to monitor small changes of the PPIIn metabolism of the cells even in high-throughput BRET applications. We could demonstrate sensitive measurements of PtdIns4 P , PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns(3,4,5) P_3 and Ins(1,4,5) P_3 dynamics in live HEK 293T cells. Measurements were made during either experimental activation of lipid degradation or PI3K- and PLC-mediated signal transduction. Our results reveal a previously unappreciated synthesis of PtdIns4 P that accompanies moderate activation of PLC signaling downstream of both EGF and M₃ receptor activation. This signaling-induced PtdIns4 P synthesis relies on PI4KA and PKC, and implicates a novel feedback mechanism in the control of inositol lipid metabolism during signal transduction. We also found that the activation of PI4KA was necessary for maintaining Ins(1,4,5) P_3 signaling and receptor endocytosis when PLC-induced PtdIns(4,5) P_2 depletion was present. Even though we failed to discriminate structural lipid pools in the plasma membrane, our data suggest the existence of functionally distinct PPIIn pools in that compartment.

10. Irodalomjegyzék

1. Hokin MR, Hokin LE. (1953) Enzyme secretion and the incorporation of P³² into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem*, 203: 967-77.
2. Di Paolo G, De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443: 651-7.
3. Balla T. (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev*, 93: 1019-137.
4. McCartney AJ, Zhang Y, Weisman LS. (2014) Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance. *Bioessays*, 36: 52-64.
5. 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.
6. Idevall-Hagren O, De Camilli P. (2015) Detection and manipulation of phosphoinositides. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 736-45.
7. Lemmon MA. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 99-111.
8. 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.
9. 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.
10. Hammond GR, Balla T. (2015) Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 746-58.
11. Balla T, Baukal AJ, Guillemette G, Catt KJ. (1988) Multiple pathways of inositol polyphosphate metabolism in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem*, 263: 4083-91.

12. Falkenburger BH, Jensen JB, Hille B. (2010) Kinetics of PIP2 metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *J Gen Physiol*, 135: 99-114.
13. Haucke V. (2005) Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans*, 33: 1285-9.
14. Posor Y, Eichhorn-Gruenig M, Puchkov D, Schoneberg J, Ullrich A, Lampe A, Muller R, Zerbakhsh S, Gulluni F, Hirsch E, Krauss M, Schultz C, Schmoranzler J, Noe F, Haucke V. (2013) Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature*, 499: 233-7.
15. Majumder AL, Chatterjee A, Ghosh Dastidar K, Majee M. (2003) Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase. *FEBS Lett*, 553: 3-10.
16. Schneider S. (2015) Inositol transport proteins. *FEBS Lett*, 589: 1049-58.
17. Burg MB, Ferraris JD. (2008) Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem*, 283: 7309-13.
18. 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.
19. Cockcroft S, Garner K. (2011) Function of the phosphatidylinositol transfer protein gene family: is phosphatidylinositol transfer the mechanism of action? *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46: 89-117.
20. Routt SM, Bankaitis VA. (2004) Biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochem Cell Biol*, 82: 254-62.
21. Kim YJ, Guzman-Hernandez ML, Wisniewski E, Balla T. (2015) Phosphatidylinositol-Phosphatidic Acid Exchange by Nir2 at ER-PM Contact Sites Maintains Phosphoinositide Signaling Competence. *Dev Cell*, 33: 549-61.
22. Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*, 260: 88-91.
23. Stack JH, DeWald DB, Takegawa K, Emr SD. (1995) Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34

- PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol*, 129: 321-34.
24. Jones AT, Clague MJ. (1995) Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for early endosome fusion. *Biochem J*, 311 (Pt 1): 31-4.
 25. Patki V, Virbasius J, Lane WS, Toh BH, Shpetner HS, Corvera S. (1997) Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 7326-30.
 26. Clague MJ, Urbe S, de Lartigue J. (2009) Phosphoinositides and the endocytic pathway. *Exp Cell Res*, 315: 1627-31.
 27. 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.
 28. Sarkes D, Rameh LE. (2010) A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochem J*, 428: 375-84.
 29. Schink KO, Raiborg C, Stenmark H. (2013) Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *Bioessays*, 35: 900-12.
 30. Backer JM. (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J*, 410: 1-17.
 31. Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol*, 20: 355-62.
 32. Franco I, Gulluni F, Campa CC, Costa C, Margaria JP, Ciraolo E, Martini M, Monteyne D, De Luca E, Germena G, Posor Y, Maffucci T, Marengo S, Haucke V, Falasca M, Perez-Morga D, Boletta A, Merlo GR, Hirsch E. (2014) PI3K class II alpha controls spatially restricted endosomal PtdIns3P and Rab11 activation to promote primary cilium function. *Dev Cell*, 28: 647-58.
 33. Cao C, Laporte J, Backer JM, Wandinger-Ness A, Stein MP. (2007) Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes. *Traffic*, 8: 1052-67.

34. Cao C, Backer JM, Laporte J, Bedrick EJ, Wandinger-Ness A. (2008) Sequential actions of myotubularin lipid phosphatases regulate endosomal PI(3)P and growth factor receptor trafficking. *Mol Biol Cell*, 19: 3334-46.
35. Amoasii L, Hnia K, Laporte J. (2012) Myotubularin phosphoinositide phosphatases in human diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 362: 209-33.
36. Audhya A, Emr SD. (2002) Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell*, 2: 593-605.
37. 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.
38. Hammond GR, Machner MP, Balla T. (2014) A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol*, 205: 113-26.
39. 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.
40. Hama H, Schnieders EA, Thorner J, Takemoto JY, DeWald DB. (1999) Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274: 34294-300.
41. De Matteis MA, D'Angelo G. (2007) The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochem Soc Symp*, 107-16.
42. Hammond GR, Fischer MJ, Anderson KE, Holdich J, Koteci A, Balla T, Irvine RF. (2012) PI4P and PI(4,5)P2 are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science*, 337: 727-30.
43. De Matteis MA, Wilson C, D'Angelo G. (2013) Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond. *Bioessays*, 35: 612-22.
44. Altan-Bonnet N, Balla T. (2012) Phosphatidylinositol 4-kinases: hostages harnessed to build panviral replication platforms. *Trends Biochem Sci*, 37: 293-302.
45. Balla A, Balla T. (2006) Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol*, 16: 351-61.

46. Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Di Tullio G, Iurisci C, Luini A, Corda D, De Matteis MA. (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat Cell Biol*, 1: 280-7.
47. Weixel KM, Blumental-Perry A, Watkins SC, Aridor M, Weisz OA. (2005) Distinct Golgi populations of phosphatidylinositol 4-phosphate regulated by phosphatidylinositol 4-kinases. *J Biol Chem*, 280: 10501-8.
48. Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell*, 114: 299-310.
49. Balla A, Tuymetova G, Tsiomenko A, Varnai P, Balla T. (2005) A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1. *Mol Biol Cell*, 16: 1282-95.
50. Chung J, Nakatsu F, Baskin JM, De Camilli P. (2015) Plasticity of PI4KIIIalpha interactions at the plasma membrane. *EMBO Rep*, 16: 312-20.
51. Bojjireddy N, Guzman-Hernandez ML, Reinhard NR, Jovic M, Balla T. (2015) EFR3s are palmitoylated plasma membrane proteins that control responsiveness to G-protein-coupled receptors. *J Cell Sci*, 128: 118-28.
52. Blumental-Perry A, Haney CJ, Weixel KM, Watkins SC, Weisz OA, Aridor M. (2006) Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Dev Cell*, 11: 671-82.
53. Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czaplá H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F, De Camilli P. (2015) INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*, 349: 428-32.
54. Sbrissa D, Ikonomov OC, Filios C, Delvecchio K, Shisheva A. (2012) Functional dissociation between PIKfyve-synthesized PtdIns5P and PtdIns(3,5)P2 by means of the PIKfyve inhibitor YM201636. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303: C436-46.
55. Zolov SN, Bridges D, Zhang Y, Lee WW, Riehle E, Verma R, Lenk GM, Converso-Baran K, Weide T, Albin RL, Saltiel AR, Meisler MH, Russell MW, Weisman LS. (2012) In vivo, Pikfyve generates PI(3,5)P2, which serves as both a

signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 17472-7.

56. Roberts HF, Clarke JH, Letcher AJ, Irvine RF, Hinchliffe KA. (2005) Effects of lipid kinase expression and cellular stimuli on phosphatidylinositol 5-phosphate levels in mammalian cell lines. *FEBS Lett*, 579: 2868-72.

57. Jones DR, Bultsma Y, Keune WJ, Halstead JR, Elouarrat D, Mohammed S, Heck AJ, D'Santos CS, Divecha N. (2006) Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an in vivo role for PIP4Kbeta. *Mol Cell*, 23: 685-95.

58. Pendaries C, Tronchere H, Arbibe L, Mounier J, Gozani O, Cantley L, Fry MJ, Gaits-Iacovoni F, Sansonetti PJ, Payrastra B. (2006) PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *EMBO J*, 25: 1024-34.

59. Gupta A, Toscano S, Trivedi D, Jones DR, Mathre S, Clarke JH, Divecha N, Raghu P. (2013) Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4K) regulates TOR signaling and cell growth during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 5963-8.

60. Nunes JA, Guittard G. (2013) An Emerging Role for PI5P in T Cell Biology. *Front Immunol*, 4: 80.

61. Niebuhr K, Giuriato S, Pedron T, Philpott DJ, Gaits F, Sable J, Sheetz MP, Parsot C, Sansonetti PJ, Payrastra B. (2002) Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J*, 21: 5069-78.

62. Mason D, Mallo GV, Terebiznik MR, Payrastra B, Finlay BB, Brumell JH, Rameh L, Grinstein S. (2007) Alteration of epithelial structure and function associated with PtdIns(4,5)P2 degradation by a bacterial phosphatase. *J Gen Physiol*, 129: 267-83.

63. Jude JG, Spencer GJ, Huang X, Somerville TD, Jones DR, Divecha N, Somerville TC. (2015) A targeted knockdown screen of genes coding for phosphoinositide modulators identifies PIP4K2A as required for acute myeloid leukemia cell proliferation and survival. *Oncogene*, 34: 1253-62.

64. Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, Wang XW, Yokota J, Riabowol K, Harris CC. (2001) DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9671-6.

65. Fedele CG, Ooms LM, Ho M, Vieusseux J, O'Toole SA, Millar EK, Lopez-Knowles E, Sriratana A, Gurung R, Baglietto L, Giles GG, Bailey CG, Rasko JE, Shields BJ, Price JT, Majerus PW, Sutherland RL, Tiganis T, McLean CA, Mitchell CA. (2010) Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 22231-6.
66. Bae YH, Ding Z, Das T, Wells A, Gertler F, Roy P. (2010) Profilin1 regulates PI(3,4)P2 and lamellipodin accumulation at the leading edge thus influencing motility of MDA-MB-231 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 21547-52.
67. Watt SA, Kimber WA, Fleming IN, Leslie NR, Downes CP, Lucocq JM. (2004) Detection of novel intracellular agonist responsive pools of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate using the TAPP1 pleckstrin homology domain in immunoelectron microscopy. *Biochem J*, 377: 653-63.
68. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP. (2003) Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J*, 22: 5501-10.
69. Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, Sasaki T. (2010) The PtdIns(3,4)P(2) phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature*, 465: 497-501.
70. Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, Bowtell D, Barretina J, Lin WM, Rameh L, Salmena L, Pandolfi PP, Cantley LC. (2009) Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*, 16: 115-25.
71. Aich J, Mabalirajan U, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. (2012) Loss-of-function of inositol polyphosphate-4-phosphatase reversibly increases the severity of allergic airway inflammation. *Nat Commun*, 3: 877.
72. Ferron M, Boudiffa M, Arsenault M, Rached M, Pata M, Giroux S, Elfassihi L, Kisseleva M, Majerus PW, Rousseau F, Vacher J. (2011) Inositol polyphosphate 4-phosphatase B as a regulator of bone mass in mice and humans. *Cell Metab*, 14: 466-77.

73. Li H, Marshall AJ. (2015) Phosphatidylinositol (3,4) biphosphate-specific phosphatases and effector proteins: A distinct branch of PI3K signaling. *Cell Signal*, 27: 1789-98.
74. 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.
75. Shen J, Liu X, Yu WM, Liu J, Nibbelink MG, Guo C, Finkel T, Qu CK. (2011) A critical role of mitochondrial phosphatase Ptpmt1 in embryogenesis reveals a mitochondrial metabolic stress-induced differentiation checkpoint in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 31: 4902-16.
76. Takasuga S, Sasaki T. (2013) Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: metabolism and physiological functions. *J Biochem*, 154: 211-8.
77. Sbrissa D, Ikononov OC, Fenner H, Shisheva A. (2008) ArPIKfyve homomeric and heteromeric interactions scaffold PIKfyve and Sac3 in a complex to promote PIKfyve activity and functionality. *J Mol Biol*, 384: 766-79.
78. Jin N, Chow CY, Liu L, Zolov SN, Bronson R, Davisson M, Petersen JL, Zhang Y, Park S, Duex JE, Goldowitz D, Meisler MH, Weisman LS. (2008) VAC14 nucleates a protein complex essential for the acute interconversion of PI3P and PI(3,5)P(2) in yeast and mouse. *EMBO J*, 27: 3221-34.
79. Yamamoto A, DeWald DB, Boronenkov IV, Anderson RA, Emr SD, Koshland D. (1995) Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell*, 6: 525-39.
80. Shen J, Yu WM, Brotto M, Scherman JA, Guo C, Stoddard C, Nosek TM, Valdivia HH, Qu CK. (2009) Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis. *Nat Cell Biol*, 11: 769-76.
81. Wang X, Zhang X, Dong XP, Samie M, Li X, Cheng X, Goschka A, Shen D, Zhou Y, Harlow J, Zhu MX, Clapham DE, Ren D, Xu H. (2012) TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell*, 151: 372-83.

82. Bolis A, Zordan P, Coviello S, Bolino A. (2007) Myotubularin-related (MTMR) phospholipid phosphatase proteins in the peripheral nervous system. *Mol Neurobiol*, 35: 308-16.
83. Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM, Everett L, Lenk GM, McKenna-Yasek DM, Weisman LS, Figlewicz D, Brown RH, Meisler MH. (2009) Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet*, 84: 85-8.
84. Campeau PM, Lenk GM, Lu JT, Bae Y, Burrage L, Turnpenny P, Roman Corona-Rivera J, Morandi L, Mora M, Reutter H, Vulto-van Silfhout AT, Faivre L, Haan E, Gibbs RA, Meisler MH, Lee BH. (2013) Yunis-Varon syndrome is caused by mutations in FIG4, encoding a phosphoinositide phosphatase. *Am J Hum Genet*, 92: 781-91.
85. Li S, Tiab L, Jiao X, Munier FL, Zografos L, Frueh BE, Sergeev Y, Smith J, Rubin B, Meallet MA, Forster RK, Hejtmancik JF, Schorderet DF. (2005) Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchetee fleck corneal dystrophy. *Am J Hum Genet*, 77: 54-63.
86. Stauffer TP, Ahn S, Meyer T. (1998) Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr Biol*, 8: 343-6.
87. Varnai P, Balla T. (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[³H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol*, 143: 501-10.
88. 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.
89. Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM. (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J*, 363: 657-66.
90. Lingwood D, Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327: 46-50.

91. Maleth J, Choi S, Muallem S, Ahuja M. (2014) Translocation between PI(4,5)P₂-poor and PI(4,5)P₂-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nat Commun*, 5: 5843.
92. Choi S, Thapa N, Tan X, Hedman AC, Anderson RA. (2015) PIP kinases define PI_{4,5}P₂ signaling specificity by association with effectors. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 711-23.
93. Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. (2003) Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI_{4,5}P₂ in its place. *J Membr Biol*, 194: 77-89.
94. van den Bout I, Divecha N. (2009) PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci*, 122: 3837-50.
95. 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.
96. Dickson EJ, Jensen JB, Hille B. (2014) Golgi and plasma membrane pools of PI(4)P contribute to plasma membrane PI(4,5)P₂ and maintenance of KCNQ2/3 ion channel current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E2281-90.
97. Ling Y, Stefan CJ, Macgurn JA, Audhya A, Emr SD. (2012) The dual PH domain protein Opy1 functions as a sensor and modulator of PtdIns(4,5)P₂ synthesis. *EMBO J*, 31: 2882-94.
98. Berridge MJ, Irvine RF. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312: 315-21.
99. Connolly TM, Bross TE, Majerus PW. (1985) Isolation of a phosphomonoesterase from human platelets that specifically hydrolyzes the 5-phosphate of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 260: 7868-74.
100. Hsu F, Mao Y. (2015) The structure of phosphoinositide phosphatases: Insights into substrate specificity and catalysis. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 698-710.
101. 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.
102. Niggli V, Adunyah ES, Carafoli E. (1981) Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺ - ATPase. *J Biol Chem*, 256: 8588-92.

103. Rohacs T. (2014) Phosphoinositide regulation of TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*, 223: 1143-76.
104. 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.
105. Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. (2011) Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*, 477: 495-8.
106. Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. (1999) Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol*, 1: 183-8.
107. Tsujita K, Itoh T. (2015) Phosphoinositides in the regulation of actin cortex and cell migration. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 824-31.
108. Levin R, Grinstein S, Schlam D. (2015) Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 805-23.
109. Martin TF. (2015) PI(4,5)P(2)-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 785-93.
110. Posor Y, Eichhorn-Grunig M, Haucke V. (2015) Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 794-804.
111. 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.
112. Narkis G, Ofir R, Landau D, Manor E, Volokita M, Hershkowitz R, Elbedour K, Birk OS. (2007) Lethal contractural syndrome type 3 (LCCS3) is caused by a mutation in PIP5K1C, which encodes PIPKI gamma of the phosphatidylinositol pathway. *Am J Hum Genet*, 81: 530-9.
113. Singhal RL, Prajda N, Yeh YA, Weber G. (1994) 1-Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (EC 2.7.1.68): a proliferation- and malignancy-linked signal transduction enzyme. *Cancer Res*, 54: 5574-8.
114. Pirruccello M, De Camilli P. (2012) Inositol 5-phosphatases: insights from the Lowe syndrome protein OCRL. *Trends Biochem Sci*, 37: 134-43.

115. Hoopes RR, Jr., Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, Hoppe B, Matyus J, Simckes A, Tasic V, Toenshoff B, Suchy SF, Nussbaum RL, Scheinman SJ. (2005) Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet*, 76: 260-7.
116. Toker A, Cantley LC. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 387: 673-6.
117. 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.
118. Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, Kato M, Ijuin T, Yamazaki D, Suetsugu S, Takenawa T. (2004) PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol*, 6: 420-6.
119. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 34: 115-27.
120. Zhang X, Loijens JC, Boronenkov IV, Parker GJ, Norris FA, Chen J, Thum O, Prestwich GD, Majerus PW, Anderson RA. (1997) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isozymes catalyze the synthesis of 3-phosphate-containing phosphatidylinositol signaling molecules. *J Biol Chem*, 272: 17756-61.
121. Blero D, Payrastre B, Schurmans S, Erneux C. (2007) Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions. *Pflugers Arch*, 455: 31-44.
122. Bayascas JR, Wullschleger S, Sakamoto K, Garcia-Martinez JM, Clacher C, Komander D, van Aalten DM, Boini KM, Lang F, Lipina C, Logie L, Sutherland C, Chudek JA, van Diepen JA, Voshol PJ, Lucocq JM, Alessi DR. (2008) Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Mol Cell Biol*, 28: 3258-72.
123. Salamon RS, Backer JM. (2013) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate: tool of choice for class I PI 3-kinases. *Bioessays*, 35: 602-11.
124. Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J. (1998) Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J*, 17: 414-22.
125. Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 268: 13-6.

126. Berridge, M.J.; Cell Signalling Biology Module 2; Portland Press Limited, London (2014) p62-64.
127. Sasaki T, Sasaki J, Sakai T, Takasuga S, Suzuki A. (2007) The physiology of phosphoinositides. *Biol Pharm Bull*, 30: 1599-604.
128. Eng C. (2003) PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat*, 22: 183-98.
129. Manna P, Jain SK. (2015) Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate and cellular signaling: implications for obesity and diabetes. *Cell Physiol Biochem*, 35: 1253-75.
130. Stahelin RV, Scott JL, Frick CT. (2014) Cellular and molecular interactions of phosphoinositides and peripheral proteins. *Chem Phys Lipids*, 182: 3-18.
131. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, 371: 168-70.
132. Kutateladze TG. (2010) Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol*, 6: 507-13.
133. Yu JW, Lemmon MA. (2001) All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem*, 276: 44179-84.
134. Yu JW, Mendrola JM, Audhya A, Singh S, Keleti D, DeWald DB, Murray D, Emr SD, Lemmon MA. (2004) Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell*, 13: 677-88.
135. Manna D, Albanese A, Park WS, Cho W. (2007) Mechanistic basis of differential cellular responses of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate- and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, 282: 32093-105.
136. Szentpetery Z, Balla A, Kim YJ, Lemmon MA, Balla T. (2009) Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC Cell Biol*, 10: 67.
137. Klein DE, Lee A, Frank DW, Marks MS, Lemmon MA. (1998) The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J Biol Chem*, 273: 27725-33.
138. Carlton JG, Cullen PJ. (2005) Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol*, 15: 540-7.

139. van Weering JR, Sessions RB, Traer CJ, Kloer DP, Bhatia VK, Stamou D, Carlsson SR, Hurley JH, Cullen PJ. (2012) Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *EMBO J*, 31: 4466-80.
140. Levine TP, Munro S. (2002) Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol*, 12: 695-704.
141. Heo WD, Inoue T, Park WS, Kim ML, Park BO, Wandless TJ, Meyer T. (2006) PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, 314: 1458-61.
142. Yeung T, Terebiznik M, Yu L, Silvius J, Abidi WM, Philips M, Levine T, Kapus A, Grinstein S. (2006) Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science*, 313: 347-51.
143. Whorton MR, MacKinnon R. (2011) Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP2, and sodium. *Cell*, 147: 199-208.
144. Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G, Antonny B. (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell*, 155: 830-43.
145. Hokin LE, Hokin MR. (1958) Phosphoinositides and protein secretion in pancreas slices. *J Biol Chem*, 233: 805-10.
146. Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, Michell RH. (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature*, 390: 187-92.
147. Hsu FF, Turk J. (2000) Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: a mechanistic study. *J Am Soc Mass Spectrom*, 11: 986-99.
148. Kielkowska A, Niewczas I, Anderson KE, Durrant TN, Clark J, Stephens LR, Hawkins PT. (2014) A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry. *Adv Biol Regul*, 54: 131-41.
149. Wakelam MJ. (2014) The uses and limitations of the analysis of cellular phosphoinositides by lipidomic and imaging methodologies. *Biochim Biophys Acta*, 1841: 1102-7.

150. Kraft ML, Klitzing HA. (2014) Imaging lipids with secondary ion mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 1841: 1108-19.
151. Toomre D, Bewersdorf J. (2010) A new wave of cellular imaging. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26: 285-314.
152. Khuong TM, Habets RL, Kuenen S, Witkowska A, Kasprowicz J, Swerts J, Jahn R, van den Bogaart G, Verstreken P. (2013) Synaptic PI(3,4,5)P3 is required for Syntaxin1A clustering and neurotransmitter release. *Neuron*, 77: 1097-108.
153. Fujita A, Cheng J, Tauchi-Sato K, Takenawa T, Fujimoto T. (2009) A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9256-61.
154. Lipsky NG, Pagano RE. (1983) Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 2608-12.
155. Wang K, Jiang D, Sims CE, Allbritton NL. (2012) Separation of fluorescently labeled phosphoinositides and sphingolipids by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 907: 79-86.
156. Chattopadhyay A, London E. (1987) Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry*, 26: 39-45.
157. Osborne SL, Thomas CL, Gschmeissner S, Schiavo G. (2001) Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci*, 114: 2501-11.
158. Rusten TE, Stenmark H. (2006) Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins. *Nat Methods*, 3: 251-8.
159. Venkateswarlu K, Oatey PB, Tavare JM, Cullen PJ. (1998) Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol*, 8: 463-6.
160. Burd CG, Emr SD. (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell*, 2: 157-62.
161. Dowler S, Kular G, Alessi DR. (2002) Protein lipid overlay assay. *Sci STKE*, 2002: pl6.

162. Kavran JM, Klein DE, Lee A, Falasca M, Isakoff SJ, Skolnik EY, Lemmon MA. (1998) Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, 273: 30497-508.
163. Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, Sigler PB, Schlessinger J. (1995) Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10472-6.
164. Varnai P, Balla T. (2006) Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochim Biophys Acta*, 1761: 957-67.
165. Varnai, P. Balla, T. Monitoring Membrane Lipids with Protein Domains Expressed in Living Cells; Optical Probes in Biology; In: Jin Zhang, Sohum Mehta, Carsten Schultz (szerk); CRC Press,(2015); p 89–136;
166. 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)P₃ suggest their interaction with protein binding partners. *J Cell Sci*, 118: 4879-88.
167. Balla T, Varnai P. (2002) Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. *Sci STKE*, 2002: p13.
168. Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 20: 448-55.
169. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2: 905-9.
170. Irino Y, Tokuda E, Hasegawa J, Itoh T, Takenawa T. (2012) Quantification and visualization of phosphoinositides by quantum dot-labeled specific binding-domain probes. *J Lipid Res*, 53: 810-9.
171. Yoon Y, Lee PJ, Kurilova S, Cho W. (2011) In situ quantitative imaging of cellular lipids using molecular sensors. *Nat Chem*, 3: 868-74.
172. Tengholm A, Teruel MN, Meyer T. (2003) Single cell imaging of PI3K activity and glucose transporter insertion into the plasma membrane by dual color evanescent wave microscopy. *Sci STKE*, 2003: PL4.

173. Edidin M. (2003) Fluorescence resonance energy transfer: techniques for measuring molecular conformation and molecular proximity. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 18: Unit 18 0.
174. Balla T. (2009) Green light to illuminate signal transduction events. *Trends Cell Biol*, 19: 575-86.
175. Wallrabe H, Periasamy A. (2005) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol*, 16: 19-27.
176. Hastings JW. (1996) Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 173: 5-11.
177. van der Wal J, Habets R, Varnai P, Balla T, Jalink K. (2001) Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 276: 15337-44.
178. Kuo MS, Auriiau J, Pierre-Eugene C, Issad T. (2014) Development of a human breast-cancer derived cell line stably expressing a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based phosphatidyl inositol-3 phosphate (PIP3) biosensor. *PLoS One*, 9: e92737.
179. Matsu-ura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, Mikoshiba K. (2006) Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J Cell Biol*, 173: 755-65.
180. Remus TP, Zima AV, Bossuyt J, Bare DJ, Martin JL, Blatter LA, Bers DM, Mignery GA. (2006) Biosensors to measure inositol 1,4,5-trisphosphate concentration in living cells with spatiotemporal resolution. *J Biol Chem*, 281: 608-16.
181. Sato M, Ueda Y, Shibuya M, Umezawa Y. (2005) Locating inositol 1,4,5-trisphosphate in the nucleus and neuronal dendrites with genetically encoded fluorescent indicators. *Anal Chem*, 77: 4751-8.
182. Tanimura A, Morita T, Nezu A, Shitara A, Hashimoto N, Tojyo Y. (2009) Use of Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Biosensors for the Quantitative Analysis of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Dynamics in Calcium Oscillations. *J Biol Chem*, 284: 8910-7.
183. Nezu A, Tanimura A, Morita T, Shitara A, Tojyo Y. (2006) A novel fluorescent method employing the FRET-based biosensor "LIBRA" for the identification of ligands of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 1274-80.

184. Nezu A, Tanimura A, Morita T, Tojyo Y. (2010) Visualization of Ins(1,4,5)P₃ dynamics in living cells: two distinct pathways for Ins(1,4,5)P₃ generation following mechanical stimulation of HSY-EA1 cells. *J Cell Sci*, 123: 2292-8.
185. Tanimura A, Nezu A, Morita T, Turner RJ, Tojyo Y. (2004) Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-trisphosphate in single living cells. *J Biol Chem*, 279: 38095-8.
186. Gulyas G, Toth JT, Toth DJ, Kurucz I, Hunyady L, Balla T, Varnai P. (2015) Measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate in living cells using an improved set of resonance energy transfer-based biosensors. *PLoS One*, 10: e0125601.
187. Sato M, Ueda Y, Takagi T, Umezawa Y. (2003) Production of PtdInsP₃ at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*, 5: 1016-22.
188. Ananthanarayanan B, Ni Q, Zhang J. (2005) Signal propagation from membrane messengers to nuclear effectors revealed by reporters of phosphoinositide dynamics and Akt activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15081-6.
189. Gyori D, Csete D, Benko S, Kulkarni S, Mandl P, Dobo-Nagy C, Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins PT, Mocsai A. (2014) The phosphoinositide 3-kinase isoform PI3K β regulates osteoclast-mediated bone resorption in humans and mice. *Arthritis Rheumatol*, 66: 2210-21.
190. 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.
191. 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.
192. Nakamura Y, Kanemaru K, Kojima R, Hashimoto Y, Marunouchi T, Oka N, Ogura T, Tanonaka K, Fukami K. (2014) Simultaneous loss of phospholipase C δ 1 and phospholipase C δ 3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. *Cell Death Dis*, 5: e1215.

193. Arcaro A, Wymann MP. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, 296 (Pt 2): 297-301.
194. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, 269: 5241-8.
195. Macias-Perez IM, Flinn IW. (2013) GS-1101: a delta-specific PI3K inhibitor in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 8: 22-7.
196. Boura E, Nencka R. (2015) Phosphatidylinositol 4-kinases: Function, structure, and inhibition. *Exp Cell Res*, 337: 136-45.
197. Dejmek M, Sala M, Hrebabecky H, Dracinsky M, Prochazkova E, Chalupska D, Klima M, Plackova P, Hajek M, Andrei G, Naesens L, Leyssen P, Neyts J, Balzarini J, Boura E, Nencka R. (2015) Norbornane-based nucleoside and nucleotide analogues locked in North conformation. *Bioorg Med Chem*, 23: 184-91.
198. Balla A, Tuymetova G, Toth B, Szentpetery Z, Zhao X, Knight ZA, Shokat K, Steinbach PJ, Balla T. (2008) Design of drug-resistant alleles of type-III phosphatidylinositol 4-kinases using mutagenesis and molecular modeling. *Biochemistry*, 47: 1599-607.
199. Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, Loewith R, Stokoe D, Balla A, Toth B, Balla T, Weiss WA, Williams RL, Shokat KM. (2006) A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*, 125: 733-47.
200. Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. (2011) Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliiovirus activity. *J Virol*, 85: 2364-72.
201. Leivers AL, Tallant M, Shotwell JB, Dickerson S, Leivers MR, McDonald OB, Gobel J, Creech KL, Strum SL, Mathis A, Rogers S, Moore CB, Botyanszki J. (2014) Discovery of selective small molecule type III phosphatidylinositol 4-kinase alpha (PI4KIIIalpha) inhibitors as anti hepatitis C (HCV) agents. *J Med Chem*, 57: 2091-106.
202. Cai X, Xu Y, Cheung AK, Tomlinson RC, Alcazar-Roman A, Murphy L, Billich A, Zhang B, Feng Y, Klumpp M, Rondeau JM, Fazal AN, Wilson CJ, Myer V, Joberty G, Bouwmeester T, Labow MA, Finan PM, Porter JA, Ploegh HL, Baird D, De Camilli

- P, Tallarico JA, Huang Q. (2013) PIKfyve, a class III PI kinase, is the target of the small molecular IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling. *Chem Biol*, 20: 912-21.
203. Mak LH, Vilar R, Woscholski R. (2010) Characterisation of the PTEN inhibitor VO-OHpic. *J Chem Biol*, 3: 157-63.
204. Pirruccello M, Nandez R, Idevall-Hagren O, Alcazar-Roman A, Abriola L, Berwick SA, Lucast L, Morel D, De Camilli P. (2014) Identification of inhibitors of inositol 5-phosphatases through multiple screening strategies. *ACS Chem Biol*, 9: 1359-68.
205. Blunt MD, Ward SG. (2012) Targeting PI3K isoforms and SHIP in the immune system: new therapeutics for inflammation and leukemia. *Curr Opin Pharmacol*, 12: 444-51.
206. Huang W, Barrett M, Hajicek N, Hicks S, Harden TK, Sondek J, Zhang Q. (2013) Small molecule inhibitors of phospholipase C from a novel high-throughput screen. *J Biol Chem*, 288: 5840-8.
207. Schultz C. (2003) Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorg Med Chem*, 11: 885-98.
208. Laketa V, Zarbakhsh S, Morbier E, Subramanian D, Dinkel C, Brumbaugh J, Zimmermann P, Pepperkok R, Schultz C. (2009) Membrane-permeant phosphoinositide derivatives as modulators of growth factor signaling and neurite outgrowth. *Chem Biol*, 16: 1190-6.
209. Laketa V, Zarbakhsh S, Traynor-Kaplan A, Macnamara A, Subramanian D, Putyrski M, Mueller R, Nadler A, Mentel M, Saez-Rodriguez J, Pepperkok R, Schultz C. (2014) PIP(3) induces the recycling of receptor tyrosine kinases. *Sci Signal*, 7: ra5.
210. Reversi A, Loeser E, Subramanian D, Schultz C, De Renzis S. (2014) Plasma membrane phosphoinositide balance regulates cell shape during *Drosophila* embryo morphogenesis. *J Cell Biol*, 205: 395-408.
211. Mentel M, Laketa V, Subramanian D, Gillandt H, Schultz C. (2011) Photoactivatable and cell-membrane-permeable phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50: 3811-4.

212. 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.
213. Suh BC, Inoue T, Meyer T, Hille B. (2006) Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science*, 314: 1454-7.
214. 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.
215. DeRose R, Miyamoto T, Inoue T. (2013) Manipulating signaling at will: chemically-inducible dimerization (CID) techniques resolve problems in cell biology. *Pflugers Arch*, 465: 409-17.
216. Komatsu T, Kukelyansky I, McCaffery JM, Ueno T, Varela LC, Inoue T. (2010) Organelle-specific, rapid induction of molecular activities and membrane tethering. *Nat Methods*, 7: 206-8.
217. Inoue T, Meyer T. (2008) Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration. *PLoS One*, 3: e3068.
218. Ueno T, Falkenburger BH, Pohlmeier C, Inoue T. (2011) Triggering actin comets versus membrane ruffles: distinctive effects of phosphoinositides on actin reorganization. *Sci Signal*, 4: ra87.
219. Liang FS, Ho WQ, Crabtree GR. (2011) Engineering the ABA plant stress pathway for regulation of induced proximity. *Sci Signal*, 4: rs2.
220. Miyamoto T, DeRose R, Suarez A, Ueno T, Chen M, Sun TP, Wolfgang MJ, Mukherjee C, Meyers DJ, Inoue T. (2012) Rapid and orthogonal logic gating with a gibberellin-induced dimerization system. *Nat Chem Biol*, 8: 465-70.
221. Lin YC, Nihongaki Y, Liu TY, Razavi S, Sato M, Inoue T. (2013) Rapidly reversible manipulation of molecular activity with dual chemical dimerizers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52: 6450-4.
222. Inoue T, Heo WD, Grimley JS, Wandless TJ, Meyer T. (2005) An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat Methods*, 2: 415-8.

223. Phua SC, Pohlmeier C, Inoue T. (2012) Rapidly relocating molecules between organelles to manipulate small GTPase activity. *ACS Chem Biol*, 7: 1950-5.
224. Karginov AV, Zou Y, Shirvanyants D, Kota P, Dokholyan NV, Young DD, Hahn KM, Deiters A. (2011) Light regulation of protein dimerization and kinase activity in living cells using photocaged rapamycin and engineered FKBP. *J Am Chem Soc*, 133: 420-3.
225. Umeda N, Ueno T, Pohlmeier C, Nagano T, Inoue T. (2011) A photocleavable rapamycin conjugate for spatiotemporal control of small GTPase activity. *J Am Chem Soc*, 133: 12-4.
226. Coutinho-Budd JC, Snider SB, Fitzpatrick BJ, Rittiner JE, Zylka MJ. (2013) Biological constraints limit the use of rapamycin-inducible FKBP12-Inp54p for depleting PIP2 in dorsal root ganglia neurons. *J Negat Results Biomed*, 12: 13.
227. Toettcher JE, Gong D, Lim WA, Weiner OD. (2011) Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics. *Nat Methods*, 8: 837-9.
228. Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. (2010) Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 7: 973-5.
229. 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.
230. Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N, De Camilli P. (2013) PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell*, 153: 1494-509.
231. Ohno H, Kato S, Naito Y, Kunitomo H, Tomioka M, Iino Y. (2014) Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science*, 345: 313-7.
232. Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y. (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature*, 435: 1239-43.
233. Hossain MI, Iwasaki H, Okochi Y, Chahine M, Higashijima S, Nagayama K, Okamura Y. (2008) Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish voltage-sensing phosphatases. *J Biol Chem*, 283: 18248-59.

234. Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T, Okamura Y. (2012) 3' Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PI(3,4)P₂] by voltage-sensing phosphatase (VSP). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 10089-94.
235. Yudin Y, Lukacs V, Cao C, Rohacs T. (2011) Decrease in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels mediates desensitization of the cold sensor TRPM8 channels. *J Physiol*, 589: 6007-27.
236. Lacroix J, Halaszovich CR, Schreiber DN, Leitner MG, Bezanilla F, Oliver D, Villalba-Galea CA. (2011) Controlling the activity of a phosphatase and tensin homolog (PTEN) by membrane potential. *J Biol Chem*, 286: 17945-53.
237. 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.
238. Rodgers W. (2002) Making membranes green: construction and characterization of GFP-fusion proteins targeted to discrete plasma membrane domains. *Biotechniques*, 32: 1044-6, 8, 50-1.
239. Johnson CM, Chichili GR, Rodgers W. (2008) Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. *J Biol Chem*, 283: 29920-8.
240. 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.
241. Varnai P, Lin X, Lee SB, Tuymetova G, Bondeva T, Spat A, Rhee SG, Hajnoczky G, Balla T. (2002) Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130. *J Biol Chem*, 277: 27412-22.
242. van der Krogt GN, Ogink J, Ponsioen B, Jalink K. (2008) A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS One*, 3: e1916.
243. Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 10554-9.

244. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY. (2006) Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*, 13: 521-30.
245. Gyombolai P, Boros E, Hunyady L, Turu G. (2013) Differential beta-arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 372: 116-27.
246. Balla T, Baukal AJ, Guillemette G, Morgan RO, Catt KJ. (1986) Angiotensin-stimulated production of inositol trisphosphate isomers and rapid metabolism through inositol 4-monophosphate in adrenal glomerulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 9323-7.
247. Brecht DS, Mourey RJ, Snyder SH. (1989) A simple, sensitive, and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5-trisphosphate in biological tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 159: 976-82.
248. Yoshikawa F, Iwasaki H, Michikawa T, Furuichi T, Mikoshiba K. (1999) Cooperative formation of the ligand-binding site of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor by two separable domains. *J Biol Chem*, 274: 328-34.
249. Iwai M, Michikawa T, Bosanac I, Ikura M, Mikoshiba K. (2007) Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem*, 282: 12755-64.
250. Mikoshiba K. (2007) IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem*, 102: 1426-46.
251. Brombacher E, Urwyler S, Ragaz C, Weber SS, Kami K, Overduin M, Hilbi H. (2009) Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J Biol Chem*, 284: 4846-56.
252. 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.
253. Roy A, Levine TP. (2004) Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J Biol Chem*, 279: 44683-9.

254. Szalai B, Hoffmann P, Prokop S, Erdelyi L, Varnai P, Hunyady L. (2014) Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G Protein Coupled Receptor dimerization. *PLoS One*, 9: e109503.
255. Downing GJ, Kim S, Nakanishi S, Catt KJ, Balla T. (1996) Characterization of a soluble adrenal phosphatidylinositol 4-kinase reveals wortmannin sensitivity of type III phosphatidylinositol kinases. *Biochemistry*, 35: 3587-94.
256. Engelman DM. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438: 578-80.
257. Tan PK, Wang J, Littler PL, Wong KK, Sweetnam TA, Keefe W, Nash NR, Reding EC, Piu F, Brann MR, Schiffer HH. (2007) Monitoring interactions between receptor tyrosine kinases and their downstream effector proteins in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol*, 72: 1440-6.
258. Osherov N, Levitzki A. (1994) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem*, 225: 1047-53.
259. Wuttke A, Sagetorp J, Tengholm A. (2010) Distinct plasma-membrane PtdIns(4)P and PtdIns(4,5)P₂ dynamics in secretagogue-stimulated beta-cells. *J Cell Sci*, 123: 1492-502.
260. Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE. (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther*, 253: 688-97.
261. Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. (2005) Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol*, 126: 243-62.
262. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*, 266: 15771-81.
263. 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.

264. 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]P₂ availability. *FASEB J*, 20: 2399-401.
265. Tóth D. A foszfoinozítidek szerepének vizsgálata a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok endocitózisában [Doktori disszertáció]. Budapest: Semmelweis Egyetem; 2014.
266. Torrecilla I, Spragg EJ, Poulin B, McWilliams PJ, Mistry SC, Blaukat A, Tobin AB. (2007) Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *J Cell Biol*, 177: 127-37.
267. Traynor-Kaplan AE, Harris AL, Thompson BL, Taylor P, Sklar LA. (1988) An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature*, 334: 353-6.
268. Golebiewska U, Kay JG, Masters T, Grinstein S, Im W, Pastor RW, Scarlata S, McLaughlin S. (2011) Evidence for a fence that impedes the diffusion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate out of the forming phagosomes of macrophages. *Mol Biol Cell*, 22: 3498-507.
269. Varnai P, Balla T. (2008) Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods*, 46: 167-76.
270. Balla T, Varnai P. (2009) Visualization of cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-domains. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 24: Unit 24 4.
271. Liu SL, Sheng R, O'Connor MJ, Cui Y, Yoon Y, Kurilova S, Lee D, Cho W. (2014) Simultaneous in situ quantification of two cellular lipid pools using orthogonal fluorescent sensors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53: 14387-91.
272. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR. (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J*, 315 (Pt 3): 709-13.
273. Varnai P, Balla A, Hunyady L, Balla T. (2005) Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases Ca²⁺ via endogenous IP3R channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 7859-64.
274. Payraastre B, van Bergen en Henegouwen PM, Breton M, den Hartigh JC, Plantavid M, Verkleij AJ, Boonstra J. (1991) Phosphoinositide kinase, diacylglycerol

kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J Cell Biol*, 115: 121-8.

275. Cochet C, Filhol O, Payrastra B, Hunter T, Gill GN. (1991) Interaction between the epidermal growth factor receptor and phosphoinositide kinases. *J Biol Chem*, 266: 637-44.

276. Kauffmann-Zeh A, Klinger R, Endemann G, Waterfield MD, Wetzker R, Hsuan JJ. (1994) Regulation of human type II phosphatidylinositol kinase activity by epidermal growth factor-dependent phosphorylation and receptor association. *J Biol Chem*, 269: 31243-51.

277. Xu JX, Si M, Zhang HR, Chen XJ, Zhang XD, Wang C, Du XN, Zhang HL. (2014) Phosphoinositide kinases play key roles in norepinephrine- and angiotensin II-induced increase in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and modulation of cardiac function. *J Biol Chem*, 289: 6941-8.

278. 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.

279. Sorensen SD, Linseman DA, McEwen EL, Heacock AM, Fisher SK. (1999) Inhibition of beta(2)-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor endocytosis after depletion of phosphatidylinositol bisphosphate. *J Pharmacol Exp Ther*, 290: 603-10.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Toth JT, Gulyas G, Toth DJ, Balla A, Hammond G, Hunyady L, Balla T, Varnai P. (2016) BRET-monitoring of the dynamics changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta*. 1861(3):177-187. **IF**: 5.162

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

Egyéb közlemény:

Toth DJ, **Toth JT**, Gulyas G, Balla A, Balla T, Hunyady L, Varnai P. (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*, 125: 2185-97. **IF**: 5.877

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Prof. Várnai Péternek szeretnék köszönetet mondani, hogy diákkörös hallgatóként bevezetett a foszfinozotidok működésének világába, és sok türelemmel és odaadással egyengette az utamat doktoranduszként is. Hálával tartozom neki, hogy sosem volt zárva előttem irodájának az ajtaja, és nemcsak mint témavezetőmhöz fordulhattam hozzá az elmúlt években, hanem az élet más területein fellépő nehézségek leküzdésében is mellettem állt.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet igazgatójának Prof. Hunyady Lászlónak, hogy meghívott diákkörösnek, kutatói munkámat lehetővé tette és támogatta, valamint Ligeti Erzsébet professzorasszonynak, aki a Celluláris és molekuláris élettan program vezetőjeként figyelemmel kísérte és támogatta doktori tanulmányaimat.

Kiemelt köszönet illeti Dr. Tóth Dánielt, aki megtanított az igényes kísérlettervezés és értékelés fortélyaira. Köszönöm közvetlen munkatársamnak, Dr. Gulyás Gergőnek a barátságát, a mindennapi munka során az egymás kiegészítésének, az együtt gondolkodásnak az élményét és nem utolsósorban a munkámhoz való jelentős hozzájárulását.

Köszönöm Dr. Balla Andrásnak, hogy az évek során bármikor fordulhattam hozzá ügyes-bajos dolgaikkal. Hálás vagyok további munkatársaimnak, Dr. Gyombolai Pálnak, Dr. Szalai Bencének, Dr. Erdélyi Lászlónak, Dr. Tóth Andrásnak, Dr. Szakadati Gyöngyinek valamint Soltész-Katona Eszternek a segítőkészségükért, az előrevívő gondolatokért, és a jó hangulatért, amit a laborban teremtettek. Szeretnék köszönetet mondani Szabolcsi Katának, Oláh Ilonának, Halász Eszternek és Rácz Juditnak, akik asszisztensként mindig készségesen segítettek a munkámat a laborban. Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi munkatársának, hogy az itt folyó magas színvonalú szakmai munkával engem is folyamatos javulásra ösztönöztek.

Végül pedig szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak a határtalan türelemért és szeretetért amellyel körülvettek. Köszönöm, hogy mindig számíthatok rájuk, az Ő bátorító támogatásuk és segítségük nélkül sokkal nehezebben ment volna a kutatói munka. Anyukámnak, aki felnevelt és megadta mindazon alapokat, melyek az élethez, és a sikeres doktori munkához szükségesek. Nővéremnek, aki példát mutatott, és jobb teljesítményre sarkallt. Legfőképpen pedig feleségemnek szeretnék köszönetet mondani, mindenért.